(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
6 de octubre de 2011 (06.10.2011)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/121158 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 5/0797 (2010.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2011/070191

(22) Fecha de presentación internacional:
22 de marzo de 2011 (22.03.2011)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201030493 31 de marzo de 2010 (31.03.2010) ES

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados salvo US)*: **FUNDACIÓN HOSPITAL NACIONAL DE PARAPLÉJICOS PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA INTEGRACIÓN (FUHNPAIIN)** [ES/ES]; Finca La Peraleda, s/n, E-45071 Toledo (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes *(para US solamente)*: **DE CASTRO SOUBRIET, Fernando** [ES/ES]; Fundación Hospital Nacional de Parapléjicos para la Investigación y la Integración (FUHNPAIIN), Finca La Peraleda, s/n, E-45071 Toledo (ES). **ARENZANA SANAGÉRICO, Francisco Javier** [ES/ES]; Fundación Hospital Nacional de Parapléjicos para la Investigación y la Integración (FUHNPAIIN), Finca La Peraleda, s/n, E-45071 Toledo (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))*

WO 2011/121158 A2

(54) **Title**: METHOD FOR OBTAINING OLIGODENDROCYTE PRECURSOR CELLS

(54) **Título** : MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRECURSORAS DE OLIGODENDROCITOS

(57) **Abstract**: The invention relates to a method for purifying cerebral cortex oligodendrocyte precursor (OP) cells from the cerebral cortex of a mammal that is more than a week old, said method comprising: obtaining an isolated brain sample; selecting the OPs of the previously obtained biological sample; and cultivating the OPs in conditions of cellular proliferation, migration, mobility or differentiation. The invention also relates to the OPs obtained by the method according to the invention and to the cell lines derived using said method.

(57) **Resumen**: Método para la purificación de células precursoras de oligodendrocitos (POs) de corteza cerebral a partir de la corteza cerebral de un mamífero de edad superior a una semana, que comprende: obtener una muestra aislada de cerebro; seleccionar las POs de la muestra biológica obtenida anteriormente y cultivar las POs en condiciones de proliferación, migración, movilidad o diferenciación celular. Además, la presente invención se refiere a los POs obtenidos por el método de la invención y a las líneas celulares derivadas del mismo.

MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRECURSORAS DE OLIGODENDROCITOS

La presente invención se encuentra dentro del campo de la neurobiología y la biomedicina. Específicamente, se refiere a un método para la purificación de células precursoras de oligodendrocitos (POs) de corteza cerebral a partir de ejemplares de edad madura.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Los axones de muchas neuronas de vertebrados están aislados por la vaina de mielina, que aumenta enormemente la velocidad con la que el axón puede conducir el potencial de acción. Los oligodendrocitos son los responsables de la formación de la mielina en el sistema nervioso central (SNC). Estos oligodendrocitos envuelven el axón capa a capa con su propia membrana hasta formar una estrecha espiral, la vaina, que aísla la membrana del axón de manera que no se pierde apenas intensidad del impulso eléctrico. La vaina se interrumpe en los nódulos de Ranvier, que están espaciados regularmente y son puntos donde se concentran casi todos los canales de sodio. Estas excelentes características de la envuelta del axón hacen que la despolarización de la membrana en un nodo se extienda casi inmediatamente y de manera pasiva al siguiente. Así, el potencial de acción se propaga a lo largo del axón mielinizado saltando de nodo en nodo. Esta conducción tiene dos ventajas principales: los potenciales de acción viajan más rápido y la energía metabólica se conserva porque sólo se dispersa en pequeñas regiones de la membrana axonal en los nódulos de Ranvier.

La importancia de la mielinización viene demostrada por las enfermedades desmielinizantes, como la esclerosis múltiple, en la que la vaina de mielina en algunas regiones del SNC es destruida por algún mecanismo todavía desconocido. Los oligodendrocitos son células post-mitóticas, totalmente diferenciadas, que no se dividen *in vivo*, lo cual dificulta su cultivo *in vitro* a

largo plazo (Verity y cols, 1993 J Neurochem. 60(2):577-87). Los POs, que tienen capacidad de proliferar, migrar y de diferenciarse, ofrecen la posibilidad de estudiar los mecanismos moleculares y celulares de diferenciación morfofuncional, así como los procesos de mielinización, desmielinización y remielinización *in vitro,* y pueden ser una fuente para promover la mielinización y/o la remielinización *in vivo*, con especial importancia en patologías desmielinizantes.

Todas las células del SNC provienen de las células troncales neuroepiteliales. Éstas dan lugar tanto a las neuronas como a la macroglia. Las células gliales son los astrocitos y los oligodendrocitos, que se distinguen por varias características. Los oligodendrocitos son de menor tamaño y presentan mayor densidad en su núcleo y su citoplasma. Carecen de filamentos intermedios y glucógeno en su citoplasma y presentan un elevado número de microtúbulos (Peters y cols, 1991, Anat Rec; 229(3):384-98).

El oligodendrocito puede tener muchos procesos o extensiones celulares y cada una de ellas contacta y envuelve repetidas veces una porción de axón neuronal. Cuando estas envueltas se condensan, la espiral de membrana forma la vaina de mielina. En el mismo axón, los segmentos de mielina adyacentes pertenecen a distintos oligodendrocitos y cada unidad de mielina termina cerca de un nódulo de Ranvier (Bunge, 1968, Physiol Rev. 48(1):197-251).

Antes de madurar hasta formar la vaina de mielina, los oligodendrocitos pasan por varias etapas de desarrollo definidas por la expresión de receptores de superficie específicos y por su respuesta a distintos factores de crecimiento, entre otras moléculas. Así, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés *"platelet-derived growth factor"*) se asocia tanto a la autorrenovación como a la generación de oligodendrocitos (Richardson y cols, 1988, Nature. 9; 333(6173):562-5.; Raff y cols, 1989 Development. 105(3):595-603; Noble y cols, 1988 Nature. 9; 333(6173):560-2).

Así, los POs se caracterizan por expresar Nestina$^+$, A2B5$^+$, NG2/AN2$^+$, plp-dm20$^+$, PDGFRα$^+$, GD3$^+$, CNP$^+$. Posteriormente los POs dan lugar a los preoligodendrocitos que expresan los mismos marcadores excepto Nestina y además presentan O4 (Rowitch, 2004, Nat Rev Neurosci. 5:409-417; de Castro y Bribián, 2005, Brain Res Brain Res Rev. 49(2):227-41)

El inicio de la diferenciación terminal (oligodendrocito inmaduro) se asocia a la síntesis y a la presencia en la superficie celular de galactosilceramidas (GalC), que reconoce el anticuerpo contra O1.

Los oligodendrocitos maduros expresan la proteína básica de la mielina (MBP) y la proteína proteolípida (PLP) y sintetizan la membrana de mielina. Otros marcadores moleculares expresados por los oligodendrocitos maduros son O4$^+$, RIP$^+$, GalC$^+$, ACNP$^+$, MAG$^+$ (Rowitch, 2004, Nat Rev Neurosci. 5:409-417; de Castro y Bribián, 2005, Brain Res Brain Res Rev. 49(2):227-41).

Aunque la mayoría de los estudios de los progenitores O-2A y los oligodendrocitos maduros se han llevado a cabo en roedores, tanto células O-2A, como células multipolares A2B5$^+$/O4$^+$, así como oligodendrocitos maduros O1$^+$ han sido identificados en cerebro fetal humano (Rivkin y cols, 1995, Ann Neurol; 38(1):92-101).

En el adulto, tanto los los oligodendrocitos como los POs se distribuyen de manera homogénea por todo el SNC, principalmente en la sustancia blanca, pero también en la sustancia gris.

