(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 976 483**

(51) Int. Cl.:

A61P 25/00 (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2017 E 21180715 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024 EP 3903795**

(54) Título: **Unidad de tejido neural y uso de una unidad de este tipo para la implantación en el sistema nervioso de un mamífero**

(30) Prioridad:

23.11.2016 FR 1661378

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.08.2024

(73) Titular/es:

UNIVERSITE DE BORDEAUX (33.3%)
35, Place Pey Berland
33000 Bordeaux, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (33.3%) y
INSTITUT D'OPTIQUE THÉORIQUE ET APPLIQUÉE (33.3%)

(72) Inventor/es:

FEYEUX, MAXIME;
ALESSANDRI, KEVIN;
NASSOY, PIERRE;
COGNET, LAURENT;
BENAZZOUZ, ABDELHAMID y
BEZARD, ERWAN

(74) Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

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

Unidad de tejido neural y uso de una unidad de este tipo para la implantación en el sistema nervioso de un mamífero

La invención se define en las reivindicaciones y se refiere a una unidad de tejido neural, que comprende una pluralidad de células neuronales postmitóticas, y eventualmente células de la glía, organizadas en red tridimensional (3D) en una matriz extracelular, y a su uso como unidad para implantar en el sistema nervioso de un mamífero. Una unidad de tejido neural de este tipo puede usarse concretamente para injertar células neuronales que presentan un fenotipo de interés en el sistema nervioso de un sujeto, con el fin de tratar una enfermedad neurodegenerativa.

Desde hace varias décadas, las enfermedades neurodegenerativas constituyen un desafío principal para la sociedad, tanto en cuanto a la comprensión de los fenómenos biológicos implicados como en cuanto al tratamiento. En efecto, cada vez más personas padecen estas enfermedades, cuyas consecuencias para el paciente, así como para sus familiares, son dramáticas.

El término genérico de "enfermedad neurodegenerativa" agrupa un gran número de enfermedades, caracterizadas principalmente por una muerte neuronal más rápida que durante un envejecimiento normal, entre ellas enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la corea de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, etc. El sistema nervioso puede verse afectado de manera diversa, conllevando una variedad de síntomas entre ellos trastornos de la motricidad, del equilibrio, del comportamiento y/o de la cognición.

En la actualidad, con frecuencia no se conocen bien las causas y los mecanismos de las enfermedades neurodegenerativas, haciendo que su tratamiento sea tanto más complejo. Por el momento no existe ningún tratamiento convincente que permita curar estas enfermedades.

Desde hace algunos años, ejes de desarrollo se han basado en la terapia celular intracerebral y, más particularmente, en el injerto de neuronas en las zonas lesionadas del cerebro de sujetos que padecen enfermedades neurodegenerativas. El objetivo de estos injertos es sustituir de manera duradera las neuronas destruidas por la enfermedad. Por tanto, se han realizado satisfactoriamente injertos localizados de células o de tejidos embrionarios en varios pacientes afectados por la enfermedad de Parkinson. No obstante, este enfoque implica el uso de tejidos procedentes de fetos abortados, lo cual supone problemas éticos y logísticos. Además, numerosos laboratorios se han centrado en las células madre pluripotentes inducidas humanas (hIPS) como fuente alternativa posible de células humanas de calidad. La diferenciación eficaz de las hIPS para dar neuronas dotadas del fenotipo necesario para sustituir a las neuronas perdidas por los pacientes es un cambio de investigación muy activo. No obstante, las neuronas son células muy frágiles.

La inyección de una suspensión de neuronas conlleva generalmente la muerte de más del 98 % de dichas neuronas por anoikis. De manera alternativa, se ha previsto injertar progenitores neuronales, conocidos por ser menos frágiles que las neuronas. Esta solución tampoco resulta satisfactoria. En efecto, la diferenciación celular de los progenitores neuronales tras la implantación no está controlada y no es seguro que las células implantadas se diferencien de manera conveniente y/o para dar el tipo neuronal deseado.

MITSUE KOMATSU ET AL ("Maturation of human iPS cell-derived dopamine neuron precursors in alginate-Ca 2+ hydrogel", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - GENERAL SUBJECTS, vol. 1850, n.º 9, 1 de septiembre de 2015), describe la encapsulación (hidrogel de alginato) de agregados de precursores de neuronas dopaminérgicas y su diferenciación para dar neuronas dopaminérgicas. A continuación se elimina la capa de hidrogel y se implanta la agrupación de neuronas dopaminérgicas en el cerebro de una rata.

Por tanto, existe una necesidad de un sistema de implantación de células neuronales que permita mejorar la supervivencia de las células implantadas, con el fin, concretamente, de sustituir de manera duradera en un paciente que padece una enfermedad neurodegenerativa las neuronas alteradas.

Resumen de la invención

Trabajando en el cultivo de células en tres dimensiones (3D), los inventores han descubierto que es posible mejorar la tasa de supervivencia a la manipulación de células particularmente frágiles tales como las neuronas, cultivándolas y manipulándolas no en forma de suspensiones celulares, sino en forma de redes celulares tridimensionales. De este modo, han optimizado una unidad de tejido neural que comprende células neuronales que presentan un fenotipo de interés, que puede inyectarse en el sistema nervioso de un paciente, con el fin de integrar en el mismo dichas células neuronales con una tasa de supervivencia muy superior a la obtenida durante la inyección de una suspensión de células neuronales. La unidad de células neurales optimizada comprende células neurales previamente organizadas en una red 3D e incrustadas en una matriz extracelular, lo cual favorece la integración y la supervivencia de las células en el sistema nervioso tras la inyección. En efecto, las células neurales se transfieren al sistema nervioso huésped manteniendo la integridad de su entorno local, concretamente las interacciones entre células y con la matriz extracelular desarrolladas en el interior de la unidad de tejido neural. Además, la unidad de tejido neural según la invención comprende células neuronales postmitóticas cuyo grado de diferenciación puede controlarse perfectamente, limitando los riesgos de introducir tipos celulares no deseados, responsables concretamente del desarrollo de

teratomos y de excrecencias tumorales. De manera interesante, se ha constatado que la unidad de tejido neural según la invención puede proyectar axones al interior del tejido huésped, favoreciendo una buena integración de las células en dicho tejido huésped, y produciendo un beneficio funcional seguro. Por tanto, la invención tiene por objeto una unidad de tejido neural que forma una agrupación de células neurales para su uso en terapia celular para una implantación en el sistema nervioso de un mamífero humano o no humano, pudiendo dicha unidad de tejido neural proyectar axones al interior del tejido huésped, en la que dicha unidad de tejido neural contiene células neuronales postmitóticas diferenciadas inmunocompatibles con el mamífero destinado a recibir la unidad de tejido neural y cuyo fenotipo corresponde al fenotipo de las células defectuosas que deben sustituirse, organizadas en tres dimensiones e incrustadas en una capa de matriz extracelular, obteniéndose dicha unidad a partir de un microcompartimento celular que comprende una cápsula de hidrogel que rodea una única unidad de tejido neural, y eliminándose al menos parcialmente dicha cápsula de hidrogel antes de la implantación de dicha unidad de tejido neural.

Por tanto, la invención tiene por objeto una unidad de tejido neural que forma una agrupación de células neurales para su uso en terapia celular para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa mediante implantación en el sistema nervioso de un mamífero humano o no humano que presenta una enfermedad neurodegenerativa, de al menos una unidad de tejido neural, que puede proyectar axones al interior del tejido huésped, que contiene células neuronales postmitóticas diferenciadas inmunocompatibles con el mamífero destinado a recibir la unidad de tejido neural y cuyo fenotipo corresponde al fenotipo de las células defectuosas que deben sustituirse, organizadas en tres dimensiones e incrustadas en una capa de matriz extracelular, obteniéndose dicha unidad a partir de un microcompartimento celular que comprende una cápsula de hidrogel que rodea dicha unidad de tejido neural, y eliminándose al menos parcialmente dicha cápsula de hidrogel antes de la implantación de la unidad de tejido neural.

Concretamente, la invención tiene por objeto una unidad de tejido neural que forma una agrupación de células neurales para su uso en terapia celular para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, mediante implantación en el sistema nervioso de un mamífero humano o no humano que presenta la enfermedad de Parkinson, de al menos una unidad neural que puede proyectar axones al interior del tejido huésped, que contiene células neuronales postmitóticas diferenciadas para dar neuronas dopaminérgicas inmunocompatibles con el mamífero destinado a recibir la unidad de tejido neural, organizadas en tres dimensiones e incrustadas en una capa de matriz extracelular, obteniéndose dicha unidad a partir de un microcompartimento celular que comprende una cápsula de hidrogel que rodea dicha unidad de tejido neural, y eliminándose al menos parcialmente dicha cápsula de hidrogel antes de la implantación de la unidad de tejido neural.

La invención también tiene por objeto un método de tratamiento de la enfermedad de Parkinson, según el cual se implanta en el sistema nervioso de un paciente que presenta la enfermedad de Parkinson al menos una unidad de tejido neural que forma una agrupación de células neurales, que contiene células neuronales postmitóticas diferenciadas para dar neuronas dopaminérgicas inmunocompatibles con el mamífero destinado a recibir la unidad de tejido neural, organizadas en tres dimensiones e incrustadas en una capa de matriz extracelular, obteniéndose dicha unidad a partir de un microcompartimento celular que comprende una cápsula de hidrogel que rodea dicha unidad de tejido neural, y eliminándose al menos parcialmente dicha cápsula de hidrogel antes de la implantación de la unidad de tejido neural.

