(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 875 315**

(51) Int. CI.:

C12N 15/09 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61L 27/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 35/30 (2015.01)
C12N 5/079 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2015 PCT/JP2015/075921**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2016 WO16039462**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2015 E 15839728 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021 EP 3196305**

(54) Título: **Células de Schwann y método para prepararlas**

(30) Prioridad:

12.09.2014 JP 2014186210

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.11.2021

(73) Titular/es:

KYOTO PREFECTURAL PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION (100.0%)
465 Kajii-cho Kawaramachi-dori Hirokoji-agaru
Kamigyo-ku Kyoto-shi
Kyoto 602-8566, JP

(72) Inventor/es:

SOWA, YOSHIHIRO;
KISHIDA, TSUNAO y
MAZDA, OSAM

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Células de Schwann y método para prepararlas

Campo técnico

La presente invención se refiere principalmente a células de Schwann y a un método para prepararlas, más específicamente a un método para preparar células de Schwann mediante reprogramación directa.

Antecedentes de la técnica

Se considera que las células de Schwann desempeñan un papel fundamental en la regeneración nerviosa. Hay muchas enfermedades asociadas con defectos nerviosos y disfunción de las células de Schwann. Si se pueden trasplantar células de Schwann autólogas, se espera que sea un tratamiento de medicina regenerativa ideal para estas enfermedades. De hecho, el tratamiento por injerto de nervio autólogo o por un método que comprende separar las células de Schwann de los nervios autólogos y cultivar y trasplantar las células de Schwann es eficaz para el daño nervioso debido a una lesión externa o la eliminación de tumores malignos. Sin embargo, la extracción de nervios es extremadamente invasiva para los pacientes y el daño nervioso secundario es inevitable. Además, el número de células de Schwann proporcionadas a menudo es insuficiente.

La bibliografía no de patente (NPL) 1 y 2 describen un método para diferenciar las células similares a las células de Schwann (dADSC) mediante el uso de células madre mesenquimales, tales como células madre derivadas de tejido adiposo indiferenciadas (ADSC) (también denominadas "células estromales derivadas de tejido adiposo", como material de partida. Sin embargo, dado que este método tiene inherentemente un riesgo de infección externa, el control de calidad no es fácil y el método es problemáticamente costoso y requiere mucho tiempo. También se ha observado que las células obtenidas son diferentes de las células de Schwann verdaderas en rasgos y funciones. Además, no se describe que las células de Schwann creadas por estos métodos tengan capacidad mielinizante y es posible que no puedan contribuir a la conducción saltatoria.

Investigaciones recientes muestran que los cardiomiocitos, hepatocitos, etc. pueden inducirse directamente a partir de fibroblastos (reprogramación directa o conversión directa). Si las células de Schwann se pueden crear directamente a partir de células somáticas, tales como los fibroblastos, que se pueden extraer de los pacientes de una manera poco invasiva, esto conducirá a una nueva técnica poco invasiva para crear células de Schwann autólogas para trasplante con un bajo riesgo de oncogénesis.

Por ejemplo, se ha descrito lo siguiente con respecto a la técnica de introducir un grupo de genes de factores de transcripción específicos de tejido en células somáticas para inducir la diferenciación directa en las células de tejido previsto sin pasar a través de las células iPS (reprogramación directa (conversión directa)):

fibroblastos de ratón → condrocitos (introducción de genes SOX9 + Klf4 + c-Myc);

fibroblastos de ratón → cardiomiocito (introducción de genes GATA4 + Mef2c + Tbx5);

fibroblastos de ratón → hepatocitos (introducción de genes Hnf4α + (Foxa1 o Foxa2 o Foxa3));

fibroblastos de ratón → células madre neurales (por ejemplo, introducción de genes Sox2 + FoxG1); y

células de ratón o células humanas → células madre hematopoyéticas; etc.

Sin embargo, no ha habido informes que demuestren la conversión directa de células somáticas en células de Schwann.

Lista de citas

Bibliografía no de patentes

NPL 1: Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, et al.: "Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro". *Exp Neurol*, 2007; 207: 267-274.

NPL 2: Liu Y, Zhang Z, Qin Y, Wu H, Lv Q, Chen X, Deng W: "A new method for Schwann-like cell differentiation of adipose derived stem cells". *Neurosci Lett.* 13 de septiembre de 2013; 551: 79-83.

Sumario de la invención

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar una célula de Schwann que sea aplicable para el tratamiento de enfermedades asociadas con defectos nerviosos y disfunción de las células de Schwann y que tenga un riesgo bajo de oncogénesis.

Solución al problema

Los autores de la presente invención encontraron que la introducción de una combinación de genes específicos en una célula somática de un mamífero puede producir una célula de Schwann directamente (por reprogramación directa) sin pasar a través de células madre pluripotentes, tales como células madre embrionarias (ES) o células iPS.

La presente invención incluye las siguientes invenciones.

Ítem 1. Un método para preparar una célula de Schwann in vitro que comprende introducir en una célula somática de un mamífero una combinación del gen SOX10 o un producto de expresión del mismo y el gen KROX20 o un producto de expresión del mismo, como se define adicionalmente en la reivindicación 1.

Ítem 2. Un material de injerto que comprende una célula obtenida por el método según el ítem 1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad como se define adicionalmente en la reivindicación 2.

Ítem 3. Una combinación del gen SOX10 o un producto de expresión del mismo y el gen KROX20 o un producto de expresión del mismo para su uso en el tratamiento de una enfermedad como se define adicionalmente en la reivindicación 3.

Ítem 4. Un vector que comprende una combinación del gen SOX10 y el gen KROX20, o un producto de expresión del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad según se define adicionalmente en la reivindicación 4.

Efectos ventajosos de la invención

Según la presente invención, las células de Schwann se pueden preparar a partir de células somáticas en un corto período de tiempo mediante reprogramación directa. Dado que las células de Schwann pueden inducirse fácilmente a partir de células somáticas de un sujeto en el que se van a trasplantar las células de Schwann, no surge el rechazo inmunológico o problemas similares en el trasplante de las células de Schwann obtenidas. Además, las células de Schwann pueden inducirse directamente a partir de células somáticas sin pasar por células iPS o células ES, lo que evita problemas debidos a células madre pluripotentes, como la oncogénesis.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 describe de forma general un método de ejemplo de la presente invención.

La Fig. 2 muestra imágenes típicas de tinción de S100β.

La Fig. 3 muestra un ejemplo típico de una escala de 4 puntos de tinción de S100β.

La Fig. 4A muestra los resultados de la evaluación en términos de morfología celular. Se muestran ejemplos típicos de morfología celular de HDF, cSC y dSC.

La Fig. 4B muestra los resultados de la evaluación en términos de morfología celular.

La Fig. 5A muestra un ejemplo de inmunotinción de un marcador relacionado con células de Schwann (p75NTR).

La Fig. 5B muestra un ejemplo de inmunotinción de un marcador relacionado con células de Schwann (GFAP).

La Fig. 5C muestra un ejemplo de inmunotinción de un marcador relacionado con células de Schwann (Nestin).

La Fig. 5D muestra un ejemplo de inmunotinción de un marcador relacionado con células de Schwann (NG2).

La Fig. 6 muestra los resultados de la medición de los niveles de expresión de ARNm de los genes S100β y p75NTR.

La Fig. 7A muestra los resultados de la evaluación de los efectos de prolongaciones de neuritas en células nerviosas. Se muestra un ejemplo de neuronas NG108-15 marcadas con fluorescencia cocultivadas con fibroblastos HDF, células de Schwann normales (cSC, control positivo) o dSC. Las flechas indican neuritas extendidas.

La Fig. 7B muestra los resultados de la evaluación de los efectos de excrecencias de neuritas en células nerviosas.

La Fig. 8 muestra un ejemplo de inmunotinción de marcadores relacionados con células de Schwann (S100β, p75NTR y GAP43) en experimentos de conversión celular inducidos por transfección de plásmidos (electroporación).

La Fig. 9A muestra imágenes de contraste de fase de células madre derivadas de tejido adiposo humano (ADSC) normales antes de la inducción y sus imágenes de contraste de fase después de la inducción a células de Schwann, e imágenes de tinción de S100β. El aumento es x200.

La Fig. 9B muestra un ejemplo de inmunotinción de marcadores relacionados con células de Schwann (S100β, GAP43, p75NTR y Proteína Cero (PO)). El aumento es x100.

La Fig. 10A muestra imágenes de contraste de fase de células endoteliales vasculares umbilicales (Huvec) antes de la inducción, sus imágenes de contraste de fase después de la inducción a células de Schwann e imágenes de tinción de S100β. El aumento es x200.

La Fig. 10B muestra un ejemplo de imágenes de inmunotinción de marcadores relacionados con células de Schwann (S100β, GAP43 y p75NTR). El aumento es x100.

La Fig. 11A muestra un ejemplo de imágenes de inmunotinción de un marcador de mielina (proteína cero (P0)).

La Fig. 11B muestra un ejemplo de imágenes de inmunotinción de un marcador de mielina (proteína básica de mielina (MBP)).

La Fig. 12A describe de forma general una prueba de evaluación utilizando un modelo de aplastamiento del nervio ciático.

La figura 12B muestra un ejemplo de imágenes de inmunotinción para marcadores relacionados con células de Schwann.

La Fig. 12C muestra un ejemplo de imágenes de inmunotinción para marcadores relacionados con células de Schwann.

La Fig. 13A describe de forma general un ensayo de trasplante de dSC en un modelo de defecto del nervio ciático de ratón inmunodeficiente.

La Fig. 13B muestra imágenes macroscópicas de nervios puenteados.

La Fig. 13C muestra imágenes de tinción de mielina de la sección transversal de tejido nervioso en regeneración.

La Fig. 13D muestra los resultados de la evaluación en términos de índice funcional ciático (SFI).

La Fig. 13E muestra los resultados de la evaluación en términos de atrofia y fibrosis del músculo inervado.

La Fig. 14 muestra la producción de factores neurotróficos (factores neurotróficos: BDNF, GDNF y NGF). Su producción se midió por ELISA. *p <0.05 frente al control; **p <0.01 frente al control; #p <0.05 frente a cSC.

Las Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4A, Figs. 5A a 5D, Fig. 7A, Fig. 8, Figs. 9A y 9B, Figs. 10A y 10B, Figs. 11A y 11B y las Figs. 12B a 12C incluyen además imágenes de color invertido.

Descripción de realizaciones

La presente invención se refiere a un método para preparar células de Schwann. El método de preparación de la presente invención es un método para preparar células de Schwann sin pasar por las células madre pluripotentes, tales como células madre embrionarias (ES) o células iPS.

Células de Schwann

Las células de Schwann son células gliales del sistema nervioso periférico. En condiciones fisiológicas, las células de Schwann contribuyen, por ejemplo, al soporte del tejido nervioso y la conducción saltatoria mediante la formación de mielina (vaina de mielina). Cuando se dañan los nervios periféricos, las células de Schwann desempeñan muchas funciones importantes en la regeneración de los nervios periféricos, tales como la producción y liberación de factores neurotróficos, el andamiaje para los axones regenerados y la mielinogénesis.

A diferencia de las células nerviosas derivadas directamente del ectodermo, las células de Schwann naturales se obtienen de la cresta neural. Las células de Schwann maduras se forman a través de células de Schwann progenitoras y células de Schwann inmaduras. En esta memoria descriptiva, en aras de la simplicidad, todas las células durante el proceso de diferenciación están incluidas en el alcance de "células de Schwann".

Las células de Schwann incluyen células de Schwann que forman mielina, células de Schwann migratorias que no forman mielina (células de Schwann indiferenciadas), y similares. En esta memoria descriptiva, todas estas células de Schwann están incluidas dentro del alcance de "células de Schwann".

En esta memoria descriptiva, las células en las que algunas o todas las funciones son identificables con las de las células de Schwann naturales, así como las células que son iguales a las de las células de Schwann naturales, se denominan "células de Schwann".

Células somáticas

Pueden usarse células somáticas derivadas de un mamífero, en donde la célula somática es un fibroblasto, una célula endotelial vascular, adipocito, queratinocito, célula epitelial de la mucosa oral, célula gingival o leucocito. Son preferibles las células derivadas de mamíferos que no son células de Schwann o las células derivadas de mamíferos

que no tienen capacidad para diferenciarse en células de Schwann in vivo. Cuando se trasplantan células de Schwann a un sujeto vivo, se utilizan preferiblemente células somáticas derivadas del sujeto en el que se van a trasplantar las células somáticas (células autólogas) para así reducir el riesgo de infección y la respuesta de rechazo, etc. Sin embargo, cuando se realiza el trasplante debido a un daño neuronal repentino, se pueden usar células de Schwann preparadas de antemano a partir de células somáticas derivadas de otras personas u otros animales para el trasplante. Alternativamente, las células de Schwann se pueden producir a partir de células somáticas de otras personas u otros animales, que se prepararon de antemano, y se pueden usar para trasplante. Es decir, se puede preparar un banco de células de Schwann (incluido un banco de células progenitoras de células de Schwann) y utilizarlo para el trasplante. En este caso, para reducir el riesgo de, por ejemplo, una respuesta de rechazo, se puede tipificar el MHC de antemano. Además, las características celulares, tumorigenicidad, etc. de las células de Schwann se pueden confirmar de antemano.

En esta memoria descriptiva, los ejemplos de mamíferos incluyen ratones, ratas, hámsteres, seres humanos, perros, gatos, monos, conejos, vacas, caballos, cerdos y similares. Los seres humanos son particularmente preferibles.

Las células somáticas que se van a someter al método de la presente invención (reprogramación directa) son un fibroblasto, una célula endotelial vascular, adipocito, queratinocito, célula epitelial de la mucosa oral, célula gingival o leucocito.

Las células somáticas obtenidas fácilmente de un organismo biológico se pueden utilizar como células somáticas, en donde las células son fibroblastos, células endoteliales vasculares, adipocitos, queratinocitos, células epiteliales de la mucosa oral, células gingivales o leucocitos. En la presente invención, se utilizan preferiblemente células obtenidas de un organismo biológico.

El "organismo biológico" o "sujeto vivo" utilizado en el presente documento incluye no sólo embriones (fetos), larvas, juveniles y adultos, sino también la placenta y el cordón umbilical que conectan a la madre y al feto. Las células endoteliales vasculares umbilicales, como las células derivadas del cordón umbilical y células derivadas de la placenta, no se consideran estrictamente células somáticas, pero también están incluidas en el alcance de las "células somáticas" de la presente invención (en este caso, la expresión "células somáticas" debe leerse como "células endoteliales vasculares umbilicales", "células derivadas del cordón umbilical", "células derivadas de la placenta", etc.). Estas células son ejemplos de células somáticas que son preferibles desde el punto de vista de la facilidad de recolección.

Los ejemplos de células somáticas también incluyen células somáticas preparadas a partir de células madre somáticas, tales como células madre mesenquimales (MSC), células madre neurales, células madre hepáticas, células madre intestinales, células madre dérmicas, células madre de folículos pilosos y células madre de melanocitos, por inducción de diferenciación, desdiferenciación o reprogramación. Los ejemplos de células somáticas también incluyen células somáticas preparadas induciendo diversas células somáticas en otras células por inducción de diferenciación, desdiferenciación o reprogramación. Los ejemplos de células somáticas también incluyen células somáticas preparadas a partir de células de la línea germinal por inducción de diferenciación, desdiferenciación o reprogramación.