La proliferación y diferenciación de los POs (incluyendo el subsiguiente proceso de mielinización) siguen un gradiente caudorrostral a lo largo del tubo neural. Cada paso del proceso de diferenciación, desde la fase de precursor hasta la de oligodendrocito maduro, puede ser identificado por cambios en la morfología celular y en la expresión de marcadores inmunocitoquímicos, lo que se

acompaña de un descenso paulatino de la capacidad proliferativa y migratoria (Almazán, G y cols, 2001, Microsc Res Tech. 15; 52(6):753-65; Rowitch, D, 2004, Nat Rev Neurosci. 5(5):409-19). La expresión de estos marcadores sirve incluso para diferenciar entre diversas poblaciones de oligodendrocitos. De hecho, se ha propuesto la existencia de dos poblaciones distintas de POs: una población dependiente del PDGF, población que denominamos PDGFRα$^+$, y otra independiente de este factor de crecimiento, población plp/dm20$^+$ (Spassky, N y cols, 2000, Glia. 15; 29(2):143-8; Spassky, N y cols, 1998, J Neurosci. 15;18(20):8331-43.; Pringle, NP y Richarson, WD, 1993, Development.117(2):525-33.; Le Bras, B, 2005, Int J Dev Biol. 49(2-3):209-20). Ambas poblaciones de oligodendrocitos experimentan un variado patrón de migración para colonizar todo el SNC durante el desarrollo.

Durante el desarrollo, los oligodendrocitos se generan a partir de POs. Este tipo celular se ha descrito en el SNC de humanos adultos y constituye una fuente celular interesante para su uso en terapias regenerativas para el tratamiento de lesiones desmielinizantes, como por ejemplo la esclerosis múltiple. Este potencial resulta especialmente interesante, porque se ha demostrado que los axones pueden ser mielinizados a lo largo de toda la vida de las neuronas, incluso después de haber sufrido un proceso de desmielinización (Setzu y cols., 2004, Glia 45:307-311). En respuesta al daño desmielinizante, los POs endógenos migran hacia la zona de lesión, pero no son capaces de penetrar y remielinizar de manera efectiva, sino que se quedan en la periferia o, si penetran en la zona de lesión, mueren (Chang y cols, 2002, N Engl J Med. 346:165-173).

El estudio de los POs durante el desarrollo embrionario ha permitido conocer los mecanismos moleculares que regulan la migración, proliferación y diferenciación de este tipo celular. Sin embargo, existen pocos datos acerca de la biología de los POs en cerebro adulto, ya que hasta la fecha sólo se han podido aislar de manera eficiente los POs de embriones o neonatos. Por tanto, no se ha podido estudiar cuál es la fisiología de estos POs adultos, sus

similitudes y divergencias con lo visto en POs embrionarios o postnatales tempranos.

La eficacia de cualquier proceso de purificación de un tipo celular dado es inversamente proporcional al tiempo que transcurre desde la obtención de la muestra hasta el momento de la siembra de las células obtenidas en la combinación de un medio de cultivo y un sustrato que permitan su supervivencia. La purificación de POs a partir de tejido embrionario o perinatal es un proceso mucho más eficiente que a partir de tejido maduro o adulto, ya que en estadio embrionario o a corta edad la cantidad absoluta y la proporción relativa de POs son significativamente mayores, y con la edad, además, el potencial de supervivencia celular disminuye.

Hasta la fecha, la mayor parte de los estudios se han realizado con cultivos de POs purificados a partir de cerebro embrionario, preferentemente, o perinatal (desde recién nacido hasta, máximo, 3-4 días de edad). Hay pocos estudios en los que se obtengan POs a partir de tejido adulto, con la excepción del nervio óptico de rata (Shi y cols, 1998, J Neurosci. 18(12):4627-4636). Esto ha imposibilitado el estudio de la neurobiología de los POs adultos, lo cual es crucial para el avance de la investigación sobre las enfermedades desmielinizantes en cuanto a la búsqueda de nuevas terapias farmacológicas y al desarrollo de la medicina regenerativa se refiere.

Las líneas celulares son una herramienta útil y de uso frecuente en la búsqueda de nuevos fármacos. Las líneas celulares se obtienen de forma espontánea o artificial a partir de cultivos celulares primarios. Estas células pueden proliferar indefinidamente y se usan frecuentemente como modelos para el estudio de las células de las que proceden.

En el caso de la oligodendroglia, se han descrito líneas celulares oligodendrogliales de rata derivadas de cerebros de animales de 2 días de edad, como la línea CG-4, descrita por Louis y cols en 1992 (J Neurosci Res.

1992; 31(1):193-204) o la línea OL-1, descrita por Lagarde y cols en 2007 (Int J Dev Neurosci. 2007 25(2):95-105). Las líneas celulares oligodendrogliales humanas descritas proceden de gliomas, oligodendrogliomas o de oligodendrocitos fusionados con células tumorales humanas (Buntinx y cols 2003, J Neurocytol. 32(1):25-38). Estas células de origen tumoral no pueden usarse de manera segura en el estudio de la neurobiología oligodendroglial, ni como herramienta terapéutica para el tratamiento de las enfermedades desmielinizantes, pues se desconoce su proceso de inmortalización. Por todo esto, una línea celular de POs humanos obtenida mediante un proceso de inmortalización controlada sería de gran utilidad para la realización de ensayos de respuesta a fármacos y ensayos de terapia celular en enfermedades desmielinizantes.

El SNC está rodeado de tres capas de tejido conectivo de origen mesodérmico conocidas como las meninges (duramadre, aracnoides y piamadre), que protegen el SNC, entre otras cosas, frente a infecciones y contienen el líquido cefalorraquídeo (LCR) en el espacio subaracnoideo, protegiendo también mecánicamente el SNC. Los plexos coroideos son las zonas de los ventrículos cerebrales donde se produce el LCR y están formados por capilares sanguíneos enrollados sobre sí mismos, limitados por células endoteliales, revestidos de un tejido conjuntivo laxo y finalmente recubiertos por un tejido epitelial. Para la purificación de los POs es necesaria la completa retirada tanto de las meninges como de los plexos coroideos, para evitar la contaminación del cultivo con células procedentes de otros tejidos. Los métodos de purificación de POs descritos hasta ahora solucionan la retirada de las meninges y los plexos coroideos con una ardua, lenta, laboriosa y delicada disección con pinzas bajo el microscopio estereoscópico, lo cual incrementa la muerte celular significativamente especialmente en ejemplares adultos.

Es necesario, por tanto, un procedimiento sencillo y que permita la purificación de POs a partir de tejido neural maduro o adulto, que permita el estudio de la neurobiología de esta población celular, así como la realización de ensayos de

respuesta a fármacos y ensayos de terapia celular en enfermedades desmielinizantes.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención proporcionan un método para el aislamiento y la purificación de POs de cerebro maduro y adulto que permite:

i. estudiar la neurobiología de POs adultos, más concretamente los procesos de proliferación, migración y diferenciación celular,
ii. estudiar los efectos de determinados fármacos en los POs,
iii. realizar estudios de criba de moléculas para encontrar nuevas dianas terapéuticas para las enfermedades desmielinizantes y
iv. ensayar terapias celulares en modelos animales de lesiones desmielinizantes.

Además, el procedimiento de la presente invención permite disminuir la duración del proceso de purificación celular e incrementa considerablemente la supervivencia de los POs y, con ello, la eficacia del método valorada en el número final de células obtenido.

Esto se consigue eliminando la mayor parte de las meninges y los plexos coroideos mediante una digestión enzimática. Como se detalla en el ejemplo 1, la incubación de los cerebros previamente disecados en una solución de la cistein-proteasa papaína a una concentración (variable según la edad) durante 5 minutos a 37ºC, permite la rápida separación de estos tejidos del tejido nervioso de interés.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de POs a partir de la corteza cerebral de un mamífero de edad superior a una semana, que comprende:

a) obtener una muestra aislada de cerebro,
b) seleccionar las POs de la muestra biológica obtenida en (a) y

c) cultivar las POs en condiciones de proliferación o diferenciación.

