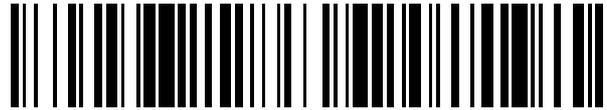


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 733**

21 Número de solicitud: 201830557

51 Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

07.06.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.12.2019

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)
Paseo de las Delicias s/n. Pabellón de Brasil
41013 Sevilla ES**

72 Inventor/es:

**HERRERA DELGADO, Alejandro;
PASTOR LORO, Ángel Manuel y
RODRÍGUEZ MATARREDONA, Esperanza**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA PROLONGAR LA VIDA MEDIA DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURALES NEONATALES CON SURAMINA**

57 Resumen:

Procedimiento para prolongar la vida media de células progenitoras neurales neonatales con suramina.

La presente invención se refiere a un procedimiento in vitro para el cultivo y expansión, de células progenitoras neurales, preferiblemente aisladas de un animal postnatal, más preferiblemente procedentes de la zona subventricular del cerebro. En particular, el procedimiento de la presente invención se basa en el tratamiento farmacológico de las células progenitoras neurales en cultivo con suramina. El procedimiento de la invención permite aumentar la supervivencia de células progenitoras neurales para su posterior uso clínico en terapia celular.

ES 2 734 733 A1

DESCRIPCIÓN

**PROCEDIMIENTO PARA PROLONGAR LA VIDA MEDIA DE CÉLULAS
PROGENITORAS NEURALES NEONATALES CON SURAMINA**

5

La presente invención se encuadra dentro del campo de la neurología y la terapia celular regenerativa del sistema nervioso, específicamente dentro de los procedimientos para la mejora del cultivo o expansión *in vitro* de células progenitoras neurales procedentes de animales neonatales, preferiblemente aisladas de la zona subventricular del cerebro. Estos procedimientos permiten amplificar *ex vivo* la población de dichas células progenitoras neurales, las cuales pueden diferenciarse en los diferentes tipos de células de la estirpe neural (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos), por lo que son de interés para su empleo clínico en terapia celular regenerativa del sistema nervioso.

10

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

20

Las células progenitoras neurales se caracterizan por tener capacidad de autorrenovación y de diferenciación a los diferentes tipos de células de origen neural: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Son las células a partir de las cuales se forman todas las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos del sistema nervioso central durante el desarrollo embrionario. Tras el nacimiento del individuo esta población de células progenitoras se restringe a solo dos regiones del cerebro, a saber, la zona subgranular del giro dentado del hipocampo y la zona subventricular adyacente a los ventrículos laterales (Álvarez-Buylla, A. y García-Verdugo, J. M., 2002, *J. Neurosci.* 22, 629-634; Gage, F. H., 2000, *Science* 287, 1433-1438). Las células progenitoras de la zona subventricular del cerebro de ratas neonatales se pueden aislar y cultivar en forma de unos agregados esféricos denominados neuroesferas (Reynolds, B. A. y Weiss, S., 1992, *Science* 255, 1707-1710). Estos cultivos de neuroesferas permiten disponer de una población de células progenitoras que puede utilizarse en terapia celular. Así, se han descrito casos de aplicaciones terapéuticas beneficiosas de implantes de células progenitoras neurales neonatales procedentes de cultivos de neuroesferas en modelos animales de ictus, traumatismo craneoencefálico, lesiones de médula espinal o axotomía (Hicks, A.U., *et al.*, 2007, *Neuroscience* 146, 31-40;

25

30

Koutsoudaki, P.N., *et al.*, 2016, *Glia* 64:763–779; Morado-Díaz, C.J., *et al.*, 2014, *J. Neurosci.* 34, 7007–17).

5 Las células progenitoras neurales obtenidas tras el nacimiento aportan importantes ventajas para su utilización en terapia celular respecto a las embrionarias, ya que por un lado se evitan las consideraciones éticas relativas al trabajo experimental con embriones y, por otro, se reduce considerablemente el riesgo de que se desarrollen teratomas a partir de las células neurales implantadas. Este riesgo en la generación de teratomas limita también el empleo de líneas celulares inmortalizadas en terapia
10 celular. Las células progenitoras neurales neonatales o adultas presentan, sin embargo, algunas limitaciones a su empleo en terapia regenerativa. Una de ellas es la necesidad de disponer de un número de animales relativamente elevado para obtener una densidad adecuada de células a implantar. Otra es el hecho de que estas células pierden capacidad proliferativa y viabilidad durante su expansión *ex vivo*, lo que limita
15 la ventana temporal de su utilización para aplicaciones clínicas a los primeros subcultivos tras su aislamiento. Es por esto por lo que la mejora de estos cultivos para lograr amplificar exitosamente esta población celular, así como retrasar su senescencia, ampliaría la posibilidad de utilización de estas células y reduciría el número de animales a sacrificar para obtenerlas.

20

La suramina es un agente bloqueante de los receptores purinérgicos de tipo P2 que se emplea tanto en investigación básica como en clínica por los múltiples efectos derivados de su mecanismo de acción. Las células progenitoras neurales expresan receptores purinérgicos P2 tanto en su nicho neurogénico de la zona subventricular,
25 como cuando se cultivan como neuroesferas (Messemer, N., *et al.*, 2013, *Neuropharmacology* 73, 122-137). Se ha descrito que el tratamiento con suramina reduce tanto la migración como la proliferación de células progenitoras neurales de la zona subventricular durante el desarrollo embrionario (Liu, X., *et al.*, 2008, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 11802-7). Sin embargo, no existen estudios sobre el efecto de la
30 suramina en esta misma población de células en estado postnatal.