Los ejemplos de células somáticas también incluyen células somáticas preparadas a partir de células madre embrionarias (células ES) o células madre pluripotentes inducidas (células iPS) por inducción de diferenciación o reprogramación.

Además de las células somáticas diferenciadas, también se pueden usar células madre somáticas. "Células madre", como se usa en el presente documento, se refiere a células capaces de autorreplicarse o que tienen la capacidad de diferenciarse en otros tipos de células. Los ejemplos específicos de dichas células madre incluyen células madre mesenquimales (MSC) (tales como células estromales derivadas de tejido adiposo (ADSC), células madre neurales, células madre hepáticas, células madre intestinales, células madre dérmicas, células madre del folículo piloso y células madre de melanocitos.

Las "células somáticas" de la presente invención también abarcan células ES, células iPS y células de la línea germinal, aunque no son, estrictamente hablando, células somáticas (en este caso, la expresión "células somáticas" debe leerse como "células ES", "células iPS" o "células de la línea germinal").

Los ejemplos de células somáticas también incluyen células cultivadas y células somáticas preparadas a partir de células cultivadas por inducción de diferenciación, desdiferenciación o reprogramación. Los ejemplos de células somáticas también incluyen células somáticas preparadas a partir de células ES, células iPS o células de la línea germinal por inducción de diferenciación, desdiferenciación o reprogramación.

En una realización preferible de la presente invención, las células somáticas son fibroblastos, células endoteliales vasculares (en particular, células endoteliales vasculares umbilicales) o células madre mesenquimales (en particular, células estromales derivadas de tejido adiposo).

Gen o producto de expresión del mismo

En el método de la presente invención, se introduce una combinación de genes SOX10 y KROX20, o los productos de expresión de los mismos, en células somáticas. Los ejemplos del "producto de expresión" incluyen ARNm y proteínas expresadas a partir del gen SOX10 y/o el gen KROX20.

La combinación de genes utilizable incluye una combinación de genes SOX10 y KROX20.

Desde el punto de vista de la eficiencia de producción de células de Schwann, se utiliza una combinación de genes SOX10 y KROX20.

En el método de la presente invención, se pueden usar otros genes con la combinación de genes SOX10 y KROX20. También se pueden usar microARN, ARNip, hcARNm o ADN que expresan estos ARN con el gen SOX10 y el gen KROX20. También se pueden usar varias proteínas con el gen SOX10 y el gen KROX20. El gen SOX10 y el gen KROX20 pueden introducirse con varios otros genes. Es preferible desde el punto de vista de la eficacia y conveniencia de la producción de células de Schwann que se usen preferiblemente los dos genes SOX10 y KROX20 solos.

El gen SOX10 codifica un factor de transcripción que pertenece a la familia SOX (caja de HMG relacionada con SRY) y que participa en el control de las decisiones sobre el destino celular en el desarrollo de las etapas embrionarias.

El gen KROX20 (también llamado "EGR2", "AT591", "CMT1D" o "CMT4E") codifica una proteína que tiene tres dedos de zinc de tipo C2H2.

Los genes anteriores están ambos altamente conservados entre los vertebrados. El término "gen" en el presente documento incluye sus homólogos a menos que se indique el nombre de un animal en particular. "Gen" también abarca polimorfismos y genes mutados que tienen una función comparable a la de los productos génicos de tipo natural.

Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de ADNc de los genes SOX10 y KROX20 de seres humanos (*Homo sapiens*) y los genes SOX10 y KROX20 de ratón (*Mus musculus*), así como las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por estas secuencias, han sido registradas en GenBank proporcionado por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), con los siguientes números de acceso (debe entenderse que cuando se han registrado múltiples revisiones, cada número se refiere a la última revisión):

Secuencia de ADNc del gen SOX10 humano: NM_00694 1 (por ejemplo, NM_006941.3);

Secuencia de aminoácidos de la proteína SOX10 humana: NP_008872 (por ejemplo, NP_008872.1);

Secuencia de ADNc del gen Sox10 de ratón: NM_011437 (por ejemplo, NM_011437.1);

Secuencia de aminoácidos de la proteína SOX10 de ratón: NP_035567 (por ejemplo, NP_035567.1);

Secuencias de ADNc del gen KROX20 humano: NM_000399, NM_001136177, NM_001136178, NM_001136179 (NM_000399.3, NM_001136177.1, NM_001136178.1, NM_001136179.1);

Secuencias de aminoácidos de la proteína KROX20 humana: NP_000390, NP_001129649, NP_001129650, NP_001129651 (por ejemplo, NP_000390.2, NP_001129649.1, NP_001129650.1, NP_001129651.1);

Secuencia de ADNc del gen Krox20 de ratón: NM_010118 (p. ej., NM_010118.3)

Secuencia de aminoácidos de la proteína KROX20 de ratón: NP_034248 (NP_034248.2).

Introducción

El método de la presente invención se puede llevar a cabo de acuerdo con un método de reprogramación directo conocido, excepto que se seleccionan genes específicos y se usa un medio adecuado para células de Schwann. Por ejemplo, el método se puede llevar a cabo de acuerdo con el método descrito en uno cualquiera de los siguientes documentos:

1: Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes by Defined Factors; Masaki Ieda, Ji-Dong Fu, Paul Delgado-Olguin, Vasanth Vedantham, Yohei Hayashi, Benoit G. Bruneau, and Deepak Srivastava. Cell 142: 375-386, 2010.

2: Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. Thomas Vierbuchen, Austin Ostermeier, Zhiping P. Pang, Yuko Kokubu, Thomas C. Sudhof, and Marius Wernig. Nature 463: 1035-1041, 2010.

3: Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, Ostermeier A, Fuentes DR, Yang TQ, Citri A, Sebastiano V, Marro S, Sudhof TC, Wernig M. Nature 476: 220-223, 2011.

4: Generation of hyaline cartilaginous tissue from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors. Kunihiko Hiramatsu, Satoru Sasagawa, Hidetatsu Outani, Kanako Nakagawa, Hideki Yoshikawa, and Noriyuki Tsumaki. Journal of Clinical Investigation, 121: 640-657, 2011.

5: Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. Pengyu Huang, Zhiying He, Shuyi Ji, Huawang Sun, Dao Xiang, Changcheng Liu, Yiping Hu, XinWang, and Lijian Hui, Nature 475: 386-389, 2011.

6: Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors, Sayaka Sekiya, and Atsushi Suzuki. Nature 475: 390-393, 2011.

7: WO2014/010746

A continuación se hace referencia al contenido de los documentos 1 a 7 anteriores.

Específicamente, es preferible que se incorpore un gen o genes de interés en uno o más vectores de expresión, los vectores de expresión se introduzcan en células somáticas diana y los genes se expresen intracelularmente.

Los ejemplos de métodos para introducir genes incluyen un método de infección con vectores virales, tales como vectores retrovirales, vectores adenovirales, vectores lentivirales, vectores virales adenoasociados, vectores virales del herpes o vectores del virus Sendai. Cuando se introduce un gen o un producto de expresión del mismo, también se pueden usar un método de transfección de un vector plasmídico, un vector episomal o un producto de expresión del gen (ARNm, proteína) utilizando un vector no viral, tal como un liposoma catiónico, un polímero catiónico o electroporación. También se puede introducir ARNm. Todos los medios de transferencia de genes anteriores se denominan colectivamente en el presente documento como "vectores".

Los vectores virales son preferibles en vista de la eficacia de la transferencia y el mantenimiento estable de los transgenes. Los plásmidos son preferibles para suprimir el riesgo de oncogénesis.

Cuando se introduce un gen marcador de selección de fármacos (que confiere resistencia a puromicina, blasticidina S, neomicina, higromicina, etc.) con un gen de interés y luego se realiza la selección por fármacos, se pueden seleccionar y utilizar células que expresan el gen de interés.

La transferencia de genes de la presente invención se puede realizar usando un plásmido. También se pueden usar vectores virales, por ejemplo, vectores retrovirales. Los vectores virales son preferibles en vista de la eficacia de la transferencia y el mantenimiento estable de los transgenes. Los plásmidos son preferibles para suprimir el riesgo de oncogénesis.

Los genes que se van a introducir en las células somáticas se pueden transcribir mediante un promotor LTR o se pueden expresar a partir de otro promotor dentro del vector. Por ejemplo, puede usarse un promotor de expresión constitutivo, tal como un promotor de CMV, un promotor de EF-1α o un promotor CAG, o un promotor inducible deseado. Alternativamente, se puede usar un promotor quimérico en el que una porción de LTR se reemplaza por otro promotor.

Cuando un factor introducido es un producto de expresión de un gen (por ejemplo, una proteína), el factor puede introducirse en las células somáticas uniendo un péptido llamado "dominio de transducción de proteínas" (PTD) a la proteína del producto de expresión y añadiendo la proteína de fusión a un medio de cultivo.

En una realización del método de la presente invención, después de introducir un gen o similar en células somáticas, las células a las que se ha transferido el gen o similar se pueden cultivar en un medio adecuado para cultivar células de Schwann. El medio adecuado para cultivar células de Schwann puede ser un medio conocido. Los ejemplos de medios utilizables incluyen medios (medios de inducción de células de Schwann) que contienen uno o más de los siguientes componentes (preferiblemente todos los componentes) en un medio habitual, tal como un medio DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco) que contiene FBS al 10% (suero bovino fetal): forskolina aproximadamente de 1 a 20 μM (particularmente aproximadamente 5 μM); bFGF (un factor de crecimiento de fibroblastos básico) aproximadamente de 2 a 50 ng/ml (particularmente 10 ng/ml aproximadamente); PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) aproximadamente de 2 a 50 ng/ml (particularmente aproximadamente 10 ng/ml); neuregulina-β1 humana (también denominada "heregulina" o "GGF" (factor de crecimiento glial)) aproximadamente de 50 a 1000 ng/ml (particularmente aproximadamente 200 ng/ml), etc.

El período de cultivo no está particularmente limitado. Por ejemplo, el período de cultivo puede ser de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 1 mes, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 3 semanas o de aproximadamente 3 días a aproximadamente 2 semanas. El medio se puede reemplazar con un medio de nueva aprotación, si es necesario. Las condiciones de cultivo son preferiblemente de acuerdo con el método habitual.

Preparación

Las células de Schwann se inducen a partir de células somáticas de esta manera para obtener células de Schwann.

En una realización, las células de Schwann obtenidas tienen una combinación de genes SOX10 y KROX20 exógenos, o productos de expresión de los mismos. El término "exógeno" como se usa en el presente documento significa un gen o un producto de expresión del mismo que se introduce típicamente por los medios de introducción anteriores y que es diferente de los genes nativos o productos de expresión de los mismos. Los ejemplos de genes exógenos incluyen genes cuya expresión está controlada por un promotor distinto de los promotores nativos, genes presentes en locus cromosómicos no nativos, genes extracromosómicos y similares.

La producción de células de Schwann puede confirmarse, por ejemplo, por observación y evaluación de la morfología (por ejemplo, la relación del ancho de la célula a la longitud de la célula); detección de la expresión de marcadores

específicos de células de Schwann, tales como S100β, p75NTR, GFAP, Nestin y NG2 (p. ej., detección de la expresión génica de un marcador por RT-PCR, detección de la expresión de una proteína marcadora por inmunotinción, etc.); producción de un factor neurotrófico; evaluación de los efectos de prolongaciones de neuritas en células neurales cocultivadas y funciones como células de Schwann, tales como la capacidad mielinogénica.

Las células de Schwann típicamente tienen una morfología celular bipoloar o multipolar con un núcleo relativamente pequeño.

Entre los marcadores específicos de las células de Schwann, p75NTR es un marcador de células de Schwann indiferenciadas.

La mielinogénesis se puede confirmar, por ejemplo, detectando un marcador de células de mielina, tal como la proteína cero de mielina (MPZ, P0) o la proteína básica de mielina (MBP), u observando la morfología de la mielina.

Las células de Schwann se pueden obtener como una mezcla de células de Schwann con otras células (tales como células somáticas originales). En tal caso, las células de Schwann pueden separarse de las células distintas de las de Schwann, si es necesario. Los medios de separación no están particularmente limitados. Por ejemplo, la separación de las células de Schwann obtenidas a partir de fibroblastos, que son células originales, se puede realizar basándose en la diferencia en la adhesión de las células a un andamio (por ejemplo, de colágeno). En general, las células de Schwann son menos adhesivas a los andamios que los fibroblastos. También es posible separar las células de Schwann de otras células clasificándolas.

Las células de Schwann preparadas por la presente invención se pueden utilizar de forma adecuada, por ejemplo, como un material de injerto descrito a continuación.

Las células de Schwann preparadas por la presente invención pueden usarse, por ejemplo, para diversas investigaciones y desarrollos técnicos. Las células de Schwann son útiles, por ejemplo, en investigación básica, tal como en el análisis de los mecanismos de desarrollo, diferenciación y morfogénesis de las células de Schwann, así como en el análisis de las influencias del estrés dinámico, nutrición, hormonas, etc. en el desarrollo, diferenciación, y morfogénesis de células de Schwann.

Con el uso de células de Schwann preparadas por la presente invención, las células de Schwann pueden establecerse a partir de seres humanos o animales con diversas enfermedades o antecedentes genéticos de forma sencilla, rápida y económica. Por lo tanto, las anomalías de las células de Schwann asociadas con enfermedades o antecedentes genéticos pueden analizarse por un método bioquímico, biológico molecular, inmunológico o similar. Dicho análisis puede ayudar en investigaciones tales como la elucidación de la patogénesis de diversas enfermedades y ayudar en el desarrollo de métodos de diagnóstico. Además, el desarrollo de fármacos, la realización de pruebas de toxicidad de fármacos, etc., utilizando tales células de Schwann puede contribuir al desarrollo de nuevas terapias para diversas enfermedades.

Material de injerto

Las células de Schwann obtenidas por la presente invención pueden usarse para tratar diversas enfermedades. En este caso, las células de Schwann se pueden proporcionar en forma de material de injerto.

La expresión "material de injerto" se refiere a un material que comprende células de Schwann y se va a introducir en un organismo biológico para reparar y reconstruir fibras nerviosas. Las células de Schwann obtenidas por la presente invención pueden usarse para preparar un material de injerto. Las propias células de Schwann también se pueden utilizar como material de injerto. Por consiguiente, las células de Schwann se pueden trasplantar a un paciente como una preparación celular, o trasplantar junto con un sustrato (andamio) hecho de material artificial, o trasplantar después de que las células de Schwann y un andamio se cultiven juntos. El sustrato (andamio) funciona, por ejemplo, como un puente nervioso. En estos casos, el andamio se puede conformar en varias formas tridimensionales de acuerdo con el propósito del trasplante.

El material de injerto de la presente invención se puede producir por un método que comprende el método de preparación de células de Schwann descrito anteriormente.

Los ejemplos específicos del sustrato (andamio) incluyen tubos de poli(ácido glicólico) (PGA), tubos de colágeno, pegamentos de fibrina, tubos de espuma polimérica, tubos de gelatina, tubos que comprenden una combinación de poli(ácido glicólico) (PGA) y colágeno, y similares. Los productos disponibles comercialmente, tales como Nerve Bridge (producido por Toyobo Co., Ltd.), también se pueden usar como tubos que comprenden una combinación de poli(ácido glicólico) (PGA) y colágeno.

