

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 378**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2008 PCT/EP2008/003146**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2009 WO09036817**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2008 E 08735329 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2201105**

54 Título: **Uso del programa de diferenciación celular opuesta (PCDO) para el tratamiento de órganos degenerados en estado patológico**

30 Prioridad:

18.09.2007 DE 102007044487

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.10.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT LEIPZIG (100.0%)
Ritterstrasse 26
04109 Leipzig, DE**

72 Inventor/es:

**BUNIATIAN, GAYANE;
GEBHARDT, ROLF;
GLEITER, CHRISTOPH;
DANIELIAN, LUSINE y
PROKSCH, BARBARA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 587 378 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso del programa de diferenciación celular opuesta (PDCO) para el tratamiento de órganos degenerados en estado patológico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de órganos que son degenerativos y/o en estado patológico por miedo del uso de células, que están diferenciándose fenotípicamente de forma estable o están diferenciadas pero no necesariamente en última instancia predeterminadas con respecto al desarrollo de un órgano donante seleccionado de acuerdo con los principios del programa de diferenciación celular opuesta (PDCO) y, asimismo, al uso de células de este tipo para el tratamiento o para la producción de un fármaco para el tratamiento de los mismos. Adicionalmente, la presente invención se refiere a agentes farmacéuticos que comprenden células
10 adecuadas fenotípicamente estables. De acuerdo con la presente invención, las células que se diferencian están diferenciadas fenotípicamente de forma estable no comprenden células madre embrionarias humanas.

15 La mayoría de las enfermedades degenerativas generalizadas del mundo occidental están actualmente en el centro de atención para las terapias basadas en células (Slack JMW. Metaplasia and transdifferentiation: from pure biology to the clinic. Nature Rev. 2007; 8: 369 – 378). Estas enfermedades comprenden enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington etc.), enfermedades hepáticas crónicas (hepatitis, fibrosis y cirrosis), diabetes, enfermedades cardíacas, artritis y muchas otras. El concepto fundamental de estas terapias basadas en células es reemplazar las células que están dañadas y restringidas en que hayan perdido su capacidad de regeneración o ayudar a su sustitución por otros factores tróficos que se producen a partir de células transplantadas naturales o modificadas biotecnológicamente (Slack JMW. Metaplasia and transdifferentiation: from pure biology to the clinic, Nature Rev. 2007; 8: 369 – 378).
20

Estas se tratan como células adecuadas para su posible éxito terapéutico: células madre embrionarias, células madre adultas, transdiferenciación de las células (por ejemplo, células madre hematopoyéticas a las células de órganos correspondientes) y también el uso continuo o transitorio de células que estimulan la regeneración en órganos receptores mediante la producción de citocinas y factores de crecimiento (Slack JMW. Metaplasia and transdifferentiation: from pure biology to the clinic, Nature Rev. 2007; 8: 369 – 378).
25

Las primeras pruebas tanto experimentales como clínicas sino también en esta dirección han producido resultados decepcionantes (Jeffrey DR Failure of allogeneic bone marrow transplantation to arrest disease activity in multiple sclerosis. Mult. Scler. 2007; 10 de julio (publicación electrónica previa a la impresión)) y al mismo tiempo han mostrado deficiencias inherentes a este abordaje terapéutico.

30 El concepto de acuerdo con la invención del "programa de diferenciación celular opuesta" (PDCO) se extiende más allá de los abordajes terapéuticos mencionados anteriormente diseñados para el reemplazo celular y persigue una estrategia diferente.

Los procedimientos modernos en la terapia basada en células de los órganos crónicamente enfermos se basan en aplicaciones de:

- 35
1. células madre de diferentes orígenes con la propiedad de diferenciarse en las células del órgano enfermo y/o
 2. células, en particular células manipuladas genéticamente, que tienen propiedades (por ejemplo, la producción de factores tróficos), con las que se puede afectar de forma positiva a la regeneración del órgano enfermo.

40 Cada uno de estos procedimientos ha prometido un progreso radical con respecto a las posibilidades terapéuticas de los órganos crónicamente enfermos o ya lo ha logrado, pero al mismo tiempo ha supuesto una serie de desventajas significativas y sin resolver.

45 En el caso de la terapia de células madre, se utilizan células donantes pluripotenciales o multipotenciales (no diferenciadas) (células madre (CM) embrionarias o adultas, CM hematopoyéticas mesenquimales o epiteliales, células de médula ósea, células madre de tejido graso y piel o raíces del y otros órganos) (Wobus AM, Boheler KR. Embryonic Stem Cells: prospects for developmental biology and cell therapy. Physiol. Rev. 2005; 85: 635 – 678). Esta aplicación se basa en los hallazgos de que las células madre no diferenciadas tienen la propiedad de ser capaces de convertir en un número limitado de divisiones celulares en diferentes células diferenciadas de específicas de órganos. Ejemplos de esto son la conversión de las células madre en osteoblastos, condrocitos, adipocitos, células dendríticas presentadoras de antígeno. Sin embargo, también se trata la posibilidad de convertir células de órganos diferenciadas mediante medidas adecuadas, por ejemplo mediante transfección de genes para factores de transcripción, en otras células de órganos diferenciados (transdiferenciación; Slack JMW. Metaplasia and transdifferentiation: from pure biology to the clinic. Nature Rev. 2007; 8: 369 – 378). Sobre la base de su flexibilidad fenotípica (pluripotencia o multipotencia), se cree que las células madre podrían implantarse casi en todos los órganos con el fin de reemplazar a las células de órganos portadoras de la función. La aplicación de células madre o transdiferenciación implica, sin embargo los siguientes inconvenientes:
50

- 55
- propiedad tumorigénico (particularmente en el caso de las células madre embrionarias)
 - aumento del potencial de dediferenciación (con células madre adultas, generación de células madre tumorales)

- transformación en células extrañas al órgano en cultivo celular y después del trasplante
 - degeneración de las células o pérdida de potencias no dispensables y/o capacidad de regulación por el entorno de las mismas debido a la manipulación genética
 - cantidad limitada de células madre obtenidas
- 5
- Baja tasa de proliferación de las células madre adultas o ya casi diferenciadas
 - escrúpulos éticos (en el caso de las células madre embrionarias y fetales)

La estrategia anterior de la terapia basada en células de enfermedades degenerativas (crónicas) se basa en el uso de células madre u otras células con potencial terapéutico en la etapa avanzada de una enfermedad cuando la protección y regeneración espontánea o farmacológicamente inducibles de cuerpo intrínseco, células funcionales, falla. De este modo, el carácter crónico de la enfermedad significa que, en el contexto de órganos, prevalecen sistemas de regulación (patológica) que ejercen una compulsión ineludible para mantener la patología. La exposición continua de tejido neural y no neural con factores patógenos desencadena homeostasis específica de órganos y altera las vías tanto metabólicas como de transducción de señales, que permiten o controlan la compensación de los daños en el contexto saludable. Estas compulsiones impiden (bloquean) no solo la regeneración de cuerpo intrínseco sino también fuerzan a las células trasplantadas en el sentido patológico. Adicionalmente, el entorno patogénico puede acelerar la diferenciación y, por lo tanto, el envejecimiento y la pérdida de la función, resultante, de las células madre implantadas. Cuanto mayor sea la flexibilidad fenotípica de las células madre utilizadas, sucumbirán con mayor facilidad a la presión patológica, mayor será, es decir el peligro de una diferenciación defectuosa, una alteración neoplásica o la eliminación de estas células por muerte celular.

El objetivo de lograr un fenotipo estable, permanentemente funcional, de las células del donante que es resistente al medio ambiente degenerativo no se ha logrado hasta la fecha mediante el uso de células madre. Por tanto, el objeto de la presente invención es evitar las desventajas conocidas que resultan de la utilización de células modificadas genéticamente y también de células madre de diferentes orígenes en el caso de una terapia basada en células. Este objeto se consigue mediante los procedimientos, y también los agentes farmacéuticos, de acuerdo con las presentes reivindicaciones independientes. En las reivindicaciones dependientes se indican realizaciones ventajosas.