El término "precursor de oligodendrocito" o PO tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una célula que aún no se ha diferenciado en un oligodendrocito maduro, y que tiene potencial para diferenciarse en oligodendrocitos. En un aspecto de la invención, el PO puede caracterizarse por el fenotipo Nestina$^+$/PSA-NCAM$^+$/plp-dm20$^+$/PDGFRα$^+$. En otro aspecto de la invención, el PO puede caracterizarse por el fenotipo Nestina$^+$/A2B5$^+$/NG2/AN2$^+$/plp-dm20$^+$/PDGFRα$^+$/GD3$^+$/CNP$^+$. Incluso en otro aspecto de la invención, el PO puede caracterizarse por el fenotipo A2B5$^+$/NG2/AN2$^+$/plp-dm20$^+$/PDGFRα$^+$/O4$^+$/GD3$^+$/CNP$^+$. Nestina, PSA-NCAM, PLP, PDGFRα, A2B5, NG2, O4, GD3 y CNP se refieren a la expresión de marcadores citoplásmicos o de superficie que sean proteínas que se reconozcan por los anticuerpos Nestina, PSA-NCAM, PLP, PDGFRα, A2B5, NG2, O4, GD3 y CNP, respectivamente.

El término "cerebro" tal y como se usa en la presente invención, se refiere a tejido neural de mamífero de edad superior a 7 días, incluyendo el prosencéfalo, el hipocampo, el cerebelo, la corteza, el estriado, el telencéfalo, el diencéfalo, el mesencéfalo, el hipotálamo, el locus coeruleus y el rombencéfalo.

El término "mamífero" tal y como se usa en la presente invención, se utiliza para referirse a cualquier organismo del superreino Eukaryota, reino Metazoa, phylum Chordata, subphylum Craniata, superclase Gnathostomata y clase Mammalia, y se refiere a cualquier especie de mamífero, incluyendo humanos, primates no humanos, roedores, equinos, caninos, felinos, bovinos, porcinos, ovinos y lagomorfos.

Preferiblemente, el mamífero tiene más de una semana de edad. Más preferiblemente, el mamífero tiene más de dos semanas de edad. Aún más preferiblemente, el mamífero tiene entre 15 días y 9 meses de edad. Mucho

más preferiblemente, el mamífero tiene entre 15 días y 6 meses de edad. Preferiblemente, el paso (b) comprende la digestión enzimática de la muestra obtenida según (a). Más preferiblemente, la enzima empleada para la digestión del paso (b) es la papaína. Aún más preferiblemente, la concentración de papaína empleada para la digestión del paso (b) es de entre 50 y 200 microgramos/mililitro.

En una realización preferida, el paso (b) comprende:

i. una primera digestión enzimática de la muestra obtenida según (a),

ii. retirar las meninges y los plexos coroideos,

iii. disociar mecánicamente el tejido nervioso resultante del paso (ii), y

iv. disociar enzimáticamente el tejido nervioso resultante del paso (iii).

Preferiblemente, la concentración de papaína empleada en el paso (i) es de entre 150 y 200 microgramos/mililitro. Más preferiblemente, la concentración de papaína empleada en el paso (i) es de entre 160 y 190 microgramos/mililitro. Aún más preferiblemente, la concentración de papaína empleada en el paso (i) es de entre 170 y 185 microgramos/mililitro.

Preferiblemente, la concentración de papaína empleada en el paso (iv) es de entre 50 y 120 microgramos/mililitro. Más preferiblemente, la concentración de papaína empleada en el paso (iv) es de entre 60 y 110 microgramos/mililitro. Aún más preferiblemente, la concentración de papaína empleada en el paso (iv) es de entre 70 y 100 microgramos/mililitro.

Preferiblemente, el tiempo de la digestión enzimática empleada en el paso (b) es de entre 2 y 22 minutos.

Preferiblemente, el tiempo de la digestión enzimática empleada en el paso (i) es de entre 3 y 7 minutos. Más preferiblemente, el tiempo de la digestión enzimática empleada en el paso (i) es de entre 4 y 6 minutos.

Preferiblemente, el tiempo de la digestión enzimática empleada en el paso (iv)

es de entre 8 y 18 minutos. Más preferiblemente, el tiempo de la digestión enzimática empleada en el paso (iv) es de entre 9 y 16 minutos.

Preferiblemente, el paso (b) comprende una digestión enzimática de la muestra obtenida según (a) con DNasa. Más preferiblemente, el paso (b) comprende una digestión enzimática de la muestra obtenida según (a) con DNasa-I.

La eficiencia del método de la invención se ha contrastado con el método de purificación celular mediante FACS (del inglés *"Fluorescence Activated Cell Sorting"*) y con el kit comercial denominado "*Oligodendrocyte Selection Kit*" de Heraclitus Biosciences (HB), como está descrito en los ejemplos 1-3. Además, se contrasta también la eficiencia del método de la invención con el descrito en el ejemplo 4, donde se purifican POs a partir de nervio óptico de rata adulta mediante inmuno-adsorción.

Ejemplo	Método	Eficiencia en adulto (miles de células/animal)	Eficiencia en perinatal (miles de células/animal)
1	Invención	68,5	263
2	FACS	10	-
3	Kit HB	7,5	250
4	Inmuno-adsorción	2,5	-

Tabla 1. Comparativa de la eficiencia del método que describe la invención con la de otros métodos ya descritos (FACS, Kit de Heraclitus Biosciences (Kit HB) e inmuno-adsorción).

Como muestra la tabla 1, la eficiencia del método de la invención es mucho más elevada que la de cualquier otro método descrito hasta ahora para la purificación de POs a partir de tejido maduro o adulto. La invención presenta un método casi 7 veces más eficiente que el método del ejemplo 2, casi 10 veces más eficiente que el método del ejemplo 3 y más de 27 veces más eficiente que el método del ejemplo 4.

Otro aspecto de la invención se refiere a la célula obtenida u obtenible

mediante el método de la invención, de ahora en adelante denominada "célula de la invención". Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a un cultivo celular derivado de la célula de la invención. Otra realización más preferida se refiere a una línea celular derivada de la célula de la invención. Más preferiblemente, la línea celular se ha inmortalizado mediante transfección génica.

El término "inmortalización" se refiere al proceso de transformación de una célula que consiste en la adquisición de dicha célula de dividirse ilimitadamente en el tiempo, sin sufrir envejecimiento o senescencia.

El término "transfección génica" se refiere a cualquier técnica o procedimiento que permita la integración en una serie de células de un organismo vivo de un gen exógeno, o "transgén", y que confiere a dichas células una nueva propiedad biológica. Este procedimiento es sobradamente conocido por un experto en la materia, y puede llevarse a cabo mediante vectores virales, mediante métodos químicos o físicos. Preferiblemente, el método de transfección es la infección viral. El transgén o gen exógeno se refiere a un ADN normalmente no residente, ni presente en la célula que se pretende transformar. En el caso particular de la presente invención el ADN codifica para un gen de inmortalización celular. Pueden considerarse genes de inmortalización celular, pero sin limitarnos, los genes que codifican para: telomerasa o transcriptasa reversa de la telomerasa, genes myc, o genes virales como SV40T (antígeno T del virus de simio 40), EBV (virus de Epstein-Barr), genes adenovirales, genes del Papilomavirus E6 y E7.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de descubrimiento o *screening* de fármacos que comprende:

a. establecer un cultivo celular a partir de los POs según la reivindicación 16, o una línea celular según la reivindicación 17,
b. administrar una sustancia química al cultivo o línea celular de (a),
c. estudiar el efecto de la sustancia química de (b) en el cultivo celular de (a)

El término "estudiar el efecto de la sustancia química" comprende, pero sin limitarnos, estudiar la supervivencia celular, la viabilidad celular, la muerte celular, el estrés celular, la proliferación celular, la migración celular, la diferenciación celular, o estudios de desmielinización, mielinización o remielinización.

