



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 275 501**

51 Int. Cl.:
A61K 35/12 (2006.01)
A61K 35/44 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00918222 .1**
86 Fecha de presentación : **20.03.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1165100**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2002**

54 Título: **Métodos para tratar la esquizofrenia.**

30 Prioridad: **09.04.1999 US 289576**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2007

73 Titular/es: **TITAN PHARMACEUTICALS, Inc.**
Post Office Plaza, Suite 503
50 Division Street
Somerville, New Jersey 08876, US

72 Inventor/es: **Allen, Richard, C. y**
Cornfeldt, Michael

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 275 501 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

Métodos para tratar la esquizofrenia.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere generalmente a la fabricación de un medicamento para el tratamiento de los trastornos psiquiátricos y particularmente al tratamiento de los síntomas negativos de la esquizofrenia y/o de ciertos efectos secundarios extrapiramidales (EPS) de los antipsicóticos.

10 **Fundamento**

15 Los trastornos del sistema nervioso comprenden una amplia variedad de condiciones y pueden generalmente separarse en “trastornos neurológicos” y “trastornos psiquiátricos”. Los trastornos neurológicos pueden caracterizarse como el producto de la muerte de las células del sistema nervioso. Ejemplos de trastornos neurológicos incluyen la enfermedad de Parkinson, que implica la muerte de las neuronas dopaminérgicas, la enfermedad de Alzheimer, en la que se pierden las neuronas colinérgicas y la esclerosis múltiple, en la que las neuronas y glia se mueren en un proceso autoinmune. La patente de EEUU n° 5.750.103 se refiere a los trastornos neurológicos.

20 Los trastornos psiquiátricos, como la esquizofrenia, son asuntos de salud pública de gran importancia. La esquizofrenia, por ejemplo, afecta aproximadamente a 2 millones de americanos. En cualquier momento, aproximadamente el 20% de las camas de hospital en EEUU están ocupadas por pacientes esquizofrénicos. La enfermedad normalmente se desarrolla entre la adolescencia y los 30 años y se caracteriza por síntomas positivos (delusiones o alucinaciones), síntomas negativos (emociones embotadas y falta de interés) y síntomas desorganizados (discurso y pensamiento confusos y percepción y comportamiento desorganizados). Adicionalmente, se observan frecuentemente déficits cognitivos, particularmente en los pacientes esquizofrénicos de edad. (Purohit *et al.*, 1993, *Biol. Psychiatry* 33(4):255-260). Para algunos pacientes el trastorno es durante toda la vida, mientras que otros pueden tener episodios periódicos de psicosis.

30 Las causas de la esquizofrenia se desconocen esencialmente. Aunque se cree que hay un componente genético, los factores medioambientales parece que influyen en la aparición y la severidad del trastorno. Los cambios neuropatológicos en los esquizofrénicos pueden incluir aumento de los ventrículos laterales, cavidades en el cerebro que son parte del sistema del fluido cerebroespinal. A veces, hay una disminución en la masa cerebral total.

35 Se han desarrollado modelos de animales con esquizofrenia, utilizando tanto animales no primates (rata) como primates (mono). En un modelo de animal con esquizofrenia usado generalmente, se administra crónicamente fenciclidina (PCP) a los animales sujeto, lo que produce disfunciones similares a las vistas en humanos esquizofrénicos (Jentsch *et al.*, 1997 *Science* 277:953-955; Piercey *et al.*, 198, *Life Sci.* 43(4):375-385).

40 Se han desarrollado varias teorías diferentes respecto a la etiología de la esquizofrenia, incluyendo la teoría dopaminérgica, la glutamatérgica y la colinérgica de la esquizofrenia. La hipótesis de la dopamina postula que los síntomas positivos se producen por la función en exceso de la dopamina neurotransmisora en el área mesolímbica del cerebro. Esta hipótesis se basa ampliamente en la evidencia farmacológica, indirecta, de que (1) los fármacos que antagonizan la dopamina son agentes antipsicóticos efectivos; (2) los fármacos que imitan la dopamina son agentes antipsicóticos efectivos y (3) algunos síntomas de la esquizofrenia paranoide aguda pueden eliminarse en los no esquizofrénicos con anfetamina, un fármaco que activa los sistemas de la dopamina. A la inversa, los síntomas negativos se han asociado con déficits de dopamina localizados regionalmente en el córtex prefrontal.

50 La hipótesis de glutamato está basada, entre otras cosas, en las acciones de la fenciclidina (PCP) en el cerebro de los abusadores. El PCP, que induce muchos síntomas también encontrados en la esquizofrenia, bloquea el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), sobre el que el glutamato ejerce algunos de estos efectos. Adicionalmente, las observaciones del modelo animal de fenciclidina (PCP) de esquizofrenia, indican que el glutamato aumenta enormemente en el cerebro de las ratas dosificadas crónicamente con PCP (Moghaddam *et al.*, 1997, *J. Neurosci.* 17:2921). La inhibición de la subida de los niveles de glutamato con un agonista de receptor de glutamato metabotrópico bloqueó una variedad de síntomas de esquizofrenia en ratas dosificadas con PCP, incluyendo el comportamiento hiperactivo, giro de cabeza y déficits de memoria (Moghaddam *et al.*, 1998, *Science* 281:1349-1352).

60 Los tratamientos actuales para la esquizofrenia incluyen fármacos antipsicóticos; tratamiento de electroshock para la catatonía severa, depresión o elación; y psicoterapia. Los tratamientos con fármacos antipsicóticos generalmente incluyen tanto antagonistas de dopamina como de acetilcolina, (anticolinérgicos), aunque los anticolinérgicos se usan generalmente para tratar los efectos secundarios extrapiramidales (EPS) de los antagonistas de dopamina utilizados comúnmente, más que el propio trastorno. Los EPS inducidos por los antagonistas de dopamina resultan de un bloqueo de dopamina en el estriato e incluyen discinesias, especialmente discinesia tardía, que se caracterizan por movimientos descontrolados. En muchos casos, la discinesia tardía se resuelve al interrumpir la terapia con un fármaco antagonista de la dopamina, pero algunos pacientes continúan experimentando discinesia mucho tiempo después de la terminación de la terapia con antagonistas de la dopamina.

La clozapina, un antipsicótico que afecta a varios sistemas receptores, se ve frecuentemente como el “estándar de oro” del tratamiento con fármacos para la esquizofrenia. Sin embargo, aunque la clozapina parece mejorar algunos síntomas (por ejemplo, la fluidez verbal, el tiempo de reacción y la atención), parece tener un efecto adverso sobre las funciones ejecutivas de alto nivel, como en la capacidad de memoria de trabajo y en la memoria visual. Goldberg *et al.* (1994) *J. Clin. Psychiatry* 55:9 (suppl. B). Además, muchos fármacos antipsicóticos antagonistas de dopamina no son tan efectivos al controlar los síntomas “negativos”, en comparación con los síntomas “positivos” de la esquizofrenia (Angrist *et al.*, 1982, *Psychopharm.* 78:128-130).

La patente de EEUU n° 5.447.948 muestra que los inhibidores de readmisión de dopamina son útiles en el tratamiento de los pacientes esquizofrénicos que sufren síntomas negativos. Sin embargo, los inhibidores de readmisión de dopamina se oponen a los efectos de la clozapina y de otros antagonistas de dopamina, anulando potencialmente la actividad de este grupo de fármacos en el tratamiento de los síntomas positivos de la esquizofrenia.