La solución a este objeto reside en la aplicación del concepto del programa de diferenciación celular opuesta (PDCO). El PDCO parte de dos premisas básicas que no se tienen en cuenta en todos los demás abordajes terapéuticos basados en células. Una premisa básica es la existencia de poblaciones de células (tipos de células) en diferentes órganos que tienen, potencialmente, con respecto a un conjunto específico de genes expresados o con respecto a un conjunto específico de propiedades fenotípicas, propiedades en contrarias (opuestas) o recíprocas y/o mecanismos de control, es preciso citar, a modo de ejemplo, por ejemplo, poblaciones de células que realizan una función indispensable en relación con el mantenimiento de la homeostasis del tejido, la transferencia de material entre compartimentos diferentes (ejemplos: sangre/tejido; aire/tejido), desintoxicación y regeneración - (abreviado como "CPG", células productoras de GFAP) (Danielyan L, Tolstonog G, Traub P, Salvetter J, Gleiter CH, Reisig D, Gebhardt R, Buniatian GH.4,6 Colocalization of glial fibrillary acidic protein, metallothionein, and MHC II in human, rat NOD/SCID, and nude mouse skin keratinocytes and fibroblasts. *J Invest Dermatol.* Mar. 2007; 127 (3): 555 – 63). La segunda premisa es el conocimiento de que estas células están presentes en diferentes órganos en diferentes estados de activación o estados de regulación que dominan el respectivo tipo de tejido, que generalmente, aunque no necesariamente, en el caso de la enfermedad, asumen un estado de activación exactamente opuesto (o estado de diferenciación) o estado de regulación con respecto a proteínas funcionales particularmente importantes y/o mecanismos de regulación (Buniatian G.H., H–J Hartmann, P. Traub, U. Weser, H. Wiesinger, R. Gebhardt (2001). Acquisition of blood–tissue barrier supporting features by hepatic stellate cells and astrocytes of myofibroblastic phenotype. Inverse dynamics of metallothionein and glial fibrillary acidic protein expression. *Neurochem. Int.* 38, 373 – 383; Buniatian G.H., Hartmann H.–J., Traub P., Wiesinger H., Albinus M., Nagel W., Shoeman R., Mecke D., Weser U. (2002). Glial Fibrillary Acidic Protein–Positive Cells of the Kidney are Capable of Raising a Protective Biochemical Barrier Similar to Astrocytes: Expression of Metallothionein in Podocytes. *Anat. Rec.* 267, 296 – 306). De una forma nueva y sorprendente, el concepto del PDCO ahora parte del hecho de que el trasplante de células orientado a la terapia de tejido enfermo es particularmente exitoso cuando se trasplantan representantes de una población de células, cuyo estado de activación natural o fenotipo en relación con los antígenos mencionados importantes (proteínas) o los mecanismos de regulación en el órgano del donante, es opuesto al fenotipo de las células "relacionadas" en el órgano receptor. Por lo tanto, es irrelevante si el, la población celular natural trasplantada tiene propiedades de células madre, sirvan como fuente de factores tróficos o tenga otras propiedades que estimulen la regeneración del órgano receptor. Subyacente al programa de diferenciación celular opuesto está el hecho de que hay células "relacionadas" en muchos órganos (si no todos), cuyo estado de diferenciación varía de tal manera que hay constelaciones de órganos en pares en los que este estado de diferenciación de las respectivas células relacionadas puede denominarse de contrario u opuesto. Células "relacionadas" en este contexto no significa necesariamente relacionadas en el sentido del mismo origen, sino que simplemente puede significar también que estas células tienen un conjunto limitado de los mismos genes expresados A, B, C, etc., de modo que estas células en el órgano pueden caracterizarse, por ejemplo, por la propiedad: "gen A altamente expresado, gen B con poca

expresión” y, en el otro por la propiedad “contraria”: “gen A con poca expresión, gen B altamente expresado”. Este gen está destinado a aclararse de nuevo con referencia a los dos ejemplos siguientes sin limitar la invención a ello:

5 A) En cada órgano, hay una población de células que realiza una función indispensable con respecto al mantenimiento de la homeostasis del tejido, la transferencia de material entre los diferentes compartimentos (ejemplos: sangre/tejido; aire/tejido), desintoxicación y regeneración (por ejemplo, células productoras de GFAP). Además de la proteína del filamento intermedio GFAP (proteína ácida fibrilar de la glía), estas células pueden producir al mismo tiempo otras proteínas del citoesqueleto, por ejemplo SMAA (alfa-actina de músculo liso), una proteína de los microfilamentos. El conocimiento de los últimos años ha demostrado que estas células están presentes en diversos órganos en diferentes estados de activación que dominan en el respectivo tipo de tejido. Por tanto, por ejemplo, los astrocitos en el cerebro normal se caracterizan por una alta expresión de SMAA y baja expresión de GFAP, mientras que las células estrelladas hepáticas (CEH) lo hacen por una alta expresión de GFAP y una baja expresión de SMAA. Este variado tipo de expresión génica se acopla con la situación de que los astrocitos normales están implicados en la construcción de la barrera hematoencefálica altamente impermeable, mientras que las CEH cooperan en el hígado en la construcción de una interfaz sangre-tejido hepático altamente permeable o determinarla. En el caso de enfermedad, este estado de expresión se invierte, respectivamente, y, por lo tanto, también la permeabilidad de la barrera hematoencefálica afectada y, además, también otras propiedades con respecto al mantenimiento de la homeostasis, la desintoxicación y la regeneración del tejido. Esto significa que, en la zona de cerebro degenerada, los astrocitos reducen la alta expresión de SMAA y aumentan la expresión de GFAP, mientras que las CEH en el hígado reducen la expresión de GFAP y aumentan la de SMAA. La caracterización de las células con un fenotipo que es opuesto en el estado normal no está limitada al ejemplo de las proteínas GFAP y SMAA. Las propiedades terapéuticas de las CPG pueden estar indicadas por otros patrones de expresión, así como, por ejemplo, por la expresión de la glutamina sintetasa, la metalotioneína o las moléculas del MHC de clase II, y determinar el fenotipo opuesto. En este caso, las reacciones de desintoxicación están en la vanguardia de la función del tejido.

25 B) El segundo ejemplo coloca el aspecto regulado más a la vanguardia. En muchos tejidos adultos (si no en todos), el dualismo de la transducción de señal hedgehog y Wnt / β -catenina es de particular importancia en el subestructuración de tejidos: una parte de las células sufre más la influencia de la proteína hedgehog y otra más la de Wnt/ β -catenina. Un ejemplo de esto puede ser el intestino, en cuyas criptas predomina la influencia Wnt/ β -catenina, mientras que la influencia de hedgehog es dominante en la punta de las vellosidades. Tal dualismo se aplica incluso al hígado. Sin el antagonismo constante de estas rutas de señal opuestas, proporcionando un cierto equilibrio metabólico específico de tejido, el tejido degenera en varios tipos de patología, incluyendo la formación de tumores. Por el contrario, en el caso de una patología, la influencia de una de estas vías de señal se extiende a costa de la otra y, por lo tanto, de manera muy similar al ejemplo de las CPG citadas anteriormente, se induce un fenotipo opuesto o recíproco de las células, pero que es sustancialmente más inestable que el respectivamente natural.

Por tanto, el PDCO permite y/o presupone la identificación de células adecuadas que están cualificadas, en particular para el trasplante: Lo primero que se determina es qué tipo de célula se daña o cambia predominantemente en un órgano patológico o que desempeña el papel más importante originalmente para la patología. Se puede suponer que el fenotipo patológico, con respecto a las propiedades esenciales, se comporta opuesto a su fenotipo normal. Por supuesto, esto no se aplica a nivel general, es decir, con respecto a todo el proteoma de estas células, pero solo con respecto a las propiedades esenciales en el sentido explicado anteriormente. En una segunda etapa, se identifica un órgano que contiene el tipo de célula "relacionada" que corresponde al fenotipo patológico con respecto a las propiedades esenciales y, si es necesario, muestra el patrón de diferenciación opuesto al tipo de célula normal del órgano patológico. La célula donante en diferenciación o diferenciada (con características de diferenciación opuestas) debe proceder del órgano donante sano con funciones fisiológicas opuestas y características de las interfaces de tejidos de sangre-tejido, por ejemplo el hígado y el cerebro. Debido a la experiencia y la memoria (Ghazarian A, Garner WL, Ehrlich HP. Memory of past exposure to the chemokine IL-8 inhibits the contraction of fibroblast-populated collagen lattices. *Exp Mol Pathol*. Dic 2000;69(3):242-7; Huang C, Kim Y, Caramori ML, Moore JH, Rich SS, Mychaleckyj JC, Walker PC, Mauer M. Diabetic nephropathy is associated with gene expression levels of oxidative phosphorylation and related pathways. *Diabetes*. Jun 2006;55(6):1826-31.) que gana la célula donante durante el ciclo de vida en un órgano donante después del trasplante de este tipo de célula, puede encajar mejor en su ambiente patológico y, también, aguantar mejor la presión patogenética del mismo. En consecuencia, la regeneración se puede introducir de manera más eficaz por este tipo de células. En el presente documento no es importante si este tipo de célula tiene propiedades específicas de células madre multipotenciales (por ejemplo, la propiedad de transformarse en tipos de células relacionadas del órgano receptor) o simplemente tiene propiedades e influencias estimulantes de la regeneración, por ejemplo, expresión de factores tróficos.

En el caso de las CPG se produce la siguiente situación, por ejemplo:

60 en el cerebro degenerado y en el caso del envejecimiento normal en la estructura de la célula, los astrocitos que ejercen un fuerte efecto protector en el cerebro con relación a los agentes nocivos de los tipos más variados pierden su fenotipo contráctil activado y alcanzan cada vez más el fenotipo dilatado con reducción de la funcionalidad. Esta situación patológica en el cerebro se mejora mediante el suministro de células estrelladas

hepáticas (CEH) activadas en diferenciación o diferenciadas a partir de células hepáticas o mesangiales (CM) del riñón.