Las células progenitoras neurales son, por tanto, una población de interés para su empleo en terapia celular, no solo por su capacidad de generar las diversas células de la estirpe neural (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos) sino también por su
35 capacidad para producir factores neuroprotectores o por ejercer importantes funciones

inmunes. Normalmente estas células se obtienen a partir del cerebro de embriones, pues es cuando tienen su máxima capacidad proliferativa y son capaces de integrarse mejor en el tejido hospedador tras su implante. Esta población de células persiste en tan solo dos regiones del cerebro tras el nacimiento, la zona subgranular del giro dentado del hipocampo y la zona subventricular adyacente a los ventrículos laterales. El número de células progenitoras en este caso, sin embargo, es mucho más reducido que en el estado embrionario y además la capacidad de proliferación de las mismas está restringida. Es por ello por lo que el desarrollo de un mecanismo que permita amplificar, así como mejorar la supervivencia y capacidad de expansión de estas células progenitoras neurales tras el nacimiento sería de interés para limitar el empleo de tejido embrionario como fuente de las células y facilitar las posibilidades de su utilización en terapia celular.

En resumen, aunque es posible aislar y mantener en cultivo células progenitoras neurales obtenidas a partir del cerebro de animales neonatales y adultos, estas células tienen una vida media y una capacidad de expansión limitadas y al cabo de varias resiembras pierden capacidad de autorrenovación. Por lo tanto, es un objetivo esencial en el campo técnico el desarrollo de procedimientos de cultivo optimizados que permitan amplificar *in vitro* la población de células progenitoras neurales neonatales y adultas hasta obtener un número elevado de células sanas y viables que puedan ser empleadas en terapia celular. Estos procedimientos de cultivo deberían también aumentar la vida media o supervivencia de las células sin que éstas pierdan, a lo largo de los subcultivos, su viabilidad, capacidad de proliferación, autorrenovación y diferenciación a los principales tipos celulares neurales. El desarrollo de estos procedimientos de cultivo mejorados limitaría así la utilización de tejido embrionario como fuente de las células, minimizaría el número de animales a sacrificar para la obtención de las mismas, y facilitaría, mejoraría y ampliaría el ámbito de aplicación terapéutica de estas células.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

30

La presente invención se refiere a un procedimiento en el que se describe una acción del compuesto suramina en cultivos de células progenitoras neurales neonatales, procedentes de la zona subventricular del cerebro.

El procedimiento aquí descrito supone una mejora con respecto a otros procedimientos descritos hasta la fecha en el estado de la técnica, ya que, con este tratamiento se logra aumentar la supervivencia de las células progenitoras neurales cultivadas y amplificar la población de las mismas hasta obtener un número adecuado
5 de células sanas y viables para su posterior uso en terapia celular, con el consiguiente interés para su aplicación con fines terapéuticos. Además, este procedimiento evita el uso de embriones y reduce el número de animales neonatales del que obtener las células.

10 En particular, el procedimiento descrito en la presente invención se basa en el tratamiento farmacológico de las células progenitoras neurales en cultivo con el compuesto suramina a una concentración de entre 100 y 300 μM , y preferiblemente de 200 μM . Como muestran los resultados de los ejemplos descritos más adelante, este tratamiento incrementa significativamente la vida media o supervivencia de estas
15 células, manteniendo a lo largo de los subcultivos su capacidad proliferativa y de autorrenovación y permitiendo así amplificar exitosamente esta población celular. Así mismo, el tratamiento con suramina induce una disminución de, preferiblemente, el 75% en la muerte celular por apoptosis de las células en cultivo. Las células progenitoras neurales adultas tratadas con suramina presentan una capacidad de
20 expansión a lo largo de los subcultivos significativamente superior a las no tratadas con este compuesto, y además mantienen la multipotencia pues son capaces de generar los distintos tipos celulares correspondientes a la estirpe neural cuando se siembran posteriormente sobre sustrato adherente. Por lo tanto, se describe un nuevo efecto de esta droga que es de interés para lograr amplificar y aumentar la vida media
25 de las células progenitoras neurales obtenidas de animales neonatales y mantenidas en cultivo como neuroesferas.

El procedimiento aquí descrito permite, por tanto, incrementar el número de subcultivos efectivos de dichas células manteniendo las condiciones de viabilidad
30 celular y conservando su capacidad de proliferación y su multipotencialidad. Además, el grado de muerte celular por apoptosis se reduce, preferiblemente en aproximadamente un 75%, con el procedimiento de la invención.

Por todo ello, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de la
35 suramina como reactivo o suplemento para la mejora en la obtención, supervivencia y

expansión *in vitro* de células progenitoras neurales.

La “suramina” o “suramina sódica” es el compuesto químico de número CAS 145-63-1 y fórmula molecular $C_{51}H_{40}N_6O_{23}S_6$. Es un antagonista de los receptores P2 y agonista
5 de los receptores rianodin que se encuentra comercialmente disponible.

En una realización preferida, la suramina se encuentra a una concentración de entre 100 y 300 μM , y más preferiblemente a una concentración de 200 μM , cuando se emplea en el contexto de la presente invención.

10

Las “células progenitoras neurales”, “células precursoras neurales” o “células madre neurales” son aquellas células del sistema nervioso que carecen de marcadores de diferenciación tardíos y tienen la capacidad de proliferar, autorrenovarse y diferenciarse hacia linajes neurales, tales como neuronas, astrocitos u
15 oligodendrocitos. Son las células a partir de las cuales se generan todas las células del sistema nervioso durante el desarrollo embrionario. En el cerebro adulto de mamíferos, sin embargo, su localización se restringe a dos zonas, la zona subventricular adyacente a los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo.

20

Las células progenitoras neurales se pueden aislar y son capaces de proliferar *in vitro* formando neuroesferas multipotentes con capacidad de autorrenovarse.

En otra realización preferida, las células progenitoras neurales a las que se refiere la
25 presente invención proceden de ratas neonatales, y preferiblemente de ratas de 6 o 7 días de edad.

En el contexto de la presente invención se entiende por “neonatal” un animal que no está en su estadio embrionario ni fetal, sino que ya ha nacido, y está en los primeros
30 días de vida (6 o 7 días de edad).