La patente de EEUU n° 5.618.531 describe los métodos de aumento de la viabilidad de las células que se administran al cerebro o a la médula espinal de un sujeto mamífero uniendo las células a una matriz soporte. Se indica que las células pueden utilizarse para “trastornos neurológicos” pero no para trastornos psiquiátricos. Como se entiende generalmente en la técnica, los “trastornos neurológicos” son trastornos del sistema nervioso que implican la muerte o la disfunción mayor de las células del sistema nervioso central, mientras que “trastornos psiquiátricos” implican la desregulación de las células del sistema nervioso. Por ejemplo, la enfermedad de Parkinson, que implica la muerte y disfunción de las neuronas dopaminérgicas, es un trastorno neurológico, mientras que la esquizofrenia, que implica la desregulación de los niveles neurotransmisores, es un trastorno psiquiátrico, Bodkin *et al.*, (1996), *J. Mental Disease*, vol 184(5) p.295-301, referido al aumento de Selegiline de la medicación de antipsicóticos.

En suma, falta en la técnica un tratamiento efectivo de los síntomas de la esquizofrenia, particularmente los síntomas negativos de la esquizofrenia y los defectos cognitivos en la esquizofrenia que no interfieran con los tratamientos para los síntomas positivos del trastorno. Además, se necesita en la técnica un tratamiento efectivo de la discinesia tardía y otros EPS.

Sumario de la invención

La invención se refiere al uso de células terapéuticas que producen dopamina en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de los síntomas negativos de la esquizofrenia. Los medicamentos terapéuticos de la invención proporcionan tratamientos de los síntomas negativos de la esquizofrenia de una forma que no interfiere con los tratamientos farmacológicos contemporáneos para los síntomas positivos de la esquizofrenia. La invención también proporciona el uso de células terapéuticas para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de EPS causados por fármacos antipsicóticos, particularmente la discinesia tardía (TD).

En un aspecto, la invención proporciona el uso de células terapéuticas que producen dopamina o precursores de dopamina y una primera matriz soporte en la fabricación de un complejo célula/soporte que comprende células terapéuticas adheridas a la primera matriz soporte, siendo el complejo célula/soporte para el tratamiento de un síntoma negativo de la esquizofrenia en un sujeto en un método que comprende la administración de una cantidad efectiva del complejo célula/soporte al cortex prefrontal del cerebro del sujeto.

Las células terapéuticas pueden ser células paraneurales, células neurales, células creadas por hibridación celular somática, células derivadas de la médula adrenal, células que se han creado genéticamente para producir dopamina, o cualquier otra célula que produzca dopamina, la matriz soporte es un soporte particular no-encapsulante.

En otro aspecto, las células protectoras (células que producen un sitio privilegiado inmunológicamente) deben administrarse con las células terapéuticas. Alternativamente, las células terapéuticas pueden tener las propiedades de las células protectoras.

En otro aspecto más, las células soporte, que proporcionan factores que mejoran la viabilidad o función de las células terapéuticas, deben administrarse con las células terapéuticas. También se contempla una combinación de células terapéuticas, células protectoras y células soporte para administrar al paciente.

En otra realización, la invención proporciona el uso de células terapéuticas que produzcan dopamina o precursores de dopamina y una primera matriz soporte para la fabricación de un complejo célula/soporte que comprende células terapéuticas adheridas a la primera matriz soporte, usándose el complejo célula/soporte para aliviar un déficit cognitivo en la esquizofrenia en un método que comprende la administración de una cantidad efectiva del complejo célula/soporte al cortex prefrontal del cerebro del sujeto.

En otra realización más, la invención proporciona el uso de células terapéuticas que producen dopamina o un precursor de dopamina y una primera matriz soporte en la fabricación de un complejo célula/soporte que comprende células terapéuticas adheridas a la primera matriz soporte, siendo el complejo célula/soporte para el tratamiento de un síntoma de los efectos secundarios extrapiramidales (EPS) causados por fármacos antipsicóticos, en un método que comprende células terapéuticas en el área estriatal del cerebro de un sujeto en el que el sujeto es alguien que sufre EPS debido a los fármacos antipsicóticos. Los EPS pueden ser discinesia tardía, distonía tardía y acatisia tardía, particularmente discinesia tardía. Las células terapéuticas pueden administrarse con células protectoras o

tener las propiedades de células protectoras. Adicionalmente pueden administrarse células soporte con las células terapéuticas.

5 Como resultará evidente, los aspectos y características preferidos de un aspecto de la invención son aplicables a cualquier otro aspecto de la misma.

Descripción detallada de la invención

10 Esta invención proporciona el uso de células en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de los síntomas negativos de la esquizofrenia en los que el medicamento administra células en uno o más sitios en el sistema nervioso central (CNS). El medicamento puede usarse particularmente para tratar los síntomas negativos de la esquizofrenia o los déficits negativos en la esquizofrenia. La invención también proporciona el uso de células terapéuticas para la fabricación de medicamentos para tratar los déficits cognitivos en la esquizofrenia. La invención también proporciona el uso de células terapéuticas para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de EPS causados por fármacos antipsicóticos, particularmente en la discinesia tardía en la que las células deben administrarse en uno o más sitios en el CNS. De acuerdo con los métodos de la invención, las células que producen dopamina (“células terapéuticas”) se introducen en el cerebro de un sujeto que sufre síntomas negativos de esquizofrenia, déficits cognitivos en la esquizofrenia y/o EPS causados por fármacos antipsicóticos. Las células terapéuticas se administran normalmente adheridas a un microvehículo (complejo célula/soporte) cuando se administran a un sujeto, y pueden administrarse con otras células. Esta invención es ventajosa para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de la esquizofrenia, particularmente para el tratamiento de los síntomas negativos de la esquizofrenia, déficits cognitivos en la esquizofrenia, particularmente en esquizofrénicos de edad, y EPS (por ejemplo, TD) causados por fármacos antipsicóticos.

25 Dichos medicamentos pueden usarse como terapia “autónoma” pero también pueden considerarse para utilizarse en combinación con otras terapias. En particular, se contempla que estos medicamentos pueden utilizarse en combinación con terapias de esquizofrenia estándar, como clozapina. También se contempla que el tratamiento de un sujeto de acuerdo con la invención producirá “réplicas agudas” dentro del cerebro del sujeto, produciendo una mejora de los síntomas positivos padecidos por el sujeto, independientemente de cualquier mejoría en los síntomas positivos debida al tratamiento con fármacos antipsicóticos. Por consiguiente, la invención también proporciona métodos para aliviar los síntomas negativos y positivos de la esquizofrenia.

30 La práctica de esta invención empleará, a menos que se indique otra cosa, las técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que están dentro de las habilidades de la técnica, véase por ejemplo, Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd edition (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F.M. Ausubel *et al.* Eds, 1987); la serie METHODS IN ENZIMOMOLOGY (Academia Press, Inc.); PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J.McPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds., 1995); ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Fresheny Ed., 1987); y ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Harlow *et al.* eds., 1987).

40 Definiciones

Como se usa aquí, el término “esquizofrenia” pretende incluir el grupo de los trastornos mentales caracterizados por las interrupciones en el pensamiento y en la percepción. En una evaluación clínica, la esquizofrenia está marcada por los “síntomas positivos” como las alucinaciones auditivas (especialmente oír voces), procesos de pensamiento desorganizado y delusiones así como “síntomas negativos” que incluyen aplanamiento afectivo, alogia, avoliación y anhedonia.

50 Como se utiliza aquí, “los síntomas negativos de la esquizofrenia” se refieren a una clase de síntomas de esquizofrenia que puede considerarse que reflejan una “pérdida” en la actividad o pensamiento dirigido funcional. Los síntomas negativos de la esquizofrenia se conocen bien en la técnica e incluyen aplanamiento afectivo (caracterizado por, por ejemplo, por una expresión facial sin respuesta y/o inmóvil, contacto visual pobre y lenguaje corporal reducido), alogia (“pobreza del discurso” o respuestas breves, vacías y/o lacónicas), avoliación (caracterizado por una capacidad reducida o ausente para iniciar o llevar a cabo actividades dirigidas a un objetivo), anhedonia (pérdida de interés o placer), rechazo social, apatía y otros síntomas negativos conocidos por los expertos en la técnica. Los síntomas negativos de la esquizofrenia pueden valorarse utilizando cualquier metodología conocida por los expertos en la técnica, incluida aunque sin limitarse a ello, la Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS) (Escala de evaluación psiquiátrica breve), la Positive and Negative Symptom Scale (PANSS) (Escala de síntomas positivos y negativos), el Rorschach Schizophrenia Index (SCZI) (Índice de esquizofrenia Rorschach), y la Scale for the Assessment of Negative Symptoms (SANS) (Escala para la valoración de síntomas negativos). Algunos de estos métodos pueden utilizarse también para valorar síntomas positivos (por ejemplo, BPRS, PANSS y SCZI), aunque también están disponibles los métodos para valorar específicamente los síntomas positivos (por ejemplo, la Scale for the Assessment of Positive Symptoms, o PANS) (Escala para la valoración de síntomas positivos).