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

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Identificación de POs de ratones adultos (60 días de edad) de la cepa CD-1. Los POs se identificaron con una doble detección inmunocitoquímica contra A2B5 y Olig-2 (**A**-**C**) o contra NG2 y A2B5 (**D**-**F**). Barra de escala: 5 micras.

Figura 2. Separación por FACS de POs de cerebro adulto de ratones transgénicos plp-GFP. Histogramas de las células sin marcar (**A**) y teñidas con un anticuerpo anti-A2B5 conjugado con ficoeritrina (PE, del inglés *"phycoeritrin"*) (**B**). Porcentajes relativos de las distintas poblaciones celulares ($GFP^-/A2B5^+$, $GFP^+/A2B5^-$, $GFP^+/A2B5^+$) sin marcar (**C**) y teñidas con un anticuerpo anti-A2B5 conjugado con PE (**D**).

Figura 3. Identificación de POs de corteza cerebral humana procedentes de márgenes de resección de tumores. Los POs se identificaron con una doble

tinción inmunocitoquímica contra PDGFRα y NG2 (**A**-**C**), contra NG2 y A2B5 (**D**-**F**) y contra Olig-2 y A2B5 (**G**-**I**). Barra de escala: 10 micras.

Figura 4. Identificación de POs de corteza cerebral humana obtenidos a partir de márgenes de resección de traumatismos. Los POs se identificaron con una doble tinción inmunocitoquímica contra PDGFRα y NG2 (**A**-**C**), contra NG2 y A2B5 (**D**-**F**) y contra Olig-2 y A2B5 (**G**-**I**). Barra de escala: 10 micras.

Figura 5. Comparación de la eficiencia de nuestro protocolo entre diferentes estirpes de ratones (CD-1, BL-6, plp-GFP). Los resultados se analizaron mediante el test de la *t* de *Student* utilizando como valores críticos *P<0,05, **P<0,01 y ***P<0,001.

Figura 6. Comparación de la eficiencia de la presente invención entre la estirpe de ratón que produjo la mayor cantidad de OPCs (CD-1) (**A**) y el resto de estirpes (**B**) con respecto a los dos tipos de biopsias (márgenes de resección de tumores y de traumatismos). En todos los casos, los resultados se analizaron mediante el test de la *t* de *Student* utilizando como valores críticos *P<0,05; **P<0,01 y ***P<0,001.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de

aplicación de la misma.

EJEMPLO 1: Purificación de POs de corteza cerebral de ratón de 15 días, 2 meses o 6 meses de edad.

Los ratones de cepa CD1 fueron suministrados por Charles River Laboratories. Todo el trabajo se llevó a cabo según las Normativas Española (RD 1201/2005 (BOE 252/34367-91, 2005)) y Europea (86/ 609/ EEC and 2003/65/EC) sobre manejo y uso animal.

Un día antes del cultivo primario se recubren los frascos en los que se sembrarán las células con poli-ornitina a una concentración de 10 mg/l. Antes de sembrar las células se retira la poli-ornitina y se lavan los frascos para eliminar los restos.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y/o asfixia con CO_2 y los cerebros se extrajeron y se llevaron a una placa con solución salina con calcio y magnesio (HBSS del inglés *"Hanks' Balanced Salt Solution"*) en hielo.

Para retirar rápidamente las meninges y los plexos coroideos, los cerebros se incubaron en diferentes diluciones de una solución de papaína (SP, compuesta por: papaína 0,9 mg/ml, L-cisteína 0,2 mg/ml, EDTA 0,2 mg/ml en HBSS) a 37ºC durante 5 minutos (ver Tabla 2). Los restos de meninges y plexos se terminaron de retirar con pinzas y con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Una vez limpias, las cortezas cerebrales se llevaron a una nueva placa con HBSS en hielo.

Estadio	Animales / frasco	1ª digestión	2ª digestión	POs obtenidos	% relativo de POs
P0	3	SP 1:10 5 min	SP 1:10 5min	263.148±6.508	100
P15	5	SP 1:5 5 min	SP 1:5 10 min	123.194±8.774	50
P60	5	SP 1:5 5 min	SP 1:5 15 min	68.444±5.461	25
P180	5	SP 1:5 5 min	SP 1:5 15 min	39.757±4.410	12

Tabla 2. Resumen de los tiempos de incubación y las concentraciones enzimáticas preferidas para cada estadio postnatal analizado y número total de POs obtenidos por animal y porcentaje relativo con respecto de la edad estándar: P0 (neonato).

El tejido fue disociado mecánicamente con la ayuda de unas tijeras y se preincubó durante 5 minutos a 37ºC. Los trozos de tejido se incubaron en diferentes diluciones de la solución de papaína arriba descrita pero en HBSS sin calcio ni magnesio. La dilución y el tiempo de incubación empleados para cada edad animal están detallados en la Tabla 2. La digestión enzimática se paró mediante la adición de medio con suero y DNasal (DMEM, del inglés *"Dulbecco's Modified Eagle Medium"*, con 10% de suero fetal bovino y 1% de DNasal).

Tras disociar mecánicamente el tejido mediante unos 25 pases de micropipeta, la suspensión celular se incubó, durante 5 minutos, a 37ºC y posteriormente se centrifugó a 900 rpm, durante 10 minutos. El sobrenadante y los restos de mielina se eliminaron y las células se resuspendieron en medio con suero. La suspensión celular se filtró por una malla de 100 micras y se sembró en un volumen final de 10 ml de medio de POs (DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB), 10 ng/ml de PDGFα y 1% de penicilina y estreptomicina) por cada frasco de 75 cm^2 de superficie, previamente recubierto con poli-ornitina, como está descrito arriba. La densidad celular de siembra depende de cada estadio. El número de animales necesarios para cada frasco se detalla la Tabla 2.

Un día después se cambió la totalidad de medio para evitar la muerte celular en ejemplares maduros (P15) y adultos (P60, P180). En el caso de animales postnatales el medio se cambio dos días después. A partir de entonces, el medio se cambió cada dos o tres días.

Un mes o 40 días después de la siembra se obtuvo una monocapa de astrocitos con POs sobre ella. Para purificar los POs, los frascos de cultivo se cerraron y se agitaron durante la noche, a 300 rpm y 37ºC de temperatura.

A la mañana siguiente se recogió el medio con los POs en suspensión y se filtró por una malla de 40 micras, centrifugándose después la suspensión celular a 900 rpm durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en medio de POs y se sembraron en placas petri durante 45 minutos a 37ºC para eliminar las células de microglía, que se adhieren rápidamente al sustrato. Transcurrido este tiempo se recogió la suspensión celular, se volvió a filtrar con una malla de 40 micras y se volvió a centrifugar como antes. Las células se resuspendieron y sembraron de nuevo en medio de POs y en placas petri durante otros 30 minutos a 37ºC para retirar las células de microglía que pudieran quedar.

Este medio enriquecido en POs se recogió y centrifugó como se describe arriba. Las células fueron finalmente resuspendidas en medio BS (Bottenstein-Sato, para 10 ml de medio: 9,6 ml de DMEM, 100 microlitros de SFB, 100 microlitros de L-Glutamina 200mM, 100 microlitros de Penicilina/Estreptomicina, 60 microlitros de BSA al 5%, 10 microlitros de transferrina 100mg/ml, 1,86 microlitros de Insulina 50 mg/ml, 1 microlitro de Progesterona 0,62mg/ml, 1 microlitro de putrescina160 mg/ml, 1 microlitro de T3 3 mg/ml, 1 microlitro de T4 4 mg/ml, 1 microlitro de selenito sódico 0,39 ng/ml), contadas y sembradas de distinta forma para el estudio bien de proliferación, de migración o de diferenciación hacía oligodendrocitos maduros (Bribián y cols, 2006, Mol Cell Neurosci. 33(1):2-14; Merchán y cols., 2007, Mol Cell Neurosci. 36(3):355-68, Bribián y cols., 2008, Dev Neurobiol. 68(13):1503-16).