Las células progenitoras neurales que se cultivan en la presente invención pueden proceder, pero sin limitarnos, de roedores o de otros mamíferos. Preferiblemente, las células progenitoras neurales a las que se refiere la presente invención proceden de la
35 especie *Rattus norvegicus* (rata), más preferiblemente de ratas de 6 o 7 días de edad.

En otra realización preferida, las células progenitoras neurales que se cultivan en la presente invención proceden de la zona subventricular del cerebro.

5 La “zona subventricular”, ZSV, es el tejido localizado adyacente a la pared de los ventrículos laterales del sistema nervioso central en los mamíferos y está formada por distintos tipos de células, entre ellas células progenitoras neurales. Es una de las zonas en las que tiene lugar la neurogénesis en el cerebro de mamíferos adultos. La zona subventricular es, por tanto, un nicho de células madre neurales para el proceso
10 de neurogénesis adulta. Aloja la mayor población de células proliferativas en el cerebro adulto de roedores, monos y humanos.

A modo de ejemplo y sin que sirva de limitación, las células progenitoras neurales pueden aislarse de la zona subventricular del cerebro de un animal neonatal o adulto
15 mediante aislamiento de la totalidad o parte de dicha zona y posterior tratamiento enzimático y/o mecánico *ex vivo* mediante los procedimientos descritos en Talaverón, R., *et al.*, 2013, *PLoS One* 8:e54519; Talaverón, R., *et al.*, 2014, *Glia* 62, 623-638; o Talaverón, R., *et al.*, 2015, *Front. Cell. Neurosci.* 9, 411. Tras dicho tratamiento la suspensión celular resultante se cultiva en un medio de cultivo adecuado para la
20 formación de neuroesferas como se explicará posteriormente en la presente descripción.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento, de ahora en adelante “procedimiento de la invención”, para el cultivo, expansión, proliferación, amplificación,
25 obtención o producción *in vitro* de células progenitoras neurales, preferiblemente adultas, que comprende las siguientes etapas:

- a. preparar un cultivo de neuroesferas a partir de una población aislada de células progenitoras neurales, y
- 30 b. añadir suramina al cultivo de la etapa (a).

En una realización preferida del procedimiento de la invención, las células progenitoras neurales proceden de ratas neonatales, y preferiblemente de ratas de 6 o 7 días de edad.

35

En otra realización preferida, las células progenitoras neurales proceden de la zona subventricular del cerebro.

5 Se entiende por “neuroesferas” los agregados de aspecto esférico de células que se forman en cultivo, preferiblemente en cultivo en suspensión, a partir de la siembra de células progenitoras neurales y en presencia de determinados factores mitogénicos, como son el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGF-2).

10 Preferiblemente, el medio de cultivo base empleado en la etapa (a) en la presente invención consta de Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) suplementado con EGF y FGF-2. Más preferiblemente, dicho medio de cultivo además está suplementado con B-27 y Glutamax®, ambos productos comercialmente disponibles. Aún más preferiblemente, dicho medio de cultivo además
15 está suplementado con antibióticos y antifúngicos. Los antibióticos que podrían emplearse en este medio de cultivo son los comúnmente utilizados para el cultivo *in vitro* de células de mamíferos, como por ejemplo pero sin limitarnos, penicilina y estreptomicina, y como antifúngico, anfotericina.

20 Así pues, en otra realización preferida del procedimiento de la invención, el cultivo de la etapa (a) tiene lugar en presencia de un medio de cultivo suplementado con EGF y FGF-2.

En otra realización preferida del procedimiento de la invención, el cultivo de la etapa
25 (a) tiene lugar a una temperatura de 37°C, 5% CO₂.

En una realización particular, el cultivo de neuroesferas se prepara, en la etapa (a) del procedimiento de la invención, según el protocolo descrito en Talaverón, R., *et al.*, 2013, *PLoS One* 8:e54519; Talaverón, R., *et al.*, 2014, *Glia* 62, 623-638; o Talaverón,
30 R., *et al.*, 2015, *Front. Cell. Neurosci.* 9, 411, que se detalla a continuación. Se aísla la zona subventricular de 4 ratas de seis-siete días y se somete a un tratamiento enzimático y mecánico descrito en los artículos mencionados, tras el cual la suspensión de células resultante se siembra en un frasco T25 en medio de cultivo con una composición definida (DMEM-F12 adicionado de suplemento B-27, 2 mM de
35 Glutamax®, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 0,25 µg/ml de

anfotericina y suplementado con EGF a 20 ng/ml y FGF-2 a 10 ng/ml) y se mantienen en un incubador a 37°C y 5% de CO₂. A las 48-72h se comenzarán a formar neuroesferas a partir de las células progenitoras neurales del cultivo y a partir de entonces habrá que realizar un subcultivo de las células cada 72-96h. Para ello se
5 centrifuga el contenido del frasco a 150g durante 5 minutos, se resuspende el pellet en 200 µl del medio de cultivo y se disgregan mecánicamente las neuroesferas por aspiraciones sucesivas a través de una punta de pipeta p200. Se añaden 5 ml de medio y se vuelve a centrifugar. Tras retirar el sobrenadante se resuspende el pellet en 1 ml de medio de cultivo, se cuentan las células resultantes en una cámara de
10 Neubauer y se procede a sembrarlas de nuevo a razón de 15.000 células/cm² con 5 ml de medio fresco.

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención además comprende una etapa (c) posterior a la etapa (b), que comprende la realización de subcultivos
15 adicionales, preferiblemente de al menos dos subcultivos adicionales, consecutivos a partir del cultivo obtenido tras la etapa (a).

En otra realización preferida, las neuroesferas generadas en el cultivo de la etapa (a) y en cada uno de los subcultivos de la etapa (c) se disgregan, preferiblemente
20 mecánicamente, previamente a la realización del siguiente subcultivo.

La disgregación mencionada anteriormente puede realizarse, por ejemplo pero sin limitarnos, mediante una o varias aspiraciones del cultivo de neuroesferas, por ejemplo con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio con la punta pulida al fuego o con la punta
25 de plástico de una pipeta automática p200.