5 Por ejemplo, las CEH y las CM están programados para asumir el fenotipo activado y contráctil y, en el curso de su diferenciación, para intensificar este fenotipo de forma creciente (es decir, las propiedades de los astrocitos
 10 funcionales). Como resultado de una diversidad de factores protectores producidos por CEH y CM activadas en diferenciación o diferenciadas de forma fenotípicamente estable (eritropoyetina y/o BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) y/o metalotioneínas y/o glutamina sintetasa y/o NGF (factor de crecimiento neural) y/o colágeno de tipo 1 y/o GPR 49 (receptor 49 acoplado a la proteína G) y/u otras), estas células pueden mejorar la homeostasis dañada y la supervivencia, así como la funcionalidad de las células del órgano receptor (en este caso
 15 del cerebro). Adicionalmente, las CEH/CM, de forma similar a las células madre en condiciones de cultivo, pueden conseguir las propiedades de las neuronas (formación de sinapsis, producción de marcadores específicos de neuronas, neurotransmisores y enzimas que están implicados en la formación de neurotransmisores). Par esta razón, las CEH/CM (aparte de su función de mejora de la homeostasis y protectora sobre las neuronas y los astrocitos) pueden sustituir a las funciones de las neuronas perdidas y degeneradas, en el caso de su implantación en el cerebro degenerado. En la tabla 1 se muestra, simplemente a modo de ejemplo, la cantidad de expresión de factores seleccionados en función de los estados de diferenciación de los respectivos tipos celulares.

20 Dada la mutualidad anatómica y funcional ("afinidad") de los astrocitos, las células estrelladas hepáticas (CEH) y las células mesangiales (CM) que pertenecen a las células perivasculares positivas para GFAP del cerebro, el hígado y el riñón, estas últimas tienen mecanismos protectores similares contra las señales transmitidas por sangre. Las principales características de las enfermedades degenerativas del cerebro son la pérdida de neuronas y los cambios profundos en la homeostasis específica del cerebro, estando esto último regulado por los astrocitos. Una característica de la terapia basada en las CEH y las CM para la terapia basada en células de las enfermedades neurodegenerativas es que estas CP-GFAP no neurales están programadas de forma natural para adquirir y aumentar en el transcurso de su diferenciación (activación), las propiedades características de los astrocitos jóvenes (función anticitotóxica), las CM neuronales (producción de nestina) y las neuronas (β -tubulina de clase III, neuromediadores, factores neurotróficos). Proliferan rápidamente *in vitro* e *in vivo*, y, debido a su fenotipo diferenciado, se mantienen de forma estable en el tejido enfermo del órgano receptor. El programa de procedimiento exactamente opuesto de la diferenciación de astrocitos y CEH/CM permite el uso de CEH/CM en diferenciación fenotípicamente estable o diferenciadas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

30 Las CEH diferenciación fenotípicamente estable o diferenciadas que se usan para la terapia basada en células de enfermedades neurodegenerativas producen EPO (eritropoyetina), GS (glutamina sintetasa) y MT (metalotioneína). Su citoesqueleto está soportado por nestina, beta-tubulina, desmina y SMAA. En el caso de estas células, la GFAP, que se expresa perinuclearmente o nuclearmente (pero no en las protrusiones), puede estar presente en pequeñas cantidades.

35 Por lo tanto, las CEH y/o las CM se pueden utilizar para terapia basada en células en una serie de enfermedades neurodegenerativas, tal como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, ictus y otras enfermedades caracterizadas por la pérdida en número y funcionalidad de las neuronas y la distorsión de la homeostasis específica del cerebro.

40 En el caso de las CEH y/o CM (u otro tipo de célula con un programa de diferenciación similar), las células se suministran las células al cerebro enfermo por medio de implantación, administración intravenosa u otros tipos de aplicación. De este modo, la implantación de CEH se puede implementar incluso con pacientes con etapas avanzadas de las enfermedades mencionadas anteriormente. Se pretende la implantación de las CEH y/o las CM:

- 1) para mejorar de forma permanente la homeostasis específica del cerebro en el tejido dañado por su pronunciada función desintoxicante (producción de glutamina sintetasa, eritropoyetina, metalotioneína)
- 45 2) para aumentar la tasa de supervivencia de las neuronas intrínsecas receptoras y también su regeneración (por ejemplo, regeneración axonal).
- 3) para mejorar la neurotransmisión mediante la transformación de CEH/CM en las células de tipo neuronal que puede producir proteínas funcionales (por ejemplo, acetilcolina, tirosina hidroxilasa)
- 50 4) para mejorar la funcionalidad de las células en el órgano receptor (la presencia de CEH/CM induce la producción de acetilcolina, tirosina hidroxilasa en astrocitos/neuronas)
- 5) para aumentar el número de neuronas de acuerdo con 2), 3), 4).

55 En el estado diferenciado y activado, las CEH no expresan proteínas de MHC de clase II y, en consecuencia, tienen una función de presentación de antígenos muy débil o escasamente presente. Por lo tanto, en el caso de implantación de CEH, se eliminan o se reducen los problemas de la reacción de rechazo, que están presentes con las células madre, y la escasa tasa de supervivencia de los implantes. La degeneración del hígado se caracteriza por pérdida de hepatocitos, por lo tanto, la función disminuida de la detoxificación realizada por los hepatocitos y los cambios profundos en la homeostasis específica del hígado, controlada por las CEH quiescentes y la modificación

- estructural de los sinusoides hepáticos realizada por las CEH activadas. Las CEH quiescentes producen una expresión elevada de GFAP, una proteína del filamento intermedio que apoya la producción de enzimas de degradación de la matriz extracelular que soportan el intercambio sangre-hígado facilitado a través de la fenestración en los capilares hepáticos. Las CEH quiescentes que almacenan vitamina A producen el complejo de antígenos de MHC de clase II importante para la presentación de antígenos a los linfocitos de retorno. Asimismo, esta función se realiza mediante fenestraciones hepáticas cuyo tamaño está controlado por las CEH quiescentes. La fibrosis hepática se caracteriza por la activación de CEH manifestada por pérdida de GFAP, disminución de la digestión de las proteínas de la MEC y desarrollo de un continuo de tipo vascular adecuado para los capilares cerebrales.
- 5 POr el contrario, la maduración y diferenciación de los astrocitos da lugar a la acumulación de grandes cantidades de GFAP, MHC-II y metaloproteinasas aparte de la adquisición de rasgos característicos de CEH no diferenciadas en hígado y riñón sano, y células similares en otros órganos no neurales. Este conjunto de antígenos se ha demostrado durante enfermedades neurodegenerativas (Markowitz CE. Interferon-beta: mechanism of action and dosing issues. *Neurology*. 12 jun 2007;68(24 Supl 4):S8-11.), la aparición frecuente de hoyos y lagunas en las
- 10 15 pareces de los vasos en la enfermedad de Alzheimer (Scheibel AB, Duong T. On the possible relationship of cortical microvascular pathology to blood brain barrier changes in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. Ene-Feb 1988;9(1):41-2.) demuestran la universalidad de mecanismos que proporcionan la interacción sangre-tejido facilitada y la capacidad de las células perivasculares enriquecidas con GFAP para soportar la abertura de avenidas paracelulares. La diferenciación de los astrocitos termina en el cerebro adulto o se puede conseguir en cultivo de
- 20 células neurales. De acuerdo con la invención, los astrocitos en diferenciación y diferenciados fenotípicamente estables se pueden usar para el tratamiento de órganos no neurales que están sufriendo fibrosis u otra enfermedad causada sustancialmente por el trastorno. Entre los ejemplos de esto se encuentran cirrosis del hígado y fibrosis de los riñones.
- 25 Los astrocitos diferenciados (u otro tipo de célula con un programa de diferenciación similar) son suministrados al órgano no neural (por ejemplo, al hígado en el caso de la fibrosis hepática, cirrosis hepática). También es posible el uso de astrocitos en diferenciación fenotípicamente estables.
- En contraste con la terapia génica y con células madre, las terapias basadas en CEH/CM de enfermedades neurodegenerativas y las terapias basadas en células de la glía de enfermedades fibrosantes de órganos no
- 30 neurales (hígado, riñón) ofrecen una serie de ventajas.
- 1) Estabilidad fenotípica de las células transplantadas y su resistencia a estados patológicos que prevalecen en el órgano receptor. Las CEH/CM diferenciadas, tras la implantación en el cerebro, pueden transdiferenciarse, preferentemente, en un tipo de célula similar a la neurona y a la glía, y, por tanto, permanecen fenotípicamente estables en contraste con las células madre. Esto ofrece una ventaja crucial durante la implantación en el medio
 - 35 enfermo. Las células transplantadas a) no tomarán el fenotipo de las células degeneradas; y b) como resultado de su programación natural y la función altamente detoxificante, no solo sobrevivirán en las condiciones tóxicas sino que también mejorarán la homeostasis.
 - 2) Prescindiendo de escrúpulos éticos (en contraste con las células madre embrionarias) y la baja complejidad del procedimiento de aislamiento). Por ejemplo, se pueden obtener CEH/CM de hígado o riñón intrínseco del receptor (autólogo) en cantidades mayores que con las células madre adultas y se pueden multiplicar en el cultivo celular mediante inducción de la proliferación. Otra posibilidad es prepararlas a partir de células madre mesenquimales derivadas de sangre, es decir inducir la transformación de las células madre mesenquimales en CEH y CM.
 - 40 3) La cantidad de células que se van a transplantar no está limitada (por su elevada capacidad de proliferación y la posibilidad de obtener estas células de un órgano donante).
 - 4) Muy buena tasa de supervivencia de las células CEH/CM implantadas en el tejido receptor debido a su hipoinmunogenicidad. Tienen una función presentadora de antígeno débilmente pronunciada (al menos en condiciones de cultivo celular), ya que apenas expresan proteínas de MHC de clase II.
- En resumen, las células positivas para GFAP perivasculares en diferenciación o diferenciadas de forma estable de
- 50 (CEH, CM y astrocitos) respectivamente, pueden ofrecer una mayor tasa de supervivencia del implante en el órgano receptor, mejora de la homeostasis, estabilidad fenotípica en el órgano receptor y obtención y manipulación simples de estas células antes de la implantación.
- Además, como ejemplo adicional de la aplicación del PDCO, se puede mencionar la sustitución mutua de los podocitos glomerulares y los queratinocitos de la piel.
- 55 La aplicación de las células en diferenciación o diferenciadas de forma fenotípicamente estable se efectúa de la manera conocida. Por ejemplo, se pueden administrar o implantar por vía intravenosa o implantar, intratecal (medular), intracraneal, intracerebroventricular, intraperitoneal, intramuscular y/o subcutánea.