Asimismo, la invención tiene por objeto una unidad de tejido neural para su uso para el tratamiento de la enfermedad de Huntington mediante implantación en el sistema nervioso de un mamífero humano o no humano, que presenta la enfermedad de Huntington, de al menos una unidad de tejido neural que forma una agrupación de células neurales, que contiene células neuronales postmitóticas diferenciadas para dar neuronas gabaérgicas inmunocompatibles con el mamífero destinado a recibir la unidad de tejido neural, organizadas en tres dimensiones e incrustadas en una capa de matriz extracelular, obteniéndose dicha unidad a partir de un microcompartimento celular que comprende una cápsula de hidrogel que rodea dicha unidad de tejido neural, y eliminándose al menos parcialmente dicha cápsula de hidrogel antes de la implantación de la unidad de tejido neural.

La invención también tiene por objeto un método de tratamiento de la enfermedad de Huntington, según el cual se implanta en el sistema nervioso de un paciente que presenta la enfermedad de Huntington al menos una unidad de tejido neural que forma una agrupación de células neurales, que contiene células neuronales postmitóticas diferenciadas para dar neuronas gabaérgicas inmunocompatibles con el mamífero destinado a recibir la unidad de tejido neural, organizadas en tres dimensiones e incrustadas en una capa de matriz extracelular, obteniéndose dicha unidad a partir de un microcompartimento celular que comprende una cápsula de hidrogel que rodea dicha unidad de tejido neural, y eliminándose al menos parcialmente dicha cápsula de hidrogel antes de la implantación de la unidad de tejido neural.

De manera similar, la invención tiene por objeto una unidad de tejido neural que forma una agrupación de células neurales para su uso para una implantación en el sistema nervioso de un mamífero humano o no humano, en la que dicha unidad de tejido neural, que puede proyectar axones al interior del tejido huésped, contiene neuronas genéticamente modificadas inmunocompatibles con el mamífero destinado a recibir la unidad de tejido neural, organizadas en tres dimensiones e incrustadas. Tales unidades de tejido neural pueden usarse concretamente para ayudar, mejorar o reparar una función cognitiva y/o de acción en un mamífero humano o no humano.

La unidad de tejido neural según la invención puede obtenerse mediante un procedimiento de preparación de una unidad de tejido neural de este tipo, destinada a implantarse en el sistema nervioso de un mamífero humano o no humano, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

(1) producir microcompartimentos celulares que comprenden, en el interior de una cápsula de hidrogel, matriz extracelular y células de mamífero humano o no humano, adecuadas para diferenciarse para dar células neurales, ventajosamente inmunocompatibles con el mamífero destinado a recibir la unidad de tejido neural;

(2) inducir la diferenciación celular en el interior del microcompartimento celular, de manera que se obtienen células neuronales que presentan al menos un fenotipo postmitótico de interés;

(3) eliminar al menos parcialmente la cápsula de hidrogel para recuperar las células neuronales en forma de unidad de tejido neural.

La invención también se refiere a un kit de implantación de unidades de tejido neural que comprende al menos un microcompartimento celular que comprende al menos una cápsula de hidrogel que envuelve una unidad de tejido neural según la invención, y medios de eliminación al menos parcial de la cápsula de hidrogel.

La invención también se refiere a un kit de implantación de unidades de tejido neural que comprende al menos una unidad de tejido neural según la invención, preferiblemente entre 10 y 100 y hasta 1000, cargándose dichas unidades de tejido neural en un dispositivo de implantación quirúrgica adecuado para implantar las unidades de tejido neural en el sistema nervioso de un mamífero.

Descripción de las figuras

La figura 1 es una representación esquemática del protocolo de preparación de diferentes ratas que se han vuelto parkinsonianas, tratadas o no mediante inyección de tejido neural según la invención. Simulado: ratas de control; 6-OHDA: ratas que se han vuelto parkinsonianas (control negativo); 6-OHDA progenitores encapsulados (o Pro encaps): ratas que se han vuelto parkinsonianas que han recibido unidades de tejido neural según la invención, procedentes de microcompartimentos celulares en los que se han encapsulado células progenitoras de neuronas comerciales; 6-OHDA CNO (Controlled Neural Organoids): ratas que se han vuelto parkinsonianas que han recibido unidades de tejido neural (que corresponden en este ejemplo a los CNO) según la invención, procedentes de microcompartimentos celulares en los que se han encapsulado células pluripotentes antes de diferenciarse para dar neuronas, entre ellas neuronas dopaminérgicas;

las figuras 2A y 2B describen el protocolo de lesión (2A) y de injerto (2B) aplicados para obtener ratas parkinsonianas y para injertar los tejidos neuronales según la invención;

la figura 3 es una microfotografía que muestra las proyecciones axónicas plurimilimétricas de neuronas humanas 6 días tras el injerto de una unidad neural implantable según la invención (en este ejemplo de tipo CNO) en el sistema nervioso central de un rata que se ha vuelto parkinsoniana (6-OHDA CNO). Se trata de una imagen confocal de una sección de cuerpo estriado de rata en la zona de injerto, fijada, congelada y cortada con criostato, revelada mediante histoquímica con un anticuerpo contra el citoplasma humano (HCM);

las figuras 4A-E muestran los resultados obtenidos para las pruebas de comportamiento realizadas en ratas que se han vuelto parkinsonianas que han recibido o no un injerto de unidad de tejido neural según la invención. (4A) Prueba del cilindro; (4B) prueba de pasos; (4C) prueba del rotómetro; (4D) prueba de ansiedad.

Descripción detallada

La presente invención describe un método de implantación, o injerto, en el sistema nervioso de un mamífero, de una unidad de tejido neural en la que células neurales están organizadas en una red 3D. El injerto de las células neurales en forma de esferas densas favorece su implantación y su integración en el interior del sistema nervioso huésped. El método de implantación según la invención, y más generalmente la unidad de tejido neural optimizada según la invención, está destinado a usarse en un mamífero humano o no humano, y más preferiblemente en un sujeto humano.

Unidad de tejido neural

La invención propone usar, en lugar de una suspensión de células neuronales, una unidad de tejido neural, para su implantación en el sistema nervioso de un sujeto, con el fin de tratar toda clase de enfermedades neurodegenerativas y/o de ayudar, mejorar, reparar una función cognitiva o de acción en dicho sujeto.

Según la invención, la unidad de tejido neural destinada a implantarse comprende ventajosamente neuronas postmitóticas diferenciadas y células de la glía, tales como astrocitos y/o oligodendrocitos, en una matriz extracelular.

Por neuronas “postmitóticas”, se entienden células neuronales que han perdido la capacidad de dividirse. Las neuronas contenidas en el microcompartimento están diferenciadas en el sentido de que presentan un fenotipo particular.

Según la invención, la cápsula de hidrogel que rodea la unidad de tejido neural se elimina al menos parcialmente antes de la implantación en el sistema nervioso del sujeto.

En el contexto de la invención, la "cápsula de hidrogel" designa una estructura tridimensional formada a partir de una matriz de cadenas de polímeros inflada por un líquido, y preferiblemente agua. Ventajosamente, el hidrogel usado es biocompatible, en el sentido de que no es tóxico para las células. Además, la cápsula de hidrogel debe permitir la difusión de oxígeno y de nutrientes para alimentar a las células contenidas en el microcompartimento y permitir su supervivencia. Por ejemplo, la cápsula de hidrogel contiene alginato. Preferiblemente, la cápsula sólo comprende alginato. En el contexto de la invención, se entiende "alginato" los polisacáridos lineales formados a partir de β-D-manuronato y α-L-guluronato, sales y derivados de los mismos. Ventajosamente, el alginato es un alginato de sodio, compuesto por el 80 % de α-L-guluronato y el 20 % de β-D-manuronato, con un peso molecular promedio de 100 a 400 KDa (por ejemplo: PRONOVA™ SLG100) y una concentración total comprendida entre el 0,5 % y el 5 % en masa.

La cápsula de hidrogel permite, en el momento de la preparación de la unidad de tejido neural, proteger las células del medio exterior al tiempo que se permite su diferenciación controlada para dar uno o varios tipos neuronales de interés. Según la invención, una cápsula de hidrogel rodea una única unidad de tejido neural. Por tanto, cada unidad de tejido neural está rodeada individualmente por una cápsula de hidrogel. Una vez obtenidos el o los tipos celulares deseados y el tamaño del tejido neural en la cápsula suficiente, se elimina al menos parcialmente dicha cápsula. Por "eliminar al menos parcialmente", se entiende que la cápsula de hidrogel se hidroliza, disuelve, perfora o rompe al menos parcialmente de manera que se permite que al menos los axones de al menos algunas células neurales de dicha unidad salgan de la cápsula. Puede usarse cualquier medio biocompatible, es decir no tóxico para las células, que permita la hidrólisis, la disolución, la perforación y/o la rotura al menos parcial de la cápsula de hidrogel. Por ejemplo, es posible usar tampón fosfato salino, un quelante de iones divalentes, una enzima, tal como la alginato liasa, microdisección por láser, bolas solubles integradas en el hidrogel, etc.

Ventajosamente, la eliminación de la cápsula es total, estando de este modo la unidad de tejido neural destinada a implantarse en el sistema nervioso de un sujeto desprovista de hidrogel.

Preferiblemente, la capa de matriz extracelular de la unidad de tejido neural forma un gel. La capa de matriz extracelular comprende una mezcla de proteínas y de compuestos extracelulares necesarios para el cultivo celular, y más particularmente para el cultivo de células neurales. Preferiblemente, la matriz extracelular comprende proteínas estructurales, tales como lamininas que contienen subunidades α1 o α4 o α5 y β1 o β2 y γ1 o γ3, entactina, vitronectina, colágeno, así como factores de crecimiento, tales como TGF-beta y/o EGF. En una realización, la capa de matriz extracelular consiste en, o contiene, Matrigel® y/o Geltrex®.