En una realización más preferida, cada subcultivo de la etapa intermedia (c) tiene lugar durante un tiempo comprendido entre 48 y 96 horas, y preferiblemente 72 y 96 horas.

30 El medio de cultivo empleado en los subcultivos de la etapa intermedia (c) es preferiblemente el mismo que el previamente descrito y empleado en la etapa (a).

Las células sembradas al inicio de cada uno de estos subcultivos de la etapa (c) son tomadas del cultivo o subcultivo previo una vez ha finalizado éste.

35

En otra realización preferida, las células se siembran, para la realización de cada subcultivo, en una cantidad inicial de 10.000-15.000 células/cm² de superficie de soporte de cultivo, y preferiblemente de 15.000 células/cm².

- 5 En otra realización preferida, la suramina se añade al inicio de cada subcultivo de la etapa (c), es decir, cada 72 a 96 horas.

En otra realización preferida, la suramina se añade en el procedimiento de la invención en una concentración final de entre 100 y 300 μM, y preferiblemente de 200μM, a
10 partir de un stock 100 veces más concentrado.

Transcurrido el cultivo de la etapa (a) y/o los subcultivos de la etapa intermedia (c) del procedimiento de la invención se puede realizar, opcionalmente, un control de calidad, esterilidad y seguridad celular. Asimismo, se pueden repartir las células obtenidas en
15 distintas densidades para ser administradas, almacenadas y/o transportadas.

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención además comprende un paso adicional (d) que comprende el almacenaje, más preferiblemente la criopreservación, de la totalidad o de parte de las células progenitoras neurales
20 obtenidas. Aún más preferiblemente este almacenaje tiene lugar en recipientes estériles, preferiblemente en viales, de igual o distintas densidades entre sí. La “criopreservación” puede llevarse a cabo entre, preferiblemente, -80°C y -196°C.

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención tiene lugar en una sala
25 blanca, es decir, bajo unas condiciones controladas de esterilidad y seguridad que permitan el posterior uso clínico seguro de las células resultantes.

Así pues, el procedimiento de la presente invención se basa en el tratamiento farmacológico de las células progenitoras neurales en cultivo con suramina. El
30 procedimiento de la invención permite obtener células progenitoras neurales sanas en un número adecuado para su posterior uso clínico en terapia celular neural. Además, dichas células mantienen la capacidad proliferativa y la multipotencialidad durante más subcultivos que las que no reciben el tratamiento y presentan una mayor supervivencia y viabilidad. Este procedimiento además permite evitar el empleo de tejido embrionario
35 como fuente de células progenitoras neurales y reducir el número de animales

neonatales necesarios para la obtención de los cultivos.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit, de ahora en adelante “kit de la invención”, que comprende todos los reactivos, soportes y medios necesarios para
5 llevar a cabo el procedimiento de la invención como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, dicho kit comprende al menos: (i) un medio de cultivo como el definido anteriormente, y (ii) suramina. Preferiblemente, dicho kit comprende además, pero sin ningún tipo de limitación, antibióticos, antimicóticos o cualquier otro agente
10 para prevenir la contaminación de las células en cultivo, uno o más recipientes o soportes estériles para contener y/o cultivar las células y/o uno o más viales para el almacenaje y/o criopreservación de las células. Dicho kit puede comprender además las instrucciones para llevar a cabo el procedimiento de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de este kit de la invención para llevar a
15 cabo el procedimiento de la invención.

Las células progenitoras neurales obtenidas tras el procedimiento de la invención presentan características funcionales y estructurales que las diferencian de otras células progenitoras neurales aisladas, cultivadas, obtenidas y/o purificadas mediante
20 otros procedimientos distintos al procedimiento de la invención. Es comúnmente conocido en el arte que los perfiles de expresión génica de las células y, como consecuencia sus funciones celulares, difieren dependiendo del protocolo empleado para su cultivo y expansión *in vitro*. Así, el procedimiento de la invención emplea unas condiciones y reactivos de cultivo específicos, en particular el empleo de suramina,
25 que afectan al perfil de expresión génica y a las propiedades de las células progenitoras neurales finalmente obtenidas. En este sentido, y como se ha explicado anteriormente en la presente descripción, estas células obtenidas al final de este procedimiento presentan: i) una supervivencia aumentada; ii) una mayor vida media, y (iii) una preservada multipotencialidad a lo largo de los subcultivos, con respecto a
30 otras células progenitoras neurales obtenidas mediante otros procedimientos de expansión *ex vivo* donde no se emplea suramina. Por lo tanto, dichas células son necesariamente diferentes a otras células progenitoras neurales obtenidas por otros procedimientos del estado de la técnica.

35 Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a una población de células

progenitoras neurales obtenida u obtenible por el procedimiento de la invención, de ahora en adelante “población celular de la invención”.

5 La población celular de la invención puede administrarse directamente a un individuo para la regeneración o reparación celular nerviosa en patologías, enfermedades o condiciones clínicas asociadas al sistema nervioso, preferiblemente central, o pueden ser añadidas a composiciones farmacéuticas para su utilización en terapia celular.

10 Así, otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, “composición farmacéutica de la invención”, que comprende la población celular de la invención, preferiblemente en una densidad celular terapéuticamente efectiva. Más preferiblemente, esta composición farmacéutica además comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable siempre que éste no sea incompatible con la supervivencia y funcionalidad de las células de la invención comprendidas en la
15 composición farmacéutica.

La expresión "densidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la densidad de células de la invención que produzca el efecto deseado. La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por
20 ejemplo, la edad, peso, sexo, condición patológica o tolerancia del individuo al que le va a ser administrada la composición de la invención.