65 Como se usa aquí “déficits cognitivos en la esquizofrenia” se refiere a los déficits cognitivos en los pacientes con esquizofrenia. Los déficits cognitivos incluyen, pero no se limitan a los déficits en la memoria de trabajo, en la memoria visoespacial y bajo rendimiento en los ensayos neuropsicológicos ‘frontales’ como el Wisconsin Card Sorting Test (WCST).

ES 2 275 501 T3

El término “matriz soporte” incluye cualquier material al que se adhieran las células después de incubación *in vitro*, y en el que las células pueden crecer y que pueden implantarse en el cerebro de un mamífero sin producir una reacción tóxica o una reacción inflamatoria o gliosis que pueda destruir las células implantadas o que interfiera de cualquier manera con su actividad terapéutica o biológica. Dichos materiales pueden ser sustancias químicas naturales o sintéticas o sustancias con un origen biológico. Los materiales matriz incluyen, pero no se limitan a ello, vidrio y otros óxidos de sílice, poliestireno, polipropileno, polietileno, fluoruro de polivinilideno, poliuretano, polialginato, polisulfona, polivinil alcohol, polímeros de acrilonitrilo, poli(acrilamida), policarbonato, polipenteno, polipentano, nylon, amilasas, gelatina, gelatina modificada (por ejemplo, reticulada), colágeno, polisacáridos naturales y modificados, incluyendo dextranos y celulosas (por ejemplo, nitrocelulosa), agar y magnetita.

Puede utilizarse cualquier material reabsorbible o no reabsorbible. También se aplican los materiales matriz extracelulares, que son bien conocidos en la técnica (véase abajo). Los materiales matriz extracelulares pueden obtenerse comercialmente o prepararse haciendo crecer células que secreten esa matriz, retirando las células secretoras y permitiendo que las células que tienen que transplantarse interaccionen con la matriz y se adhieran a ella.

Como se usa aquí, el término “célula terapéutica” se refiere a una célula que produce dopamina o un precursor de dopamina (por ejemplo, L-DOPA). Las células terapéuticas pueden ser de origen neural, células paraneurales como las células del epitelio pigmentado retinal (RPE) y células cromafina, células fabricadas por hibridación celular somática, células derivadas de la médula adrenal, células que se han fabricado genéticamente para producir factores activos biológicamente y cualesquiera otras células que produzcan dopamina o un precursor de dopamina. En algunos casos, las células terapéuticas pueden también tener los atributos de células protectoras (por ejemplo, células RPE). Las células terapéuticas son preferiblemente “especies iguales” (derivadas de la misma especie que el sujeto) pero pueden derivarse de cualquier especie, preferiblemente de especies mamíferas.

Una “célula paraneural” es una célula que se deriva de la cresta neural embrional. Ejemplos de células paraneurales incluyen las células del epitelio pigmentado retinal (RPE) y las células derivadas de la médula adrenal, como las células de cromafina adrenal.

Una “célula que produce un sitio inmunológicamente privilegiado” es una célula que produce un entorno inmunosupresor localmente. Una célula que produce un sitio privilegiado inmunológicamente puede también conocerse como una “célula protectora”. Un entorno inmunosupresor localmente puede producirse por la expresión de moléculas inmunosupresoras o antiinflamatorias como el ligando Fas (Fas L), factor de crecimiento de transformación beta (TGF- β) y/o otras moléculas conocidas en la técnica. Las células que producen un sitio privilegiado inmunológicamente incluyen células que naturalmente producen un sitio privilegiado inmunológicamente, como las células RPE y las células Sertoli, y las células que se han modificado genéticamente para producir un sitio privilegiado inmunológicamente por, por ejemplo, expresión de Fas L o TGF- β . Las células protectoras son preferiblemente especies iguales, pero pueden derivarse de cualquier especie, aunque preferiblemente de las especies de mamíferos.

El término “célula soporte”, como se utiliza aquí, se refiere a una célula que produce factores que mejoran la viabilidad de las células terapéuticas. Las células soporte pueden producir factores solubles, como factores neurotróficos u otros factores (por ejemplo, factores de crecimiento), o pueden producir matrices extracelulares u otros factores insolubles que mejoran la viabilidad de las células terapéuticas. Células soporte convenientes para utilizar en esta invención incluyen células glial, que naturalmente “soportan” neuronas y células fabricadas genéticamente para actuar como células soporte, por ejemplo, produciendo un factor neurotrófico beneficioso, como NGF.

Como se usa aquí, “tratamiento” es una aplicación para obtener resultados clínicos deseados beneficiosos. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos deseados beneficiosos incluyen, pero no se limitan a ello, el alivio de los síntomas asociados con el trastorno psiquiátrico, disminución de la extensión del trastorno, estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado del desorden, retraso o ralentización de la progresión del trastorno.

Una “cantidad efectiva” o “número efectivo” es una cantidad o número suficiente para conseguir resultados terapéuticos deseados o beneficiosos. Una cantidad efectiva puede administrarse en una o más administraciones. Para los propósitos de esta invención, una cantidad efectiva es esa cantidad que alcance el resultado deseado, llámese mejoría, estabilización, paliación o ralentización del trastorno mental.

Como se usa aquí, el término “comprendiendo” y sus cognatos se utilizan en su sentido inclusive; esto es, equivalente al término “incluyendo” y sus correspondientes cognatos.

El término “sujeto” se refiere a un mamífero, preferiblemente humano.

Un “vector de expresión” es un constructo de ADN que (debido a la presencia de secuencias de control traslacional y/o transcripcional apropiado) es capaz de expresar una molécula de ADN (o cADN) que se ha clonado en el vector y por consiguiente producir un polipéptido o una proteína en la célula terapéutica. La expresión de las secuencias clonadas sucede cuando el vector de expresión se introduce en una célula huésped apropiada. Una célula huésped de mamífero apropiada puede ser una célula capaz de expresar las secuencias clonadas. Los procedimientos para preparar cADN y para producir una biblioteca genómica se muestran en Sambrook *et al.* (*supra*).

ES 2 275 501 T3

Dos secuencias de ADN (como una secuencia de región promotora y una secuencia de codificación) se supone que están enlazadas operablemente si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN no resulta en la introducción de una mutación con desplazamiento de la pauta de lectura, (2) interfiere con la capacidad de la secuencia de región promotora para dirigir la transcripción de la secuencia de codificación, o (3) interfiere con la capacidad de la secuencia de codificación para ser transcrita por la secuencia de región promotora. Una región promotora estaría unida operablemente a una secuencia de ADN si el promotor es capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ADN.

Debe observarse que como se usa aquí, la forma singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

Esta invención proporciona, en un aspecto, la fabricación de medicamentos para el tratamiento de los síntomas negativos de la esquizofrenia. De acuerdo con esta invención, los síntomas negativos de la esquizofrenia se tratan con el medicamento administrando un complejo de célula/soporte que comprende células terapéuticas que suministran dopamina o un precursor de dopamina adherido a una matriz soporte (complejo célula/soporte) al sujeto. El complejo célula/soporte debe administrarse generalmente directamente dentro del cerebro por inyección o implantación. El complejo célula/soporte puede administrarse en uno o más sitios en el sujeto, y puede administrarse en una administración única o en múltiples administraciones. Después de realizar la administración, los síntomas negativos de la esquizofrenia se alivian, mejoran o eliminan. El alivio, mejoría o eliminación de los síntomas negativos de la esquizofrenia puede mejorarse utilizando cualquiera de los ensayos, escalas o índices conocidos en la técnica, como el BPRS, SANS o PANSS.