La unidad de tejido neural según la invención presenta la ventaja de contener células neurales organizadas en una red 3D en cuyo interior ya existen interacciones entre células y matriz extracelular.

Ventajosamente, las células neurales de la unidad de tejido neural que forman una agrupación de células neurales, concretamente de forme ovoidal, tubular o esférica, presentan de manera preferida una dimensión más pequeña comprendida entre 10 µm y 1000 µm más o menos el 10 %, preferiblemente entre 150 µm y 400 µm más o menos el 10 %, aún más preferiblemente entre 200 µm y 300 µm más o menos el 10 %. Estas dimensiones son particularmente favorables para la supervivencia de las neuronas en el interior de la unidad de tejido neural y optimizan la reorganización así como la vascularización del injerto tras la implantación. Por "dimensión más pequeña", se entiende la distancia mínima entre dos puntos situados a ambos lados de la agrupación de células.

Preferiblemente, la unidad de tejido neural según la invención contiene de 100 a 100.000 células neurales.

En el interior del tejido neural, las células neuronales presentan ventajosamente uno o varios fenotipos de interés, elegidos en función del uso al que está destinada dicha unidad de tejido neural. Según la invención, la unidad de tejido neural implantada comprende células neuronales diferenciadas según uno o varios fenotipos elegidos y controlados. Preferiblemente, la unidad de tejido neural comprende entre el 10 y el 100 % de células neuronales postmitóticas de fenotipo(s) de interés, preferiblemente entre el 50 y el 100 %, más preferiblemente más del 90 %. Las otras células presentes en la unidad de tejido neural pueden ser concretamente las células de la glía y/o células neuronales postmitóticas cuyo fenotipo es diferente del fenotipo de interés. Ventajosamente, la unidad de tejido neural comprende esencialmente células neuronales postmitóticas que tienen el mismo fenotipo.

El fenotipo de interés de las células neuronales postmitóticas depende del propósito de dicha unidad. Por tanto, en el caso de un uso en terapia celular, el fenotipo de las neuronas corresponde ventajosamente al fenotipo de las células defectuosas que deben sustituirse.

En efecto, la unidad de tejido neural según la invención puede usarse ventajosamente en terapia celular, para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, tal como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la enfermedad de Alzheimer o las ceroidolipofuscinosis neuronales, tales como la enfermedad de Batten.

Por tanto, para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la unidad de tejido neural contiene ventajosamente neuronas dopaminérgicas. Preferiblemente, las neuronas postmitóticas contenidas en una unidad de tejido neural de este tipo son esencialmente neuronas dopaminérgicas.

Por "esencialmente", se entiende, en el contexto de la invención, al menos el 90 % de las células, preferiblemente al menos el 95 %, aún más preferiblemente al menos el 99 %.

Para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, la unidad de tejido neural contiene ventajosamente neuronas gabaérgicas. Preferiblemente, las neuronas postmitóticas contenidas en una unidad de tejido neural de este tipo son esencialmente neuronas gabaérgicas.

La unidad de tejido neural según la invención también puede contener células neurales genéticamente modificadas. Por tanto, es posible implantar en el interior del sistema nervioso de un sujeto células neurales en las que la expresión de uno o varios genes se ha inhibido o, por el contrario, aumentado. También es posible implantar células neurales en las que se ha introducido un gen heterólogo, de manera que se introduce en el interior del sistema nervioso una función normalmente ausente.

Una unidad de tejido neural de este tipo, que contiene células genéticamente modificadas, encuentra un interés concretamente para ayudar, mejorar o reparar una función cognitiva y/o de acción, tal como una función cognitiva y/o de acción defectuosa o insuficiente en el sujeto considerado.

Por ejemplo, en el tratamiento de la enfermedad de Huntington, conociéndose la causa genética (elongación de una repetición de triplete CAG en el interior del gen que codifica para la huntingtina), es posible extraer células del paciente para preparar unidades de tejido neural según la invención, que comprenden neuronas gabaérgicas en las que se ha corregido el gen defectuoso, antes de realizar un autoinjerto de dichas unidades de tejido neural.

Para los pacientes que padecen enfermedad de Parkinson, es posible preparar unidades de tejido neural que comprenden neuronas dopaminérgicas modificadas para expresar canales sensibles a la luz, tales como los canales de rodopsina, con el fin de controlar la actividad del tejido neural injertado mediante simple iluminación, de manera similar a la estimulación cerebral profunda (deep brain stimulation) pero menos invasiva. De una manera general, el control de la actividad del tejido neural injertado, concretamente mediante expresión de canales sensibles a la luz, puede resultar ventajoso para el conjunto de las aplicaciones previstas.

Kits de implantación de unidades de tejido neural

La invención también propone un kit de implantación de unidades de tejido neural que comprende al menos un microcompartimento celular que comprende una cápsula de hidrogel que envuelve una unidad de tejido neural según la invención, y medios de eliminación al menos parcial de la cápsula de hidrogel (hidrólisis, disolución, perforación y/o rotura).

Por tanto, el médico que debe usar la unidad de tejido neural según la invención puede eliminar, en el momento del uso y en función de las necesidades, al menos parcialmente la cápsula de hidrogel para obtener la o las unidades de tejido neural listas para implantarse en el sistema nervioso de un sujeto.

Además, el kit de implantación según la invención también puede contener un dispositivo de implantación quirúrgica adecuado para implantar una unidad de tejido neural en el sistema nervioso de un mamífero.

La invención también propone un kit de implantación de unidades de tejido neural que comprende al menos una unidad de tejido neural según la invención, preferiblemente entre 1 y 10.000, más preferiblemente entre 10 y 1000 unidades de tejido neural cargadas en un dispositivo de implantación quirúrgica adecuado para implantar la o las unidades de tejido neural en el sistema nervioso de un mamífero. Ventajosamente, la cantidad de unidades de tejido neural implantada depende del tamaño del cerebro del huésped y de la aplicación.

Las unidades de tejido neural pueden congelarse eventualmente, antes de introducirse en el dispositivo de implantación quirúrgica y/o congelarse al mismo tiempo que el dispositivo de implantación quirúrgica. Evidentemente, entonces se necesita una etapa de descongelación antes de la implantación de las unidades de tejido neural en el sistema nervioso del sujeto.

Procedimiento de preparación

La unidad de tejido neural adecuada para implantarse en el sistema nervioso de un mamífero según la invención puede prepararse mediante un procedimiento de preparación de unidades de tejido neural. Más particularmente, la invención propone realizar unidades de tejido neural que contienen células neuronales postmitóticas cuyo fenotipo o fenotipos dependen del uso al que están destinadas dichas unidades. Según la invención, es posible realizar microcompartimentos celulares que comprenden una cápsula de hidrogel que rodea células neurales, concretamente

a partir de células diferenciadas de mamíferos que se someten a una reprogramación antes o después de la encapsulación, que después se diferencian para dar uno o varios tipos neurales en el interior de la cápsula de hidrogel. A continuación se elimina al menos parcialmente la cápsula, con el fin de permitir que las células neurales se implanten en el tejido huésped tras el injerto.

De una manera general, el procedimiento de preparación de una unidad de tejido neural de este tipo, destinada a implantarse en el sistema nervioso de un mamífero humano o no humano, según la invención comprende las etapas que consisten en:

(1) producir microcompartimentos celulares que comprenden, en el interior de una cápsula de hidrogel, matriz extracelular y células de mamífero humano o no humano, adecuadas para diferenciarse para dar células neurales, ventajosamente inmunocompatibles con el mamífero destinado a recibir la unidad de tejido neural;

(2) inducir la diferenciación celular en el interior del microcompartimento celular, de manera que se obtienen células neuronales postmitóticas que presentan al menos un fenotipo de interés;

(3) eliminar al menos parcialmente la cápsula de hidrogel para recuperar las células neurales en forma de unidad de tejido neural.

Puede usarse cualquier método de producción de microcompartimentos celulares que contienen en el interior de una cápsula de hidrogel matriz extracelular y células susceptibles de dar lugar a células neurales. Concretamente, es posible preparar microcompartimentos con el dispositivo de microfluidos descrito en Alessandri et al., 2016 ("A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC)", Lab on a Chip, 2016, vol. 16, n.º 9, págs. 1593-1604).

En una realización particular, las células encapsuladas son células madre pluripotentes, tales como células madre pluripotentes inducidas (IPS), o células madre embrionarias (ES). En el contexto de la invención, por "células madre pluripotentes inducidas" (CSPI o IPS), se entienden células madre pluripotentes obtenidas mediante reprogramación genética de células somáticas diferenciadas, y que presentan una morfología y un potencial de autorenovación y de pluripotencia en parte similares a los de las células madre embrionarias. Estas células son concretamente positivas para los marcadores de pluripotencia, tales como la coloración con fosfatasa alcalina y la expresión de las proteínas NANOG, SOX2, OCT4 y SSEA3/4. El experto en la técnica conoce bien los procedimientos que permiten la obtención de las células madre pluripotentes inducidas y se describen concretamente en los artículos de Yu et al (Science, 2007, 318 (5858): 1917-1920), Takahashi et al (Cell, 2007, 131(5): 861-872) y Nakagawa et al (Nat Biotechnol, 2008, 26(1): 101-106). En el caso de células madre embrionarias, por dichas células madre pluripotentes se entienden células derivadas de la masa celular interna del blastocisto y que tienen la capacidad de conducir a la formación de todos los tejidos del organismo. La pluripotencia de las células madre embrionarias puede evaluarse mediante la presencia de marcadores tales como los factores de transcripción OCT4 y NANOG y marcadores de superficie tales como SSEA3/4, Tra-1-60 y Tra-1-81. Las células madre embrionarias pueden obtenerse sin destrucción del embrión del que proceden, por ejemplo con la ayuda de la técnica descrita por Chung et al. (Cell Stem Cell, 2008, 2(2): 113-117). En una realización particular, y por motivos legales o éticos, se entiende que las células madre excluyen las células madre embrionarias humanas.