Las cantidades de aplicación son, ventajosamente, 5×10^3 to 1×10^{10} células. De este modo, la cantidad puede depender de: 1) el estadio de la enfermedad; 2) la edad del paciente; 3) el tipo de enfermedad; 3) la vía de aplicación (i.v., i.p., etc.); 4) la duración de la aplicación (crónica, una o varias veces); 5) las enfermedades anteriores y/o concomitantes.

- 5 Las tasas de aplicación son, ventajosamente, aplicación única, infusión con diferentes velocidades y duración de la infusión, aplicación múltiple o crónica.

10 La presente invención reivindica adicionalmente el uso de células diferenciadas o en diferenciación de forma fenotípicamente estable como células donantes (primeras células) para la producción de un fármaco para el tratamiento de un segundo órgano de un organismo, en el que el órgano ha degenerado y/o está en estado patológico, con segundas células que están degeneradas y/o en el estado patológico, que se usan como células donantes, las células de un primer órgano que es diferente del segundo órgano con respecto al tipo de órgano, que, en estado fisiológico normal con respecto a una conjunto predeterminado de genes expresados y/o propiedades fenotípicas, tienen propiedades opuestas a las segundas células en el estado fisiológico normal.

15 Dicho uso puede estar caracterizado adicionalmente porque las segundas células en el estado degenerado y/o patológico, en comparación con su estado fisiológico normal, tienen propiedades opuestas con respecto al conjunto predeterminado de genes expresados y/o propiedades fenotípicas.

Dicho uso puede estar además caracterizado porque las células donantes en su estado fisiológico normal con respecto al conjunto predeterminado de genes expresados y/o propiedades fenotípicas son equivalentes a las células que están degeneradas y/o en estado patológico y/o tienen las mismas propiedades.

20 Dicho uso puede estar caracterizado adicionalmente porque las células donantes en comparación con las segundas células con respecto al conjunto predeterminado de genes expresados y/o propiedades fenotípicas tienen un programa de diferenciación celular opuesta con respecto al estado fisiológico normal en un estado degenerado y/o patológico.

25 La presente invención reivindica adicionalmente el uso de o células diferenciadas o en diferenciación de forma fenotípicamente estable de un primer tipo celular específico de un organismo para la producción de un fármaco para la protección y/o regeneración de las células, que están degeneradas y/o en estado patológico, de un segundo tipo de célula específico de un organismo, las células del primer tipo de células, en el estado fisiológico normal con respecto a un conjunto predeterminado de genes expresados y/o propiedades fenotípicas, que tienen propiedades opuestas a las de las células del segundo tipo de célula en el estado fisiológico normal.

30 La presente invención reivindica adicionalmente el uso de o células diferenciadas o en diferenciación de forma fenotípicamente estable de un primer tipo celular específico de un organismo para la protección y/o regeneración de las células, que están degeneradas y/o en estado patológico, de un segundo tipo de célula específico de un organismo, las células del primer tipo de células, en el estado fisiológico normal con respecto a un conjunto predeterminado de genes expresados y/o propiedades fenotípicas, que tienen propiedades opuestas a las de las células del segundo tipo de célula en el estado fisiológico normal.

35 Los usos mencionados anteriormente pueden además estar caracterizados porque las células diferenciadas o en diferenciación de forma fenotípicamente estable están en un estado fisiológico normal.

40 Los usos mencionados anteriormente pueden además estar caracterizados porque las células del segundo tipo de células, en el estado degenerado y/o patológico, tienen propiedades opuestas con respecto a un conjunto predeterminado de genes expresados y/o propiedades fenotípicas relativas a su estado fisiológico normal.

Los usos mencionados anteriormente pueden estar además caracterizados, además, porque las células del primer tipo de célula, en el estado fisiológico normal con respecto a un conjunto predeterminado de genes expresados y/o propiedades fenotípicas, son equivalentes a las células del segundo tipo de célula que están degeneradas y/o en estado patológico y/o tienen las mismas propiedades.

45 Los usos mencionados anteriormente pueden estar además caracterizados, además, porque las células del primer tipo de célula, en el estado fisiológico normal tienen estados de activación, regulación y/o diferenciación contrarios y/u opuestos con respecto a un conjunto predeterminado de genes expresados y/o propiedades fenotípicas con respecto a las células del segundo tipo de célula que están degeneradas y/o en estado patológico.

50 Los usos mencionados anteriormente pueden estar además caracterizados, además, porque, con respecto a un conjunto predeterminado de genes expresados y/o propiedades fenotípicas, el grado de activación, regulación y/o diferenciación de las células del primer tipo de célula en estado fisiológico normal es puesto al grado de activación, regulación y/o diferenciación de las células del segundo tipo de célula que están degeneradas y/o en estado patológico.

55 Los usos mencionados anteriormente pueden además estar caracterizados porque las segundas células y las células donantes o ambas, el primer tipo celular y el segundo tipo celular, en sus órganos respectivos, tienen

funciones de homeostasis del tejido del órgano, transferencia de material entre diferentes compartimentos del órgano, detoxificación del órgano y/o regeneración del órgano.

5 Los usos mencionados anteriormente pueden además estar caracterizados porque los genes expresados y/o las propiedades fenotípicas del conjunto predeterminado cumplen las funciones dentro del alcance de la homeostasis del tejido del órgano, la transferencia de material entre diferentes compartimentos del órgano, la detoxificación del órgano y/o la regeneración del órgano.

Los usos mencionados anteriormente pueden además estar caracterizados porque al menos una o más funciones predeterminadas y/o propiedades de las células del órgano, que está degenerado y/o en estado patológico, o de las células del segundo tipo se reduce y/o se ha perdido.

10 Los usos mencionados pueden además estar caracterizados porque el organismo es un vertebrado y/o mamífero.

Los usos mencionados pueden además estar caracterizados porque el organismo es un ser humano.

Los usos mencionados anteriormente pueden además estar caracterizados porque las células donantes o células del primer tipo de célula producen factores protectores como propiedades y/o funciones de las células predeterminadas.

15 Los usos mencionados anteriormente pueden además estar caracterizados porque las células donantes o células del primer tipo de célula producen uno o más factores que son específicos de las segundas células o células del segundo tipo y estimulan el crecimiento y/o la regeneración, no estando dichos factores producidos o estándolo de forma insuficiente por las segundas células o células del segundo tipo de célula.

20 Los usos mencionados anteriormente pueden además estar caracterizados porque las células positivas para GFAP, en particular las células positivas para GFAP perivasculares, se usan/aplican.

Los usos mencionados anteriormente pueden además estar caracterizados porque las células usadas/aplicadas producen eritropoyetina y/o BDNF y/o metalotioneína y/o glutamina sintetasa y/o NGF y/o colágeno de tipo 1 y/o GPR 49 y/u otros factores protectores.

25 Los usos mencionados anteriormente pueden además estar caracterizados porque se usan/aplican células de la glía.

Los usos mencionados anteriormente pueden además usarse para el tratamiento de enfermedades fibrosantes de un órgano no neural, usándose/aplicándose astrocitos o células que tienen un programa de diferenciación similar diferenciadas o en diferenciación de forma fenotípicamente estable.

30 Los usos mencionados anteriormente pueden además usarse para el tratamiento de la cirrosis hepática usándose/aplicándose astrocitos o células que tienen un programa de diferenciación similar diferenciadas o en diferenciación de forma fenotípicamente estable.

Los usos mencionados anteriormente pueden además usarse para el tratamiento de la fibrosis renal, usándose/aplicándose astrocitos o células que tienen un programa de diferenciación similar diferenciadas o en diferenciación de forma fenotípicamente estable.

35 Los usos mencionados anteriormente pueden además usarse para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, usándose/aplicándose células estrelladas hepáticas y/o células mesangiales o células que tienen un programa de diferenciación similar diferenciadas o en diferenciación de forma fenotípicamente estable.

40 Los usos mencionados anteriormente pueden además usarse para el tratamiento de enfermedades que se caracterizan por una pérdida de neuronas y/o su funcionalidad y/o un trastorno de la homeostasis específica de órgano, usándose/aplicándose células estrelladas hepáticas, células mesangiales, células estrelladas del páncreas, células dendríticas del bazo y/o fibroblastos de la piel en diferenciación o diferenciadas de forma fenotípicamente estable.

45 Los usos mencionados anteriormente pueden además usarse para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, usándose/aplicándose células estrelladas hepáticas, células mesangiales, células estrelladas del páncreas, células dendríticas del bazo y/o fibroblastos de la piel en diferenciación o diferenciadas.