En otro aspecto, esta invención proporciona el uso de un complejo célula/soporte que comprende células terapéuticas en combinación con células que produce un sitio privilegiado inmunológicamente (“células protectoras”) en la fabricación de medicamento para el tratamiento de los síntomas negativos de la esquizofrenia. En algunas otras realizaciones las células terapéuticas tienen las propiedades de las células protectoras. Si las células terapéuticas se combinan con células protectoras separadas, ambos tipos de células se administran normalmente como un complejo de célula/soporte y generalmente deben administrarse directamente dentro del cerebro del sujeto por inyección o implantación.

Las células terapéuticas, opcionalmente con células protectoras acompañantes, se administran a través de los medicamentos a sujetos que sufren los síntomas negativos de la esquizofrenia. La administración de las células terapéuticas (con o sin células protectoras) produce un alivio de los síntomas negativos de la esquizofrenia.

Preferiblemente, las células deben administrarse directamente al cerebro por inyección o implantación. Las células deben administrarse en uno o más sitios en el córtex prefrontal. Preferiblemente, las células deben administrarse al córtex prefrontal en un modelo simétrico- bilateralmente (es decir, en sitios equivalentes en el córtex prefrontal derecho e izquierdo). La administración de las células terapéuticas produce un alivio de los síntomas de la esquizofrenia, particularmente los síntomas negativos.

En otro aspecto, la invención proporciona la fabricación de medicamentos para aliviar los déficits cognitivos en la esquizofrenia, particularmente en los pacientes con esquizofrenia de edad. Las células terapéuticas deben administrarse en un complejo de célula/soporte por inyección o implantación en el córtex prefrontal del cerebro del sujeto, particularmente el córtex prefrontal dorsolateral. Como con los presentes medicamentos para el tratamiento de los síntomas negativos de la esquizofrenia, pueden utilizarse células terapéuticas en un complejo de célula/soporte con células protectoras y/o células soporte, para la fabricación de un medicamento para tratar defectos cognitivos. La administración de células terapéuticas en un complejo célula/soporte produce una mejoría en la función cognitiva.

La invención también proporciona medicamentos para el tratamiento de los efectos secundarios extrapiramidales (EPS) causados por fármacos antipsicóticos. De acuerdo con la invención, un complejo célula/soporte que comprende células terapéuticas que producen dopamina o precursores de dopamina adheridos a una matriz soporte se usa en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto que sufre EPS (como discinesia tardía, distonía tardía y/o acatisia tardía). Las células terapéuticas pueden administrarse opcionalmente en combinación con las células protectoras. Preferiblemente, las células deben administrarse por implantación o inyección en uno o más sitios en el área estriatal del cerebro del sujeto. Preferiblemente, las células deben administrarse en un modelo simétricamente-bilateralmente.

Células

Células terapéuticas, de acuerdo con esta invención, producen dopamina o un precursor de dopamina (por ejemplo, L-DOPA). Las células útiles en la práctica de varios aspectos de esta invención incluyen células de origen neural, células paraneurales como las células RPE y células de cromafina, células fabricadas por hibridación celular somática, células derivadas de la médula adrenal y células que se han fabricado genéticamente para producir factores activos biológicamente. En esta invención se prefiere usar células neurales y paraneurales.

Típicamente, una célula utilizada en esta invención se selecciona por su capacidad para producir dopamina o un precursor de dopamina. Alternativamente, una célula puede seleccionarse para otras propiedades (como facilidad de propagación *in vitro*) y fabricadas genéticamente para producir el compuesto activo biológicamente deseado.

Generalmente, las células a usar de acuerdo con la invención son post-mitóticas o de potencial mitótico controlado o muy bajo cuando se administran al sujeto. Como entenderán los expertos en la técnica, la introducción de células que se dividen activamente en el cráneo deben evitarse. La introducción de células que se dividen activamente en el cráneo de un sujeto puede llevar a la formación de un tumor, que puede dañar o destruir estructuras en el cerebro del sujeto debido al daño compresivo.

Una célula preferida para usar en esta invención es una célula paraneural. Las células epiteliales pigmentadas retinales (RPE) que se encuentran como una monocapa entre la retina y la úvea y que producen dopamina y otros factores, son una célula paraneural preferida (Song *et al.*, 1990, *J. Cell. Physiol.* 148:196-203). Los métodos para aislar y cultivar células RPE humanas son conocidas en la técnica (por ejemplo, como se describe en Lin *et al.* 1988, *Exp. Eye Res.* 47:911-917; López *et al.*, 1989 *Invest. Ophthalmol. Vis* 30:586-588; y Lui *et al.*, 1990, *Investigative Ophthalmol.*, ARVO Supplement). Las células RPE pueden aislarse de cualquier fuente conocida en la técnica y son preferiblemente humanas.

Otro ejemplo de una célula de origen paraneural es una célula de cromafina medularmente adrenal. Las células que forman la médula adrenal de mamíferos se derivan de la cresta neural y poseen el potencial de desarrollar a lo largo tanto líneas endocrinas como neuronales de diferenciación (Bohn *et al.*, 1981, *supra* y 1982, *Devel Biol* 89:299-308; Unsicker, 1985, *Develop. Biol.* 108:259-268). Las células de cromafina de mamíferos de la médula adrenal, cuando se sepan de influencias de la corteza adrenal y se exponen al factor de crecimiento del nervio (NGF), cambian de un fenotipo endocrino a uno neuronal (Notter *et al.*, 1986, *Cell Tiss. Res.* 244:69-70; Stromberg *et al.*, 1985, *Exp. Brain Res* 60:335-349). Cuando están co-injertadas con tejido de la corteza cerebral o del hipocampo dentro de la cámara anterior del ojo de la rata, las células de cromafina adrenal forman fibras nerviosas que inervan el tejido cerebral co-injertado adyacente (Olson *et al.*, 1990, *Exp. Neurol.* 70:414-426). Se ha demostrado también que el tejido medular adrenal puede corregir los déficits funcionales que resultan del agotamiento de la dopamina nigroestriatal en ratas (véase, por ejemplo, Freed *et al.*, 1981, *Nature* 292(5821):351-352), aunque la secreción de dopamina y la mejoría funcional por el implante, disminuye aproximadamente a los tres o seis meses de la implantación. Sin embargo, el tratamiento NGF de las células trasplantadas induce a excrecencia de fibra desde el trasplante al huésped e induce a una recuperación del comportamiento de más larga duración (al menos un año) y pocas células implantadas sobreviven sin tratamiento NGF. Por consiguiente, en las realizaciones que utilizan células de cromafina de la médula adrenal como células terapéuticas, las células terapéuticas se tratan preferiblemente con un factor neurotrófico, preferiblemente NGF, previamente a la implantación, y pueden implantarse opcionalmente en presencia de un factor neurotrófico como NGF.

Otra fuente de célula terapéutica establece líneas celulares neurales. Existen muchos clones neurales que se han usado extensivamente como sistemas modelo de desarrollo puesto que son activos eléctricamente con receptores de superficie apropiados, neurotransmisores específicos, propiedades de formación de sinapsis y la capacidad de diferenciar morfológica y bioquímicamente en las neuronas normales. Dichas células se describen, por ejemplo, en las siguientes referencias: Khimi *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 73:462-466; In: *Excitable Cells in Tissue Culture*, Nelson, P. G. *et al.*, eds., Plenum Press, New York. 1977, pp. 173-245; Prasad *et al.*, In: *Control of Proliferation de Animal Cells*, Clarkson, B. *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1974, pp.581-594; P...*et al.*, 1976, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:3544-3548; Notter *et al.*, 1986, *Devel. Brain Res.* 26:59-68; Shubert *et al.*, 1970, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 67-247-254; Kaplan *et al.*, In: *Basic and clinical Aspects of Molecular Neurobiology*, Guffrida-Stella, A.M. *et al.*, eds., Milano Fondazione Internazionale Manarini, 1982.