El material de injerto se puede utilizar de acuerdo con un injerto de nervio autólogo o un método terapéutico que comprende separar las células de Schwann de los nervios autólogos y cultivar e injertar las células de Schwann. Dicho método se describe en los siguientes documentos:

1: Hadlock T, Sundback C, Hunter D, Cheney M, Vacanti JP. A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration. Tissue Eng 2000; 6: 119-127.

2: Jesuraj NJ, Santosa KB, Macewan MR, Moore AM, Kasukurthi R, Ray WZ, Flagg ER, Hunter DA, Borschel GH, Johnson PJ, Mackinnon SE, Sakiyama-Elbert SE. Schwann cells seeded in acellular nerve grafts improve functional recovery. Muscle Nerve. 2014 Feb; 49(2): 267-76.

3: Tabesh H, Amoabediny G, Nik NS, Heydari M, Yosefifard M, Siadat SO, Mottaghy K. The role of biodegradable engineered scaffolds seeded with Schwann cells for spinal cord regeneration. Neurochem Int. 2009 Feb; 54(2): 73-83.

4: Novikova LN, Pettersson J, Brohlin M, Wiberg M, Novikov LN. Biodegradable poly-beta-hydroxybutyrate scaffold seeded with Schwann cells to promote spinal cord repair. Biomaterials. 2008 Mar; 29(9): 1198-206.

5: Guest J, Santamaria AJ, Benavides FD. Clinical translation of autologous Schwann cell transplantation for the treatment of spinal cord injury. Curr Opin Organ Transplant. 2013 Dec; 18(6): 682-9.

6: Brook GA, Lawrence JM, Shah B, Raisman G. Extrusion transplantation of Schwann cells into the adult rat thalamus induces directional host axon growth. Exp Neurol. 1994 Mar; 126(1): 31-43.

7: Vaudano E, Campbell G, Hunt SP. Change in the molecular phenotype of Schwann cells upon transplantation into the central nervous system: down-regulation of c-jun. Neuroscience. 1996 Sep; 74(2): 553-65.

8: Keirstead HS, Ben-Hur T, Rogister B, O'Leary MT, Dubois-Dalcq M, Blakemore WF. Polysialylated neural cell adhesion molecule-positive CNS precursors generate both oligodendrocytes and Schwann cells to remyelinate the CNS after transplantation, J Neurosci. 1999 Sep 1; 19(17): 7529-36.

9: Wan H, An YH, Sun MZ, Zhang YZ, Wang ZC. Schwann cells transplantation promoted and the repair of brain stem injury in rats. Biomed Environ Sci. 2003 Sep; 16(3): 212-8. 10: Chen L, Fan X, Jin G, Wan X, Qiu R, Yi G, You Y, Xu Q. Treatment of rat with traumatic brain injury and MR tracing in vivo via combined transplantation of bone marrow stromal cells labeled with superparamagnetic iron oxide and Schwann cells, J Biomed Nanotechnol. 2014 Feb; 10(2): 205-15.

11: Shields SA, Blakemore WF, Franklin RJ. Schwann cell remyelination is restricted to astrocyte-deficient areas after transplantation into demyelinated adult rat brain, J Neurosci Res. 2000 Jun 1; 60(5): 571-8.

A continuación se hace referencia al contenido de los documentos 1 a 11 anteriores.

Las enfermedades que se van a tratar son defectos o daños del sistema nervioso central provocados por infarto cerebral, daño espinal o similares, y defectos o daño de nervios periféricos asociados con daños, lesiones externas, resección de tumores o similares; enfermedades del sistema nervioso central, tales como esclerosis múltiple, neuromielitis óptica (síndrome de Devic), esclerosis concéntrica (enfermedad de Balo), encefalomielitis diseminada aguda (ADEM), esclerosis difusa inflamatoria (enfermedad de Schilder), panencefalitis esclerosante subaguda infecciosa (SSPE) y leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP); enfermedades del sistema nervioso periférico, tales como síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Miller Fisher y polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; enfermedades basadas en defectos, deficiencias o hipofunción de las células de Schwann, tales como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT); y similares.

A menos que se indique lo contrario, el término "tratamiento" como se usa en el presente documento significa cualquier tratamiento que se aplica a un paciente mientras el paciente padece una enfermedad o trastorno específico, y que puede reducir la gravedad de la enfermedad o trastorno o uno o más de los síntomas, o retrasar o ralentizar la progresión de la enfermedad o trastorno. El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, incluye "prevención".

La célula de Schwann obtenida mediante la presente invención puede usarse no solo para el tratamiento de enfermedades, sino también para la mejora funcional y de la belleza. Cualquier tratamiento proporcionado a los seres humanos para la mejora funcional y de la belleza también se denomina "tratamiento" por razones de conveniencia en la presente memoria descriptiva. En este caso, el término "paciente" se puede leer como "persona sana" o "ser humano", y el término "enfermedad" se puede leer como "belleza" o "función".

La presente invención también se puede utilizar en el tratamiento de enfermedades no solo para seres humanos, sino también para animales que se mantienen como mascotas tales como perros y gatos, ganado como vacas, caballos, cerdos, ovejas y pollos, y mamíferos similares. En este caso, el término "paciente" debe leerse como "ganado enfermo" o "mamífero".

Composición (aspecto de referencia)

Como se describió anteriormente, las células de Schwann se pueden preparar introduciendo en células somáticas al menos una combinación de genes SOX10 y KROX20, o productos de expresión de los mismos. Por consiguiente, en el presente documento se describe una composición para preparar células de Schwann, comprendiendo la composición al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes SOX10 y KROX20, o un producto de expresión de los mismos. La composición para preparar las células de Schwann contiene un factor utilizado para inducir células de Schwann a partir de células somáticas. El gen o producto de expresión del mismo está contenido preferiblemente en una forma que se puede introducir en células somáticas. Los ejemplos de la forma introducible en

células somáticas incluyen vectores en los que se incorpora el gen. Los genes anteriores pueden incorporarse en vectores separados, o pueden incorporarse estos dos o más genes en un vector.

Los tipos, etc. de vectores utilizables son como se ha descrito anteriormente.

Reprogramación directa in vivo (Aspecto de referencia)

Como se describió anteriormente, las células de Schwann se pueden preparar introduciendo en células somáticas al menos una combinación de genes SOX10 y KROX20, o productos de expresión de los mismos.

Cuando se daña un nervio, los fibroblastos se enriquecen en el sitio dañado. Los fibroblastos enriquecidos forman entonces una cicatriz fibrosa.

En consecuencia, cuando el método de preparación de acuerdo con un aspecto de referencia se aplica in vivo, se introduce al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes SOX10 y KROX20, o un producto de expresión de los mismos, en fibroblastos para inducir células de Schwann en el sitio dañado por reprogramación directa, contribuyendo así al tratamiento del daño nervioso y la regeneración nerviosa. En la introducción de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes SOX10 y KROX20, o un producto de expresión de los mismos, se puede usar adecuadamente la composición del aspecto de referencia descrito anteriormente.

Debe entenderse que el método de preparación de la presente invención incluye la reprogramación directa in vitro.

La reprogramación directa in vivo de acuerdo con un aspecto de referencia se puede realizar, por ejemplo, de acuerdo con la reprogramación directa en cardiomiocitos in vivo como se describe en los siguientes documentos, excepto que se introduce al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes SOX10 y KROX20, o un producto de expresión de los mismos, en fibroblastos en el sitio dañado del nervio.

1: Ieda M. Heart regeneration using reprogramming technology. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2013; 89(3): 118-28. Review.

2: Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, Srivastava D. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. Cell. 2010 Aug 6; 142(3): 375-86.

3: Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, Conway SJ, Fu JD, Srivastava D. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. Nature. 2012 May 31; 485(7400): 593-8.

Se hace referencia al contenido de los documentos 1 a 3 anteriores a continuación.

Ejemplos

La presente invención se describe a continuación con referencia a ejemplos. Sin embargo, el alcance de la invención no se limita a estos ejemplos.

En los ejemplos, "HDF" se refiere a fibroblastos dérmicos humanos normales. "cSC" se refiere a células de Schwann de control obtenidas de un sujeto vivo y cultivadas (células de Schwann cultivadas). "dSC" se refiere a células de Schwann obtenidas por el método de la presente invención (células de Schwann reprogramadas directamente).

"Cont" se refiere a un control.

Ejemplo 1 Descripción general del método (Fig.1)

La figura 1 describe un método para preparar células de Schwann según la presente invención ("células de Schwann reprogramadas directamente: dSC" en la figura 1).

Las secuencias codificantes de ADNc de varios genes, tales como SOX10, se incorporaron en plásmidos de vector retrovírico puro pMXs usando un sistema GeneArt. Se suspendieron células de empaquetamiento Plat-GP en NEAA al 1% DMEM FBS al 10% (medio ordinario) que contenía penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml, y se sembraron en placas de cultivo de 10 cm recubiertas de gelatina en una concentración de 5×10^6 células/placa (día -3). Después de cultivar durante 24 horas, se introdujeron los vectores pMX que contienen varios genes en varias combinaciones en la siguiente proporción junto con los vectores pCMV VSV, utilizando X-tremeGENE 9. Más específicamente, una mezcla de 5 µg de transgenes, 2.5 µg de pCMV-VSV, 500 µl de Opti-MEM y 22.5 µl de X-tremeGENE 9 se añadió a placas de 10 cm que contenían 10 ml de medio (día -2). Después de 24 horas, el medio se reemplazó por un medio ordinario sin antibióticos (día -1). El mismo día (día -1), la línea de fibroblastos dérmicos humanos normales (aHDF) ("fibroblastos" en la Fig. 1) se sembró en placas de cultivo o placas de 12 pocillos de 1.5×10^4 a 2×10^4 células/ml. Después de 24 horas (día 0), el líquido sobrenadante del cultivo de Plat-GP se pasó a través de un filtro de jeringa con un diámetro de poros de 0.45 µm y luego se mezcló con polibreno (concentración final de 4 µg/ml) (suspensión de virus). Después de separar por succión el líquido sobrenadante del cultivo de aHDF, se añadió rápidamente 1 ml de la suspensión de virus, seguido de cultivo durante 24 horas (infección; "Transfección" en la Fig. 1). Se prepararon células no infectadas por virus como grupo de control. Un día después (día 1), el líquido

sobrenadante del cultivo se separó por succión y el medio de inducción de células de Schwann (medio obtenido por adición de forskolina 5 mM, factor de crecimiento de fibroblastos básico humano recombinante (bFGF) 10 ng/ml, factor de crecimiento derivado de plaquetas humano recombinante (PDGF) 5 ng/ml y heregulina 1-b1 recombinante (GGF) 200 ng/ml de (todas estas concentraciones son concentraciones finales) al medio ordinario). Luego, el medio se reemplazó cada dos días con un medio de cultivo nuevo que tenía la misma composición. Del día 12 al día 22, las células obtenidas se tiñeron para S100β, que es un marcador de células de Schwann representativo. Se utilizaron como control células que se cultivaron de la misma manera pero que no se infectaron con vectores retrovirales.

Ejemplo 2 Conversión de fibroblastos dérmicos humanos normales en células de Schwann, imágenes de inmunotinción fluorescente de S100β (Fig.2)

Se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos normales (aHDF) en placas de 12 pocillos y se llevó a cabo la misma operación que en el Ejemplo 1. El día 14, el medio de cultivo se retiró por succión de cada pocillo y las células se lavaron con PBS una vez y luego se fijaron con PFA al 4%. Se añadió una solución de bloqueo y las placas se dejaron reposar a 37ºC durante 15 minutos. Las células se tiñeron con un anticuerpo anti-S100β (anticuerpo primario) y un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con AlexaFluor566 (anticuerpo secundario). En cada pocillo de las placas, se introdujo una combinación de genes diferente. La tabla 1 muestra qué combinación de genes se introdujo en qué número de pocillo (en la tabla, "1" significa que las células se infectaron con un vector retroviral que contiene el gen, mientras que en blanco significa que las células no se infectaron con un vector retroviral que contenga el gen). Los genes candidatos introducidos fueron los siguientes siete factores: SOX10, Krox20 y Oct6 como genes relacionados con las células de Schwann y SOX2, C-myc, KLF4 y Oct3/4 como genes relacionados con la reprogramación, en donde los ejemplos de la invención se caracterizan por la introducción de al menos SOX10 y Krox20 en combinación. Por ejemplo, el número 43 en la Tabla 1 se refiere a células infectadas con vectores retrovirales que contienen genes SOX10, Krox20, Oct6 y KLF4.

La Fig. 2 muestra, como imágenes típicas de tinción de S100β, células en las que se introdujeron los genes de dos factores Sox10 y Krox20. La Fig. 2 muestra la tinción conjunta con tinción del núcleo usando DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol).

Tabla 1

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Evaluación	+	+	-	+++	+	++	+	+	+	+	+++	+++	++	++	++	++	++	++
SOX10	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
KROX20		1		1		1					1	1	1	1	1	1	1	1
OCT6			1		1	1												
SOX2							1				1				1			1
c-myc								1		1		1			1	1		
KLF4													1			1	1	1
OCT3/4									1	1				1			1	

Nº	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Evaluación	+	++	++	++	+++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOX10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
KROX20	1	1	1	1	1	1	1											
OCT6								1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SOX2	1		1	1	1		1	1				1			1	1		1
c-myc		1	1	1		1	1		1			1	1				1	1
KLF4			1		1	1	1			1			1	1	1			1
OCT3/4	1	1		1	1	1	1				1			1		1	1	

Nº	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
Evaluación	+	+	+	+	++	++	+	++	+	+	+	+	++	++	+	++	+	+
SOX10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
KROX20					1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OCT6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SOX2	1	1		1	1				1			1	1		1	1	1	
c-myc	1		1	1		1			1	1				1	1	1		1
KLF4		1	1	1			1			1	1	1			1		1	1
OCT3/4	1	1	1	1				1			1		1	1		1	1	1

Ejemplo 3 Conversión de fibroblastos dérmicos humanos normales en células de Schwann, semicuantificación de tinción de S100β (Fig.3)

Para confirmar la tinción de otras combinaciones en el mismo experimento que en la Fig.2, las placas se observaron bajo un microscopio de fluorescencia (producido por Olympus Corporation) y se evaluó la tinción de S100β en una escala de 4 puntos (+++, ++, +, - en orden descendente desde el mayor número de células positivas para S100β).

La figura 3 muestra imágenes típicas de cada evaluación. La Tabla 1 también muestra los resultados de la evaluación. Por ejemplo, las células Nº 4, que se infectaron con vectores retrovirales que contenían los genes tanto SOX10 como KROX20, se evaluaron como +++ y se mostró que contenían el mayor número de células positivas para S100β. Aunque las células de Schwann pueden inducirse con baja eficiencia introduciendo SOX10 solo o KROX20 solo, la introducción conjunta de SOX10 y KROX20 puede introducir células de Schwann con mayor eficiencia. Los resultados muestran que Oct6 es casi completamente ineficaz en la inducción de células de Schwann.

Ejemplo 4 Conversión de fibroblastos dérmicos humanos normales en células de Schwann, evaluación de la morfología celular (Fig. 4)

Utilizando las células en las que se introdujeron los genes de dos factores Sox10 y Krox20 en el Ejemplo 1, se evaluaron los cambios en la morfología celular tras la conversión de fibroblastos dérmicos humanos normales en células de Schwann en términos de la relación de la longitud de la célula al ancho de la célula para determinar el aumento en la longitud de la célula bipolar, que es una característica de las células de Schwann.