EJEMPLO 2: Purificación de POs de corteza cerebral de ratón de 2 meses de edad mediante FACS.

La separación celular por activación de fluorescencia se llevó a cabo con ratones transgénicos *plp*-GFP (Spassky et al, 1998; Bribián et al, 2006, Merchán et al, 2007).

Los animales se sacrificaron como en el ejemplo 1 y los cerebros se extrajeron de la misma manera. Las meninges y los plexos coroideos se retiraron como en el ejemplo 1 y las cortezas cerebrales se disecaron mecánicamente con el *"Neural Tissue Dissociation Kit"* de Miltenyi Biotec, según las instrucciones del fabricante.

Los restos de mielina se eliminaron mediante una filtración de la suspensión celular a través de una malla de 40 micras seguida de una centrifugación en sacarosa (0,9 M) en HBSS en hielo.

Las células se tiñeron con anticuerpo anti-A2B5 conjugado con PE y se analizaron y separaron en un equipo FACSAria de BD. Las células se separaron en HBSS con 2% de suero fetal bovino, 25 mM HEPES y 5mM EDTA.

Como muestra la Figura 2, en el cerebro de ratones adultos (2 meses de edad) hay un porcentaje muy bajo (en torno al 2%) de células doble positivas para GFP (plp) y A2B5. Además, el proceso de separación provoca una muerte masiva de células, ya que sólo alrededor del 50% de las células analizadas sobreviven 24 horas después de la separación.

La purificación de POs de corteza cerebral de ratón de 2 meses de edad mediante FACS tiene un rendimiento final de 10.000 POs por cada animal utilizado.

EJEMPLO 3: Purificación de POs de corteza cerebral de ratón de 2 meses de edad mediante el *"Oligodendrocyte Selection Kit"* de HB.

Es importante puntualizar que este kit está descrito por el fabricante para la obtención de oligodendrocitos inmaduros con fenotipo $O4^+/GalC^-$ a partir de cerebros de rata o ratón P3, es decir, de 3 días de edad, lo que anteriormente hemos llamado estadio perinatal.

Los animales se sacrificaron como en el ejemplo 1 y los cerebros se extrajeron de la misma manera. Posteriormente, se siguieron las instrucciones del fabricante detalladas en el manual del usuario.

A pesar de haber introducido el paso de digestión enzimática de las meninges (ver arriba) para minimizar la muerte celular, este método (*"Oligodendrocyte Selection Kit"*) resultó casi 10 veces menos eficaz que el descrito en el Ejemplo 1, con un rendimiento final de 7.500 POs por animal adulto.

EJEMPLO 4: Purificación de POs de nervio óptico de rata adulta mediante la técnica de inmuno-adsorción (del inglés, *"immunopanning"*).

Este método está descrito en la solicitud de patente PCT/US1996/013279 y consiste en la purificación de los POs de nervio óptico de rata adulta a partir de una suspensión mixta de células del nervio óptico. Esta suspensión celular se pone en contacto primeramente con una placa donde previamente se ha absorbido un anticuerpo anti-Thy1, lo que permite la retirada de células de origen no glial. La suspensión celular se pone entonces en contacto con una segunda placa previamente adsorbida con anticuerpo anti-A2B5, anticuerpo anti-NG2 o con aglutinina de cacahuete, que va a permitir que sólo las células con estas proteínas en su superficie queden adsorbidas a la placa. Estas células serán en su mayoría POs aunque, en el caso de A2B5, podrán ser también precursores O-2A.

La eficiencia de este método es aproximadamente de 2.500 POs por cada animal (1.250 POs por nervio óptico; WO/1997/007200; Shi y cols, 1998), lo cual es enormemente inferior (30 veces) a la del método de la invención (Tabla 1).

EJEMPLO 5: Purificación de POs de corteza cerebral humana a partir de biopsias (márgenes de resección en traumatismos y tumores).

Para la obtención de POs humanos se siguió el protocolo descrito en el ejemplo 1 con las siguientes modificaciones:

a. Para la siembra de cada frasco de 25 cm^2 se empleó una cantidad de tejido de entre 1 y 4 gramos, encontrando los mejores resultados empleando 4 gramos.

b. La digestión enzimática de las meninges y los plexos coroideos se realizó empleando la solución de papaína (SP) a una dilución de 1:2,5, durante 10 minutos.

c. El volumen de medio de POs fue de 5 ml por frasco de 25 cm^2.

d. La agitación para separar los POs se realizó a 250 rpm.

La eficiencia de este método es de 60.000 células POs por cada gramo de tejido fresco utilizado en el caso de márgenes de resección de tumores y de 15.000 células POs por cada gramo de tejido fresco procedente de márgenes de resección de traumatismos.

REIVINDICACIONES

1. Un método de obtención de POs a partir de la corteza cerebral de un mamífero de edad superior a una semana, que comprende:

a) obtener una muestra aislada de cerebro,
b) seleccionar las POs de la muestra biológica obtenida en (a) y
c) cultivar las POs en condiciones de proliferación, migración, movilidad o diferenciación celular.

2. El método según la reivindicación anterior donde el paso (b) comprende la digestión enzimática de la muestra obtenida según (a).

3. El método según la reivindicación 2 donde el paso (b) comprende:

i. una primera digestión enzimática de la muestra obtenida según (a),
ii. retirar las meninges y los plexos coroideos,
iii. disociar mecánicamente el tejido nervioso resultante del paso (ii), y
iv. disociar enzimáticamente el tejido nervioso resultante del paso (iii).

4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2-3 donde la enzima empleada para la digestión enzimática del paso (b) es la papaína.

5. El método según la reivindicación 4 donde la concentración de papaína empleada en el paso (b) es de entre 50 y 200 microgramos/mililitro.

6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, donde la concentración de papaína empleada en el paso (i) es de entre 150 y 200 microgramos/mililitro.

7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, donde la concentración de papaína empleada en el paso (iv) es de entre 50 y 120 microgramos/mililitro.

8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, donde la concentración de papaína empleada en el paso (iv) es de entre 70 y 100 microgramos/mililitro.

9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2-8, donde el tiempo de la digestión enzimática empleada en el paso (b) es de entre 2 y 22 minutos.

10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-9, donde el tiempo de la digestión enzimática empleada en el paso (i) es de entre 3 y 7 minutos.

11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-9, donde el tiempo de la digestión enzimática empleada en el paso (iv) es de entre 8 y 18 minutos.

12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el paso (b) comprende una digestión enzimática con DNasa.

13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el mamífero tiene más de dos semanas de edad.

14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el mamífero tiene entre 15 días y 9 meses de edad.

15. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde el mamífero tiene entre 15 días y 6 meses de edad.

16. POs obtenibles por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1-15.

17. Una línea celular de POs obtenible por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, o por la inmortalización celular mediante transfección génica de los POs de la reivindicación 16.

18. Método de descubrimiento de fármacos que comprende:

a. establecer un cultivo celular a partir de los POs, según la reivindicación 16, o una línea celular de POs, según la reivindicación 17,
b. administrar una sustancia química al cultivo o línea celular de (a),
c. estudiar el efecto de la sustancia química de (b) en el cultivo celular de (a).