Las líneas celulares neurales tienen cualidades ventajosas que pueden ser útiles en esta invención. Generalmente, estas células pueden propagarse *in vitro* indefinidamente, lo que simplifica la manipulación genética de las células. Adicionalmente, el fenotipo de células diferenciadas a partir de la mayoría de las líneas celulares neurales puede manipularse alterando el medio de cultivo. Debe señalarse que, debido al potencial de dichas líneas celulares de formar tumores benignos o malignos, las células terapéuticas derivadas de las líneas celulares se vuelven amitóticas antes de la administración de acuerdo con esta invención. Por tanto, en una realización de esta invención, las células de la línea celular se modulan *in vitro* con el factor de crecimiento o de diferenciación apropiado y con un agente amitótico antes del trasplante con el fin de promover la supervivencia celular y prevenir la expresión del potencial tumorigénico.

Por ejemplo, las células de neuroblastoma humanas de la línea celular IMR 32 pueden sobrevivir y expresar marcadores colinérgicos en el cerebro de los primates nueve meses después del trasplante (Gash *et al.*, 1986, *Science* 233:120-22). Como se señaló antes, estas células se tratan preferiblemente para hacerlas morfológica y bioquímicamente diferenciadas *in vitro* y deben volverse permanentemente amitóticas antes de su administración, lo que además ayuda a su supervivencia (Gash *et al.*, *supra.*; Gupta *et al.*, *Dev. Brain Res.* 19:21-19). Las células de la línea celular feocromocitoma/neuroblastoma, PC12, pueden estimularse para diferenciarse *in vitro* con la adición de NGF y agentes antimitóticos al medio de cultivo. Las células diferenciadas resultantes producen neurotransmisores de catecolamina. Las líneas celulares neurales útiles como células terapéuticas de acuerdo con esta invención son aquellas líneas celulares neurales que producen dopamina naturalmente, a través de la manipulación de hormona/factor de crecimiento de las células, o a través de la ingeniería genética de las células.

También pueden usarse híbridos de células somáticas como fuente de células terapéuticas. Pueden formarse híbridos de células somáticas que retienen las propiedades de las células diferenciadas. Por ejemplo, los híbridos derivados de la fusión de los ganglios simpáticos y de las células de neuroblastoma pueden sintetizar dopamina (Gree-

ES 2 275 501 T3

ne *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4923-4927). Los precursores embrionarios de neuronas dopaminérgicas del CNS pueden fusionarse con células mitóticas para incorporar ambos genomas en uno individual que pierda cromosomas extra a lo largo de tiempo y de lugar a una nueva línea híbrida. Los expertos en la técnica conocen métodos para producir dichas células paraneurales o neurales híbridas sin experimentación indebida, clasificarlas para los rasgos deseados (incluyendo secreción de dopamina) y seleccionar aquellas que tienen el mejor potencial para transplante.

Las células que se han sometido a ingeniería genética para producir una sustancia de interés neurológico pueden usarse como células terapéuticas. Un tipo de célula preferido para la ingeniería genética es un fibroblasto de prepucio humano, que se obtiene y se cultiva fácilmente. Para usarse en esta invención, las células se alteran genéticamente, utilizando métodos conocidos en la técnica, para expresar las enzimas necesarias para la producción de dopamina o precursores de dopamina (por ejemplo, tirosina hidroxilasa; Wolf *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(22):9011-9014, y/o L-DOPA decarboxilasa, Scherer *et al.*, 1992, *Genomics* 13(2):469-471). Véase por ejemplo Gage *et al.*, 1987, *Neuroscience* 23:795-807; Rosenberg *et al.*, 198, *Science* 242:1575-1578; Shimohama *et al.*, 199, *Mol. Brain Res* 5:271-278.

Las moléculas de ADN recombinante útiles para los métodos de esta invención pueden producirse a través de una variedad de medios, como por ejemplo, síntesis de RNA o ADN, o más preferiblemente por aplicación de técnicas de ADN recombinante. Las técnicas para sintetizar dichas moléculas se muestran por ejemplo en Wu *et al.*, (1978, *Prog Nucl. Acid. Res. Molec. Biol.* 21:101-141). Los procedimientos para construir moléculas recombinantes son bien conocidos en la técnica y se muestran con detalle en, por ejemplo, Sambrook *et al.* (*supra*).

La dopamina se sintetiza a partir del aminoácido tirosina en un procedimiento de dos pasos. La tirosina se hidroxila primero por tirosina hidroxilasa para producir L-DOPA. L-DOPA, que se utiliza como terapia en los trastornos neurológicos que implican la pérdida de neuronas dopaminérgicas, como la enfermedad de Parkinson, se convierte en dopamina por la L-DOPA decarboxilasa. Los genes de tirosina hidroxilasa y de L-DOPA decarboxilasa se conocen en gran número de diferentes especies, incluyendo los humanos.

Preferiblemente, las células se fabrican genéticamente para producir enzimas de “especies equivalentes”; esto es, si el sujeto es un humano, las enzimas de trayectoria de dopamina fabricadas genéticamente son también humanas. Sin embargo, puesto que el cerebro es un sitio privilegiado inmunológicamente, no es necesario que las enzimas de trayectoria de dopamina fabricadas genéticamente sean especies equivalentes.

El(los) gen(es) para la ingeniería genética pueden amplificarse convenientemente a partir de ADN o ARN que contiene el gen(es) de interés utilizando la reacción en cadena de polimerasa o cualquier otro método de amplificación dependiente de la plantilla, como es bien conocido e la técnica. El ADN amplificado se aísla entonces utilizando técnicas estándar (como electroforesis sobre gel de agarosa). Alternativamente, el gen(es) pueden aislarse a partir de una biblioteca de ADN, típicamente de cADN, que se conoce o se cree que contiene el gen(es) de interés. El gen(es) se aísla utilizando técnicas bien conocidas incluyendo exploración de hibridación nucleica, visualización de fagos, exploración de expresión utilizando anticuerpos o receptores comunes que se unen al producto de gen deseado, y secuenciación de ADN).

Una vez aislado el gen(es) se subclona en un “vector de expresión” (un constructo de ADN que comprende las secuencias regulatorias translacionales o transcripcionales del mRNA resultante en la célula terapéutica) de modo que el gen(es) se enlaza operablemente a las secuencias regulatorias transcripcionales y translacionales. Si se somete a ingeniería genética más de un gen en las células, los genes se enlazan preferiblemente para separar secuencias reguladoras transcripcionales/translacionales.

Los constructos de expresión para usar en células eucarióticas se conocen bien en la técnica. Generalmente, el constructo de expresión comprende un potenciador, un promotor que incluye secuencias regulatorias de iniciación transcripcionales y transcripcionales, uno o más intrones (que pueden situarse en el extremo 5' del gen, dentro de la secuencia del gen, o en el extremo 3' del gen), el gen de interés, un codón de terminación, una secuencia 3' no trasladada (3' UTR) y un sitio de adición poli-A-. Los detalles precisos del constructo de expresión variarán según las especies y el tipo de célula de la célula soporte o terapéutica que es el sujeto de la ingeniería genética, como se conoce en la técnica.