La composición farmacéutica de la invención puede estar adaptada para su aplicación mediante un “dispositivo adecuado para la inyección de células en un tejido”. Éste
25 sería cualquier dispositivo o instrumento que pueda ser útil para la inyección de células en circulación sanguínea o en un tejido. Ejemplos de este tipo de dispositivos o instrumentos son, pero sin limitarnos, jeringas, viales, catéteres, agujas, cánulas, o en general cualquier instrumento que pueda emplearse en terapia celular, incluyendo los conocidos en el estado de la técnica.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a la población celular de la invención para su uso en terapia celular. Preferiblemente, este aspecto de la invención se refiere a las células o población celular de la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades, patologías o condiciones clínicas relacionadas con el
35 sistema nervioso, preferiblemente con el sistema nervioso central. En una realización

más preferida, las enfermedades, patologías o condiciones clínicas relacionadas con el sistema nervioso se seleccionan de la lista que consiste en: enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, etc., ictus o isquemias, traumatismos craneoencefálicos, axotomías, retinosis pigmentaria, lesiones nerviosas como por ejemplo lesiones de médula espinal, o similares

Se entiende por "terapia celular" o "citoterapia" la terapia en la cual se administra material celular o células a un individuo, en el contexto de la presente invención las células o población celular de la invención vivas.

La composición farmacéutica a la que se refiere la invención podría administrarse, pero sin que sirva de limitación, mediante trasplante a nivel sistémico o mediante inyección local en el tejido afectado.

En general, la composición farmacéutica a la que se refiere la invención es para el tratamiento y/o prevención de cualquier situación clínica en la que haya que restaurar o regenerar la totalidad o parte de la funcionalidad del sistema nervioso, preferiblemente central, en un individuo con algún tipo de lesión o patología del sistema nervioso.

En otra realización preferida, el individuo que presenta la enfermedad, patología o condición patológica asociada al sistema nervioso es un mamífero, más preferiblemente un primate, aún más preferiblemente un humano.

La composición farmacéutica a la que se refiere la presente invención puede administrarse sola o en combinación, simultánea o secuencial, con otros medicamentos o agentes terapéuticos destinados al tratamiento y/o prevención de enfermedades, patologías o condiciones clínicas relacionadas con el sistema nervioso, preferiblemente con el sistema nervioso central.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la

invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **FIG. 1. Muestra el efecto del tratamiento con suramina en neuroesferas obtenidas de la zona subventricular de ratas neonatales.** Aspecto de neuroesferas crecidas en condiciones control **(A)** y tratadas con suramina 200 μ M **(B)**. Barras: 100 μ m. **(C)** Diámetro medio de neuroesferas control y tratadas con suramina. Se muestra el porcentaje respecto al valor control. Las barras muestran el valor medio \pm el error estándar de la media (e.e.m.). Los datos reúnen medidas de diámetros de neuroesferas obtenidas de 7 cultivos diferentes. * $p < 0.05$ (test t de Student). **(D)** Medida del porcentaje de muerte celular tras sucesivos subcultivos o pases (p) (p3, p4, p5, p6, p7) en cultivos de neuroesferas control y tratados con suramina. Los datos corresponden a la media \pm e.e.m., n=4. * $p < 0,05$ (test t de Student). **(E)** Porcentaje de muerte celular por apoptosis en cultivos de neuroesferas control y tratadas con suramina. Los datos representan la media \pm e.e.m., n=7. * $p < 0,001$ (test t de Student).

20 **FIG. 2. Muestra el aspecto de neuroesferas control y tratadas con suramina tras seis pases del cultivo.** Se observa que las neuroesferas control pierden capacidad proliferativa y se adhieren al frasco, algo que no se observa en ninguna de las neuroesferas de los frascos tratados con suramina. Barras: 100 μ m.

25 **FIG. 3: Muestra la multipotencialidad de las células progenitoras neurales procedentes de los cultivos de neuroesferas tratados con suramina 200 μ M.** Se muestran fotomicrografías tomadas en un microscopio de epifluorescencia de células procedentes de los cultivos de neuroesferas tratados con suramina sembradas sobre un sustrato adherente y en ausencia de mitógenos para favorecer la diferenciación celular y tras siete días en cultivo. En estas condiciones se forman las células de la estirpe neural: astrocitos (A, identificados por inmunocitoquímica para la proteína fibrilar ácida de la glía), neuronas (B, identificadas por inmunocitoquímica para la proteína doblecortina) y precursores de oligodendrocitos (PREC. OLIGODEN.) (C, identificados por inmunocitoquímica para el sulfato de condroitina proteoglicano NG2, se muestran también los núcleos de las células presentes en ese campo, teñidas con

un colorante específico de ácidos nucleicos). Barras: 50 µm.

EJEMPLOS

5 A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que ponen de manifiesto la efectividad del procedimiento de la invención.

EJEMPLO 1. PROCEDIMIENTO DE CULTIVO DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURALES NEONATALES Y TRATAMIENTO CON SURAMINA

10

Para aplicar la invención propuesta se realizaron cultivos de neuroesferas provenientes de ratas neonatales siguiendo los protocolos ya descritos con detalle anteriormente (Talaverón, R., *et al.*, 2013, *PLoS One* 8:e54519; Talaverón, R., *et al.*, 2014, *Glia* 62, 623-638; Talaverón, R., *et al.*, 2015, *Front. Cell. Neurosci.* 9, 411).
15 Brevemente, se aisló la zona subventricular de 6 ratas de siete días y se sometió a un tratamiento enzimático y mecánico como el descrito en los artículos mencionados, tras el cual la suspensión de células resultante se sembró en un frasco T25 en medio de cultivo con una composición definida (DMEM-F12 adicionado de suplemento B-27, 2 mM de Glutamax®, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 0,25
20 µg/ml de anfotericina y suplementado con factor de crecimiento epidérmico a 20 ng/ml y factor básico de crecimiento de fibroblastos a 10 ng/ml) y se mantuvo en un incubador a 37°C y 5% de CO₂. A las 48-72h se comenzaron a formar neuroesferas a partir de las células progenitoras neurales del cultivo y a partir de entonces se realizó un subcultivo de las células cada 72-96h. Para ello, se centrifugó el contenido del
25 frasco a 150g durante 5 minutos, se resuspendió el precipitado en 200 µl del medio de cultivo y se disgregaron mecánicamente las neuroesferas por aspiraciones sucesivas a través de una punta de pipeta p200. Se añadieron 5 ml de medio y se volvió a centrifugar. Tras retirar el sobrenadante se resuspendió el precipitado en 1 ml de medio de cultivo, se contaron las células resultantes en una cámara de Neubauer y se
30 procedió a sembrarlas de nuevo a razón de 15.000 células/cm² con 5 ml de medio fresco.