La figura 4 muestra los resultados de la evaluación. Los resultados muestran que, como resultado de la conversión, aumenta la relación longitud celular/ancho celular, es decir, la morfología celular cambia a una morfología característica de las células de Schwann.

Ejemplo 5 Conversión de fibroblastos dérmicos humanos normales en células de Schwann, imágenes de inmunotinción fluorescente de células para otros marcadores relacionados con las células de Schwann (Fig. 5)

Se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos normales aHDF en placas de 12 pocillos y se llevó a cabo la misma operación que en el Ejemplo 1. Se muestran los resultados del grupo en el que se introdujeron los dos genes SOX10 y Krox20. Doce días después de la transferencia génica, se realizó la inmunotinción.

La figura 5 muestra los resultados. Los hospedantes del anticuerpo anti-p75NTR (anticuerpo primario), el anticuerpo anti-GFAP (anticuerpo primario) y el anticuerpo anti-NG2 (anticuerpo primario) eran conejos. Los hospedantes del anticuerpo anti-Nestin (anticuerpo primario) eran ratones. Como anticuerpo secundario, se utilizó anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con AlexaFluor488,566 o anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con AlexaFluor488. Se confirmó la expresión de cada antígeno, aunque sus tasas positivas fueron inferiores a las de S100β.

Ejemplo 6

A. Conversión de fibroblastos dérmicos humanos normales en células de Schwann, medición del nivel de expresión de ARNm de los genes de S100β y p75NTR (Fig. 6)

Se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos normales (aHDF) en placas de 12 pocillos y se llevó a cabo la misma operación que en el Ejemplo 1. Los genes de dos factores Sox10 y Krox20 se introdujeron en las células de los pocillos nº 1 a 6, mientras que no se introdujeron genes en las células de los pocillos nº 7 a 12 como controles. Veinte días después de la transferencia génica, se recogió el ARN total de cada pocillo usando ISOGEN II, y el ADNc se sintetizó usando una mezcla maestra ReverTra Ace qPCR RT. Para determinar los niveles de ARNm de los genes de UCP1 y β actina, se mezclaron la mezcla maestra de PCR en tiempo real, una sonda TaqMan, cebadores específicos y ADNc, y se realizó una RT-PCR en tiempo real utilizando un sistema de PCR en tiempo real AB7300. Se calcularon los niveles de ARNm de los genes de interés en relación con el nivel de ARNm de β-actina de cada pocillo.

La figura 6 muestra los resultados. El eje vertical del gráfico indica los valores relativos de cada pocillo que se calcularon suponiendo que el valor en el pocillo Nº 1 era 1. Las células (Nº 1 a 6) en las que se introdujeron los dos genes SOX10 y KROX20 mostraron una fuerte expresión de los genes S100β y p75NTR, que son marcadores específicos de células de Schwann, en comparación con los controles (Nº 7 a 12).

B. Electroforesis usando gel de agarosa del producto de la RT-PCR

El producto de la RT-PCR en tiempo real obtenido en A se sometió a electroforesis utilizando un gel de agarosa. Como resultado, se confirmó una fuerte expresión de ARNm de los genes de S100β y p75NTR en el grupo celular en el que se introdujeron los genes de dos factores SOX10 y Krox20.

C. Análisis de la eficacia de reprogramación directa de fibroblastos humanos en células de Schwann sin introducir factores, introduciendo SOX10 solo, introduciendo Krox20 solo o introduciendo una combinación de SOX10 y Krox20

Se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos normales aHDF en placas de 12 pocillos y se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1. La expresión de ARNm de S100β y p75NTR en las siguientes células se comparó

de la misma manera que en A: células en las que no se introdujeron genes (control); células en las que solo se introdujo el gen de SOX10; células en las que solo se introdujo el gen de Krox20; y células en las que se introdujeron los genes de SOX10 y Krox20. Los valores de ARNm relativos se muestran como niveles de ARNm relativos. Se calculó el nivel de ARNm del gen de interés en relación con el nivel de ARNm de β-actina en cada grupo. Con el nivel de ARNm en un grupo celular en el que no se introdujeron genes definido como "1", el promedio de los valores relativos calculados en cada grupo se mostró como un nivel de ARNm relativo. Como resultado, en el grupo en el que se introdujeron los dos factores SOX10 y Krox20, los niveles de expresión del ARNm de S100β y p75NTR aumentaron enormemente. Los niveles de expresión del ARNm de S100β y p75NTR aumentaron incluso en las células en las que solo se introdujo Sox10, aunque el aumento fue menor que el aumento en las células en las que se introdujeron tanto Sox10 como Krox20. El nivel de expresión del ARNm de S100β aumentó incluso en las células en las que solo se introdujo Krox20, aunque el aumento fue menor que el aumento en las células en las que se introdujeron tanto Sox10 como Krox20. El nivel relativo de ARNm de S100β fue 4.4 en las células en las que no se introdujeron genes, 1712.3 en las células en las que solo se introdujo Sox10, 25.1 en las células en las que solo se introdujo Krox20 y 127615.0 en las células en las que se introdujeron Sox10 y Krox20. El nivel relativo de ARNm de p75NTR era 3.1 en las células en las que no se introdujeron genes, 74.3 en las células en las que solo se introdujo Sox10, 0.4 en las células en las que solo se introdujo Krox20 y 35397.6 en las células en las que se introdujeron Sox10 y Krox20. Por tanto, la reprogramación directa de fibroblastos humanos en células de Schwann puede producirse con baja eficacia mediante la introducción de SOX10 o Krox20 solos.

Los resultados anteriores confirmaron que la reprogramación directa de fibroblastos humanos en células de Schwann se produce con alta eficacia cuando se utilizan los dos factores SOX10 y Krox20. Además, los resultados muestran que incluso cuando se usa un factor, sea SOX10 o Krox20, es posible la reprogramación directa de fibroblastos humanos en células de Schwann, aunque la eficiencia es baja.

Ejemplo 7 Análisis de los efectos de prolongaciones de neuritas de dSC en las células nerviosas (Fig. 7)

Se cultivó NG108-15 durante 12 horas y luego se cocultivó con HDF, cSC o dSC (dSC inducidas mediante la introducción de genes de dos factores Sox10 y Krox20) durante 36 horas. Como control, se cultivó NG108-15 en DMEM que contenía FBS al 1% solo. Las células resultantes se compararon y analizaron en términos de los parámetros: I. porcentaje de células portadoras de neuritas; II. número de neuritas primarias que se extienden directamente desde los cuerpos celulares; y III. longitud de la neurita más larga, por los métodos descritos en el siguiente documento: Tomita K, Madura T, Sakai Y, et al: "Glialdifferentiation of human adipose-derived stem cells: implications for cell-based transplantation therapy". *Neuroscience*. 2013; 236: 55-65. NG108-15 solo se tiñó con fluorescencia usando anticuerpo Anti-Tuj-1 (como anticuerpo primario) y anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con AlexaFluor566 como anticuerpo secundario.

La figura 7 muestra los resultados. En comparación con el grupo de control, los cSC y dSC presentaban efectos de promoción de prolongaciones de neuritas elevados en todos los parámetros (I a III). Los resultados de los dSC eran comparables a los de los cSC. Los resultados anteriores confirmaron que el líquido sobrenadante del cultivo de dSC promueve las prolongaciones de neuritas de las células nerviosas.

Ejemplo 8 Conversión de fibroblastos dérmicos humanos normales en células de Schwann por introducción de plásmido sin virus (electroporación) (Fig. 8)

Se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos normales aHDF en placas de 12 pocillos y se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1. La Fig. 8 muestra los resultados de un grupo en el que se introdujeron los dos genes SOX10 y Krox20. Catorce días después de la transferencia del gen, se realizó la inmunotinción.

La figura 8 muestra los resultados. Los hospedantes del anticuerpo anti-S100β (anticuerpo primario), el anticuerpo anti-p75NTR (anticuerpo primario) y el anticuerpo anti-GAP43 (anticuerpo primario) eran conejos. Como anticuerpo secundario, se utilizó anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con AlexaFluor566. Se confirmó la expresión de S100β, p75NTR y GAP43, aunque sus tasas positivas eran bajas, en comparación con el caso de usar vectores retrovirales. Se confirmó la conversión de fibroblastos aHDF en células de Schwann.

Ejemplo 9 Conversión de células madre derivadas de tejido adiposo humano normal en células de Schwann, imagen de tinción inmunofluorescente de células para otros marcadores relacionados con células de Schwann (Fig. 9)

Se analizó la conversión de células estromales derivadas de tejido adiposo en dSC.

Método

Se cultivaron células estromales normales derivadas de tejido adiposo (ADSC) en placas de 12 pocillos y se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1. Se muestran los resultados del grupo en el que se introdujeron los dos genes SOX10 y Krox20. Catorce días después de la transferencia de genes, se realizó la inmunotinción.

Resultado

La figura 9 muestra los resultados. Los hospedantes del anticuerpo anti-S100β (anticuerpo primario), el anticuerpo

anti-p75NTR (anticuerpo primario), el anticuerpo anti-GAP43 (anticuerpo primario) y el anticuerpo anti-proteína cero (anticuerpo primario) eran conejos. Como anticuerpo secundario, se utilizó anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con AlexaFluor566. En la tinción para S100β, aproximadamente 40% de las células eran positivas. Se confirmó la expresión de otros marcadores de células de Schwann aunque sus tasas positivas eran inferiores a las de S100β. Las células también eran positivas para el marcador de mielina proteína cero.

Específicamente, se indujeron células estromales derivadas de tejido adiposo humano normal en células de Schwann de la misma manera que la inducción a partir de fibroblastos. La morfología celular cambió de la morfología de las células estromales derivadas de tejido adiposo humano normal a una morfología celular bipolar o multipolar que tiene un núcleo relativamente pequeño, que es típico de las células de Schwann. Además, las células que cambiaron a una morfología celular típica de las células de Schwann eran positivas para un marcador de células de Schwann (S100β) (aproximadamente de 40 a 50%) (Fig. 9A).

Las células después de la inducción eran positivas para marcadores de células de Schwann (S100β, GAP43), un marcador de células de Schwann indiferenciado (p75NTR) y un marcador de mielina (P0) (Fig. 9B).

Ejemplo 10 Conversión de células endoteliales vasculares umbilicales en células de Schwann, imágenes de tinción inmunofluorescente de células para otros marcadores relacionados con células de Schwann (Fig. 10)

Se examinó la conversión de células endoteliales vasculares en dSC.

Método

Se cultivaron células endoteliales vasculares umbilicales humanas (Huvec) en placas de 12 pocillos y se llevó a cabo la misma operación que en el Ejemplo 1. Se muestran los resultados de un grupo en el que se introdujeron los dos genes SOX10 y Krox20. Catorce días después de la transferencia de genes, se realizó la inmunotinción.

Resultados

La figura 10 muestra los resultados. Los hospedantes del anticuerpo anti-S100β (anticuerpo primario), el anticuerpo anti-p75NTR (anticuerpo primario), el anticuerpo anti-GAP43 (anticuerpo primario) y el anticuerpo anti-proteína cero (anticuerpo primario) eran conejos. Como anticuerpo secundario, se usó anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con 566. En la tinción para S100β, aproximadamente 30% de las células eran positivas. También se confirmó la expresión de otros marcadores de células de Schwann, aunque sus tasas positivas eran inferiores a las de S100β. Las células también eran positivas para el marcador de mielina proteína cero.

Específicamente, se indujeron células endoteliales vasculares umbilicales humanas en células de Schwann de la misma manera que la inducción a partir de fibroblastos. La morfología celular cambió de la morfología de las células endoteliales vasculares umbilicales a una morfología celular bipolar o multipolar que tiene un núcleo relativamente pequeño, que es típico de las células de Schwann. Además, las células que cambiaron a una morfología celular típica de las células de Schwann eran positivas para un marcador de células de Schwann (S100β) (aproximadamente de 50 a 60%) (Fig. 10A).

Las células después de la inducción eran positivas para marcadores de células de Schwann (S100β, GAP43) y un marcador de células de Schwann indiferenciado (p75NTR) (Fig. 10B).

Ejemplo 11 Mielinización de dSC in vitro por cocultivo de dSC marcadas con GFP (dSC inducidas mediante la introducción de genes de dos factores Sox10 y Krox20) con DRGn, imágenes de tinción inmunofluorescente de células para un marcador relacionado con células de Schwann (Fig. 11)

Se evaluó la capacidad de mielinización de las dSC in vitro por cocultivo de dSC marcadas con GFP con DRGn.

Método

Las células dSC se marcaron con GFP usando un vector retroviral.

Específicamente, el marcado de las células se llevó a cabo de acuerdo con los métodos descritos en los siguientes documentos: Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K, Hanazono Y. "Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+stem cells in a nonhuman primate model". *Stem Cells* 2005 Mar; 23 (3): 355-64; y Hirschmann F y Verhoeyen E, Wirth D, Bauwens S, Hauser H, Rudert M. "Vital marking of articular chondrocytes by retroviral infection using green fluorescence protein". *Osteoarthritis Cartilage* 2002 Feb; 10 (2): 109-18.

Las células neuronales del ganglio de la raíz dorsal (DRGn) obtenidas de ratones del día 5 postnatal se cultivaron en placas de 12 pocillos y se cocultivaron con dSC marcadas con GFP en un medio inductor de diferenciación de mielina que contenía factores de crecimiento nervioso, ácido ascórbico y cAMP. Catorce días después del inicio del cocultivo de los genes, se realizó la inmunotinción.

El medio utilizado tenía la siguiente composición:

DMEM que contiene N_2 (Invitrogen), ácido ascórbico 50 ng/ml (Wako, Osaka, Japón) y factor de crecimiento del nervio b de rata recombinante 50 ng/ml (NGF) (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EE. UU.) y AMPc 0.5 µM (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EE.UU.).

El medio se preparó de acuerdo con el siguiente documento: Sango K, Kawakami E, Yanagisawa H, Takaku S, Tsukamoto M, Utsunomiya K, Watabe K."Myelination in coculture of established neuronal and Schwann cell lines". *Histochem Cell Biol*. 2012 Jun; 137 (6): 829-39.

Los hospedantes del anticuerpo anti-neurofilamento (anticuerpo primario) y del anticuerpo anti-MBP (proteína básica de mielina) (anticuerpo primario) eran ratones. Los hospedantes del anticuerpo anti-Tuj-1 (anticuerpo primario) y del anticuerpo anti-proteína cero (anticuerpo primario) eran conejos. Como anticuerpos secundarios, se utilizaron anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con AlexaFluor566, anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con AlexaFluor566, anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con Cy5 y anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con Cy5. El anticuerpo anti-MBP y el anticuerpo anti-proteína cero, que son anticuerpos marcadores de mielina, se marcaron en rojo. El anticuerpo anti-neurofilamento y el anticuerpo anti-Tuj-1, que son marcadores de axones nerviosos, se marcaron en gris.

Resultado

La figura 11 muestra los resultados. Se observan células de Schwann mielinizadas a lo largo del axón nervioso del DRG. Las células de Schwann mielinizadas se superponen parcialmente con las células dSC marcadas con GFP.

Ejemplo 12 Mielinización in vitro mediante trasplante de dSC marcadas con GFP (dSC inducidas por introducción de genes de dos factores Sox10 y Krox20) en un modelo de aplastamiento del nervio ciático, imágenes de tinción inmunofluorescente de células para un marcador relacionado con mielina (Fig. 12)

Se examinó la capacidad de mielinización de dSC in vivo.