Como es evidente para los expertos en la técnica, el promotor; potenciador, intrones, 3' UTR, y el sitio de adición poli-A puede ser nativo del gen o puede ser heterólogo, dependiendo del gen y de la célula terapéutica. En muchos casos, el promotor puede ser un promotor heterólogo, como el promotor I metalotioneína del ratón (Hamer *et al.*, 192, *J. Mol. Appl. Gen* 1:273-288); el promotor TK del virus Herpes (McKnight, 1982, *Cell* 31-355-365); el promotor temprano SV40 (Benoist *et al.*, 1981, *Nature* (London) 290:304-310) y el promotor de colágeno (Prockop *et al.*, 1979, *New Eng. J. Med* 301:13-23, 77-85; Eyre, 1980 *Science* 207:1315-1322, Martin *et al.*, 1985, *Trends Biochem Sci.* 10:285-287). Los potenciadores heterólogos útiles incluyen el potenciador SV40.

Resultará evidente para los expertos en la técnica que los marcadores de superficie celular pueden utilizarse para seleccionar las células terapéuticas antes de la administración. Los marcadores específicos pueden utilizarse para seleccionar las células diferenciadas completamente de una población de células, o para seleccionar genéticamente células modificadas. Se conocen muchos marcadores CNS-específicos que pueden ser útiles para la selección de células,

incluyendo los gangliosidos específicos-CNS, receptores de superficie celular para neurotransmisores y neuropéptidos y otros marcadores como se conocen en la técnica, como son métodos para utilizar estos marcadores para seleccionar las células deseadas.

5 Si las células terapéuticas son heterólogas al sujeto (es decir, se derivan de otro individuo y/o especies), entonces debe considerarse la posibilidad de una reacción inmune contra las células terapéuticas. Como se estableció antes, las células terapéuticas son preferiblemente de especies iguales. Si las células terapéuticas son de especies iguales, el riesgo de rechazo hiperagudo es de muy bajo orden. Sin embargo, son posibles las reacciones de rechazo de injerto crónicas y agudas. Por consiguiente, en algunas realizaciones de la invención, particularmente cuando las células terapéuticas no son análogas, las células terapéuticas tienen las propiedades de las células protectoras (por ejemplo, células RPE) o se administran con células protectoras (por ejemplo, células Sertoli). Si las células terapéuticas se administran con células protectoras separadas, las dos tipos de células se pueden mezclar antes de o durante la unión a la matriz soporte, o pueden unirse separadamente a las matrices soporte y combinarse inmediatamente antes o durante la administración al sujeto. Si las células terapéuticas y las células protectoras se adhieren separadamente a las matrices soportes, las matrices soportes para las células terapéuticas y las células protectoras pueden ser iguales o diferentes. Generalmente, aproximadamente, 10^2 - 10^7 células protectoras se administran con las células terapéuticas por sitio de administración, preferiblemente 10^3 - 10^6 células protectoras, aunque el número exacto variará dependiendo de las propiedades de las células protectoras (por ejemplo, el nivel de expresión de la molécula inmunosupresora), como será evidente para los expertos en la técnica.

20 Las células transplantadas en el cerebro de mamífero de acuerdo con esta invención pueden sobrevivir en ausencia de factores de crecimiento añadidos. Sin embargo, en algunas realizaciones de la invención, las células terapéuticas se tratan con un factor neurotrófico (por ejemplo, NGF) antes, durante o después de la unión a la matriz soporte, y/o pueden tratarse con un factor neurotrófico durante o después de la administración al sujeto.

25 Las células terapéuticas de la invención pueden también implantarse o inyectarse con células soporte. Las células glial generalmente actúan como neuronas soporte en el sistema nervioso, y las células glial injertadas pueden jugar un importante papel en la recuperación funcional de neuronas, por ejemplo, suministrando factores neurotróficos importantes (Doering *et al.*, 1984, *J. Neurolog Sci.* 63:183-196; Cumble *et al.*, 1984 *Neurosci. Lett* 37:307-311). Adicionalmente cualquier célula elegida puede someterse a ingeniería genética para proporcionar factores neurotróficos. Por consiguiente, en ciertas realizaciones de la invención, las células terapéuticas se administran al sujeto en combinación con las células soporte. Las células terapéuticas se pueden combinar con las células soporte antes de o durante la unión a la matriz soporte, o pueden unirse separadamente a las matrices soportes y combinarse inmediatamente antes o durante la administración al sujeto. Si las células terapéuticas y las células soporte se adhieren por separado a las matrices soportes, las matrices soportes para las células terapéuticas y las células soporte pueden ser iguales o diferentes. Adicionalmente, las células soporte pueden combinarse con células terapéuticas y células protectoras.

40 *Matrices soporte*

La matriz soporte está hecha de material que es preferiblemente no tóxico, por ejemplo, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, policarbonato, polipentano, polímero de acrilonitrilo, nylon, magnetita, polisacárido natural, un polisacárido modificado, colágeno, gelatina y gelatina modificada como gelatina reticulada.

45 Una matriz soporte preferida es un microvehículo de gelatina, como se describe para ejemplo en la patente de EEUU n° 4.935.365. Los microvehículos de gelatina apropiados están disponibles comercialmente como microvehículos porosos de Cultispher-S®. Estos microvehículos de gelatina tienen diámetros que van de 80 μm a 330 μm . Particularmente preferidos en la práctica de la invención reivindicada son los microvehículos porosos de gelatina de enlace cruzado que tienen un diámetro entre 80 μm a 170 μm (120 μm). Cuando se usan células humanas RPE se ha determinado que a estos microvehículos de gelatina se adhieran, como media 24 células por microvehículo, comparado con los vehículos de colágeno o de vidrio (por ejemplo Cytodex) a los que se adhieren aproximadamente 5-7 células por microvehículo.

55 Debe observarse que la matriz soporte de esta invención no es un material o matriz de encapsulación. De acuerdo con esta invención, las células están unidas a o recubren la superficie del soporte; no están encapsuladas dentro de un compartimento cerrado. Cuando están unidas al soporte de acuerdo con esta invención, las células usadas para trasplante están generalmente sobre la "superficie exterior" del soporte. El soporte puede ser sólido o poroso. Sin embargo, incluso en un soporte poroso, las células están en contacto directo con el medio externo sin una membrana que intervenga u otra barrera. Así, de acuerdo con esta invención, se considera que las células están en la "superficie exterior" del soporte incluso aunque la superficie a la que se adhieren pueda estar en forma de pliegues internos o con voluciones del material de soporte poroso que no están en el exterior de la propia partícula o cuenta. Debe señalarse además que la matriz soporte de esta invención no presenta requisitos en cuanto a que el material tenga propiedades de permeabilidad particulares, como el "corte" de peso molecular particular.

65 La configuración del soporte es preferiblemente esférica, como en una cuenta, pero puede ser cilíndrico, elíptico, una banda u hoja plana, una forma de alfiler o aguja, y similares. Las formas de cuenta pueden ir de 10 μm a 200 μm de diámetro, preferiblemente de aproximadamente 90 μm a aproximadamente 150 μm , incluso más preferiblemente alrededor de 100 μm . Para una descripción de varias cuentas microvehículos, véase, por ejemplo, *Fisher Biotech Source*

ES 2 275 501 T3

87-88. Fisher Scientific, Co., 1987, pp. 72-75; Sigma *Cell Culture Catalog*, Sigma Chemical Co St. Louis, 1991, pp 162-163; *Ventrex Product Catalog*, Ventrex Laboratories, 1989; Patente n° 4.935.365.

5 Para mejorar la función, supervivencia y adhesión celular, la matriz sólida puede recubrirse opcionalmente en su superficie externa con factores conocidos en la técnica para promover la adhesión, el crecimiento o la supervivencia celular. Dichos factores incluyen moléculas de adhesión celular, matriz extracelular, tal como, por ejemplo, fibronectina, laminina, colágeno, elastina, glicosaminoglicanos o proteoglicanos (véase: Albers, B. *supra*, pp. 802-834) o factores de crecimiento, como, por ejemplo, NGF. Alternativamente, si la matriz sólida a la que se unen las células está construida con un material poroso, el factor o factores que promueven la supervivencia o crecimiento celulares pueden incorporarse en el material de la matriz, de la que se eliminarán lentamente después de la implantación *in vivo*.