Los usos mencionados anteriormente pueden además usarse para el tratamiento de la esclerosis múltiple, usándose/aplicándose células estrelladas hepáticas, células mesangiales, células estrelladas del páncreas, células dendríticas del bazo y/o fibroblastos de la piel en diferenciación o diferenciadas de forma fenotípicamente estable.

50 Los usos mencionados anteriormente pueden además usarse para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, usándose/aplicándose células estrelladas hepáticas, células mesangiales, células estrelladas del páncreas, células dendríticas del bazo y/o fibroblastos de la piel en diferenciación o diferenciadas.

Los usos mencionados anteriormente pueden además usarse para el tratamiento del ictus, usándose/aplicándose células estrelladas hepáticas, células mesangiales, células estrelladas del páncreas, células dendríticas del bazo y/o fibroblastos de la piel en diferenciación o diferenciadas de forma fenotípicamente estable.

5 La presente invención reivindica adicionalmente un agente farmacéutico, caracterizada porque comprende, con respecto a al menos una o más propiedades y/o funciones celulares predeterminadas, células en diferenciación o diferenciadas de una forma fenotípicamente estable.

Dicho agente farmacéutico puede además estar caracterizado porque las células en diferenciación o diferenciadas de una forma fenotípicamente estable producen factores protectores como propiedades y/o funciones celulares predeterminadas.

10 Dicho agente farmacéutico puede además estar caracterizado porque las células en diferenciación o diferenciadas de una forma fenotípicamente estable son células positivas a GFAP, en particular células positivas a GFAP perivasculares.

Dicho agente farmacéutico puede además estar caracterizado porque las células en diferenciación o diferenciadas de forma fenotípicamente estable son células de la glía.

15 Dicho agente farmacéutico puede además estar caracterizado porque las células en diferenciación o diferenciadas de una forma fenotípicamente estable son astrocitos o células que tienen un programa de diferenciación similar.

Dicho agente farmacéutico puede además estar caracterizado porque las células en diferenciación o diferenciadas de una forma fenotípicamente estable son células estrelladas hepáticas, células mesangiales, células estrelladas del páncreas, células dendríticas del bazo y/o fibroblastos de la piel.

20 Los ejemplos siguientes explican la invención sin restringirla.

1. Pruebas *in vitro*

25 A continuación se usan las abreviaturas siguientes: CEH – células estrelladas hepáticas; CM – células mesangiales; CP-GFA – células perivasculares positivas para la proteína ácida fibrilar de la glía; PA cultivo primario de astrogliá; P – paso; EPO – eritropoyetina; GS – glutamina sintetasa; MT – metalotioneína; PCNA – antígeno nuclear de células en proliferación; PDCO – programa de diferenciación celular opuesta.

30 Las propiedades protectoras de CEH, CEH-T6 y CM se caracterizaron en monocultivos individuales y cocultivos con cultivos primario de astrogliá de rata por medio de análisis inmunohistoquímicos de diferentes proteínas marcadoras específicas de la función y del tipo celular. La eficacia del tratamiento PDCO se evaluó en modelos *in vitro* de cocultivos de cultivos primarios enormemente diferenciadas de CP-GFAP cerebrales y no neurales. Las CP-GFAP no neurales se incluyeron en:

1. Células mesangiales de riñones adultos y de riñones de ratas neonatas
2. CEH activadas adultas (cultivo primario)
3. Línea celular CEH-T6 (línea celular CEH activada)

35 Todos estos tipos de células se analizaron individualmente y en cocultivos con células de la astrogliá a una edad de cultivo diferente (hasta 150 días de cultivo) y diferentes condiciones cuantitativas unas respecto de otras y a densidades celulares diferentes.

Las propiedades morfológicas y antigénicas específicas de las neuronas de CP-GFAP diferenciadas no neurales, es decir CEH y CM activadas, conseguidas por medio de la diferenciación se muestran a continuación.

Propiedades específicas de las células madre y las neuronas de células CP-GFAP (CEH y CM)

40 En el caso de las CM de ratas recién nacidas en cultivos de diferentes edades (día 7; día 14 y día 21) y también CEH y CM de adultos en diferentes pases, se puede observar una reducción gradual de la GFAP y una expresión creciente altamente regulada de beta-tubulina III, un marcador de neuronas en CM. Además, LA nestina, un marcador de células madre, presenta una expresión muy elevada. Asimismo, en CM y CEH adultas expresan, nestina y β -tubulina en un grado elevado. En CM, se puede observar que la expresión de beta-III tubulina tras 3 pases en el cultivo celular tiene una expresión extremadamente alta.

Expresión de proteínas con funciones detoxificantes y protectoras (GS, MT, EPO) y proteínas que participan en la neurotransmisión (sinapsina y sinaptofisina) y acetilcolina en CP-GFAP

50 Las CEH activadas adultas de rata y las CM expresan, en un nivel elevado, GS, la enzima que convierte el exceso de glutamato y NH_3 en glutamina. La metalotioneína (MT), conocida por su función de "secuestrante" con respecto a los radicales libres, se observa en las CM positivas para GS. Además, las CEH diferenciadas adultas coexpresan

GS y EPO. GS y EPO también se expresan en CM activadas. Las CM activadas adultas muestran una capacidad proliferativa alta, incluso después del 9º pase. Esto se muestra mediante la expresión de PCNA. Las CM activadas también expresan marcadores de neuronas funcionalmente activas: acetilcolina, sinapsina y sinaptofisina.

Morfología de tipo neurona de CEH y CM

- 5 Los botones terminales sinápticos, típicos de las neuronas, también se encuentran en las CM y las CEH. Asimismo, las protrusiones de tipo axón largas, típicas de las neuronas, se forman a partir de las CM y las CEH. Adicionalmente, la doble tinción para EPO y GS mostró la formación de espigas dendríticas en las CEH.

Expresión de marcadores neuronales (beta-III tubulina) y GFAP en cocultivos de CEH-T6 (línea celular de CHE) con cultivos primarios de astrogliá de rata

- 10 Con el fin de mostrar la eficacia de la terapia con PCDO en el tejido del SNC degenerado, se utilizó como modelo *in vitro* de neurodegeneración un cultivo primario de astrogliá que, en gran parte, comprende astrocitos y tiene un número de neuronas muy pequeño. Este modelo refleja las condiciones en el cerebro enfermo en el que el número de neuronas reduce drásticamente y el número de astrocitos aumenta. Dado que los astrocitos en regiones específicas del cerebro tienen las propiedades de las células precursoras y pueden servir como fuente para las nuevas poblaciones de células, incluyendo neuronas, se utilizaron cultivos celulares de diferentes edades. Además de las células jóvenes de 7 días de edad y de los astrocitos de edad media (14 días en cultivo), también se usaron astrocitos viejos (cultivos de 30, 48, 90 días de edad), que pierden sus propiedades originales.

- 20 III. 1 muestra los cambios en el número de células positivas para beta-III tubulina —en cultivos de astrogliá de 14 días de edad tras el cocultivo con la línea celular CEH-T6 o CM primarias. A partir del diagrama, es evidente que el cocultivo de 14 días de longitud de células de la astrogliá (Ao) con CEH-T6 (Ao + T6) o con CM (Ao + MC) causa un incremento por casi tres veces de las células positivas a beta-III tubulina en comparación con cultivos de astrogliá de control (Ao14d). El día 28, los cultivos de astrogliá solo contenían pocas células positivas beta-III tubulina. La administración de 5×10^4 células CEH-T6 a cultivos de astrogliá de 14 días de edad dio como resultado una enorme expansión de la población de células positivas para beta-iii tubulina después de un cocultivo de 7 días de edad.
- 25 Después de 14 días en el cocultivo, se observó un aumento espectacular en el número de células positivas para beta-III tubulina. De estas células positivas para beta-III tubulina, un gran número mostró una morfología neuronal, es decir, protuberancias de tipo axón extendidas individuales y numerosas dendritas cortas que giran alrededor del cuerpo celular. Este efecto se observó en los cultivos con una densidad celular 5 veces menor. Las células positivas para beta-III tubulina se organizaron en una red. Estas células expresaron beta-tubulina III en un grado elevado de GFAP hasta un grado muy bajo.

Expresión de marcadores neuronales (beta-III tubulina) y GFAP en cocultivos de CM con cultivos primarios de astrogliá de ratas neonatas

Las células de la astrogliá se cocultivaron con CM de ratas neonatas.

- 35 1. Células de la astrogliá de 14 días de edad con células CM recién aisladas de ratas neonatas y posterior cocultivo durante 14 días.
2. CM de 14 días de edad con células de la astrogliá recién aisladas de ratas neonatas y posterior cocultivo durante 14 días.
3. CM de 14 días de edad con cultivos de astrogliá de 14 días de edad de ratas neonatas tras un pase en cultivo y el posterior cocultivo durante 14 días.
- 40 4. Cultivos de astrogliá de 21 días de edad con CM de 21 días de edad de ratas neonatas tras un pase en cultivo y el posterior cocultivo durante 14 días.
5. Células de la astrogliá de 46 días de edad con células CM de 31 días de edad en el pase 1 y el posterior cocultivo durante 14 días.