Método

Las células dSC se marcaron con GFP usando un vector viral.

El nervio ciático de cada ratón inmunodeficiente se expuso y se sujetó su parte central con unas pinzas de Pean durante aproximadamente 1 minuto para aplastar el nervio en el intervalo de aproximadamente 5 mm. Se inyectaron aproximadamente 50 000 dSC marcadas con GFP en el lado periférico. Un mes después del inicio del trasplante, el nervio reparado en el sitio aplastado se recogió y se inmunotiñó. La figura 12 muestra el esquema del método.

El hospedante del anticuerpo anti-neurofilamento (anticuerpo primario) y del anticuerpo anti-MBP (anticuerpo primario) era un ratón. El hospedante del anticuerpo anti-Tuj-1 (anticuerpo primario) y del anticuerpo anti-proteína cero (anticuerpo primario) era un conejo. Como anticuerpos secundarios, se usaron anticuerpo anti-IgG de conejo anti-ratón conjugado con AlexaFluor566 y anticuerpo anti-IgG de conejo anti-ratón conjugado con Cy5. El anticuerpo anti-MBP y el anticuerpo anti-proteína cero, que son anticuerpos marcadores de mielina, se marcaron en rojo. El anticuerpo anti-neurofilamento y el anticuerpo anti-Tuj-1, que son marcadores de axones nerviosos, se marcaron en gris.

Resultados

La figura 12 muestra los resultados. Las células GFP+ se observan a lo largo de los nervios en regeneración y estos se superponen con las células + para marcadores de mielina (Figs. 12B y 12C).

Las células GFP+ que migraban a los nervios en regeneración expresaban el marcador de mielina (Figs. 12B y 12C, flechas).

Ejemplo 13 Trasplante de dSC en un modelo de defecto del nervio ciático (5 mm) de ratón inmunodeficiente (Fig. 13)

Método

Las células de Schwann cultivadas (SC: grupo de control comparativo) se separaron del nervio ciático y se cultivaron. Estas células se sembraron de antemano en un tubo de gelatina y se formó un espacio de aproximadamente 5 mm en el tronco del nervio ciático de cada ratón. El tubo híbrido obtenido se trasplantó al sitio del defecto del nervio. Los efectos de promoción de la regeneración nerviosa se evaluaron en comparación con ratones operados de forma simulada y con ratones en los que se trasplantó un tubo que contenía solo PBS (Fig. 13A).

La figura 13A muestra imágenes macroscópicas de nervios puenteados e imágenes de tinción de mielina de la sección transversal de tejidos nerviosos en regeneración usando azul luxol rápido. Las funciones del nervio ciático seis semanas (6 sem.) y doce semanas (12 sem.) después del trasplante se muestran como resultados. La atrofia del músculo inervado se evaluó en función del peso del músculo húmedo.

El índice funcional ciático (SFI) se determinó de acuerdo con el método descrito en el siguiente documento: Inserra MM, Bloch DA, Terris DJ."Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse", *Microsurgery*, 1998; 18: 119-124.

La atrofia y fibrosis del músculo inervado se evaluaron de acuerdo con los métodos descritos en el siguiente documento: Clavijo-Alvarez JA, Nguyen VT, Santiago LY, Doctor JS, Lee WP, Marra KG. "Comparison of biodegradable conduits within aged rat sciatic nerve defects". *Plast Reconstr Surg*. 2007; 119: 1839-1851.

Resultados

Las imágenes macroscópicas de los nervios puenteados muestran que los grupos tanto de cSC como de dSC eran superiores a los controles y que no se observaba una diferencia clara entre los grupos de cSC y dSC (Fig. 13B).

En las imágenes de tinción de mielina de la sección transversal de tejidos nerviosos en regeneración usando azul luxol rápido, el grupo de dSC era comparable al grupo de cSC (Fig. 13C).

En el índice funcional ciático (SFI), la recuperación de la función del nervio ciático en el grupo de dSC a las 12 semanas era comparable a la del grupo de cSC (Fig. 13D).

Además, en términos de atrofia y fibrosis del músculo inervado también, los grupos de dSC y de cSC eran ambos significativamente diferentes del grupo de control, pero no se observaron diferencias significativas entre las cSC y dSC (Fig. 13E).

Ejemplo 14 Conversión en células de Schwann (Tabla 2)

Se llevó a cabo el mismo experimento que en el Ejemplo 2 usando las combinaciones de genes que se muestran en la Tabla 2.

La Fig. 2 muestra qué combinación de genes se introdujo en qué número de pocillo. (En la columna de cada gen en la tabla, "1" significa que las células se infectaron con un vector retroviral que contiene el gen, mientras que en blanco significa que las células no se infectaron con un vector retroviral que contenga el gen).

Las placas se observaron bajo un microscopio de fluorescencia (producido por Olympus Corporation) de la misma manera que en el Ejemplo 3, y la tinción de S100β se evaluó en una escala de 4 puntos (+++, ++, +, - en orden descendente desde el mayor número de células positivas para S100β).

La Tabla 2 incluye los resultados de la evaluación, en donde los ejemplos de la invención se caracterizan por la introducción de al menos SOX10 y Krox20 en combinación.

Los resultados muestran que, aunque Oct6 es un factor conocido por realizar funciones importantes en la diferenciación de las células de Schwann, Oct6 es casi completamente ineficaz para inducir la reprogramación directa de células somáticas en células de Schwann. El resultado muestra además que Oct6 no mejora la eficiencia de la reprogramación directa de células somáticas a células de Schwann lograda mediante el uso de Sox10 solo, Krox20 solo o una combinación de Sox10 y Krox20.

Tabla 2-1

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Evaluación	+	+	-	+++	+	-	++	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Sox10	1			1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
krox20		1		1		1	1												
Oct6			1		1	1	1												
Sox2								1				1			1	1		1	1
c-myc									1			1	1				1	1	1
KLF4										1			1	1	1			1	
Oct4											1			1		1	1		1

Nº	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
Evaluación	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	++	++
Sox10																1	1	1	1
krox20																1	1	1	1
Oct6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
Sox2	1				1			1	1		1	1	1		1	1			
c-myc		1			1	1				1	1	1		1	1		1		
KLF4			1			1	1	1			1		1	1	1			1	
Oct4				1			1		1	1		1	1	1	1				1

Nº	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Evaluación	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sox10	1	1	1															
krox20				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Oct6																		
Sox2	1		1	1				1			1	1		1	1	1		1
c-myc		1	1		1			1	1				1	1	1		1	1
KLF4	1	1	1			1			1	1	1			1		1	1	1
Oct4	1	1	1				1			1		1	1		1	1	1	1

Tabla 2-2

Nº	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
Evaluación	++	++	++	++	+	++	++	++	+++	++	++	+	+	+	+	+	+	+
Sox10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
krox20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1							
Oct6												1	1	1	1	1	1	1
Sox2	1			1	1		1	1	1		1	1				1		
c-myc	1	1				1	1	1		1	1		1			1	1	
KLF4		1	1	1			1		1	1	1			1			1	1
Oct4			1		1	1		1	1	1	1				1			1

Nº	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
Evaluación	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sox10	1	1	1	1	1	1	1	1												
krox20									1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Oct6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sox2	1	1		1	1	1		1	1				1			1	1		1	1
c-myc			1	1	1		1	1		1			1	1				1	1	1
KLF4	1			1		1	1	1			1			1	1	1			1	
Oct4		1	1		1	1	1	1				1			1		1	1		1

Nº	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
Evaluación	-	-	-	++	++	+	++	+	+	+	+	++	++	+	++	+	+	-
Sox10				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
krox20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Oct6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sox2	1		1	1				1			1	1		1	1	1		1
c-myc		1	1		1			1	1				1	1	1		1	1
KLF4	1	1	1			1			1	1	1			1		1	1	1
Oct4	1	1	1				1			1		1	1		1	1	1	1

Ejemplo 15 Producción de factor neurotrófico (Fig. 14)

Se sembraron HDF, cSC y dSC en placas de cultivo celular en una concentración de 4 x 10^4 células/cm^2. Después de confirmar una confluencia de 80%, las células se cultivaron en medio para recolectar los líquidos sobrenadantes celulares durante 48 horas. Después de pasar el líquido sobrenadante de cultivo de cada grupo a través de un filtro de 40 µm, se recogió el filtrado. Las cantidades de las siguientes proteínas en los líquidos sobrenadantes de cultivo de las células cultivadas se midieron usando kits de ELISA para BDNF, GDNF y NGF humanos (Promega, Madison, WI): factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GDNF) y factor de crecimiento nervioso (NGF).

Los resultados muestran que las cSC y dSC producían fuertemente BDNF, GDNF y NGF, en comparación con el control (HDF). Además, las cSC y dSC son similares en que la producción de BDNF es la más alta.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una célula de Schwann in vitro que comprende introducir en una célula somática de un mamífero una combinación del gen SOX10 o un producto de expresión del mismo y el gen KROX20 o un producto de expresión del mismo,

en donde la célula de Schwann se induce directamente a partir de la célula somática sin pasar a través de células madre pluripotentes, y en donde la célula somática es un fibroblasto, una célula endotelial vascular, adipocito, queratinocito, célula epitelial de la mucosa oral, célula gingival o leucocito.

2. Un material de injerto para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de defectos o daños del sistema nervioso central causados por infarto cerebral, daño espinal o similares, y defectos o daños de nervios periféricos asociados con daño, lesión externa, resección de tumores o similares; enfermedades del sistema nervioso central, tales como esclerosis múltiple, neuromielitis óptica (síndrome de Devic), esclerosis concéntrica (enfermedad de Balo), encefalomielitis diseminada aguda (ADEM), esclerosis difusa inflamatoria (enfermedad de Schilder), panencefalitis esclerosante subaguda infecciosa (SSPE) y leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML); enfermedades del sistema nervioso periférico, tales como síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Miller Fisher y polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; enfermedades basadas en defecto, deficiencia o hipofunción de las células de Schwann, tales como enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), comprendiendo el material de injerto una célula obtenida por el método según la reivindicación 1.

3. Una combinación del gen SOX10 o un producto de expresión del mismo y el gen KROX20 o un producto de expresión del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de defectos o daño del sistema nervioso central causados por infarto cerebral, daño espinal o similares, y defectos o daño de nervios periféricos asociados con daño, lesión externa, resección de tumores o similares; enfermedades del sistema nervioso central, tales como esclerosis múltiple, neuromielitis óptica (síndrome de Devic), esclerosis concéntrica (enfermedad de Balo), encefalomielitis diseminada aguda (ADEM), esclerosis difusa inflamatoria (enfermedad de Schilder), panencefalitis esclerosante subaguda infecciosa (SSPE) y leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP); enfermedades del sistema nervioso periférico, tales como síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Miller Fisher y polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; enfermedades basadas en defecto, deficiencia o hipofunción de las células de Schwann, tales como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), en donde el tratamiento comprende convertir una célula somática de un mamífero en una célula de Schwann.

4. Un vector o un producto de expresión del mismo para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de defectos o daño del sistema nervioso central causados por infarto cerebral, daño espinal o similares, y defectos o daño de nervios periféricos asociados con daño, lesión externa, resección de tumores, o similar; enfermedades del sistema nervioso central, tales como esclerosis múltiple, neuromielitis óptica (síndrome de Devic), esclerosis concéntrica (enfermedad de Balo), encefalomielitis diseminada aguda (ADEM), esclerosis difusa inflamatoria (enfermedad de Schilder), panencefalitis esclerosante subaguda infecciosa (SSPE) y leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML); enfermedades del sistema nervioso periférico, tales como síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Miller Fisher y polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; enfermedades basadas en un defecto, deficiencia o hipofunción de las células de Schwann, tales como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), en las que el tratamiento comprende convertir una célula somática de un mamífero en una célula de Schwann, en donde el vector comprende una combinación del gen SOX10 y el gen KROX20.

Fig. 1

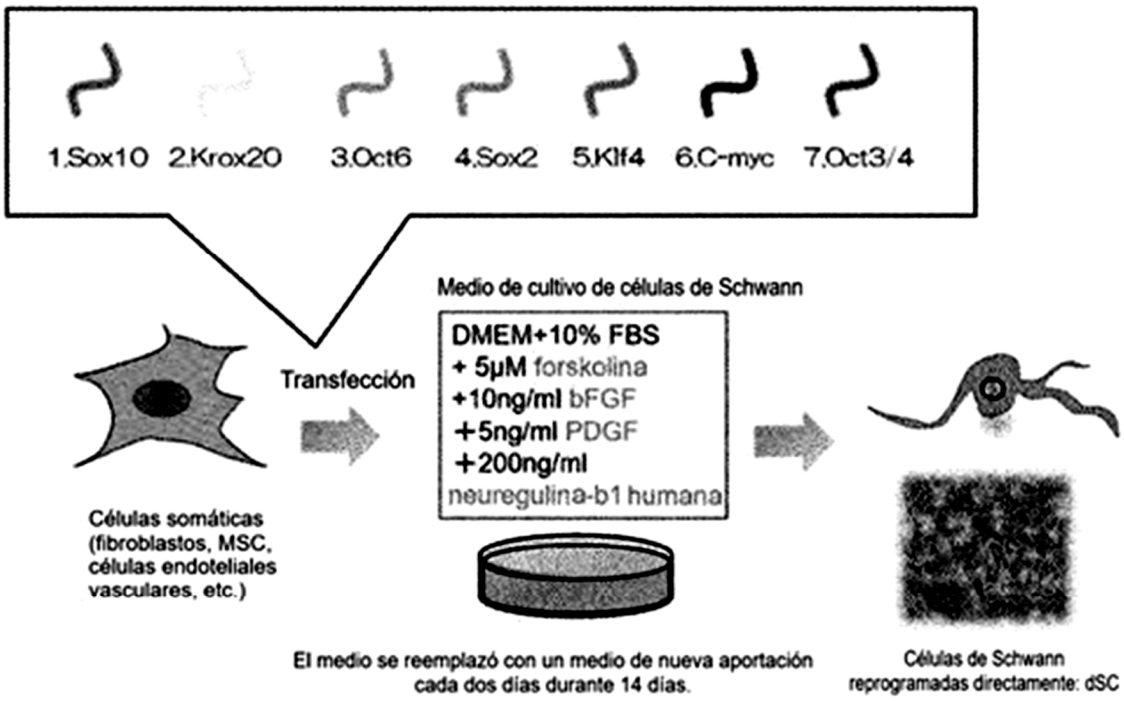

1.Sox10
2.Krox20
3.Oct6
4.Sox2
5.Klf4
6.C-myc
7.Oct3/4
Transfección
Medio de cultivo de células de Schwann
DMEM+10% FBS
+ 5μM forskolina
+10ng/ml bFGF
+5ng/ml PDGF
+200ng/ml
neuregulina-b1 humana
Células somáticas
(fibroblastos, MSC,
células endoteliales
vasculares, etc.)
El medio se reemplazó con un medio de nueva aportación
cada dos días durante 14 días.
Células de Schwann
reprogramadas directamente: dSC