Para el tratamiento con suramina se preparó un stock 100X (20 mM) de suramina en agua milliQ, se filtró y se hicieron alícuotas de 50 µl que se congelaron hasta su

utilización. El tratamiento de las células con suramina comenzó tras realizar dos subcultivos al cultivo inicial de neuroesferas, pues es cuando se logra purificar la población de células progenitoras y eliminar las células muertas del mismo. Para ello, tras el pase se sembraron frascos T25 con la densidad celular mencionada
5 anteriormente y 5 ml de medio de cultivo a los que se añadieron 50 μ l de una alícuota 100X del stock de suramina. Este proceso se repitió cada 72-96h. Las células se mantuvieron con este tratamiento vivas y en autorrenovación al menos durante 10 subcultivos.

10 Una vez se sembraron los frascos con células de neuroesferas tratadas con suramina se hizo un seguimiento de la proliferación y grado de muerte celular de las mismas y se comparó frente a frascos control, que no recibieron tratamiento con suramina, a los que se les añadió la misma cantidad del vehículo (50 μ l de agua milliQ). Así, 72h tras la siembra, las neuroesferas tratadas con suramina presentaron un diámetro
15 significativamente superior a las neuroesferas de los frascos control (Figura 1A, B y C). Cuando se realizaron los sucesivos subcultivos se procedió a contar el número de células vivas y muertas en cada frasco. Los frascos tratados con suramina siempre presentaron un porcentaje de células vivas significativamente superior y un porcentaje de células muertas significativamente inferior que los frascos control (Figura 1D). Al
20 evaluar el grado de muerte celular por apoptosis mediante la técnica de TUNEL, se demostró que las células tratadas con suramina presentaron un porcentaje de muerte por apoptosis inferior ($p < 0,001$) al de los frascos sin tratamiento (Figura 1E).

Además se observó que, tras el quinto-sexto subcultivo, las células de los frascos control iban perdiendo capacidad de autorrenovación y, por tanto, capacidad para
25 seguir formando neuroesferas y además iban muriéndose o comenzando a adherirse a la superficie del frasco para diferenciarse (Figura 2). Sin embargo, esto no ocurrió con las células de los frascos tratados con suramina, que no se adherían a la superficie del frasco y mantuvieron su capacidad de formar neuroesferas viables al menos tras diez
30 subcultivos (Figura 2).

Por lo tanto, se puede concluir que el tratamiento de las neuroesferas obtenidas de la zona subventricular de ratas neonatales con suramina 200 μ M produce un aumento significativo en la supervivencia de estas células y en el número de subcultivos en el
35 que se mantienen proliferativas y viables.

REIVINDICACIONES

1. Uso de la suramina como reactivo o suplemento para la obtención y expansión *in vitro* de células progenitoras neurales.
5
2. Uso según la reivindicación 1, donde la suramina se encuentra a una concentración de entre 100 y 300 μM .
3. El uso según la reivindicación 2, donde la suramina se encuentra a una
10 concentración de 200 μM .
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde las células progenitoras neurales proceden de ratas neonatales.
- 15 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde las células progenitoras neurales proceden de la zona subventricular del cerebro.
6. Procedimiento para el cultivo *in vitro* de células progenitoras neurales que comprende las siguientes etapas:
20
 - a. preparar un cultivo de neuroesferas a partir de una población aislada de células progenitoras neurales, y
 - b. añadir suramina al cultivo de la etapa (a).
- 25 7. Procedimiento según la reivindicación 6, donde la suramina se añade en una concentración de 200 μM .
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, donde las células progenitoras neurales proceden de ratas neonatales.
30
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde las células progenitoras neurales proceden de la zona subventricular del cerebro.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, donde el cultivo de la etapa (a) tiene lugar en presencia de un medio de cultivo suplementado con factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento básico de fibroblastos.
- 5 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde el cultivo de la etapa (a) tiene lugar a 37°C, 5% CO₂ y durante un tiempo comprendido entre 48 y 72 horas.
- 10 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, que además comprende una etapa (c) posterior a la etapa (b), que comprende la realización de subcultivos adicionales consecutivos a partir del cultivo obtenido tras la etapa (a).
13. Procedimiento según la reivindicación 12, donde cada subcultivo de la etapa (c) tiene lugar durante un tiempo comprendido entre 48 y 96 horas.
- 15 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, donde las neuroesferas generadas en el cultivo de la etapa (a) y en los subcultivos de la etapa (c) se disgregan previamente a la realización del siguiente subcultivo.
- 20 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde las células se siembran, para la realización de cada subcultivo, en una cantidad de 10.000-15.000 células/cm² de superficie de soporte de cultivo.
- 25 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, donde se añade suramina al inicio de cada subcultivo de la etapa (c).
17. Procedimiento según la reivindicación 16, donde la suramina se añade en una concentración final de entre 100 y 300 µM.
- 30 18. Procedimiento según la reivindicación 17, donde la suramina se añade en una concentración final de 200 µM.