- 45 En todas estas 5 condiciones de cocultivo mencionadas anteriormente, el número de células positivas para beta-III tubulina se incrementó considerablemente. Además, el número de células silentes, que pueden detectarse solamente mediante tinción nuclear es, en condiciones de control en cultivos de astrogliá de 60 días de edad, significativamente mayor que en los cocultivos. Dado que el número de células positivas para beta-III tubulina en cocultivos aumenta considerablemente, se puede suponer que estas células silentes se transforman en neuronas.

Expresión de beta-tubulina III en cocultivos de cultivos de células de la astrogliá de 140 días de edad y CEH o CM adultas de rata

- 50 En esta serie de experimentos, se observaron cultivos de astrogliá de más de 140 días de edad. El cocultivo de 28 días de células de la astrogliá de 149 días de edad (PA1) con CM adultas desde el 8º pase o con CEH activadas adultas desde el 7º pase condujo al aumento significativo de células positivas para la beta-III tubulina, en comparación con el cultivo de control. El cocultivo de la línea celular PA1 y CEH-T6 llevó a un desprendimiento

considerable de las células de la base de las placas de Petri. No obstante, la población de células adherentes restantes mostró un mayor número de células positivas para la beta-III tubulina que en el cultivo de control.

Propiedades anticitotóxicas de CEH-T6

5 III. 2 muestra un incremento del 600 % en el número de células positivas para GS en cocultivo de células de la astrogliá después del pase (P2) con CM (PA2 + CM P1) después del pase (P1) en comparación con el monocultivo de células de la astrogliá de 56 días de edad (PA2). Adicionalmente, en esta ilustración, se representan los resultados del estudio comparativo de la expresión de GS y MT en cultivos de la astrogliá con y sin adición de CEH-T6 (la línea celular de CEH activadas). La adición de CEH-T6 a cultivos de astrogliá de 52 días de edad condujo a un aumento espectacular de la GS, la MT y la desmina. Las células formaron una red de tipo neuronal con protuberancias fuertemente configuradas en las que se produjo una fuerte expresión de GS, MT y desmina.

Propiedades anticitotóxicas de las CM

La expresión y, correspondientemente, la actividad de GS en cultivos de astrogliá de 58 días de edad se incrementa dramáticamente mediante la adición de CM de ratas neonatas a cocultivos de 14 días de edad.

Desarrollo de funciones específicas de neuronas en cocultivos de astrogliá con CEH o CM

15 Expresión de tirosina hidroxilasa (TH)

El día 28, un gran número de astrocitos en cultivo homogéneo expresó TH. Después de 14 días en cocultivo con CM adultas diferenciadas (activadas) a partir de cultivos primarios de rata o CEH y CM adultas diferenciadas en el 7° - 8° pase, el número de células positivas para TH permaneció aproximadamente igual en comparación con los cultivos de control de astrogliá.

20 Expresión de TH tras tiempos de cultivo bastante largos

El día 40 en los cultivos primarios de astrogliá, el número de células positivas para TH se redujo ligeramente en el cultivo en comparación con el día 28. La intensidad de la tinción con TH y el número de células que expresan TH se redujeron aún más considerablemente entre los días 40 y 52. El cocultivo de cultivos de astrogliá de 40 días de edad con CM adultas de rata o CEH de rata activadas adultas o con la línea celular CEH-T6 activada produjo un aumento significativo de la expresión de TH en comparación con los cultivos de control de astrogliá de 52 días de edad.

Expresión de la proteína del neurofilamento (NF)

30 La adición de 20.000 células CEH-T6 a cultivos de astrogliá de 14 días de edad dio lugar a un ligero aumento en el número de células expresadas con NF en comparación con cultivos de control de astrogliá. Un aumento de 10 veces el número de células CEH-T6 condujo a un gran aumento del número y la intensidad de las células positivas para NF en cocultivos de 14 días de PA (cultivo primario de astrocitos) y CEH-T6.

Expresión del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) en cocultivos de células de la astrogliá (pase 2, PA2 y línea celular CEH-T6)

35 III. 3 muestra un aumento del 370 % de las células positivas para PCNA en cocultivos de células de la astrogliá y cultivos de astrogliá de 52 días de edad. La actividad proliferativa de las células de la astrogliá de 31 días de edad en el pase 2 (PA2) se redujo ligeramente en comparación con cultivo primario sin pases (evidente por medio de la expresión de PCNA). La proliferación se incrementó considerablemente mediante la adición de células CEH-T6 en PA2 y el cocultivo posterior durante 14 días. El efecto de CEH-T6 fue aún mayor si estas últimas se mezclaron con PA2 en suspensión celular y, simultáneamente, se cultivaron en una placa de Petri. La elevada proliferación en cultivos mixtos produjo un desprendimiento masivo de las células de la base de la placa (detectable por medio de grandes áreas de células en crecimiento denso adyacentes a regiones de una distribución celular muy densa o muy escasa). Sin embargo, en cocultivo, incluso en las zonas con una escasa distribución de células, el número de células positivas para PCNA fue mayor que en el cultivo de astrogliá sin CEH.

Efecto de CEH-T6 sobre el proceso de envejecimiento de las células de la astrogliá

45 Con el fin de aclarar este efecto, la expresión de GFAP en cultivos de astrogliá se analizó de forma individual y en cocultivo con CEH-T6 mediante transferencia Western. III. 4 muestra la expresión apenas presente de GFAP en un cocultivo de células de la astrogliá con CEH-T6 (columna 1 en III.4) en comparación con la expresión de GFAP en cultivos individuales de CEH-T6 (columna 2) o cultivos primarios de astrogliá (columna 3 y 4). Esto indica una diferenciación muy fuerte y, por tanto, un efecto retardante del envejecimiento de CEH en las células de la astrogliá.

Resistencia a la hipoxia de las células de la astrogliá y de CEH-T6 en cocultivo

50 En esta serie de experimentos, las células de la astrogliá se sometieron a las siguientes condiciones:

1. Los cultivos de 43 días de edad desde el primer pase (P1) se cultivaron de forma individual en condiciones de

normoxia (CN). Control normóxico

2. Los cultivos de 43 días de edad de células de la astroglia desde el primer pase (P1) se cultivaron durante 10 días adicionales en CN y, después, se transfirieron a 48 horas adicionales en condiciones hipóxicas (CH) (1 % O₂, 10 % de CO₂, 89 % de N₂). Control hipóxico.

5 3. Al cultivo de astroglia de 31 días de edad en P1 se añadieron 150.000 células CEH-T6 y se cocultivaron en CN 12 días adicionales.

4. Al cultivo de astroglia de 31 días de edad en P1 se añadieron 150.000 células CEH-T6 y se cocultivaron en CN 10 días adicionales. Posteriormente, el cocultivo se sometió durante otras 48 horas al CH.

Expresión de nestina

10 Se observó una expresión moderada de nestina en las células de astroglia positivas para GFAP en el primer pase (PA1) en condiciones de normoxia. En estos cultivos, la expresión de nestina se redujo excesivamente en condiciones de hipoxia. Después de 12 días de cocultivo con CEH-T6 en CN, la tasa de expresión de la nestina se aumentó excesivamente. En el 50 % de la población celular total, la intensidad de la expresión de nestina fue mayor que la expresión de GFAP. En CH, la intensidad de la tinción de nestina fue incluso más alta que en los cultivos de control de las células de la astroglia sin CEH en CN. En cocultivo de células PA1 y CEH-T6, se mantuvo la capacidad de expresar acetilcolina, incluso en condiciones de hipoxia.

Expresión de beta III-tubulina

20 La tinción simultánea de beta III-tubulina y GFAP y la tinción individual con un anticuerpo monoclonal contra la beta III-tubulina mostraron únicamente células positivas para la beta III-tubulina individual en PA1 en condiciones de normoxia e hipoxia. Después de 12 días en cocultivo con CEH-T6, el número de células positivas para la beta III-tubulina aumentó significativamente en CN y CH. Algunas de estas células mostraron un fenotipo típicamente neuronal (evidente por medio de la presencia de beta III-tubulina y la ausencia de GFAP). En CH, la intensidad de la tinción de beta III tubulina y el número de células positivas para la beta III-tubulina fue el mismo en CN y CH, pero mucho mayor que en los monocultivos de PA1 en CN.

Coexpresión de glutamina sintetasa (GS) y metalotioneína (MT)

25 Las células en CN en monocultivo de PA1 expresaron GS ligeramente y apenas MT tanto en CN y como en CH. 7. Tras 12 días en cocultivo con CEH-T6 en CN, GS y MT estaban altamente reguladas. La mayoría de las células coexpresó GS y MT. En muchas células, la expresión de GS o MT predominó. En CH, la intensidad de la tinción de MT en cocultivos fue ligeramente menor que en los cocultivos en CN. No obstante, la expresión de GS y MT en cocultivos en CH fue sustancialmente mayor que en un monocultivo de astroglia en condiciones de normoxia.