Fig. 2

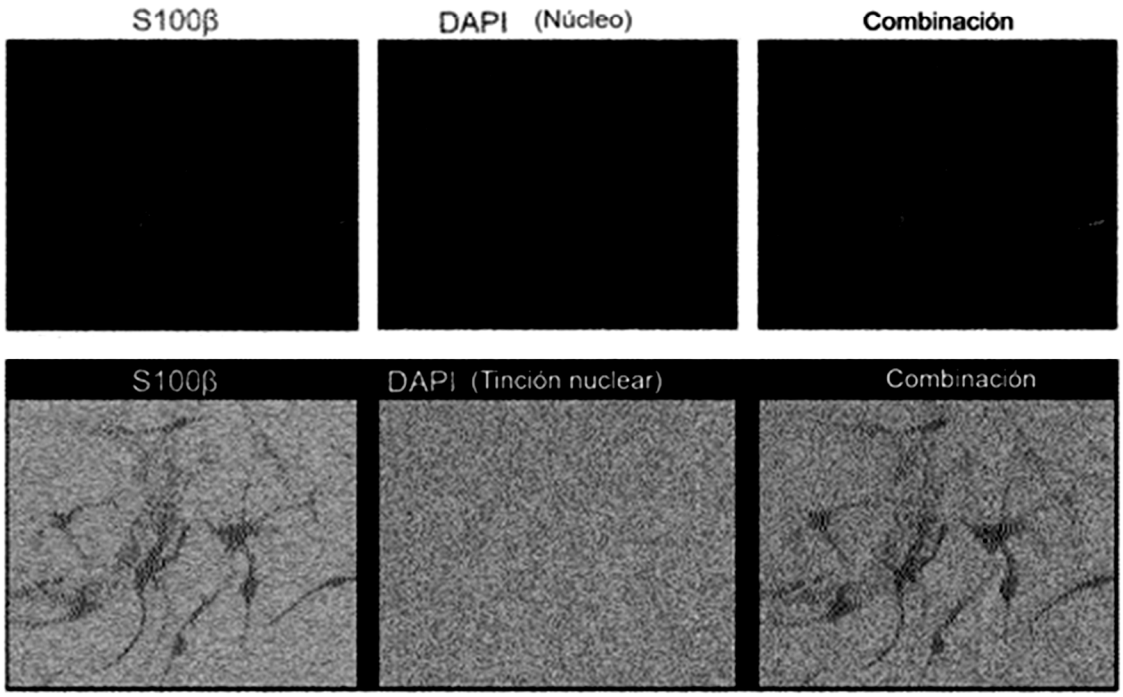

S100β
DAPI (Núcleo)
Combinación
S100β
DAPI (Tinción nuclear)
Combinación

Fig. 3

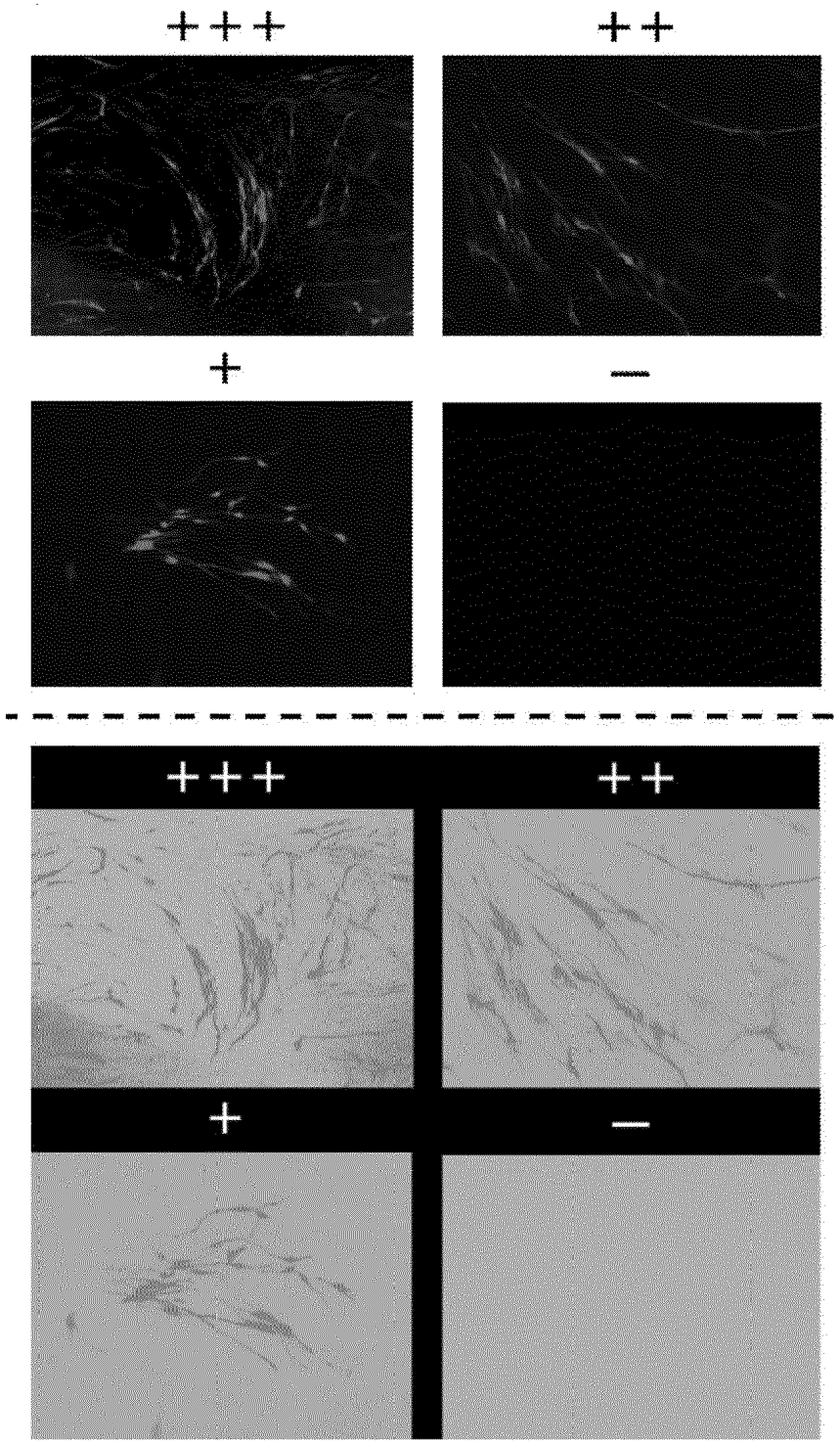


Fig. 4A

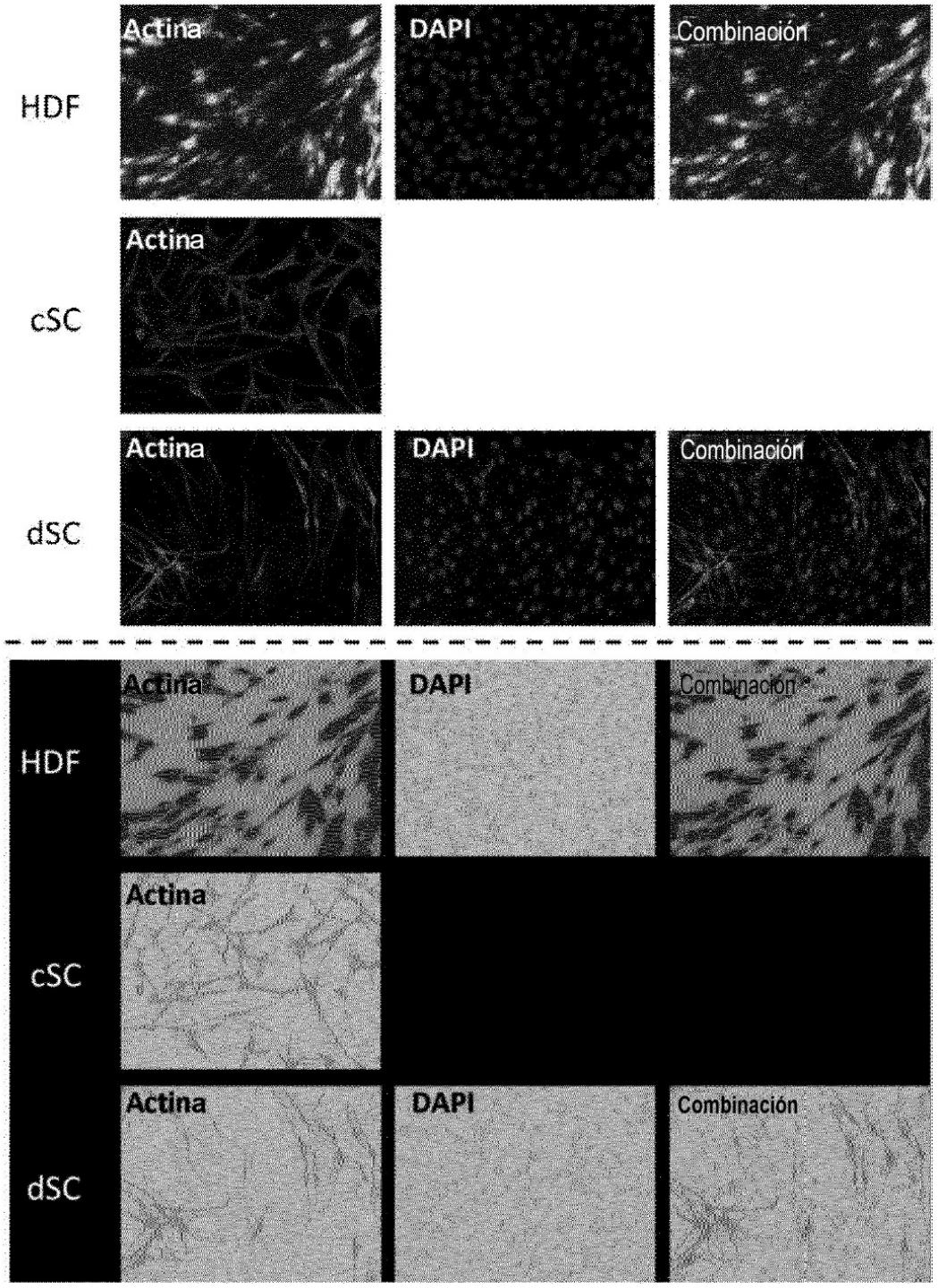

HDF
Actina
DAPI
Combinación
cSC
Actina
dSC
Actina
DAPI
Combinación
HDF
Actina
DAPI
Combinación
cSC
Actina
dSC
Actina
DAPI
Combinación

Fig. 4B

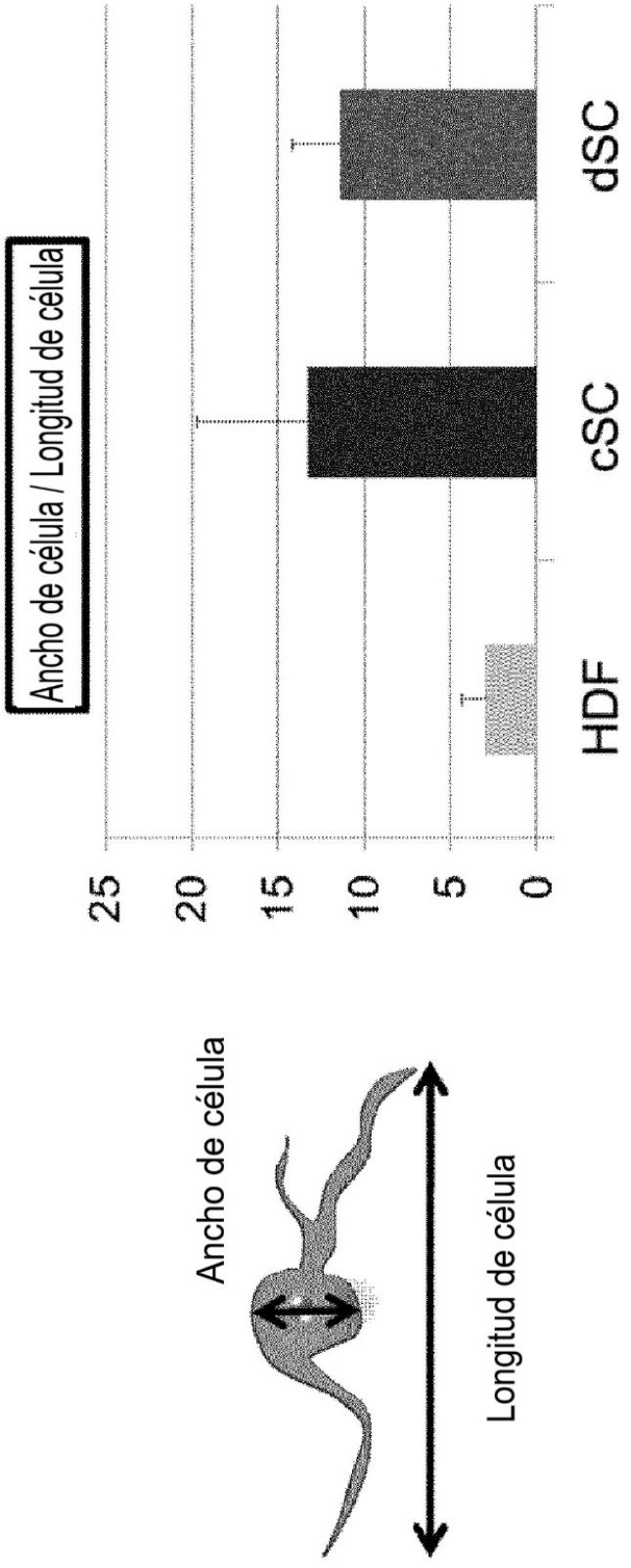

Ancho de célula / Longitud de célula
25
20
15
10
5
0
HDF
cSC
dSC
Ancho de célula
Longitud de célula