De manera alternativa, es posible encapsular células progenitoras neurales, es decir células madre ya implicadas en la diferenciación celular para dar células neurales. En otra realización, es posible encapsular células diferenciadas, que se forzarán a diferenciarse para dar células neurales mediante transdiferenciación. También es posible encapsular células adecuadas para formar células de la glía, tales como células somáticas.

En otra realización, es posible usar células diferenciadas, que se reprogramarán para dar células madre pluripotentes antes o después de la encapsulación. En la medida en que las unidades de tejido neural deben poder implantare durante un tiempo prolongado en el sistema nervioso de un paciente, es preferible partir de células inmunocompatibles con dicho sujeto, para evitar cualquier riesgo de rechazo. En un modo de puesta en práctica particular, las células usadas para preparar las unidades de tejido neural se han extraído previamente del mamífero humano o no humano en el que deben implantarse dicha o dichas unidades de tejido neural.

En cualquier caso, una vez obtenidos los microcompartimentos celulares, las células que contienen deben someterse a una diferenciación celular de manera que se diferencien concretamente para dar células neuronales según uno o varios fenotipos deseados.

Puede usarse cualquier método puesto en práctica habitualmente en cultivo en 2D (placa de Petri y otros) para forzar la diferenciación celular, tal como el método descrito en Chambers et al. ("Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling", Nature Biotechnology 27, 275 - 280 (2009)) o en Lippmann et al., ("Defined human pluripotent stem cell culture enables highly efficient neuroepithelium derivation without small molecule inhibitors", Stem Cells 2014). En un modo de puesta en práctica particular, el medio de diferenciación contiene 24(S),25-epoxicolesterol, de manera que se mejora la diferenciación dopaminérgica.

Preferiblemente, los microcompartimentos celulares se cultivan durante al menos tres semanas en un medio de diferenciación y antes de cualquier eliminación de la cápsula de hidrogel.

De una manera general, los microcompartimentos celulares pluripotentes pueden congelarse antes de cualquier uso y descongelarse según las necesidades.

En un ejemplo de realización, es posible inducir una diferenciación celular de manera que se fuerzan las células, en el interior del microcompartimento celular, a diferenciarse para dar células dopaminérgicas ("Generating regionalized neuronal cells from pluripotency, a step-by-step protocol" Kirkeby et al. Frontiers in Cellular Neuroscience 2012). A continuación, pueden implantarse las unidades de tejido neural procedentes de tales microcompartimentos celulares en el sistema nervioso de un sujeto que padece la enfermedad de Parkinson, con el fin de sustituir al menos parcialmente las neuronas dopaminérgicas defectuosas de dicho sujeto.

En otro ejemplo de realización, es posible inducir una diferenciación celular de manera que se fuerzan las células, en el interior del microcompartimento celular, a diferenciarse para dar células gabaérgicas ("Derivation of striatal neurons from human stem cells" Viegas et al. Prog Brain Res 2012). A continuación, pueden implantarse las unidades de tejido neural procedentes de tales microcompartimentos celulares en el sistema nervioso de un sujeto que padece corea de Huntington, con el fin de sustituir al menos parcialmente las neuronas gabaérgicas defectuosas de dicho sujeto.

El procedimiento de preparación de unidades de tejido neural según la invención también puede comprender la etapa complementaria que consiste en:

- cargar un dispositivo de implantación quirúrgica con al menos una unidad de tejido neural, preferiblemente entre 10 y 1000, más preferiblemente entre 10 y 100 unidades de tejido neural.

Por tanto, el dispositivo de implantación está listo para usarse para injertar células neurales en el sistema nervioso de un sujeto.

Según la invención, es posible congelar las células neurales en forma de unidades de tejido neural, antes o después de la eliminación al menos parcial de la cápsula de hidrogel. Evidentemente, las unidades de tejido neural pueden usarse directamente al final del procedimiento de preparación, sin haberse congelado previamente.

Ventajosamente, el procedimiento de preparación según la invención comprende la etapa intermedia que consiste en:

- verificar el fenotipo de las células neurales contenidas en la cápsula de hidrogel, tras la etapa de diferenciación celular.

Por ejemplo, en el caso de unidad(es) de tejido neural que comprende(n) neuronas dopaminérgicas, es posible medir la actividad de las unidades neurales implantables antes del injerto de manera no invasiva extrayendo el sobrenadante del medio de cultivo y realizando un análisis mediante microdiálisis acoplada a una HPLC.

Más generalmente, puede resultar ventajoso caracterizar la actividad eléctrica de las neuronas representativas de la muestra mediante la técnica denominada de "Patch-Clamp" (registro electrofisiológico de fijación de voltaje) basada en el registro de corrientes iónicas que transitan a través de las membranas celulares.

Dado que las unidades de tejido neural se cultivan ventajosamente en lotes, en condiciones idénticas, también es posible realizar análisis más exhaustivos, concretamente mediante inmunocitoquímica, secuenciación de ARN y/o proteómica, en una muestra representativa de la población de las unidades de tejido neural considerado, con el fin de garantizar la calidad exacta de la diferenciación. Por ejemplo, en el caso de unidades de tejido neural que comprenden neuronas dopaminérgicas, es posible proceder a un análisis mediante inmunocitoquímica que selecciona como diana la tirosina hidroxilasa, FOXA2 y/o NURR1 ("Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease" Kriks et al 2012).

Por tanto, es posible verificar que las neuronas postmitóticas y/o las células neurales presentan correctamente el o los fenotipos deseados antes de la etapa de implantación en el sistema nervioso del sujeto.

Injerto de unidad(es) de tejido neural en el sistema nervioso de un mamífero humano o no humano

La invención también propone un procedimiento de implantación, o de injerto, de unidad(es) de tejido neural en el sistema nervioso de un sujeto, y concretamente de un humano, que lo necesita. En efecto, las unidades de tejido neural según la invención pueden usarse ventajosamente para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. En el contexto de la invención, el término "tratamiento" designa un tratamiento curativo, sintomático o preventivo. Tal como se usa en este caso, el término "tratamiento" de una enfermedad se refiere a cualquier acción destinada a prolongar la calidad y/o la vida de los pacientes. El tratamiento puede concebirse para erradicar la enfermedad, detener o retrasar la progresión de la enfermedad y/o favorecer la regresión de la enfermedad. El término "tratamiento" de una

enfermedad también designa cualquier acción destinada a disminuir los síntomas asociados a la enfermedad. El paciente que va a tratarse es cualquier mamífero, preferiblemente un ser humano.

De una manera general, puede usarse cualquier método de injerto de células neurales para implantar las unidades de tejido neural en el interior del sistema nervioso del sujeto. Concretamente, es posible usar una cánula, tal como una cánula de vidrio, en la que se han cargado previamente las unidades de tejido neural.

En un modo de puesta en práctica particular, la implantación comprende las etapas que consisten en

- dormir y/o inmovilizar al sujeto antes de recibir la o las unidades de tejido neural;

- abrir el cráneo del sujeto;

- posicionar el dispositivo de implantación que contiene las unidades de tejido neural por encima de la zona de injerto, por ejemplo con la ayuda de un aparato denominado "estereotáxico";

- insertar el dispositivo de implantación en la zona de injerto;

- inyectar las unidades de tejido neural al tiempo que se retira progresivamente el dispositivo de implantación de la zona de injerto.

Ventajosamente, la etapa de inyección se controla mediante un sistema de bomba de microfluidos y de motorización que permite gestionar la profundidad de penetración del dispositivo de implantación en el sistema nervioso del sujeto, para disponer el lugar necesario para las unidades de tejido neural en dicho sistema nervioso, que de este modo se depositan en la trayectoria de retirada del dispositivo de implantación.

En un modo de puesta en práctica particular, el dispositivo de implantación consiste en una cánula de vidrio que presenta un diámetro interno comprendido entre 0,3 y 2 mm, preferiblemente de 0,4 mm, y un diámetro externo comprendido entre 0,4 y 3 mm, preferiblemente de 0,55 mm. La cánula presenta ventajosamente una parte redondeada o un chaflán en su extremo y su superficie está silanizada con un compuesto fluorado, con el fin de reducir los riesgos de daño de los tejidos durante la inserción de la cánula y reducir los riesgos de obstrucciones por un coágulo de sangre. Las unidades de tejido neural se cargan, por ejemplo por la parte delantera, en la cánula. La cánula se inserta en su posición en el cráneo del sujeto.

Ventajosamente, durante un mismo injerto, se implantan entre 10 y 40 unidades de tejido neural, comprendiendo cada unidad de tejido neural preferiblemente entre 1.000 y 10.000 células neurales. Evidentemente, el número de unidades de tejido neural que van a implantarse se adapta en función del sujeto y de la enfermedad que va a tratarse y/o de la función cognitiva o de acción que va a modificarse. También pueden preverse varios injertos, más o menos alejados en el tiempo. Asimismo, pueden realizarse injertos simultáneos o en un transcurso de tiempo corto en diferentes zonas del sistema nervioso del sujeto.

Ejemplos

1. Fabricación de unidades de tejido neural implantables, para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson:

Se obtienen progenitores según el método publicado por Kriks et al. ("Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease" Kriks et al 2012), usando 24(S),25-epoxicolesterol (concentración de 1 a 10 µM) con cultivos procedentes de células madre pluripotentes inducidas humanas, para optimizar la diferenciación para dar neuronas dopaminérgicas.