Adhesión de células a una matriz soporte

15 Las células útiles para la práctica de esta invención pueden adherirse a una matriz soporte por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Típicamente, las células pueden adherirse simplemente por incubación con la matriz soporte. Las cantidades relativas y concentraciones de células en los microvehículos pueden determinarlas fácilmente los expertos en la técnica, pero en una de las realizaciones preferidas, las células y microvehículos se mezclan en una proporción conocida de entre aproximadamente 5 a aproximadamente 50 células por microvehículo.

20 En una realización preferida, los microvehículos de Cultispher® (gelatina reticulada) se incuban con células terapéuticas, células protectoras, células soporte, o cualquiera de sus combinaciones, bajo condiciones que promueven la unión de las células a los microvehículos, por ejemplo, durante al menos 4 horas mientras se mezclan o al menos 15 horas sin mezclar, formando un complejo célula/soporte (células terapéuticas, células protectoras, células soporte o cualquier combinación de ellas adheridas a la matriz soporte). Debe señalarse que los microvehículos deben esterilizarse antes de la incubación con las células, utilizando una apropiada técnica de esterilización apropiada al microvehículo, como resultará evidente para los expertos en la técnica.

30 El complejo célula/soporte se formula preferiblemente como una suspensión líquida. El líquido puede comprender simplemente un tampón isotónico fisiológica y farmacéuticamente aceptable o puede contener componentes adicionales, incluyendo, aunque no limitándose a ello, nutrientes, vitaminas, antioxidantes, factores de crecimiento y factores neurotróficos. En una realización preferida, el complejo célula-soporte se formula en una solución salina tamponada de Hank (HBSS).

Administración del complejo célula/soporte a los sujetos

35 Los métodos para aportar células a un sitio determinado en el cerebro son conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, el medicamento que comprende el complejo célula-soporte debe administrarse directamente dentro del sitio particular del cerebro, por ejemplo, por inyección o por implantación. Para tratar los síntomas negativos de la esquizofrenia, por ejemplo, el complejo célula-soporte puede administrarse dentro del córtex prefrontal. Para mejorar los déficits cognitivos de la esquizofrenia, el complejo célula-soporte se administra también al córtex prefrontal, particularmente al córtex prefrontal dorsolateral. El EPS (por ejemplo, discinesia tardía, distonía tardía y/o acatisia tardía) se tratan por administración de un complejo matriz soporte/célula terapéutica al área estriatal del cerebro del sujeto.

45 Típicamente, el sitio(s) de interés se identifica y, utilizando las coordenadas del atlas estereotáxico estándar, o alternativamente utilizando las coordenadas desarrolladas a partir de una exploración de imagen de resonancia magnética (MRI), el complejo célula/matriz soporte se inyecta. Como será evidente para los expertos en la técnica, las agujas utilizadas para la inyección deben elegirse para minimizar la obstrucción de la aguja y minimizar el daño al tejido del sitio de inyección. Por consiguiente, el tamaño de la aguja dependerá del tamaño y forma de la matriz soporte.

50 La aguja utilizada para la inyección puede ser recta, biselada o tener una punta doblada. Si se utiliza una aguja biselada o con punta doblada, debe tenerse cuidado y corregir las coordenadas estereotáxicas para compensar la punta de la aguja.

55 Alternativamente, se implantará el complejo célula/soporte. Si se usa la implantación, el complejo célula-soporte se formula preferiblemente como un lodo o un pelet. Se identifica el sitio para la implantación y entonces se deposita el pelet o lodo de la célula/soporte en el lugar de implantación utilizando técnicas quirúrgicas estándar.

60 El número de células que se administran a un sujeto particular dependerá de un gran número de variables individuales, como será evidente para los expertos en la técnica. La gravedad del trastorno, el historial médico y psiquiátrico del paciente y las propiedades de las células terapéuticas se consideran cuando se selecciona el número y tipo de células que administrar al sujeto. Generalmente, aproximadamente se administran 10^3 - 10^7 células terapéuticas por sitio, preferiblemente 10^5 - 10^6 células por sitio, en un total de 1 a 25 sitios, más preferiblemente de 5 a 20 sitios para el tratamiento de los síntomas negativos de la esquizofrenia, los déficits cognitivos asociados a la esquizofrenia o la discinesia tardía.

65 Preferiblemente el medicamento que comprende el complejo célula/soporte debe administrarse al sujeto que sufre los síntomas negativos de la esquizofrenia, los déficits cognitivos asociados con la esquizofrenia o EPS en una única ocasión (aunque el sujeto puede recibir el complejo célula/soporte en múltiples sitios en esa única ocasión), para

minimizar el trauma al sujeto. Sin embargo, como será evidente para los expertos en la técnica, la célula-matriz soporte puede suministrarse al paciente en múltiples dosis. Preferiblemente, cualquier complejo de célula-soporte administrado subsecuentemente a la primera ocasión se administra al menos una semana y preferiblemente 4 semanas después de la primera ocasión de la administración, para permitir la valoración del sujeto después de cada administración.

5 El tratamiento de un sujeto que sufre los síntomas negativos de la esquizofrenia por administración de células terapéuticas al sujeto produce una mejoría en los síntomas negativos, por ejemplo, alivio o eliminación de uno o más de los síntomas negativos, disminución de la extensión de los síntomas negativos, estabilización de los síntomas negativos del sujeto o retraso o ralentización de la progresión de los síntomas negativos. Los síntomas negativos de la esquizofrenia del sujeto pueden medirse (antes, durante o después de la administración de células terapéuticas) utilizando cualquier dispositivo, escala o método de medición relevante conocido en la técnica, como PANSS, el SAPS, el SANS o el SCZI, preferiblemente el PANSS.

15 El tratamiento de un sujeto que sufre déficit(s) cognitivo(s) en la esquizofrenia con administración de células terapéuticas al sujeto produce un alivio de los déficit(s) cognitivo(s), por ejemplo, con la mejora de la función cognitiva o un retraso o ralentización del déficit cognitivo incrementado. La función cognitiva puede medirse antes o después del tratamiento de acuerdo con la invención, utilizando cualquier ensayo o escala relevante conocidos en la técnica, incluyendo los ensayos neuropsicológicos estándar como el Wisconsin Card Sorting Test (WCST), el Mini-mental State Examination (MMSE), el Alzheimer's Disease Assessment Scale (ADAS) y el Clinical Global Impresión (CGI), pero más preferiblemente las versiones de lápiz y papel de tareas que activen el área 56 Walker en primates no humanos como el ensayo de memoria de trabajo descrito por Keefe et al. (1995, *Schizophr. Res.* 17(1):25-33).

25 El tratamiento de un sujeto que sufre un EPS causado por un fármaco antipsicótico como la discinesia tardía, la distonia tardía y/o la acatisia tardía por administración de células terapéuticas al sujeto, produce una mejoría de los síntomas del EPS por, por ejemplo, reducción o eliminación de movimientos no dirigidos, reducción, eliminación o estabilización de la distonia en cualquier sitio afectado particular, reducción, eliminación o estabilización de los síntomas relacionados con la acatisia, estabilización de los síntomas de discinesia del sujeto o un retraso o ralentización de la progresión de los síntomas de discinesia. Los EPS del sujeto pueden medirse (antes, durante o después de la administración de las células terapéuticas) utilizando cualquier método, escala o dispositivo de medición conocido en la técnica, como el Abnormal Involuntary Movement Scale (AIMS), el Barnes Akathisia Scale (BAS), the Modified Simpson Dyskinesia Scale (MSDS) y el Simpson-Angus Extrapiramidal Effects Scale (S-AS), preferiblemente el AIMS.

Ejemplos

35 Ejemplo 1

Tratamiento de los síntomas negativos de la esquizofrenia con la administración de células RPE adheridas a una matriz soporte

40 Los humanos que habían ingerido PCP durante bastante tiempo mostraban un gran número de síntomas asociados con la esquizofrenia, como rechazo, embotamiento afectivo, paranoia, delusiones y alucinaciones. Esta observación es la base de un modelo aceptado de esquizofrenia que utiliza la administración a largo plazo de fenciclidina (PCP) a monos vervet (Jentsch *et al.*, *supra*).