Fig. 5A

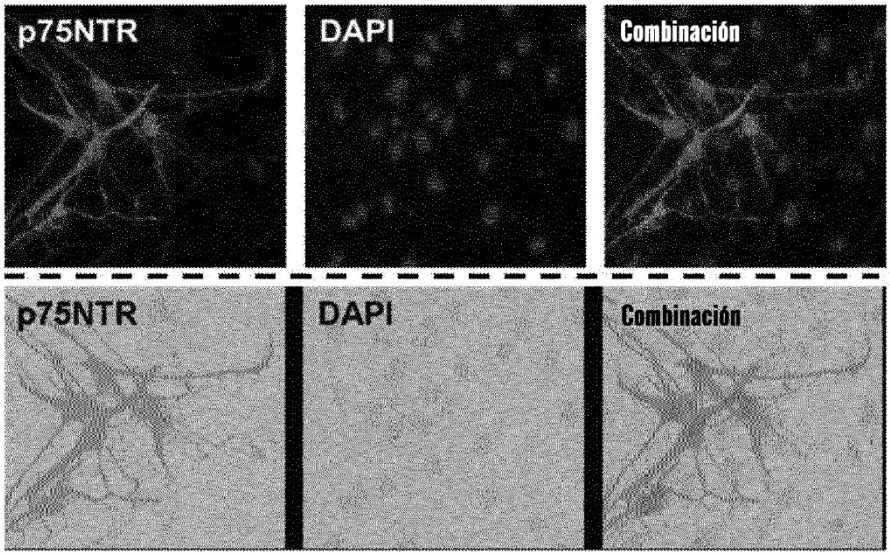

p75NTR
DAPI
Combinación
p75NTR
DAPI
Combinación

Fig. 5B

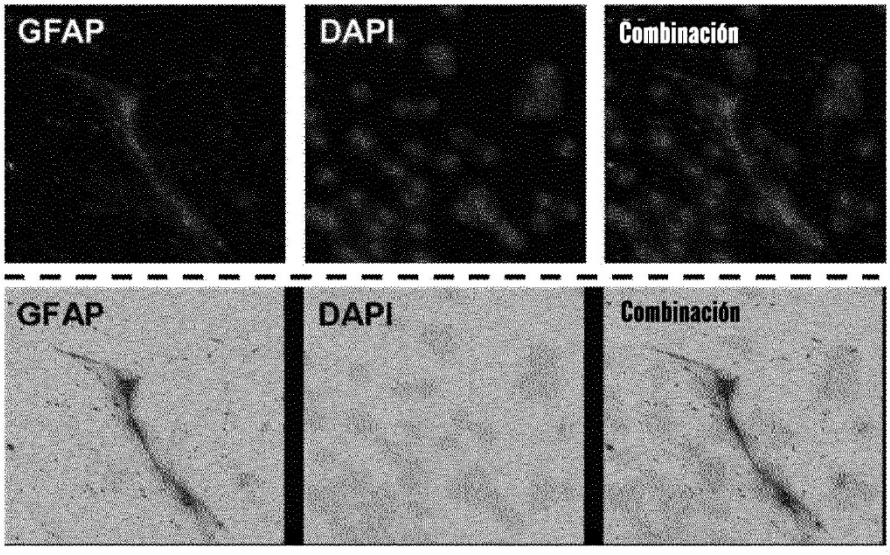

GFAP
DAPI
Combinación
GFAP
DAPI
Combinación

Fig. 5C

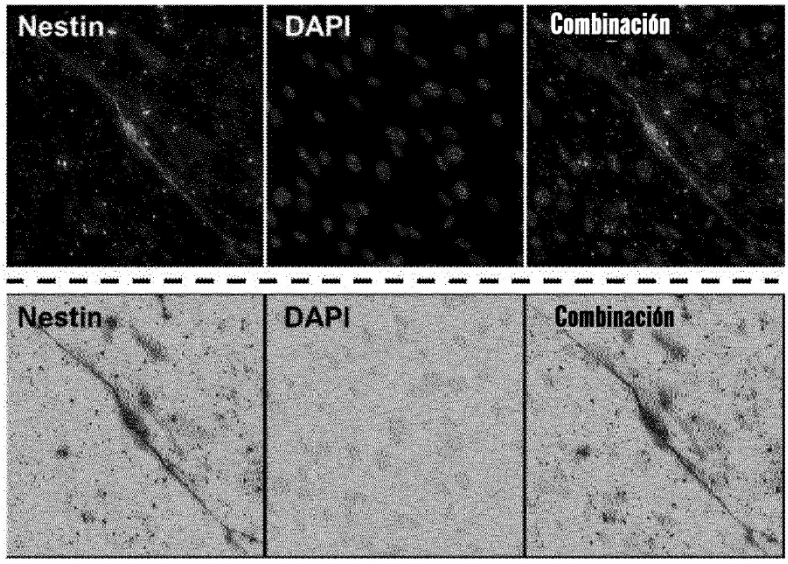

Nestin
DAPI
Combinación
Nestin
DAPI
Combinación

Fig. 5D

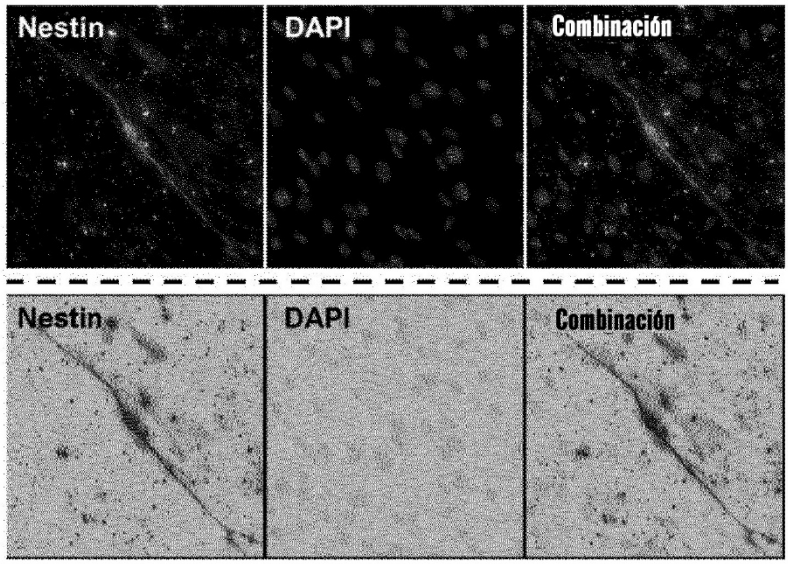

Nestin
DAPI
Combinación
Nestin
DAPI
Combinación

Fig. 6

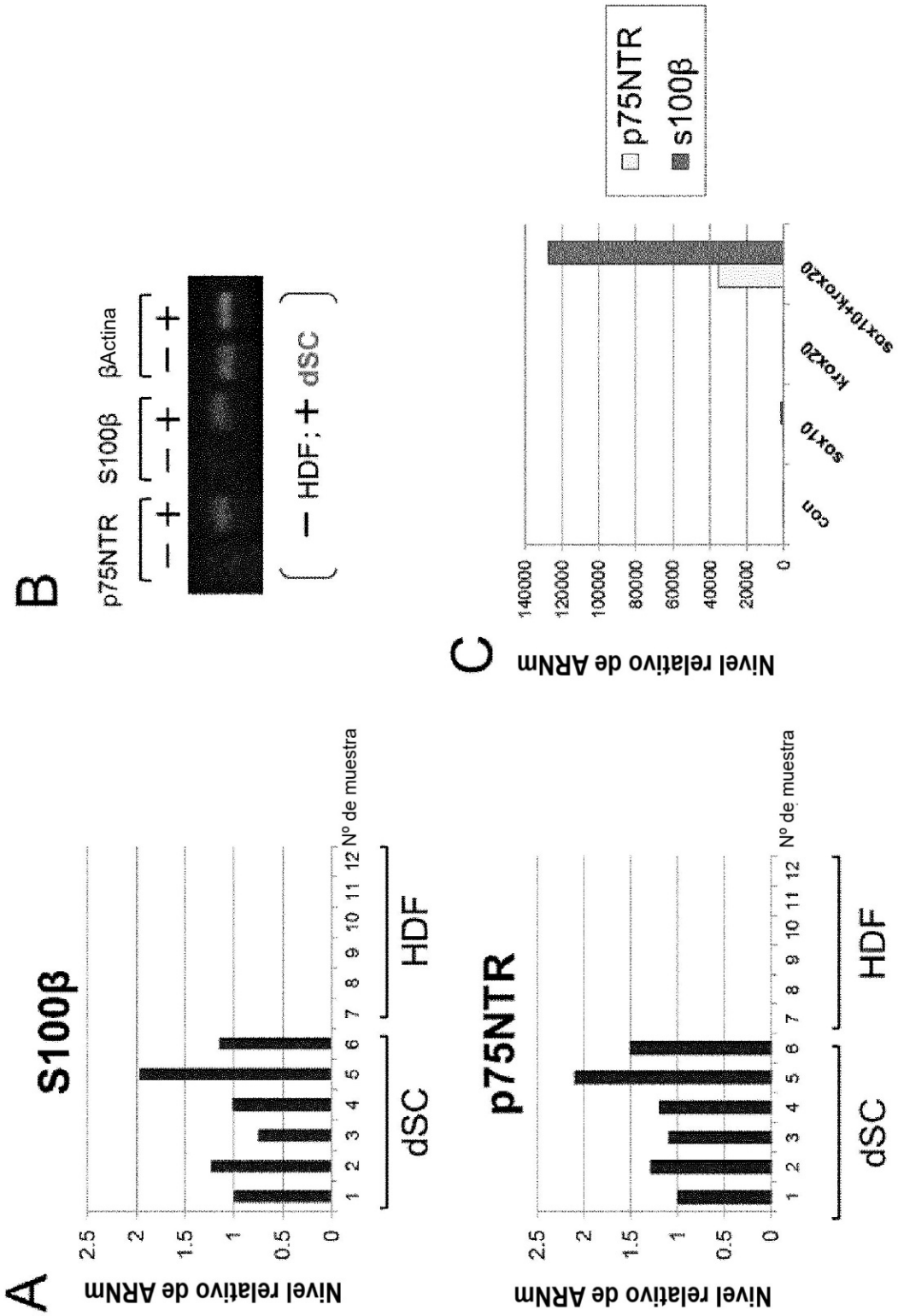

A
S100β
Nivel relativo de ARNm
Nº de muestra
dSC
HDF
p75NTR
B
p75NTR
S100β
βActina
− HDF; + dSC
C
p75NTR
s100β
Nivel relativo de ARNm
con
sox10
Klfox20
sox10+Klfox20

Fig. 7A

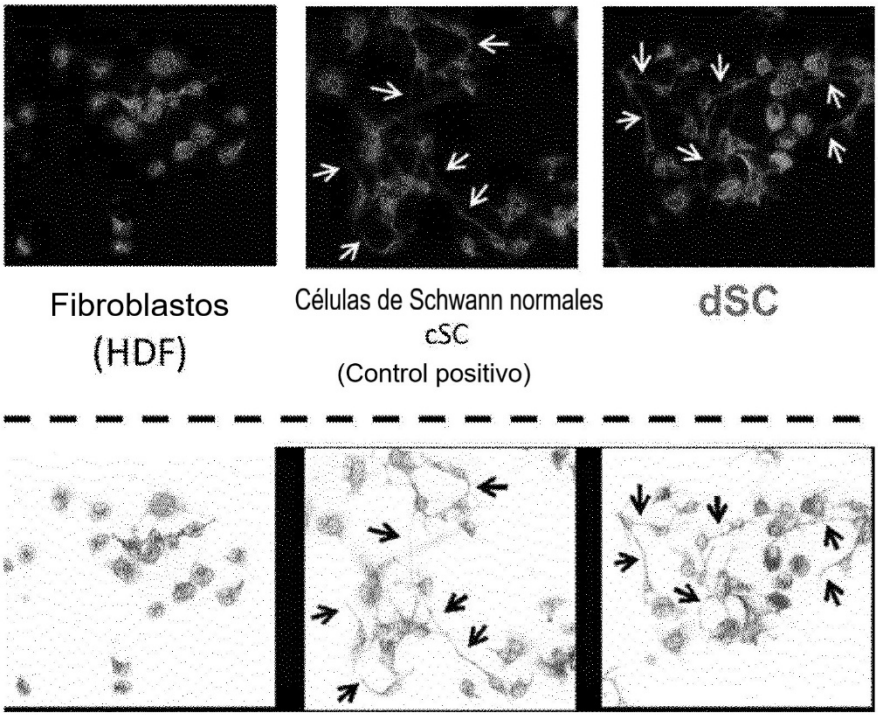

Fibroblastos
(HDF)
Células de Schwann normales
cSC
(Control positivo)
dSC

Fig. 7B

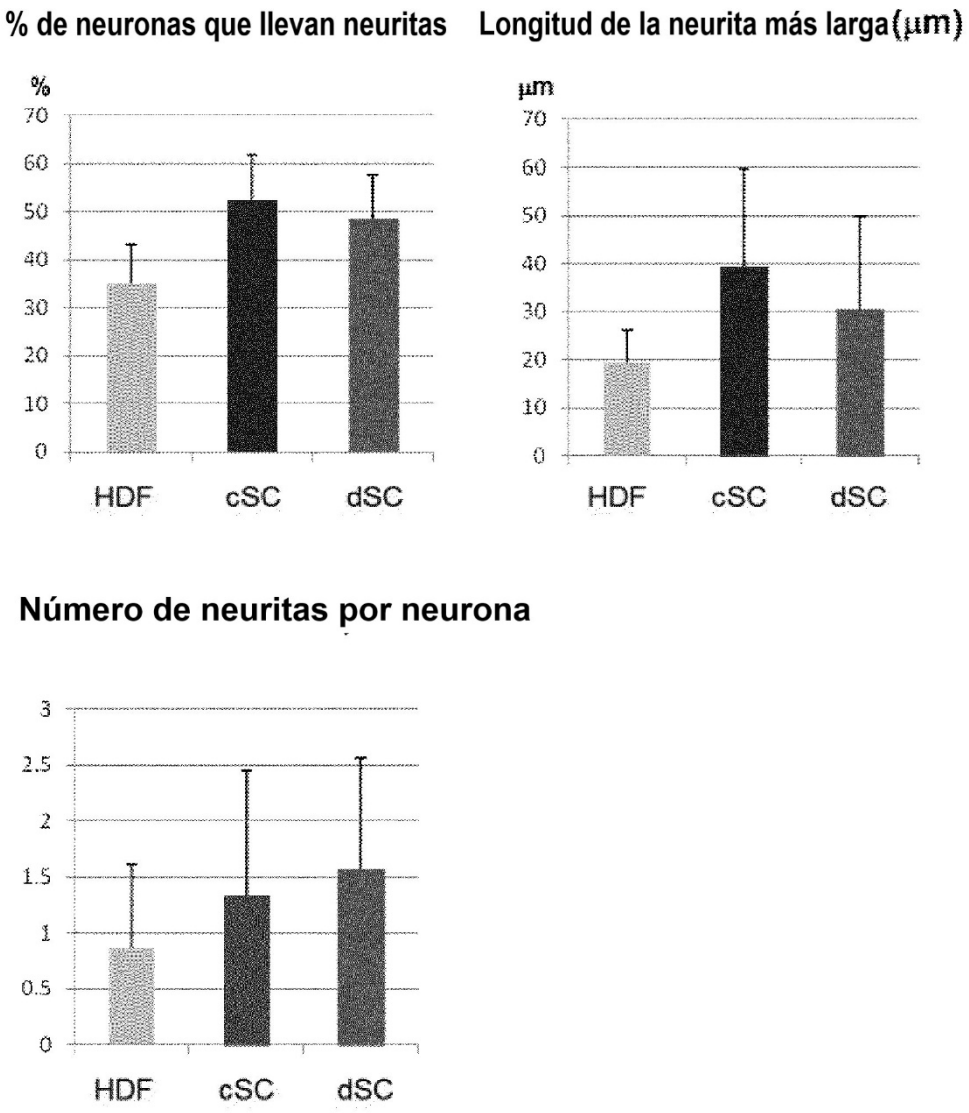

% de neuronas que llevan neuritas
%
70
60
50
40
30
20
10
0
HDF
cSC
dSC
Longitud de la neurita más larga (µm)
µm
70
60
50
40
30
20
10
0
HDF
cSC
dSC
Número de neuritas por neurona
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
HDF
cSC
dSC