Los progenitores así obtenidos se encapsulan según el método publicado por Alessandri et al., 2016 ("A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC)", Lab on a Chip, 2016).

Una vez obtenidos los microcompartimentos celulares que contienen los progenitores, se realiza una diferenciación denominada "terminal" para dar neuronas dopaminérgicas según el método publicado por Kriks et al. ("Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease" Kriks et al 2012), usando de nuevo 24(S),25-epoxicolesterol (concentración de 1 a 10 µM).

Se presta atención particular al cambio de los medios de cultivo, ya que la proliferación de las células en los microcompartimentos celulares aumenta la velocidad a la que se consume el medio por las unidades neurales implantables a lo largo de su preparación.

El conjunto de la diferenciación tiene lugar en los microcompartimentos celulares, pero es posible desencapsular y volver a encapsular las células, mientras las células soporten la disociación en suspensión de células únicas (es decir,

hasta un máximo de una semana tras la adición de inhibidor de gamma secretasa y/o de la señal Notch tal como DAPT, el compuesto E u otras moléculas que fuerzan la diferenciación terminal).

Los microcompartimentos celulares así obtenidos después de tres semanas de diferenciaciones se tratan mediante aclarados sucesivos en una disolución de PBS para disolver la cubierta de hidrogel y recuperar las unidades de tejido neural antes de la inyección.

Fabricación de la cánula de inyección:

Una sección de capilar de borosilicato (diámetro interno: 0,4 mm, diámetro externo de 0,55 mm) de 5 cm se corta con la ayuda de una cuchilla de cerámica.

Se redondea la cara delantera del capilar con la ayuda de un papel de lija de óxido de aluminio para fibra óptica de 12 µm y después de 1 µm.

Se activa el vidrio mediante un tratamiento con plasma durante 5 minutos, después se silaniza en fase gaseosa mediante deposición de 20 µl de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctiltriclorosilano cerca de la punta posicionada en una placa de Petri de vidrio herméticamente cerrada.

Después de 30 minutos de reacción, la cánula de inyección está lista y se monta en un dispositivo convencional de estereotaxia unido a una jeringa de 10 µl (Hamilton), motorizada gracias a un dispositivo de accionamiento de jeringa (Harvard Apparatus). El brazo de inyección del aparato estereotáxico también está motorizado (PI).

Cirugía:

Entonces se realiza una cirugía convencional para el injerto de neuronas en una rata. Un método quirúrgico de este tipo comprende las etapas según las cuales:

1) Se induce un sueño medicamentoso (ketamina) y una anestesia en el animal

2) Se posiciona con precisión el animal gracias a un aparato estereotáxico.

3) Se afeita el cráneo del animal, a continuación se trata con Betadine, y después se abre con la ayuda de un bisturí para separar la piel del cráneo, después se usa un microtaladro para formar una fenestración en el hueso del cráneo, permitiendo el paso de la cánula. Se separan con cuidado las meninges sin dañar la corteza que asoma justo por debajo.

4) Se posiciona la cánula conectada a una jeringa con la ayuda de un aparato estereotáxico por encima de la zona de injerto.

5) Se cargan las unidades de tejido neural por delante en la cánula (aproximadamente 80 cápsulas, es decir de 10.000 a 800.000 células). El injerto representa 4 µl en total, es decir 4 cm de altura en la cánula. Se inyecta en dos sitios de manera unilateral en la rata, en el cuerpo estriado a aproximadamente 1 mm de distancia.

6) Se inserta la cánula en su posición en el cráneo del animal en el primer sitio en el interior del cuerpo estriado ventral. Durante la inyección de 2 µl, se retira la cánula de manera simultánea a la inyección gracias a un sistema de bomba de microfluidos y de gestión motorizada de la profundidad de la cánula, para liberar el espacio necesario para el injerto que de este modo se deposita en la trayectoria de retirada a lo largo de aproximadamente 2 mm.

7) Se deja la cánula en su sitio durante un minuto antes de retirarla suavemente.

8) A continuación se procede a la implantación en el segundo sitio, según el mismo procedimiento.

9) Se cose la piel de la rata (de tres a cinco puntos) tras haber aclarado la zona con Betadine.

Resultados del injerto:

Dado que la demostración es la supervivencia al proceso de injerto de las neuronas maduras humanas, se sacrifica el animal una semana después de la cirugía para estudiar la supervivencia y la implantación del injerto mediante inmunocitoquímica a lo largo de una sección de cerebro recortada con vibratomo en la trayectoria de injerto.

La supervivencia estimada basándose en el tamaño de los injertos (conocido antes del injerto) es superior al 84 % ± 33 %, en comparación con la tasa de supervivencia del 2 % obtenida con los métodos de injerto de neuronas maduras dopaminérgicas en suspensión (D. M. Marchionini et al., “Interference with anoikis-induced cell death of dopamine neurons: implications for augmenting embryonic graft survival in a rat model of Parkinson's disease.” J Comp Neurol 464, 172-179 (2003)). El fenotipo de las neuronas se conserva (positivo para tirosina hidroxilasa). Además, son visibles

prolongaciones axónicas de varios milímetros, que indican que las neuronas han comenzado inmediatamente a integrarse en el cerebro de la rata.

2. Injerto de unidades de tejido neural que comprenden células neuronales para el tratamiento de Parkinson

2.1- Protocolo quirúrgico

Se albergan ratas (de 7/8 semanas de edad) en una sala a temperatura controlada con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h con un acceso a voluntad a comida y agua.

La figura 1 resume las diferentes intervenciones realizadas en estas ratas con el fin de obtener ratas parkinsonianas, a las que se les van a aplicar a continuación injertos de tejido neural según la invención.

Preparación de las ratas parkinsonianas

Se someten los animales a ayuno antes de la cirugía. Se guardan los alimentos, incluidos los complementos alimenticios, y el agua.

Se coloca cada animal en una cámara de anestesia alimentada por un flujo continuo de aire (0,3 l / min) + oxígeno (0,3 l / min) y el 2 % de isoflurano. Se inyectan xilocaína (7 mg / kg, s.c.), borgal (7,5 %, i.m.) y buprenorfina (0,1 mg / kg, s.c.). A continuación se mantiene el animal anestesiado con un anestésico a base de isoflurano administrado por un respirador con regulación de volumen. Se registra la temperatura central por vía rectal durante la cirugía. Se usan cojines calefactores para mantener la temperatura corporal, si es necesario. Se administra una pomada oftálmica (gel oftálmico lipósico) en cada ojo. Se cortan los pelos del cráneo hasta el cuello. Tras la pérdida de consciencia, se coloca el animal en un marco estereotáxico (Kopf) y se fija su cabeza en posición con la ayuda de barras de oreja.

Con la ayuda de una jeringa Hamilton 1702N (Ga22s / 51 mm / PST3) acoplada a un inyector automático Legato 101 (KD scientific), se vuelven las ratas pseudo-parkinsonianas mediante una inyección estereotáxica unilateral de 2,5 µl de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Sigma, 5 mg / ml en NaCl estéril, al 0,9 %) con el 0,1 % de ácido ascórbico en MFB (Medial Forebrain Bundle) en las coordenadas -2,8 mm anteroposterior, 2 mm lateral y 8,4 mm dorsoventral según el atlas cerebral de Paxinos y Watson a un caudal de 1 µl / min (figura 2A).

Tras la inyección, se deja la aguja en su sitio durante 5 minutos antes de retirarse lentamente del cerebro. Treinta minutos antes de la cirugía, los animales reciben por vía i.p. (intraperitoneal) una inyección de desipramina (25 mg / kg, 5 ml / kg) disuelta en el 0,9 % de NaCl, para proteger el sistema noradrenérgico.

Cuando se termina la inyección, se cierra la piel con una sutura. A continuación se deja que el animal se recupere de la anestesia.

Injertos

La conservación del microentorno de las neuronas maduras a lo largo de todo el procedimiento de injerto permite la supervivencia y la conexión con el cerebro del huésped.

Un grupo de ratas (6-OHDA progenitores encapsulados) reciben un injerto de unidades de tejido neural según la invención que comprende células progenitoras de neuronas comerciales (Cellular dynamics icell dopaneurons) encapsuladas y maduradas durante dos semanas in vitro antes de su uso.

Un segundo grupo de ratas (6-OHDA CNO) reciben un injerto de unidades de tejido neural según la invención que comprenden CNO (Controlled Neural Organoid) producidos y clasificados en el laboratorio.