Coexpresión de PCNA y caspasa 3

30 Sólo unas pocas células en los cultivos de astroglia de 43 días de edad en el primer pase (PA1) expresaron PCNA en condiciones de normoxia (CN). La mayoría de las células tampoco contenían caspasa 3. El número de células de los cultivos de PA1 y la intensidad de PCNA se redujeron aún más en condiciones de hipoxia. El cocultivo de PA1 con CEH-T6 condujo a un aumento masivo de células positivas para PCNA en condiciones de normoxia y condiciones de hipoxia en comparación con el cultivo PA1 en CN y CH. El aumento de la proliferación en los cocultivos produjo un desprendimiento masivo de las células de la base de la placa de Petri que es evidente por la existencia de grandes conglomerados de células positivas para PCNA y pocas células en crecimiento, individualmente dispersas adyacentes. En algunos conglomerados, la expresión de caspasa 3 estuvo casi completamente ausente. En otros, por el contrario, se reveló una fuerte expresión de caspasa y PCNA. Esto indica la producción de nuevas poblaciones de células capaces de proliferar que se compensan mediante apoptosis.

Los presentes resultados verifican las propiedades protectoras de las líneas de células CEH, CEH-T6 y CM en cultivos primarios de astroglia. Estas propiedades se evaluaron por medio de los parámetros siguientes:

- 45 1. aumento del número de neuronas (incremento del 250 – 300 % de neuronas positivas para beta-III tubulina en cocultivos;
- 2. activación de las células silentes;
- 3. aumento de la expresión de la tirosina-hidroxilasa;
- 4. aumento de la expresión de GS y MT, es decir, función anticitotóxica;
- 5. aumento de la proliferación celular;
- 50 6. regeneración de la población de astrocitos (evidente por medio del aumento de la intensidad de la tinción de nestina y aumento del 300% en las células positivas para nestina);

7. expansión de la red neuronal en co-cultivos;
8. aumento de la resistencia a condiciones de hipoxia que surgen debido a los siguientes efectos:
- a) incremento de la proliferación celular en condiciones hipóxicas;
 - b) regeneración de los cultivos de astrogliá (incremento de más del 300 % en las células positivas a la nestina en normoxia e hipoxia en comparación con los monocultivos);
 - c) incremento de la expresión de GS y MT;
 - d) aumento del número de neuronas (evidente por medio del aumento del 300 % en las células positivas para beta-III tubulina).

Estas propiedades de protección de las células positivas para GFAP no neurales se basan en su efecto de larga duración en las células del SNC por medio de:

1. producción de sustancias que son esenciales para la diferenciación y la generación de neuronas;
2. efectos retardantes de la diferenciación sobre los astrocitos, ya que asumen la función de los astrocitos diferenciados;
3. regeneración de las poblaciones de células neuronales por medio de la proliferación;
4. la capacidad intrínseca de la transformación en células similares a neuronas.

2. Ensayos in vivo

Efecto protector de la línea celular CEH-T6 para el tratamiento de la esclerosis múltiple

Diseño del ensayo:

Se aplica MOG humana (glicoproteína de mielina de oligodendrocitos) por vía intravenosa en una concentración de 50 µg/animal con 18 ratas GA a la edad de aproximadamente 1 mes. Después de 24 horas, los animales se dividieron en 2 grupos: el grupo 1 obtuvo 5.000.000 células por vía intravenosa (en solución de PBS), aplicándose las células marcadas con fluorescencia en el caso de 2 animales de este grupo; el grupo 2 (grupo de control) obtuvo solamente PBS por vía intravenosa. Las células estrelladas hepáticas en forma de la línea celular CEH-T6 se utilizaron como células correspondientes al PDCO. En el caso de 2 animales del grupo 1, las células marcadas con fluorescencia de marcado se aplicaron i.v. con el fin de detectar la accesibilidad y la persistencia de las células aplicadas en el SNC. Estos animales se prepararon después de 11 días. Además, en el caso de 2 ratas normales (no expuestas previamente) en las que no se indujo EAE (encefalomielitis autoinmune experimental) inducida por MOG, se aplicó la misma cantidad de células marcadas con fluorescencia por vía intravenosa. Estos animales de control deben tener una población de células más pequeña de CEH-T6 en el SNC, ya que la barrera hematoencefálica se mantuvo intacta en estos animales. Los animales tratados con MOG se sometieron a observación diaria de acuerdo a la posterior "puntuación" neurológica.

Resultados

Se analizó a los animales diariamente para detectar características motoras sorprendentes de acuerdo con los siguientes criterios:

Puntuaciones	Criterios de puntuación
1	Cola colgando
2	Ligero trastorno motor de las patas traseras
3	Patatas traseras completamente cojas
3,5	Columna vertebral inmóvil
4	Puntuación 1 - 3,5 con claudicación adicional de las patas delanteras
5	Muerte

El estado intermedio del estado neurológico se enumera en la ilustración 5.

La enfermedad completa se desarrolló en la mayoría de la población de animales a la décima semana después de la

5 aplicación de MOG. A partir de entonces, el grupo en el que se aplicaron las células mostró una mejoría significativa en el estado neurológico (puntuación) en el curso posterior (entre el día 42 y 54). El grupo de tratamiento con células (curva verde en III. 5) presentó una puntuación promedio de $0,9 \pm 0,05$ ($n = 8$), mientras el grupo tratado con PBS (curva roja en III.1) mostró una puntuación promedio de $2,21 \pm 0,06$ ($n = 8$). Por lo tanto, el promedio de la diferencia entre el grupo 1 ("células" en III. 5) y el grupo 2 ("PBS") estaba en una puntuación de $1,2 \pm 0,08$, lo que implica una mejora significativa de los síntomas neurológicos.

Identificación de las CEH-T6 marcadas con CFDA en diferentes regiones del cerebro de las ratas con EM y los animales no tratados intactos

10 Con el fin de demostrar la persistencia de las CEH-T6 en diferentes regiones del cerebro con la aplicación intravenosa de 5.000.000 células, se prepararon secciones en serie de los cerebros de los animales que obtuvieron células CEH-T6 fluorescentes marcadas con CFDA y se analizaron mediante microscopia de fluorescencia. Se identificaron numerosas poblaciones celulares en el cerebelo (III. 6A), la corteza prefrontal (III. 6B) y el hipocampo (III. 6C) en los animales con EM, mientras que solo se encontraron células individuales exclusivamente en el hipocampo en el caso de las ratas intactas (sin aplicación de MOG) (III. 6D).

15 Los resultados ilustrados anteriormente verifican de manera inequívoca las ventajas conseguidas por la presente invención, en particular:

1. La aplicación de células CEH-T6, que tienen un fenotipo estable diferenciado, conduce a una mejora significativa en los síntomas neurológicos en el modelo experimental animal de esclerosis múltiple (EM);
- 20 2. El enriquecimiento de CEH-T6 por medio de administración intravenosa difiere significativamente en el caso de los animales con EM de los animales intactos con barrera hematoencefálica sin dañar y muestra que, solo en el caso de una enfermedad avanzada en la que se daña la barrera hematoencefálica, un gran número de células migran al SNC, mientras que solo las células individuales pueden alcanzar el SNC con animales sanos.
- 25 3. Los animales con aplicación de células indicaron ausencia de reacción tóxica o tumorigénica adicional a la aplicación de células (ni ratas intactas sanas ni animales con EM), de modo que el uso de las células de puntos de vista toxicológicos puede considerarse seguro.

Tabla 1

Composición antigénica de astrocitos y células estrelladas hepáticas (CEH) en diversos estados de diferenciación				
Expresión de	Astrocitos estacionarios silentes (diferenciados)	CEH silentes (no diferenciadas)	Astrocitos activados (no diferenciados)	CEH activadas (diferenciadas)
	Cultivo de cerebro adulto a largo plazo	Cultivo de hígado normal a corto plazo	Cultivo de cerebro joven a corto plazo	Cultivo de hígado activado a largo plazo
GFAP	+++	++++	-/+	-/+
SMAA	-	-	++++	++++
Desmina	++	++	++++	+++
Nestina	-	-	++++	++++
Glutamina sintetasa	-/+	-	++++	++++
Metalotioneína	-/+	-	++++	++++
Factor de crecimiento neural	-/+	-	++++	++++
SMAA Alfa-actina de músculo liso				
Graduación: -, ausente; +/-, de ausente a débil; ++, moderado; +++/ alto; +++++, muy alto				

REIVINDICACIONES

1. Células estrelladas hepáticas positivas para GFAP diferenciadas de forma fenotípica estable, células mesangiales y/o células estrelladas del páncreas para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa y/o para su uso en el tratamiento de una enfermedad que **se caracteriza por** una pérdida de neuronas y/o para su uso en el
- 5 tratamiento de una enfermedad que **se caracteriza por** una pérdida de funcionalidad neuronal y/o para el tratamiento de una enfermedad neurológica que **se caracteriza por** cambios en la homeostasis de órganos específicos.
2. Células para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en las que la enfermedad es enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple y/o enfermedad de Parkinson.
- 10 3. Agente farmacéutico, **caracterizado porque** comprende células diferenciadas para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2.