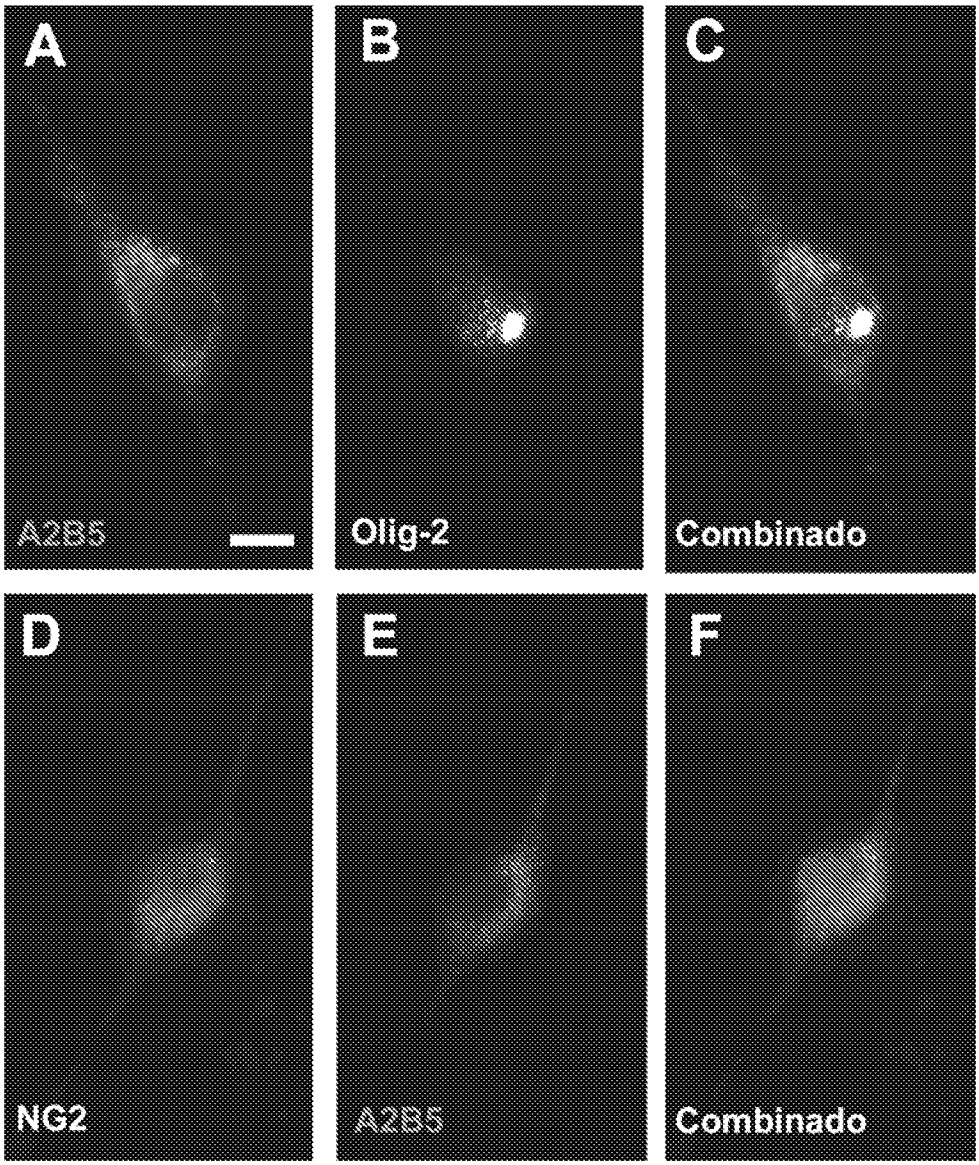

FIG.1

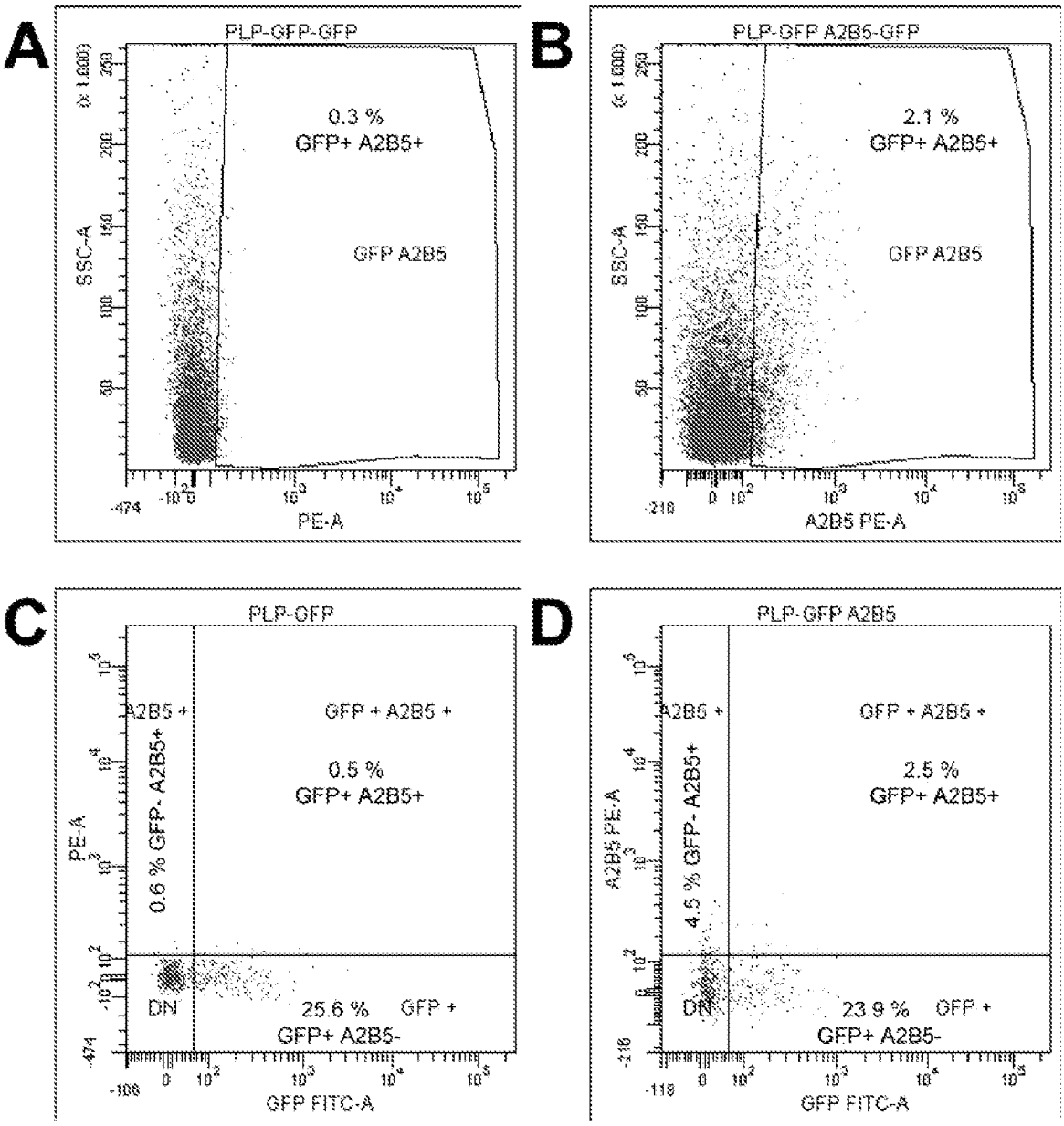
A
PLP-GFP-GFP
0.3 %
GFP+ A2B5+
GFP A2B5
SSC-A
PE-A
B
PLP-GFP A2B5-GFP
2.1 %
GFP+ A2B5+
GFP A2B5
SSC-A
A2B5 PE-A
C
PLP-GFP
A2B5 +
GFP + A2B5 +
0.5 %
GFP+ A2B5+
0.6 % GFP- A2B5+
PE-A
DN
25.6 % GFP +
GFP+ A2B5-
GFP FITC-A
D
PLP-GFP A2B5
A2B5 +
GFP + A2B5 +
2.5 %
GFP+ A2B5+
4.5 % GFP- A2B5+
A2B5 PE-A
DN
23.9 % GFP +
GFP+ A2B5-
GFP FITC-A