45 Los monos Vervet (*Cercopithecus aethiops sabaues*) se dividen en tres grupos. El primer grupo ("Control") recibió inyecciones salinas intramusculares (IM) *bid* durante 14 días. El segundo y tercer grupo ("PCP-" y "PCP+") recibió 0.3 mg/kg de PCP por inyección IM, *bid*, durante 14 días.

50 Las células RPE humanas se preparan de acuerdo con el método de Lui *et al.* (1990, *Investigative Ophthalmol.*, ARVO Supplement). Las células se adhieren a microesferas de gelatina reticuladas (Cultispher-S[®], diámetro medio 120 μ m) mezclando microesferas con células suspendidas en el medio de cultivo (medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM) con suero de ternera fetal (FCS) al 10%), después se incubaba la mezcla durante toda la noche a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% para formar el complejo célula-soporte. El complejo célula-soporte se aclaró y se resuspendió en HBSS.

60 El complejo célula-soporte se administró a monos PCP+ en 10 sitios en el córtex prefrontal por inyección estereotáxica. Aproximadamente 5 x 10⁵ células se administraron por sitio. Los monos PCP- y de control recibieron inyecciones de un volumen igual a la matriz soporte suspendida HBSS en 10 sitios en el córtex prefrontal por inyección estereotáxica.

65 Después de dejar que los animales recuperaran de la cirugía durante una o dos semanas, todos los monos fueron evaluados ensayando la función cognitiva prefrontal utilizando el ensayo de "object retrieval with detour task" ("recuperación del objeto con trabajo de rodeo"). En dicho ensayo, los monos están entrenados para recuperar un premio de una caja transparente con una única abertura. Se puntuó a los monos con la tasa de éxito en el primer intento (recuperando el premio a través de la abertura en el primer intento), alcances a la barrera (número de alcances hacia el premio sobre un lado cerrado de la caja), y perseveración (número de intentos repetidos para alcanzar el premio a través de un lado cerrado).

ES 2 275 501 T3

Ejemplo 2

Tratamiento de la discinesia tardía con la administración de células RPE adheridas a una matriz soporte

5 La administración a largo plazo a monos *Cebus* de ciertos fármacos antipsicóticos, proporcionan un modelo para el EPS humano asociado a la terapia con fármacos antipsicóticos, particularmente TD (Kovacic *et al.*, 1982, *J. Clin Psychopharm* 2(5):305-307). Los monos *Cebus* tratados con administración a largo plazo de flufenazina muestran síntomas de TD clásicos, incluyendo movimientos rítmicos de los dedos, movimientos análogos a los paseos rápidos de los humanos, y síntomas orales como movimientos arriba y abajo rítmicos de la mandíbula y movimientos de la lengua.

10 Los monos *Cebus apella* se trataron para producir un modelo de TD, por administración a largo plazo de enantato de flufenazina depot. La flufenazina se administró bisemanalmente, progresando desde una dosis baja (0,1 mg/kg) a 3.2 mg/kg durante seis meses. El tratamiento se continuó durante al menos un año.

15 Se observó la actividad de los monos, con particular atención a la actividad locomotora y a los signos de TD, para establecer niveles de línea base de EPS. Los monos se dividieron en dos grupos: control y tratamiento.

20 Las células humanas se prepararon de acuerdo con el método de Lui *et al.* (1990, *Investigative Ophthalmol.*, ARVO Supplement). Las células se adhieren a microesferas de gelatina reticulada (Cultispher-S[®], diámetro medio 120 μm) mezclando microesferas con células suspendidas en el medio de cultivo (medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM) con suero de ternera fetal (FCS) al 10%), después se incubó la mezcla durante toda la noche a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% para formar el complejo célula-soporte. El complejo célula-soporte se aclaró y se resuspendió en HBSS.

25 El complejo célula-soporte se administró por inyección estereotáxica al estriato de los monos del grupo de tratamiento, administrando aproximadamente 5×10^5 células por sitio. Los monos PCP y de control recibieron inyecciones de un volumen igual a la matriz soporte suspendida HBSS en 10 sitios en el estriato por inyección estereotáxica.

30 Después de un periodo de recuperación de una o dos semanas, los monos del grupo de tratamiento y de control se evaluaron respecto a la actividad locomotora y los signos de TD.

35 Esta invención se ha detallado tanto por descripción directa como con ejemplos. Las modificaciones y equivalencias de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica y se encuentran dentro del alcance de la invención.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de células terapéuticas que producen dopamina o un precursor de dopamina y una primera matriz soporte en la fabricación de un complejo célula/soporte que comprende células terapéuticas adheridas a la primera matriz soporte, y la primera matriz soporte es para tratar un síntoma negativo de esquizofrenia en un sujeto en un método que comprende administrar una cantidad efectiva del complejo célula/soporte al cortex prefrontal del cerebro del sujeto.
- 10 2. El uso de la reivindicación 1, en que el síntoma negativo es aplanamiento afectivo, avolición, anhedonia, rechazo social, o apatía.
- 15 3. Uso de células terapéuticas que producen dopamina o un precursor de dopamina y una primera matriz soporte en la fabricación de un complejo célula/soporte que comprende células terapéuticas adheridas a la primera matriz soporte, y el complejo célula/soporte es para usar en el alivio de un déficit cognitivo en esquizofrenia en un método que comprende administrar una cantidad efectiva del complejo célula/soporte al córtex prefrontal del cerebro del sujeto.
- 20 4. Uso de células terapéuticas que producen dopamina o un precursor de dopamina y una primera matriz soporte en la fabricación de complejo célula/soporte que comprende células terapéuticas adheridas a la primera matriz soporte, y el complejo célula/soporte es para tratar un síntoma de efectos secundarios extrapiramidales (EPS) causados por fármacos antipsicóticos, en un método que comprende administrar una cantidad efectiva del complejo célula/soporte que comprende células terapéuticas al área estriatal del cerebro de un sujeto, en que el sujeto está sufriendo EPS debido a fármacos antipsicóticos.
- 25 5. El uso de la reivindicación 4, en que EPS es discinesia tardía.
6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que ese complejo célula/soporte es para administrar al sujeto por inyección.
- 30 7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en que ese complejo célula/soporte es para administración al sujeto por implantación.
- 35 8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en que esa primera matriz soporte está hecha de vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, fluoruro de polivinilideno, poliuretano, polialginato, polisulfona, alcohol polivinílico, polímeros de acrilonitrilo, poliacrilamida, policarbonato, polipenteno, polímero acrilonitrilo, nylon, magnetita, polisacárido natural, polisacárido modificado, colágeno, gelatina o gelatina modificada.
- 40 9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en que esa primera matriz soporte es gelatina o gelatina reticulada.
10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en que esa primera matriz soporte es gelatina reticulada.
- 45 11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en que las células terapéuticas son células epiteliales pigmentadas retinales, células derivadas de la médula adrenal, o células que se han sometido a ingeniería genética para expresar un precursor de dopamina.
- 50 12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en que las células terapéuticas producen un precursor de dopamina.
13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en que las células producen dopamina.
- 55 14. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en que las células terapéuticas son células de epitelio pigmentadas retinales (RPE).
15. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en que el sujeto es un ser humano.
- 60 16. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en que ese complejo célula/soporte además comprende células protectoras que producen un sitio inmunológicamente privilegiado.
17. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en que ese complejo célula/soporte además comprende células soporte que producen factores que mejoran la viabilidad de las células terapéuticas.
- 65 18. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en que esas células protectoras son adherentes a una segunda matriz soporte.
19. El uso de la reivindicación 18, en que ese complejo célula/soporte además comprende células soporte adherentes a una tercera matriz soporte.