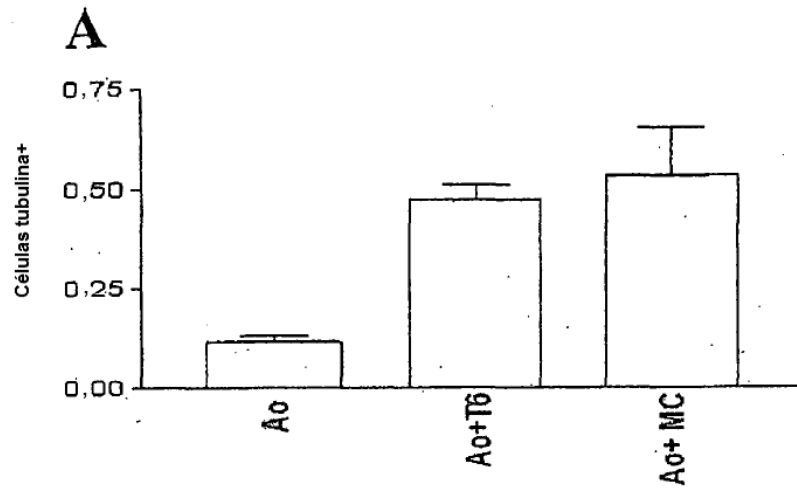


Figura 1

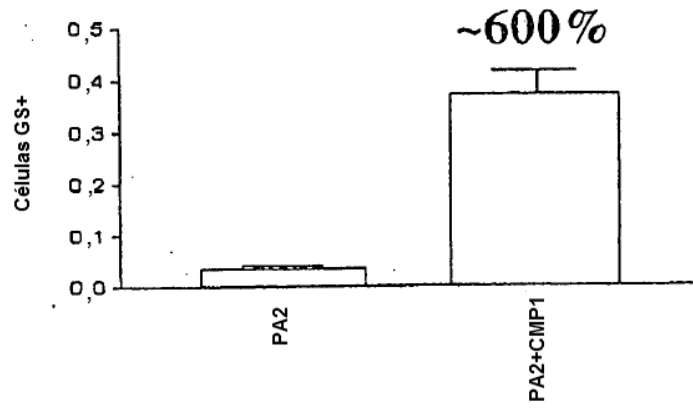


Figura 2

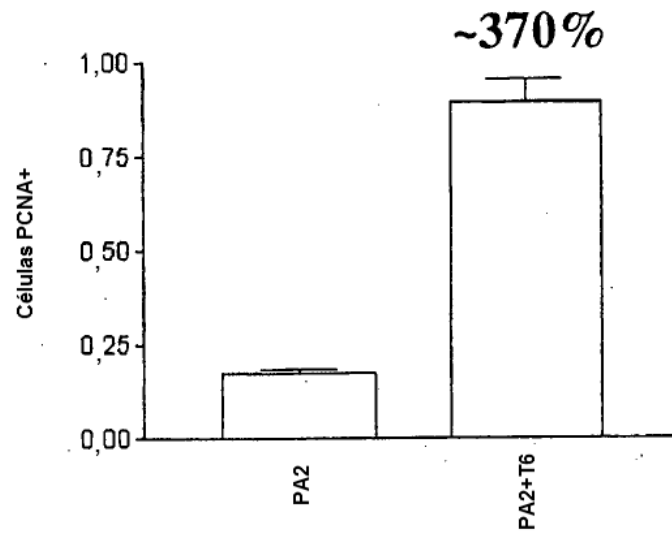


Figura 3

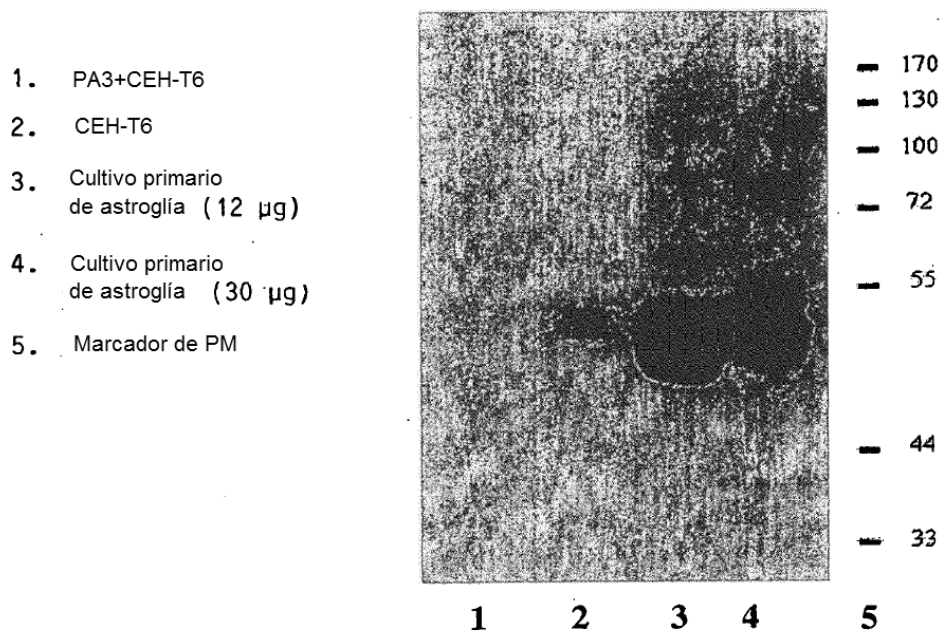


Figura 4

Día 0-54

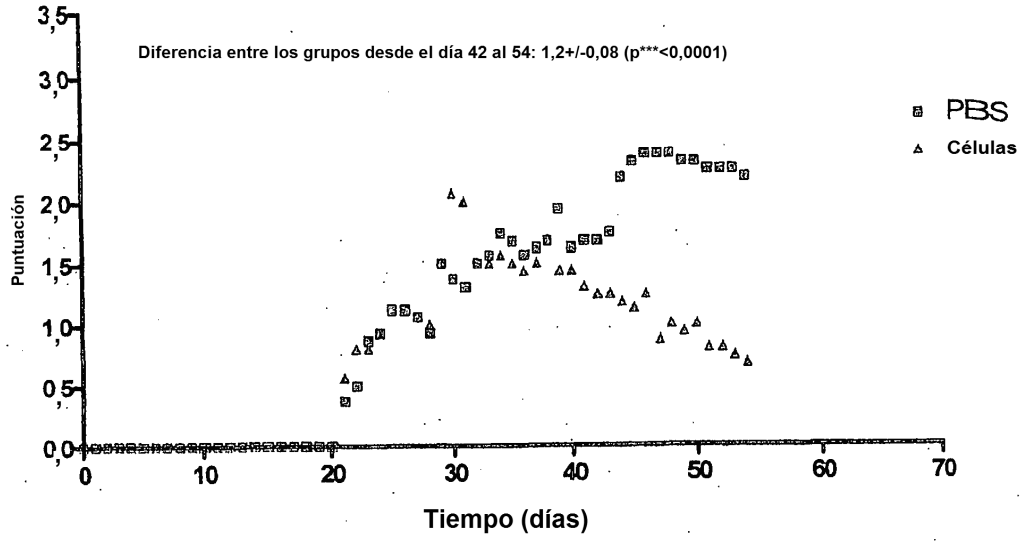


Figura 5

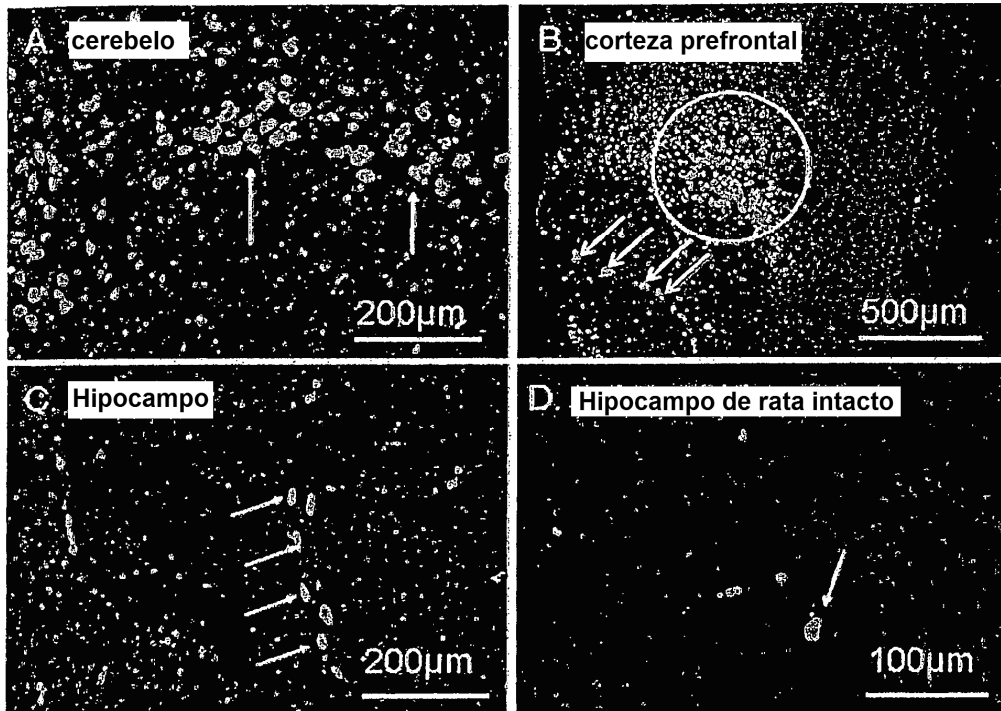


Figura 6. Localización de CEH-T6 marcadas con GFDA (fluorescencia verde) en el cerebelo (A), la corteza prefrontal (B) y el hipocampo (C) en ratas con esclerosis múltiple inducida por MOG y en el hipocampo de la rata intacta (sin EM) (D).