FIG. 2

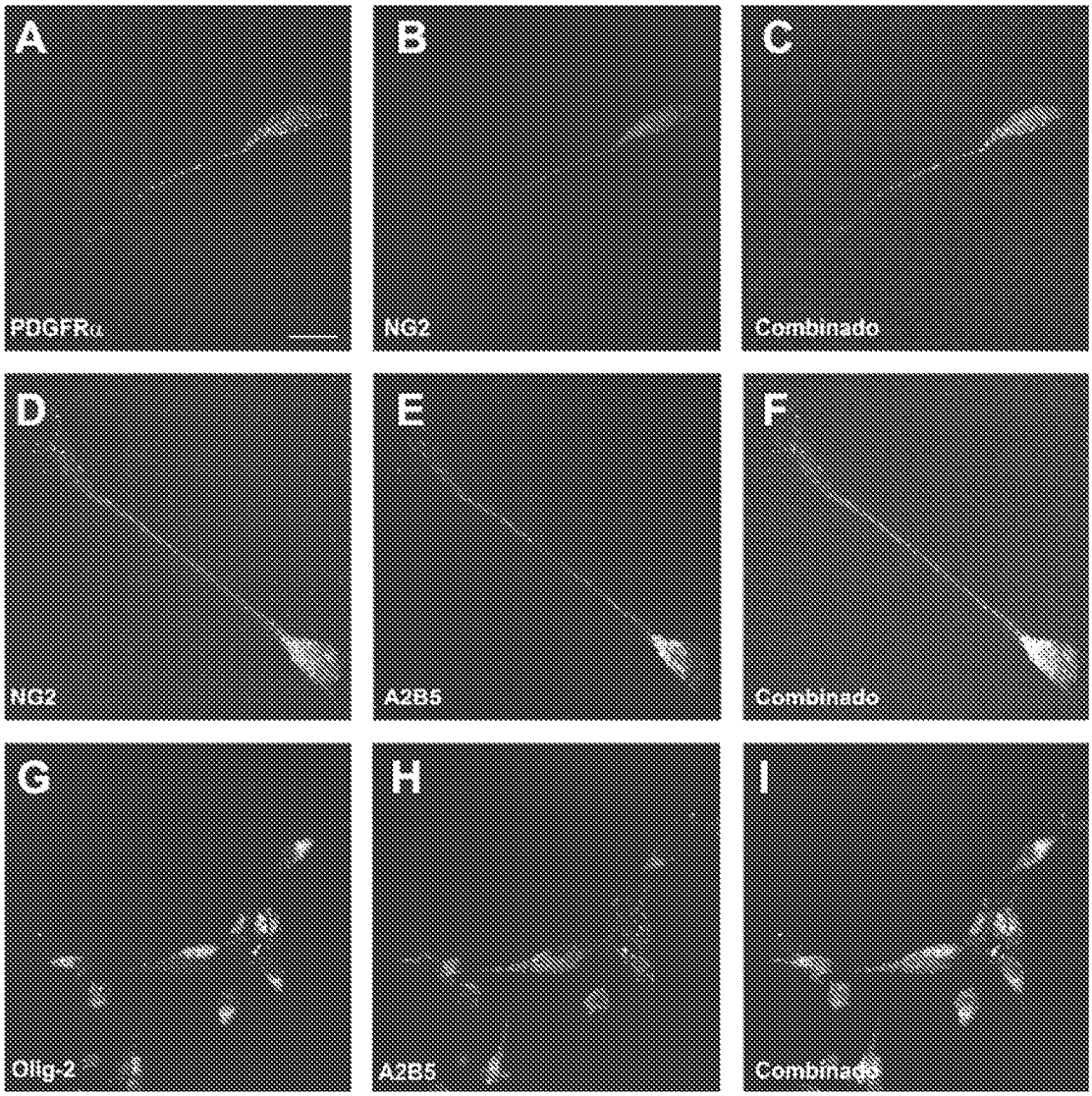
A
PDGFRα
B
NG2
C
Combinado
D
NG2
E
A2B5
F
Combinado
G
Olig-2
H
A2B5
I
Combinado

FIG.3

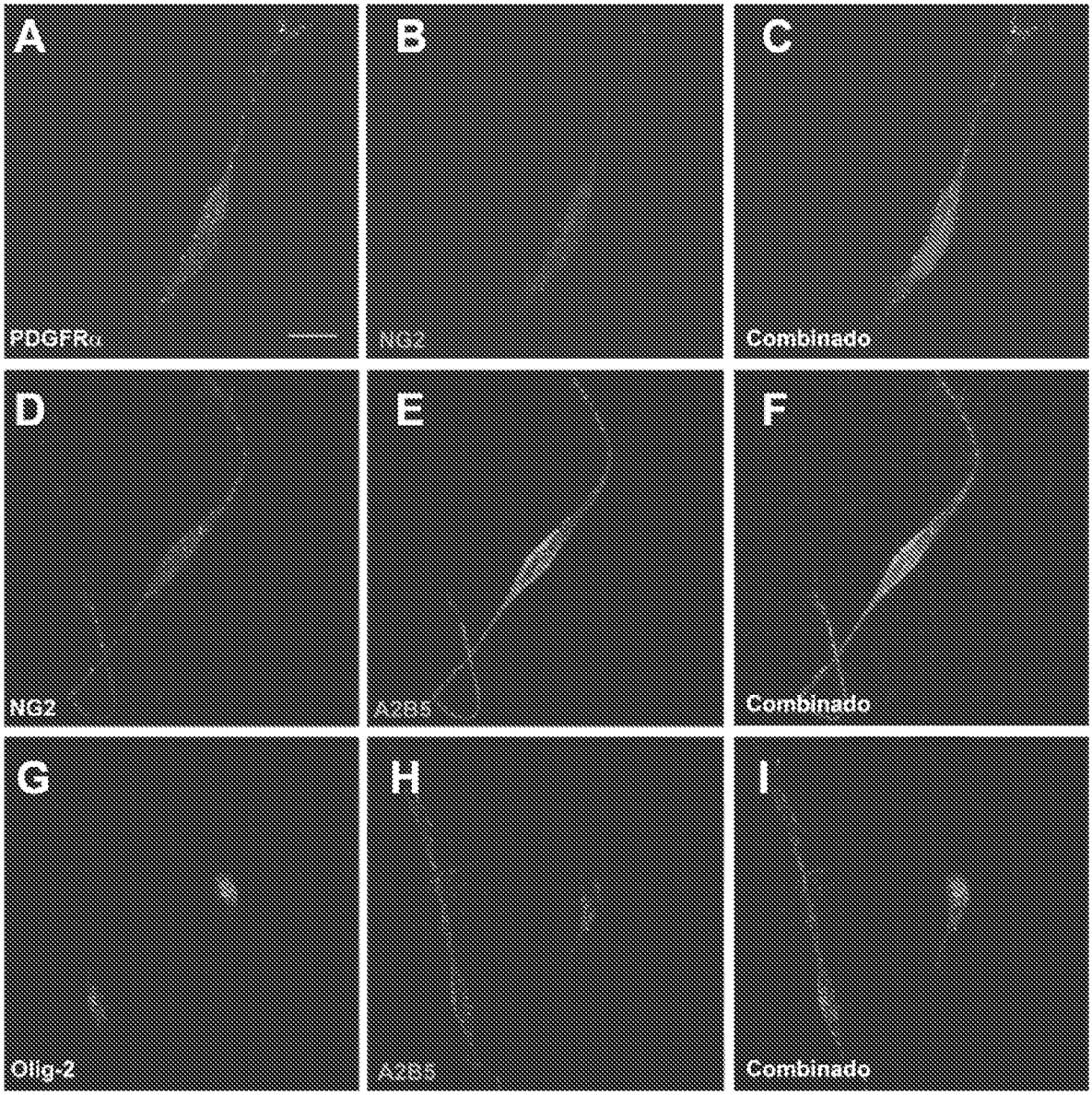
A
PDGFRα
B
NG2
C
Combinado
D
NG2
E
A2B5
F
Combinado
G
Olig-2
H
A2B5
I
Combinado