Las unidades de tejido neural que comprenden células CNO se obtuvieron encapsulando en alginato células pluripotentes o células pluripotentes vírgenes y diferenciándolas para dar células progenitoras de neuronas según el siguiente protocolo:

Todos los cultivos se realizan a 37 °C, bajo el 5 % de CO2, y saturación de humedad superior al 95 %

D0-D3 (del día 0 al día 3): N2B27 (para 500 ml de medio: 250 ml de medio Neurobasal + 250 ml de medio Dmem F12 con glutamax + 1 complemento N2 + 1 complemento B27 + LDN-193189 0,5 microM + SB431542 10 microM + Shh (Sonic Hedgehog) 100 ng/ml + FGF-8 (factor de crecimiento de fibroblastos 8) 100 ng/ml + purmorfamina 2 microM + 24(S),25-epoxicolesterol 10 microM

D3-D9: N2B27 + LDN + SB + Shh + FGF-8 + purmorfamina + CHIR + 24(S),25-epoxicolesterol

D9-D10: N2B27 + LDN + CHIR + 24(S),25-epoxicolesterol

D10-D15 o más: N2B27 + AMPc + AA + GDNF + BDNF + FGF-20 + TGFbeta + tricostatina + CpE + 24(S),25-epoxicolesterol

Tabla 1: lista de las abreviaturas y acrónimos

Abreviatura / acrónimo	Descripción
AA	Ácido ascórbico
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina - transducción de señales intracelulares
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
CHIR	Inhibidor de GSK3
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECM	Matriz extracelular
FGF-20	Factor de crecimiento de fibroblastos 20
FGF-8	Factor de crecimiento de fibroblastos 8
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
hESC	Células madre embrionarias humanas
HS415	Línea de células ES humanas
LDN193189	Inhibidor de smad1/8/5/8
NEAA	Aminoácidos no esenciales
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PS	Penicilina / estreptomicina
TA	Temperatura ambiente
SB431542	Anticuerpo anti-TGF beta
Shh	Sonic hedgehog
TGFbeta3	Factor de crecimiento transformante tipo 3

Tabla 2: Concentraciones finales

Moléculas pequeñas o factores de crecimiento	Concentraciones finales a nivel de las células
AMPc	0,5 mM
Ácido ascórbico AA	200 µM
BDNF	10 ng/ml
Chir99021	3 µM
Compuesto E	1 µM
FGF-20	5 ng/ml
FGF-8	100 ng/ml
GDNF	10 ng/ml
LDN -193189	0,5 µM
purmorfamina	2 µM
inhibidor de rock	10 µM
SB431542	10 µM
Shh	100 ng/ml
TGFbeta3	1 ng/ml
Tricostatina A	10 nM
24(S),25-epoxicolesterol	10 µm

Antes de la inyección de las unidades de tejido neural (6-OHDA progenitores encapsulados y 6-OHDA CNO), se disuelven las cápsulas de alginato de los microcompartimentos celulares simplemente cambiando el medio por PBS.

Las configuraciones de inyección son una jeringa o una cánula montada en un equipo estereotáxico. La carga de las unidades de tejido neural en la cánula de inyección se realiza mediante aspiración del volumen inyectado (25 CNO ~ 1 µl) en el cuerpo de la cánula.

Para inyectar en los 4 sitios de inyección a lo largo de 2 trayectorias (figura 2B): se inyectan 4 µl con progenitores (grupo 3), progenitores encapsulados (6-OHDA progenitores) o CNO (6-OHDA CNO) en el cuerpo estriado en las siguientes coordenadas: A / P +1.2; M / L -2,6; D / V-5,0 (3 ul) y -4,0 (3 ul); y A / P +0,5; M / L -3,0; D / V-5,0 (3 ul) y -4,0 (3 ul); barra de dientes -2,4 (Grealish et al., 2014).

Procedimiento posoperatorio

Se forman cuatro grupos de ratas a partir de las ratas inmunodeprimidas (RNU o ratas desnudas):

- "Simulado": ratas no lesionadas

- "6-OHDA": ratas cuyas neuronas dopaminérgicas del hemisferio derecho se han destruido químicamente, sin injerto (experimento de control)

- "CNO" o "6-OHDA CNO": ratas cuyas neuronas dopaminérgicas del hemisferio derecho se han destruido químicamente, y con injerto en el cuerpo estriado derecho de unidades de tejido neural según la invención que comprenden aproximadamente 250.000 células.

- "Pro encaps" o "6-OHDA progenitores encapsulados": ratas cuyas neuronas dopaminérgicas del hemisferio derecho se han destruido químicamente, y con injerto en el cuerpo estriado derecho de unidades de tejido neural según la invención que comprenden aproximadamente 250.000 células de iDopaneurons de Cellular dynamics maduradas durante 2 semanas en cápsulas.

Se observa cada animal de cerca y se mantiene en caliente hasta que recupera los reflejos de enderezamiento y de deglución. Técnicos experimentados que tienen fácil acceso a asistencia veterinaria experimentada se encargan de los animales.

Si es necesario se usan otros medicamentos para la gestión clínica del animal. Cada medicamento, dosis, vía y sitio de administración se documentan en los cuadernos quirúrgicos.

Se monitorizan las incisiones quirúrgicas para detectar signos de infección, de inflamación y de integridad general al menos una vez al día (hasta que cicatrizan las incisiones). Todas las observaciones realizadas y los resultados se documentan en los cuadernos quirúrgicos. Se informa al coordinador del estudio de cualquier anomalía. Se informa al monitor del estudio en cuanto es razonablemente posible de cualquier anomalía.

Se realizan controles sobre el estado de los animales dos veces al día (de 11h00 a 22h00).

Se evalúan los animales según los criterios de tratamiento justo y humano. Si se necesario se proporciona una asistencia veterinaria apropiada. Cualquier animal que presente signos de dolor o de malestar graves, susceptibles de perdurar, se sacrifica rápidamente. A continuación se somete a una autopsia macroscópica. Además de la autopsia, se extirpa el cerebro para la histología y se trata tal como se indica en la sección de Sacrificio. Se realizan todos los esfuerzos razonables para aplicar los criterios de tratamiento justo y humano con el fin de evitar que muera un animal

2.2- Estudios de comportamiento

Rotación inducida por anfetamina (protocolo adaptado de Grealish et al., 2014).

Se consideró que sólo los animales que realizaban más de 5 giros por minuto tras inyección de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) a nivel del haz telencefálico medio habían experimentado satisfactoriamente una lesión. El sesgo de rotación, tras una inyección sistémica de anfetamina (2,5 mg/kg, por vía intraperitoneal, Apoteksbolaget), se registró usando un sistema automatizado (Omnitech Electronics). La rotación de los animales se registró durante 90 minutos, sólo se contaron los giros completos del cuerpo y a continuación se expresan como giros netos por minuto, las rotaciones hacia el lado de la lesión (sentido horario) se cuentan de manera positiva.

Prueba de pasos

Se coloca cada rata sobre una superficie plana; se levantan sus patas traseras sujetando suavemente la cola de manera que sólo se permite que una pata delantera toque la mesa. El investigador tira de la rata hacia atrás un metro a ritmo regular. Se contabilizan independientemente los movimientos de ajuste de las patas delanteras controlaterales e ipsilaterales a lo largo de sus trayectos respectivos. Los datos se presentarán en porcentaje de movimiento de ajuste usando las patas calculando la razón de controlaterales / (controlaterales + ipsilaterales).

Prueba del cilindro

La prueba del cilindro se realiza colocando cada animal en un cilindro de vidrio y contando el número de toques de la pared del cilindro durante 5 min de las patas ipsilaterales y controlaterales, expresándose el resultado calculando la razón de controlaterales / (controlaterales + ipsilaterales), a lo largo de un máximo de 20 toques.

El actímetro de "campo abierto"

Se mide la actividad locomotora espontánea con la ayuda de un actímetro fotoeléctrico (Actitrack, Panlab, S.L., Barcelona, España). El aparato consiste en una jaula transparente conectada a una célula fotoeléctrica. Los haces luminosos detectan los movimientos, y el número total de detecciones de movimiento horizontal de cada rata se registra cada día en dos sesiones sucesivas de 10 minutos. Todas las pruebas en el actímetro se realizan en una sala aislada entre 8h00 y 13h00. La primera fase de tres días permite una habituación. El cuarto día se considera el día de la prueba. La primera sesión de 10 min se considera la habituación diaria. Sólo se usa la actividad locomotora registrada durante la segunda sesión de 10 minutos para el análisis de los datos.

2.3- Evaluaciones de estudio de autopsia - análisis histológico

Tras terminar los experimentos, se sacrifican las ratas mediante perfusión intracardíaca de paraformaldehído al 4 %, se extirpan los cerebros, se congelan en isopentano a - 45 °C y se conservan a - 80 °C. Se cortan los cerebros sometidos a perfusión con criostato en secciones coronales de 50 µm.

Validación de la lesión dopaminérgica (DA)

Se verifican la pérdida de las células DA en el sistema nervioso central y la pérdida de las fibras DA en el cuerpo estriado mediante inmunohistoquímica de la tirosina hidroxilasa (TH) tal como se describió anteriormente (Bouali-Benazzouz et al., 2009). El nombre de células inmunorreactivas frente a tirosina hidroxilasa (TH) se obtiene aplicando el método del fraccionamiento óptico usando un microscopio Leica DM6000B con el software Mercator Pro (ExploraNova, versión 7.9.8).

Validación del injerto

Se someten las secciones de cerebros de rata y los CNO a análisis inmunohistoquímicos usando anticuerpos para analizar la supervivencia celular, la proliferación posible y la maduración fenotípica de los injertos (identificados con la ayuda de HCM, marcador citoplasmático humano) y se caracterizan mediante marcadores de DA clásicos (TH, DAT, FOXA2) , los marcadores pan-neuronales (MAP2, NeuN), serotoninérgicos (FOXG1), los marcadores proliferativos Ki-67 / PCNA y un marcador de la glía (GFAP específica del ser humano).

Prueba de supervivencia neuronal

Se sacrificaron 6 ratas CNO 6 días después del injerto, con el fin de evaluar la supervivencia neuronal tras el injerto.

Resultados

Resultados de los estudios de comportamiento

Los estudios de comportamiento demuestran un efecto muy positivo de los injertos según la invención en las ratas que recibieron injerto (6Pro-encaps y CNO) ya que se obtiene una corrección del comportamiento en de 4 a 6 semanas para la prueba de pasos (figura 4B) y la prueba del cilindro (figura 4A), y en 2 semanas para la prueba del rotómero (figura 4C), mientras que los pocos efectos demostrados en la bibliografía con injertos de progenitores muestran una mejora del comportamiento después de aproximadamente 20 semanas (Kriks et al. 2011, Grealish et al. 2014, Kirkeby et al. 2017, Doi et al. 2014).