FIG. 1

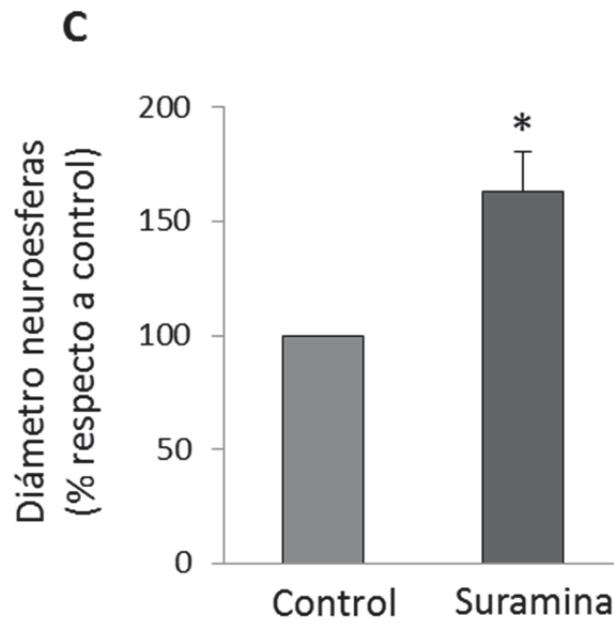
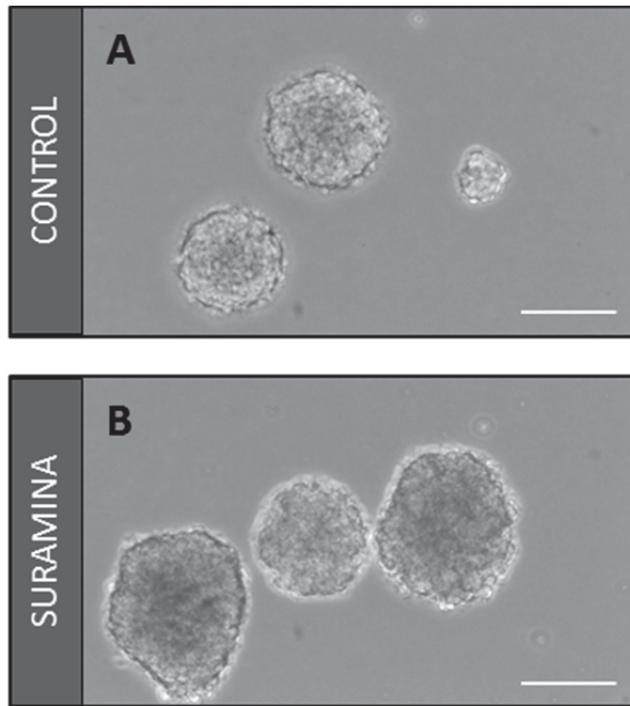


FIG. 1 (cont.)

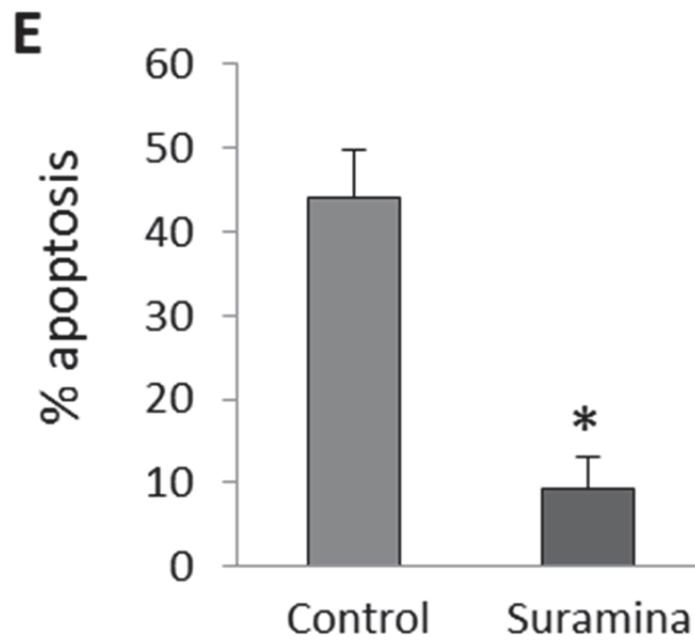
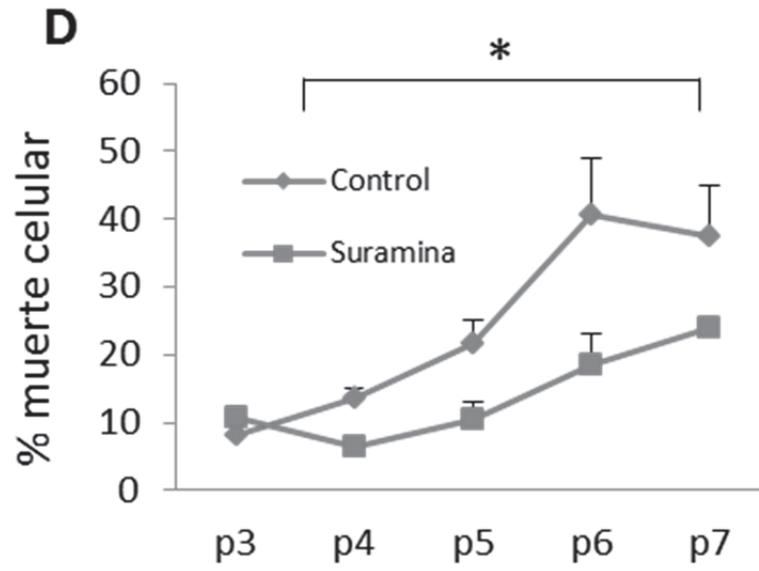