FIG. 4

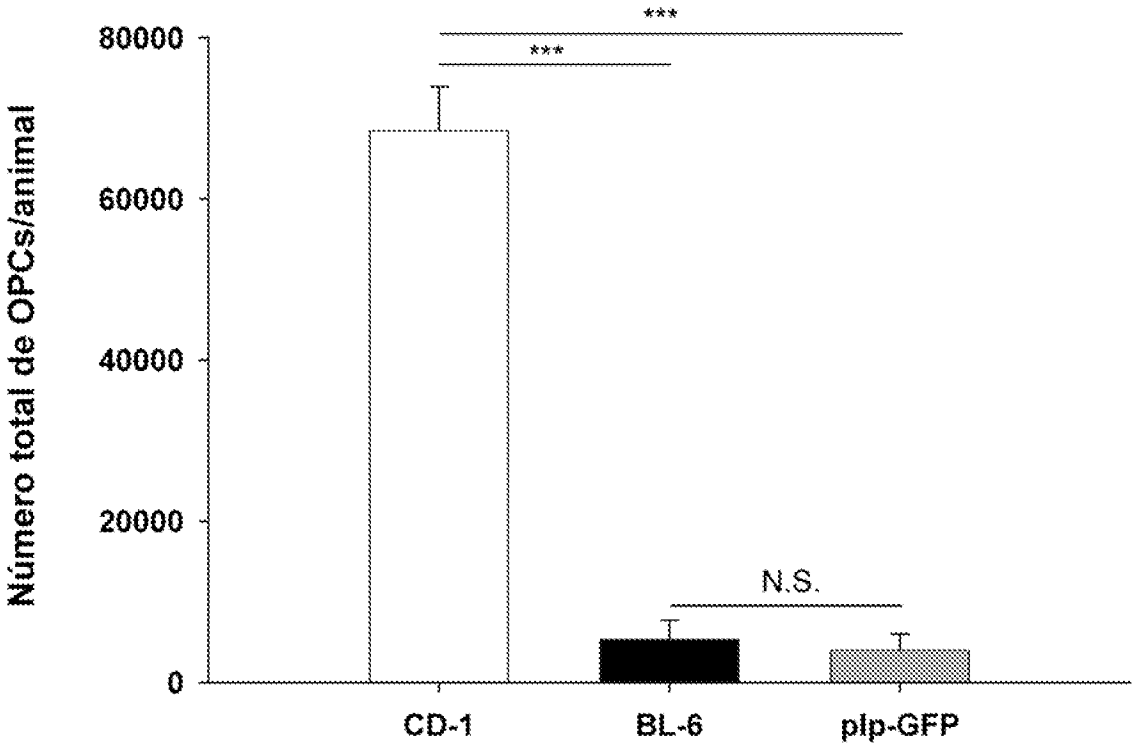
***
***
80000
60000
40000
20000
0
Número total de OPCs/animal
N.S.
CD-1
BL-6
plp-GFP

FIG. 5

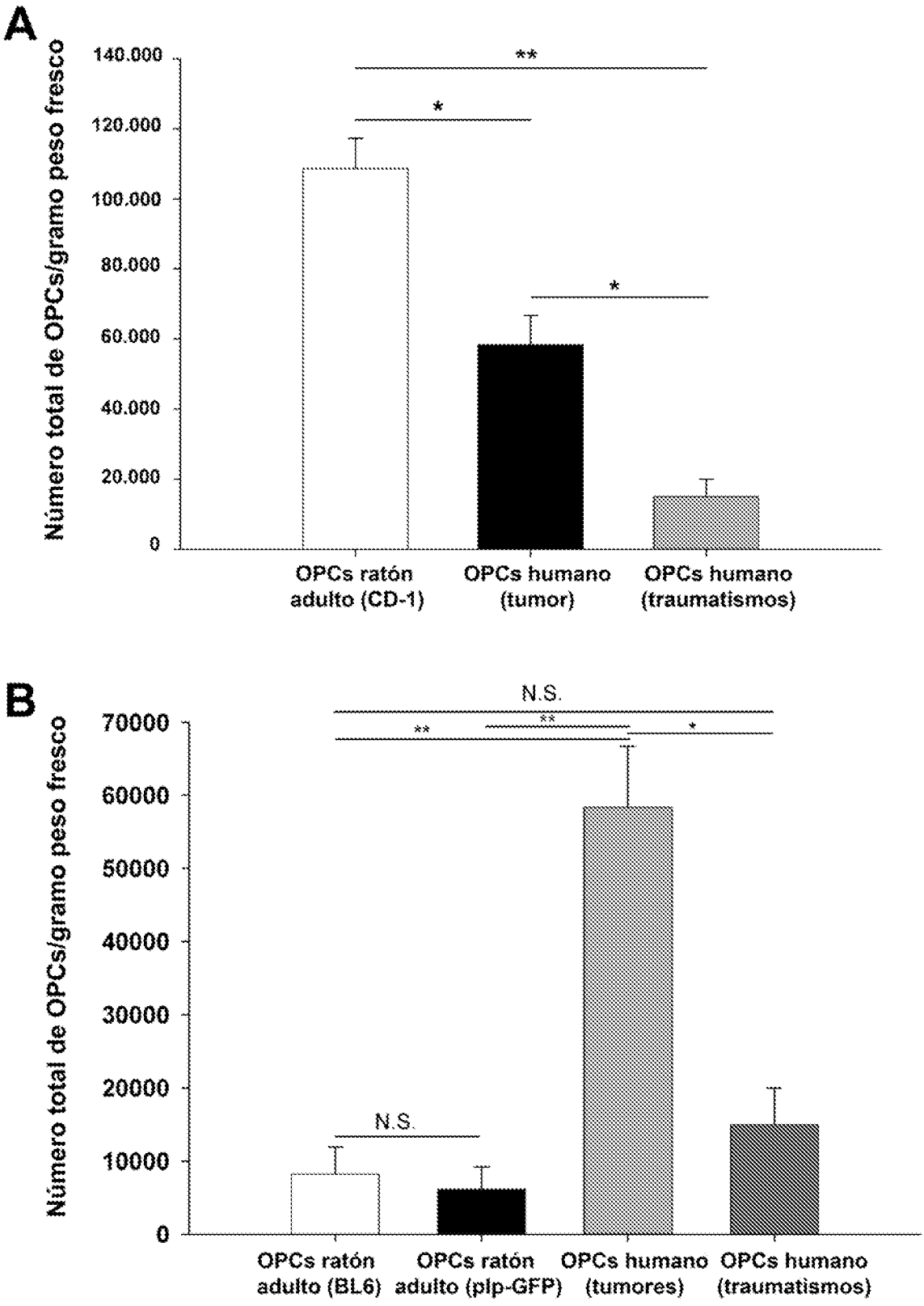
A
Número total de OPCs/gramo peso fresco
140.000
120.000
100.000
80.000
60.000
40.000
20.000
0
**
*
*
OPCs ratón adulto (CD-1)
OPCs humano (tumor)
OPCs humano (traumatismos)
B
Número total de OPCs/gramo peso fresco
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
N.S.
**
**
*
N.S.
OPCs ratón adulto (BL6)
OPCs ratón adulto (plp-GFP)
OPCs humano (tumores)
OPCs humano (traumatismos)

FIG. 6