Tal como se esperaba, los injertos según la invención no tienen en cambio ningún efecto a nivel de los resultados de ansiedad (figura 4D).

Resultados histológicos

El análisis histológico de los injertos realizados en los dos grupos CNO y Pro-encaps muestra la presencia del 10 al 15 % de neuronas TH en los injertos. A modo de comparación, los estudios anteriormente publicados describen tasas de neuronas TH tras el injerto de progenitores del orden del 5 % (Kirkeby et al. 2017) o el 6 % (Kriks et al. 2011).

El análisis de la supervivencia neuronal muestra que, después de 6 días desde el injerto, se observan proyecciones axónicas plurimilimétricas en el cerebro de las ratas CNO (figura 3), lo cual confirma la supervivencia importante de las neuronas tras un injerto según la invención.

REIVINDICACIONES

1. Unidad de tejido neural que forma una agrupación de células neurales para su uso en terapia celular para una implantación en el sistema nervioso de un mamífero humano o no humano, pudiendo dicha unidad de tejido neural proyectar axones al interior del tejido huésped, en la que dicha unidad de tejido neural contiene células neuronales postmitóticas diferenciadas inmunocompatibles con el mamífero destinado a recibir la unidad de tejido neural y cuyo fenotipo corresponde al fenotipo de las células defectuosas que deben sustituirse, organizadas en red tridimensional e incrustadas en una capa de matriz extracelular, obteniéndose dicha unidad a partir de un microcompartimento celular que comprende una cápsula de hidrogel que rodea una única unidad de tejido neural, y eliminándose al menos parcialmente dicha cápsula de hidrogel antes del uso de dicha unidad de tejido neural.

2. Unidad de tejido neural para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha unidad de tejido neural carece de hidrogel.

3. Unidad de tejido neural para su uso según la reivindicación 1 o 2, en la que las células neurales presentan de manera preferible una dimensión más pequeña comprendida entre 50 pm y 500 pm, más o menos 10 %, preferiblemente entre 150 pm y 400 pm, más o menos 10 %, aún más preferiblemente entre 200 pm y 300 pm, más o menos 10 %.

4. Unidad de tejido neural para su uso según una de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo dicha unidad de células neurales células neuronales y células de la glía.

5. Unidad de tejido neural para su uso según una de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha unidad comprende entre el 10 y el 100 % de células neuronales postmitóticas cuyo fenotipo corresponde al fenotipo de las células defectuosas que deben sustituirse, preferiblemente entre el 50 y el 100 %, más preferiblemente más del 90 %.

6. Unidad de tejido neural para su uso según una de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha unidad contiene de 100 a 100.000 células neurales.

7. Unidad de tejido neural para su uso según una de las reivindicaciones anteriores, para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, tal como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la enfermedad de Alzheimer o las ceroidolipofuscinosis neuronales tales como la enfermedad de Batten.

8. Unidad de tejido neural para su uso según la reivindicación 7, en la que dicha unidad de tejido neural contiene neuronas dopaminérgicas, para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

9. Unidad de tejido neural para su uso según la reivindicación 7, en la que dicha unidad de tejido neural contiene neuronas gabaérgicas, para el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

10. Unidad de tejido neural para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicha unidad de tejido neural contiene células neurales genéticamente modificadas.

11. Unidad de tejido neural para su uso según la reivindicación 10, para ayudar, mejorar o reparar una función cognitiva y/o de acción.

12. Kit de implantación de unidades de tejido neural que comprende al menos un microcompartimento celular que comprende al menos una cápsula de hidrogel que envuelve una unidad de tejido neural según una de las reivindicaciones 1 a 11, y medios de eliminación al menos parcial de la cápsula de hidrogel.

13. Kit de implantación de unidades de tejido neural según la reivindicación 12, que comprende además un dispositivo de implantación quirúrgica adecuado para implantar una unidad de tejido neural en el sistema nervioso de un mamífero.

14. Kit de implantación de unidades de tejido neural que comprende al menos una unidad de tejido neural según una de las reivindicaciones 1 a 11, preferiblemente entre 1 y 10.000, más preferiblemente entre 10 y 1.000 unidades de tejido neural en un dispositivo de implantación quirúrgica adecuado para implantar la o las unidades de tejido neural en el sistema nervioso de un mamífero.