FIG. 2

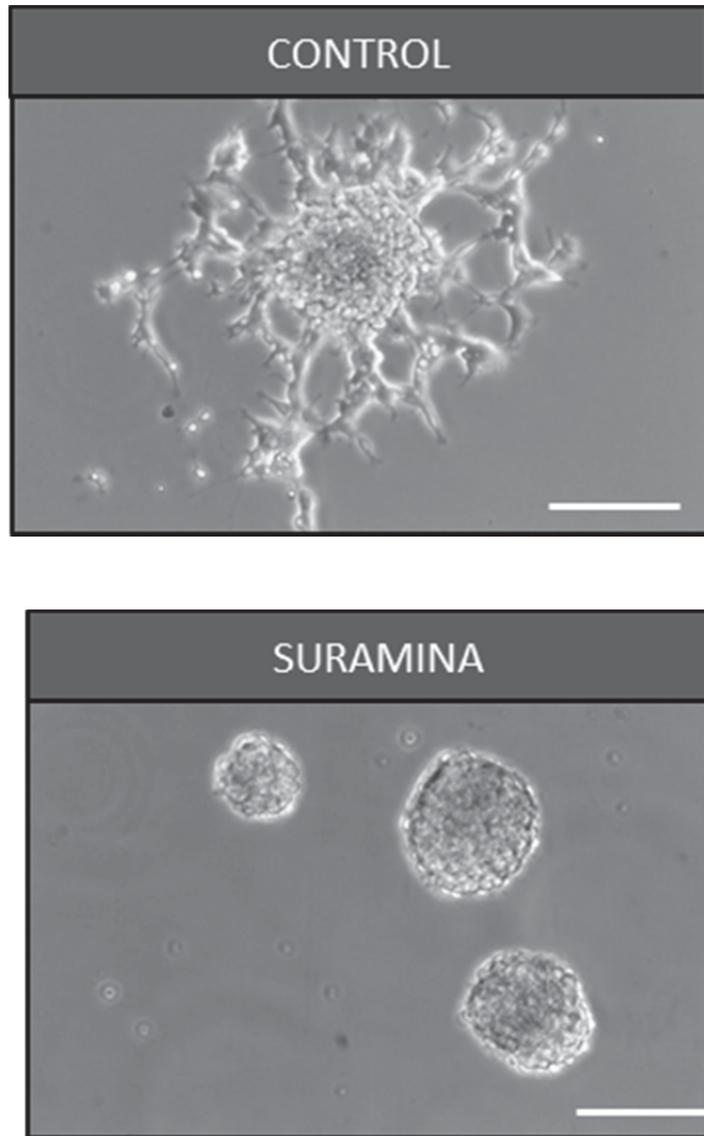
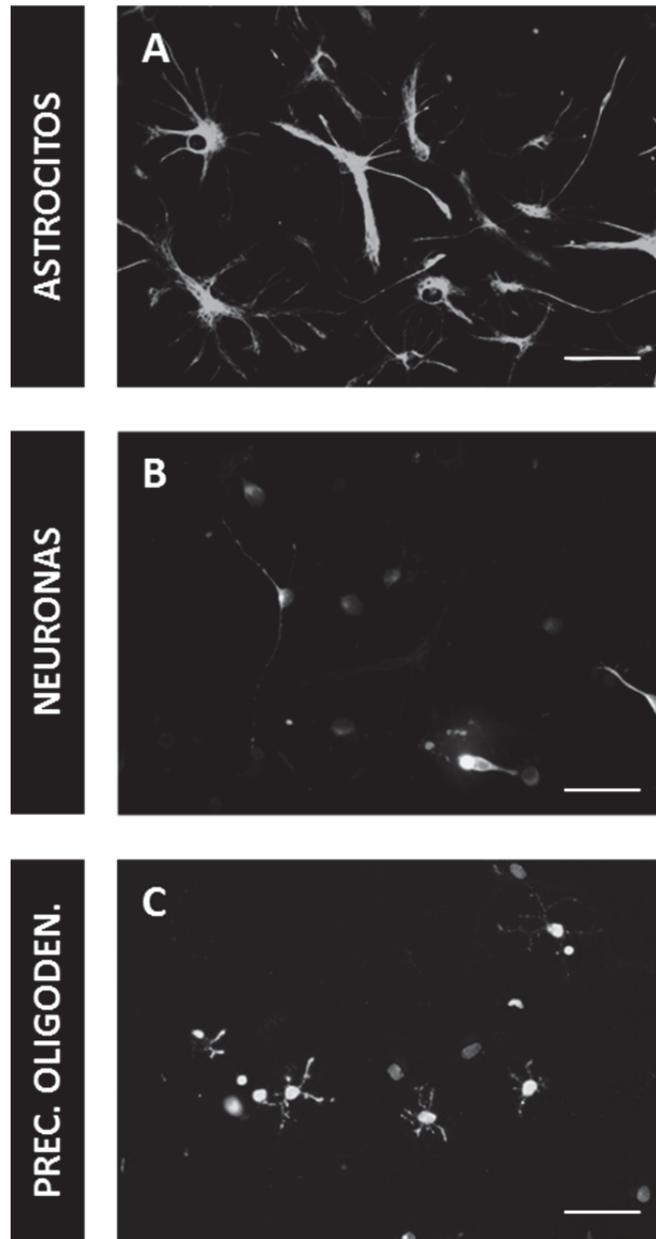


FIG. 3





- ②¹ N.º solicitud: 201830557
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 07.06.2018
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12N5/02** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LIN et al. "Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis". Developmental Biology, 20070117 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. Irish Vivian; Chitwood Daniel, 17/01/2007, Vol. 302, Nº 1, Páginas 356 - 366, ISSN 0012-1606, <DOI: doi:10.1016/j.ydbio.2006.09.017>. (ver apartado "Discussion")	1-5
Y		6-18
Y	TALAVERON ROCIO et al. Neural progenitor cells isolated from the subventricular zone present hemichannel activity and form functional gap junctions with glial cells. Frontiers in Cellular Neuroscience OCT 13 2015. , 30/09/2015, Vol. 9, Páginas Article No.: 411, ISSN 1662-5102(print) ISSN 1662-5102(electronic). ver apartado "Neural Progenitor Cell Culture"	6-18
A	WO 2008028531 A1 (NEUROPROGEN GMBH LEIPZIG et al.) 13/03/2008, todo el documento.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
23.01.2019

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE, XPESP/Elsevier, Compendex/EI, INSPEC/IEE, y Bases de Datos TXT