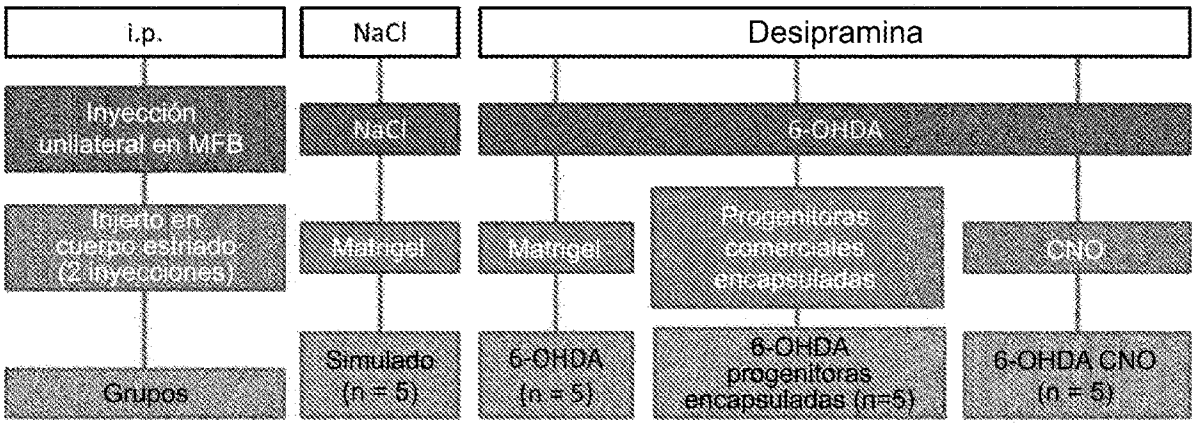


Figura 1

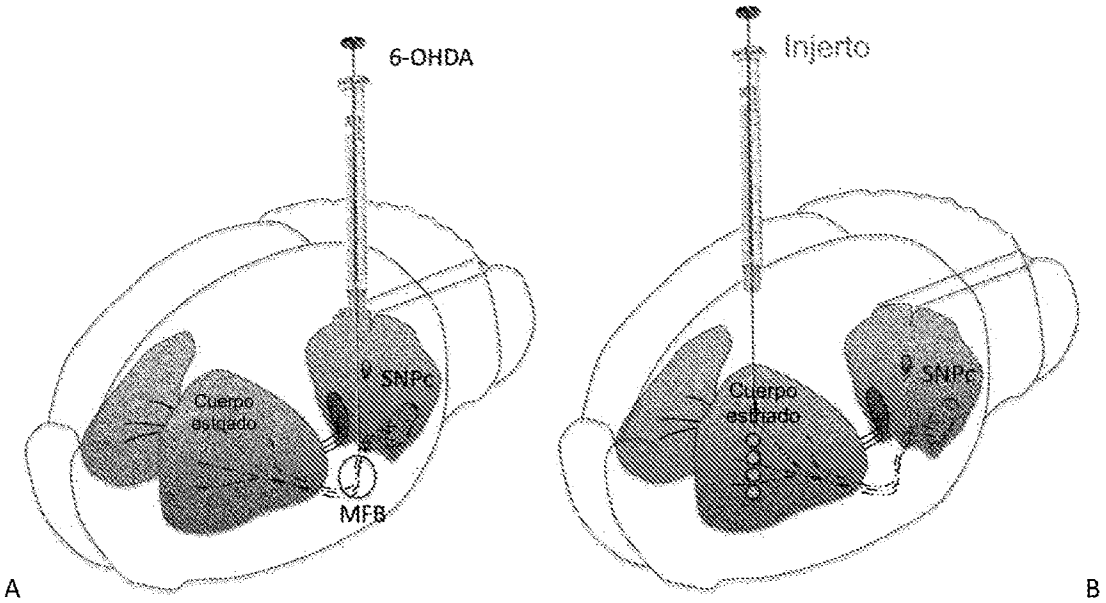


Figura 2

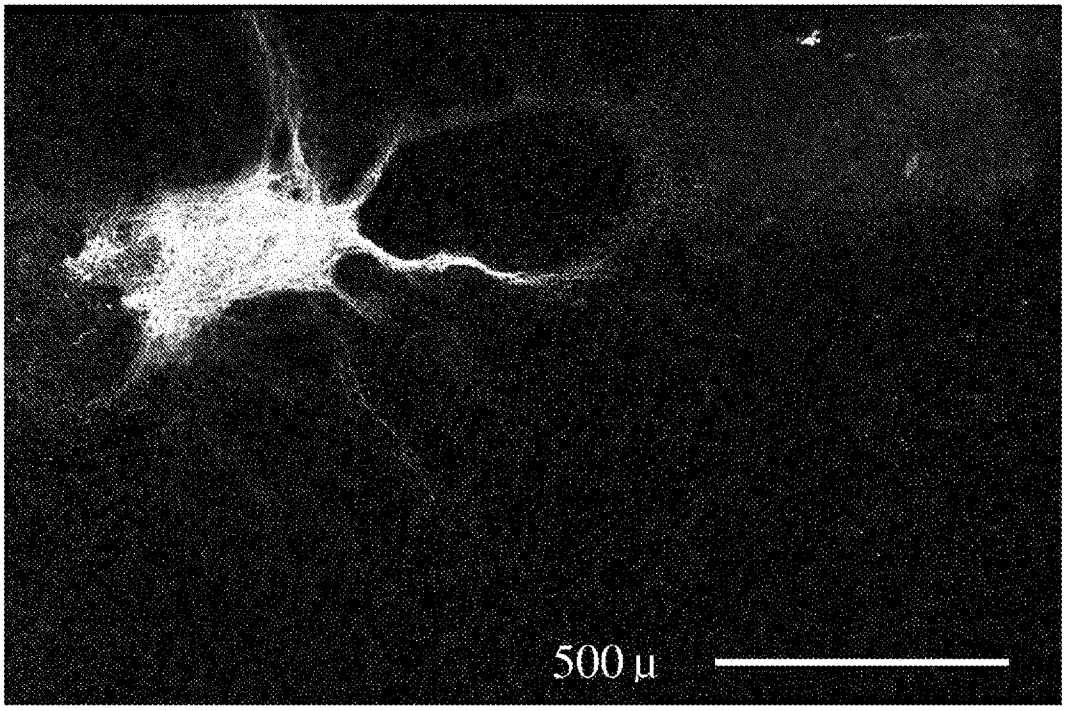


Figura 3

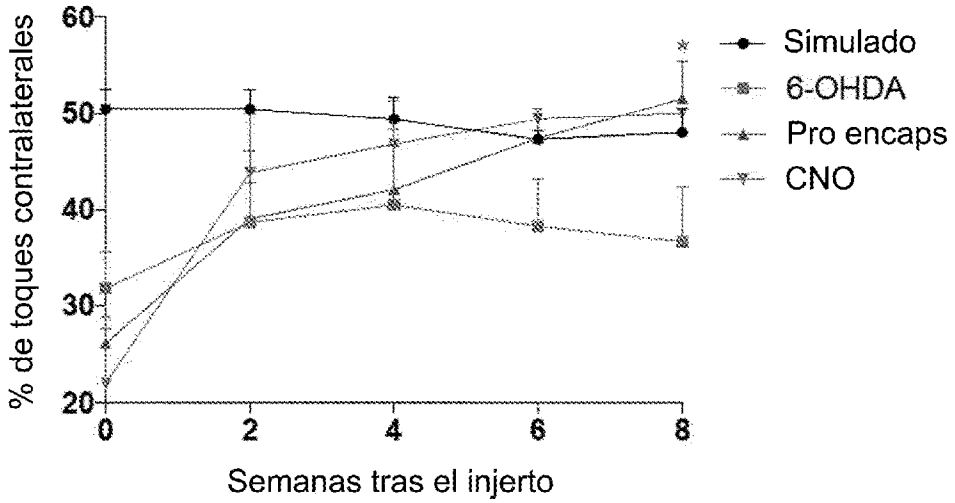


Figura 4A

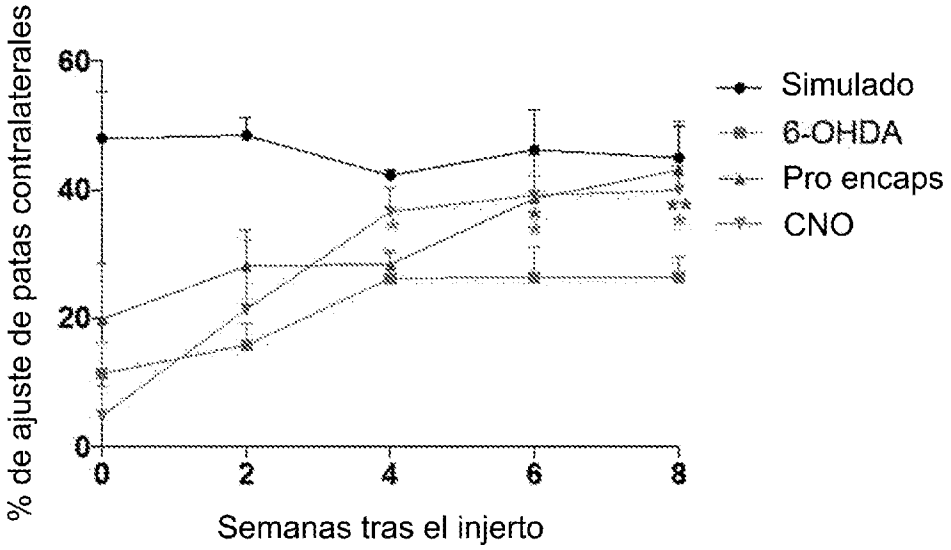


Figura 4B

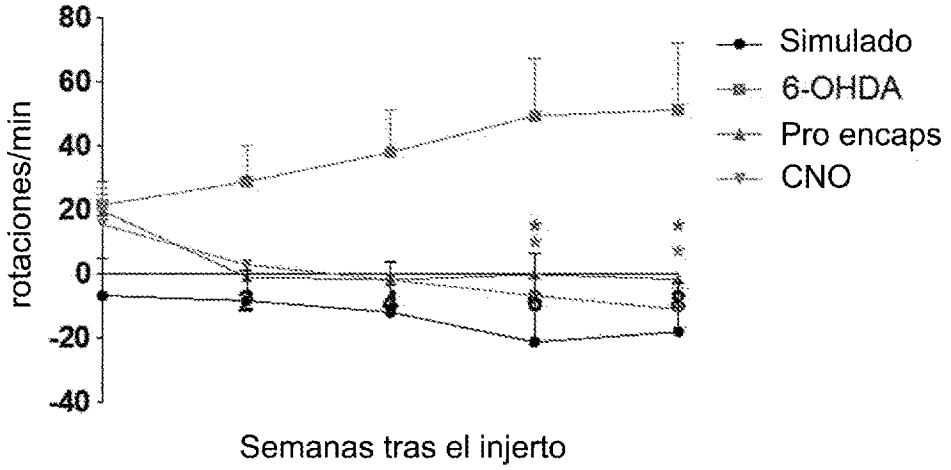


Figura 4C

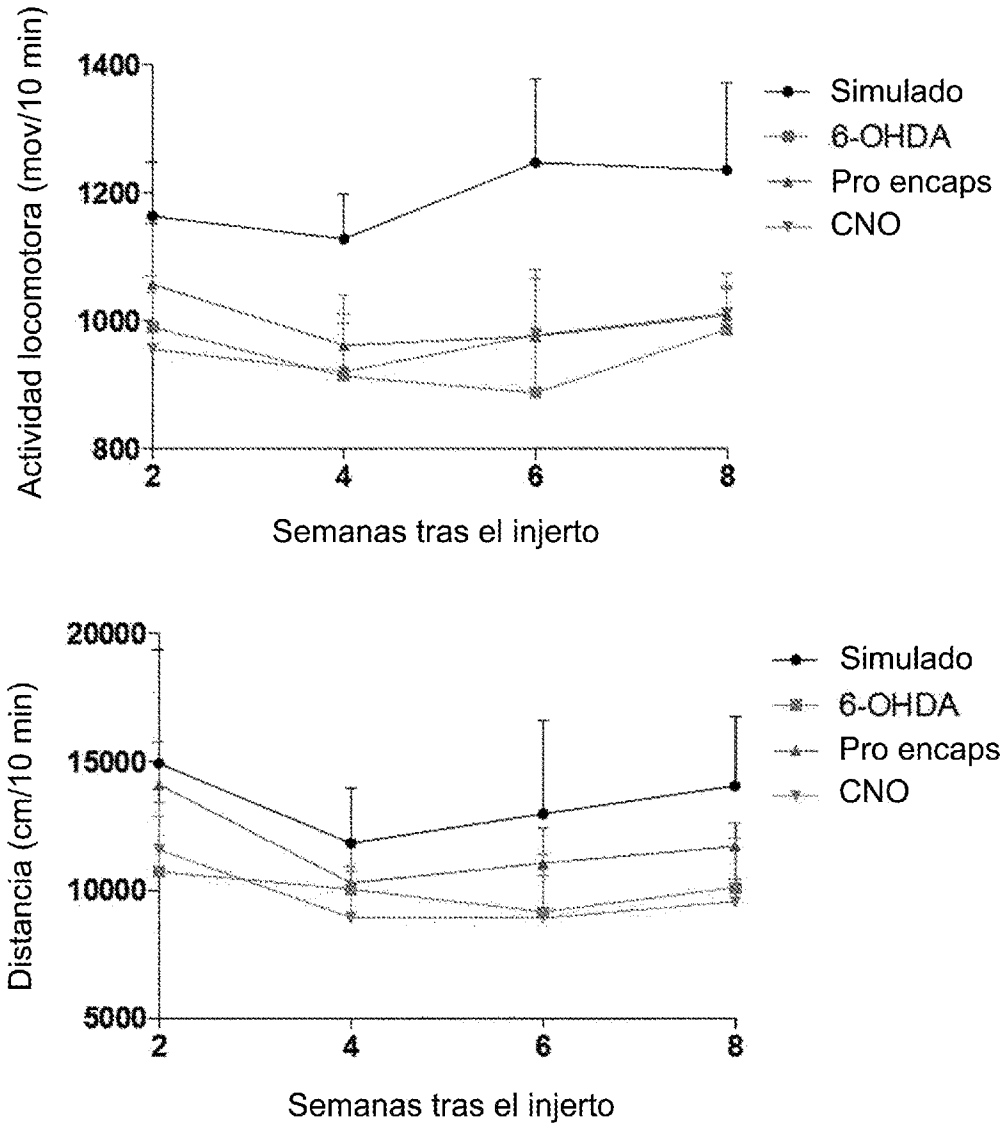

Actividad locomotora (mov/10 min)
1400
1200
1000
800
2
4
6
8
Semanas tras el injerto
Simulado
6-OHDA
Pro encaps
CNO
Distancia (cm/10 min)
20000
15000
10000
5000
2
4
6
8
Semanas tras el injerto
Simulado
6-OHDA
Pro encaps
CNO

Figura 4D