Fig. 8

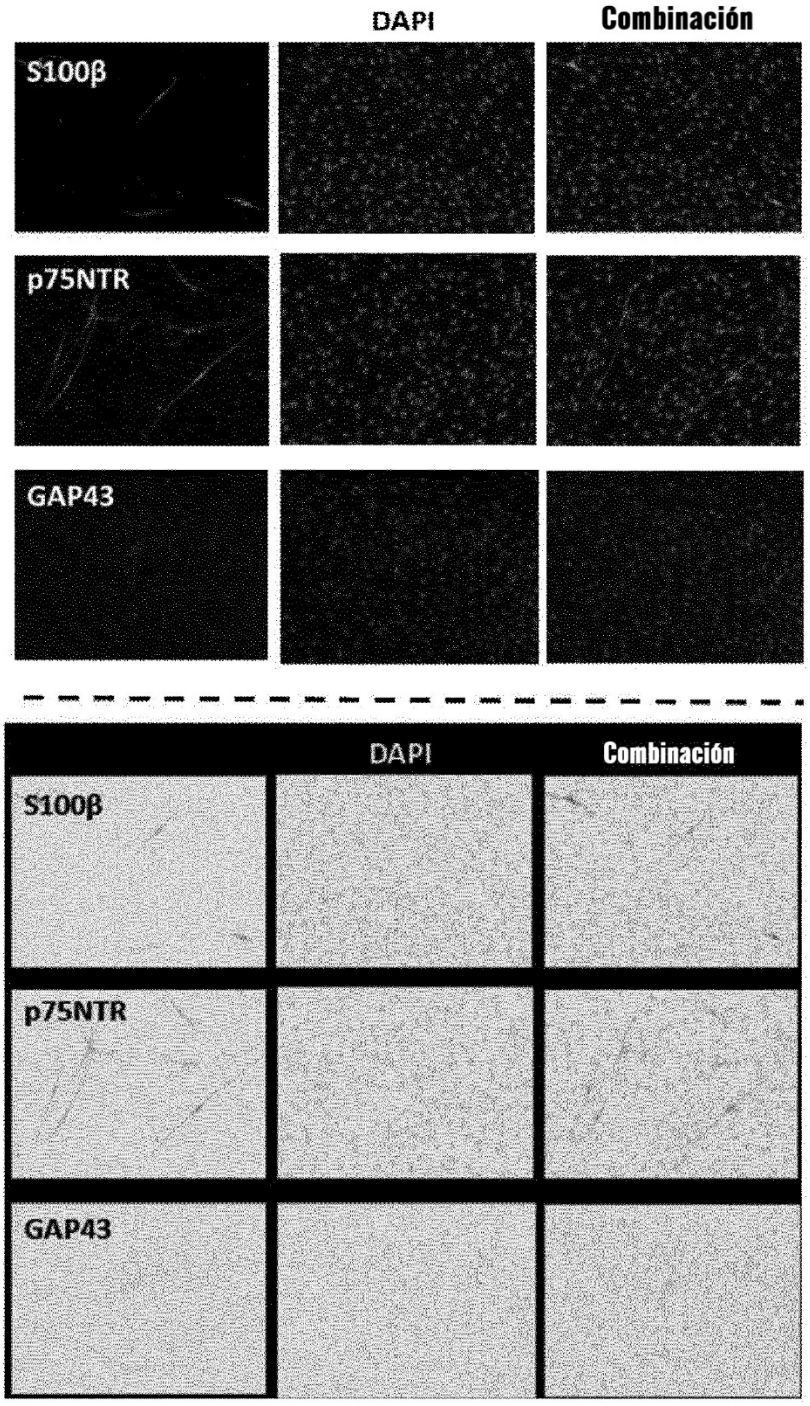

DAPI
Combinación
S100β
p75NTR
GAP43
DAPI
Combinación
S100β
p75NTR
GAP43

Fig. 9A

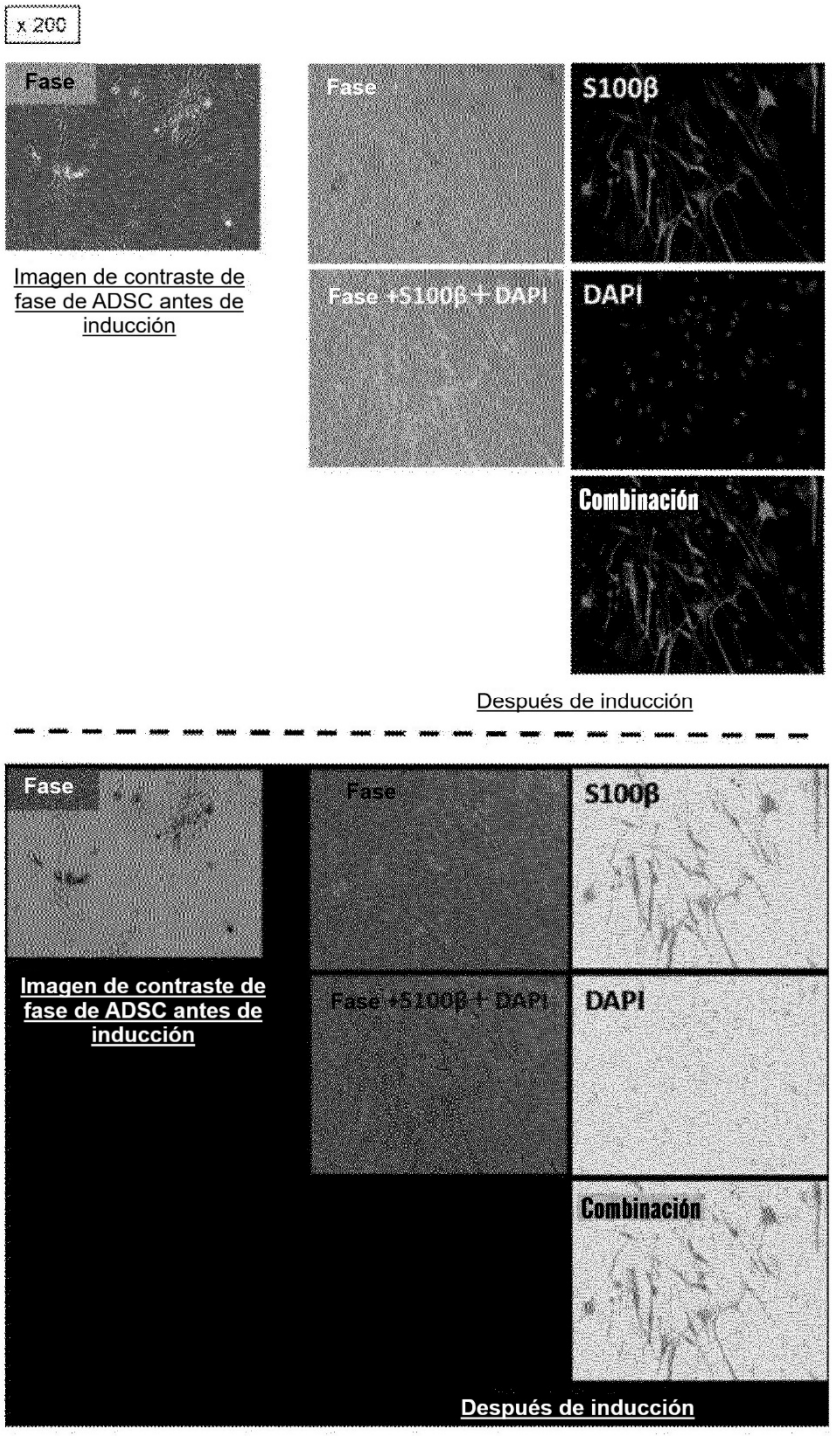

x 200
Fase
Imagen de contraste de fase de ADSC antes de inducción
Fase
S100β
Fase +S100β + DAPI
DAPI
Combinación
Después de inducción
Fase
Imagen de contraste de fase de ADSC antes de inducción
Fase
S100β
Fase +S100β + DAPI
DAPI
Combinación
Después de inducción

Fig. 9B

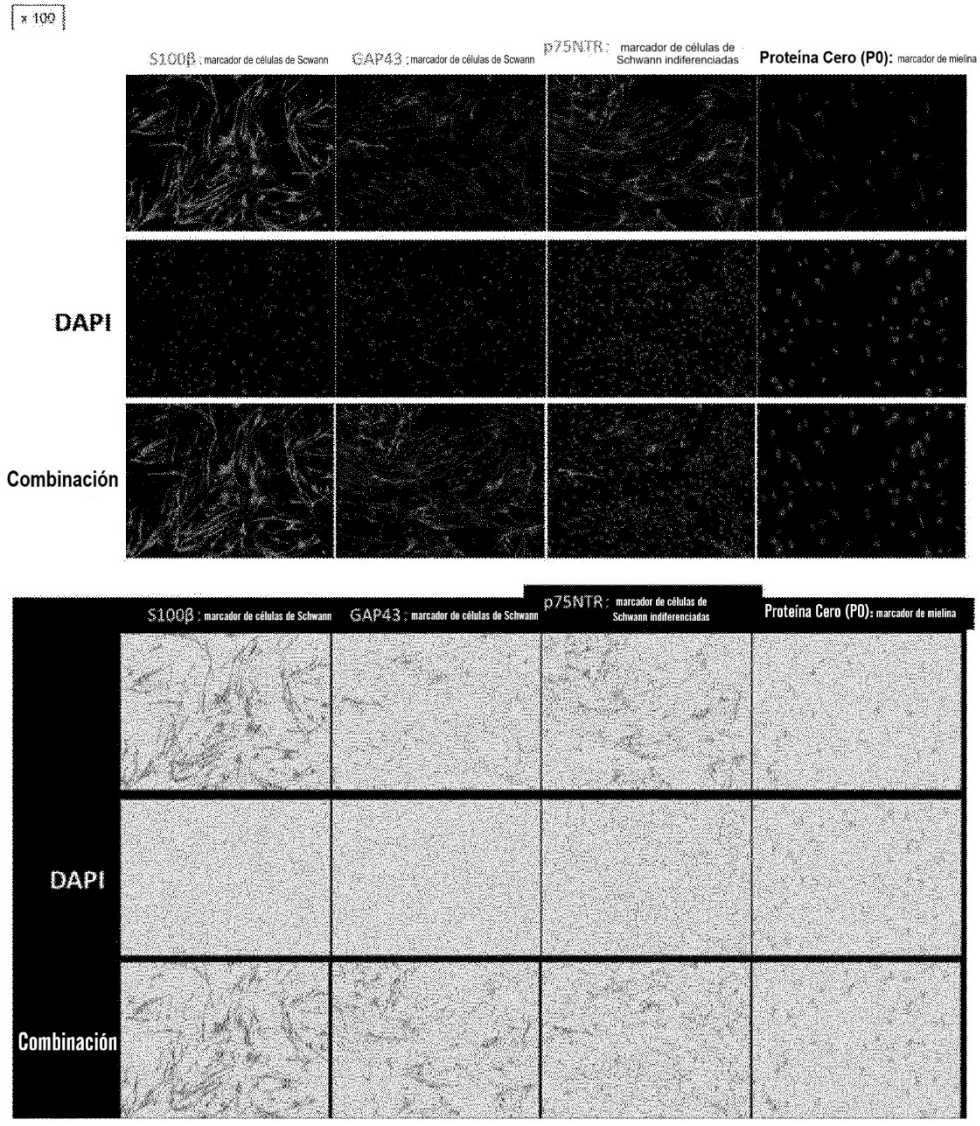

× 100
S100β : marcador de células de Schwann
GAP43 : marcador de células de Schwann
p75NTR : marcador de células de Schwann indiferenciadas
Proteína Cero (P0): marcador de mielina
DAPI
Combinación
S100β : marcador de células de Schwann
GAP43 : marcador de células de Schwann
p75NTR : marcador de células de Schwann indiferenciadas
Proteína Cero (P0): marcador de mielina
DAPI
Combinación

Fig. 10A

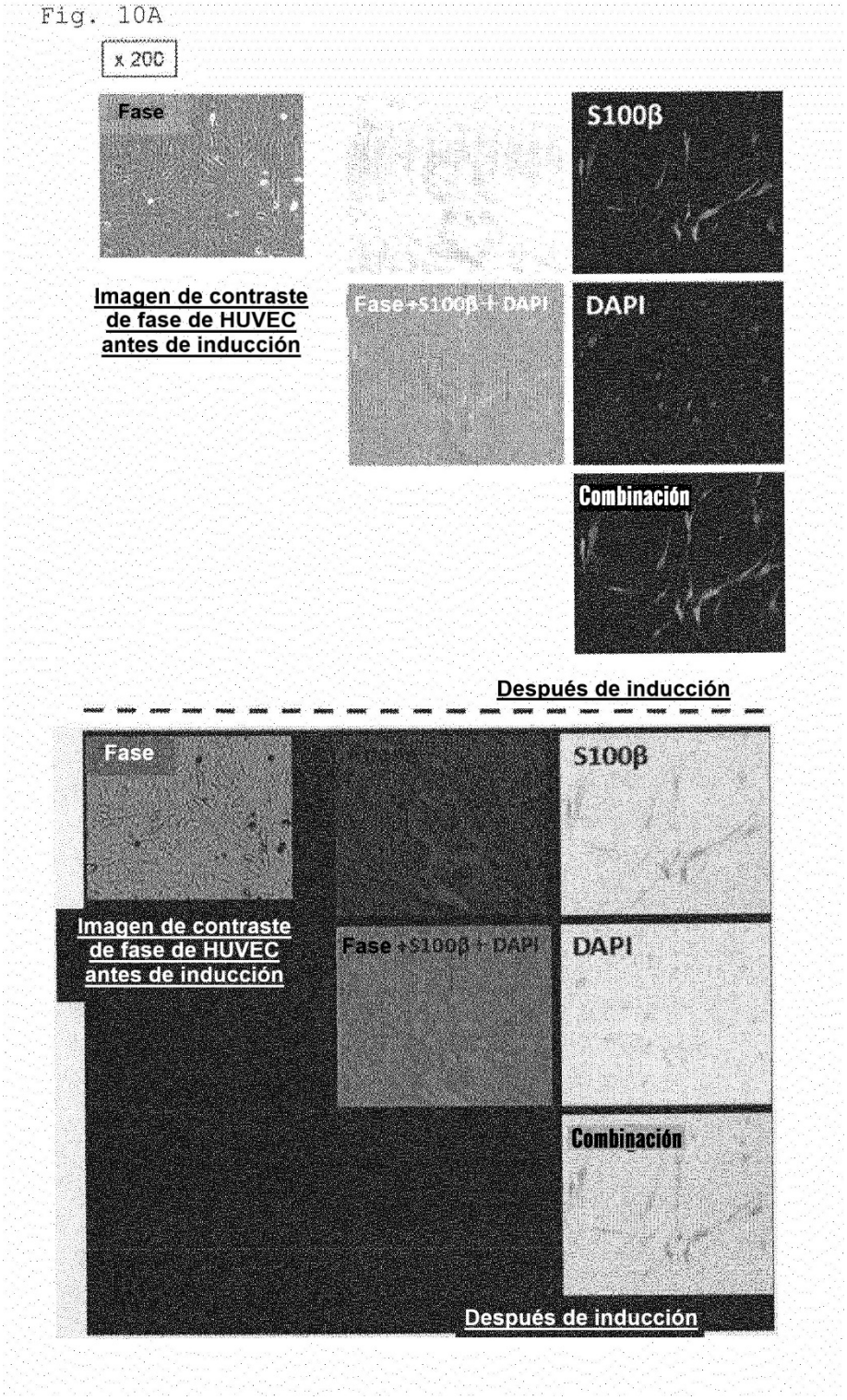

x 200
Fase
S100β
Imagen de contraste de fase de HUVEC antes de inducción
Fase+S100β + DAPI
DAPI
Combinación
Después de inducción
Fase
S100β
Imagen de contraste de fase de HUVEC antes de inducción
Fase +S100β + DAPI
DAPI
Combinación
Después de inducción

Fig. 10B

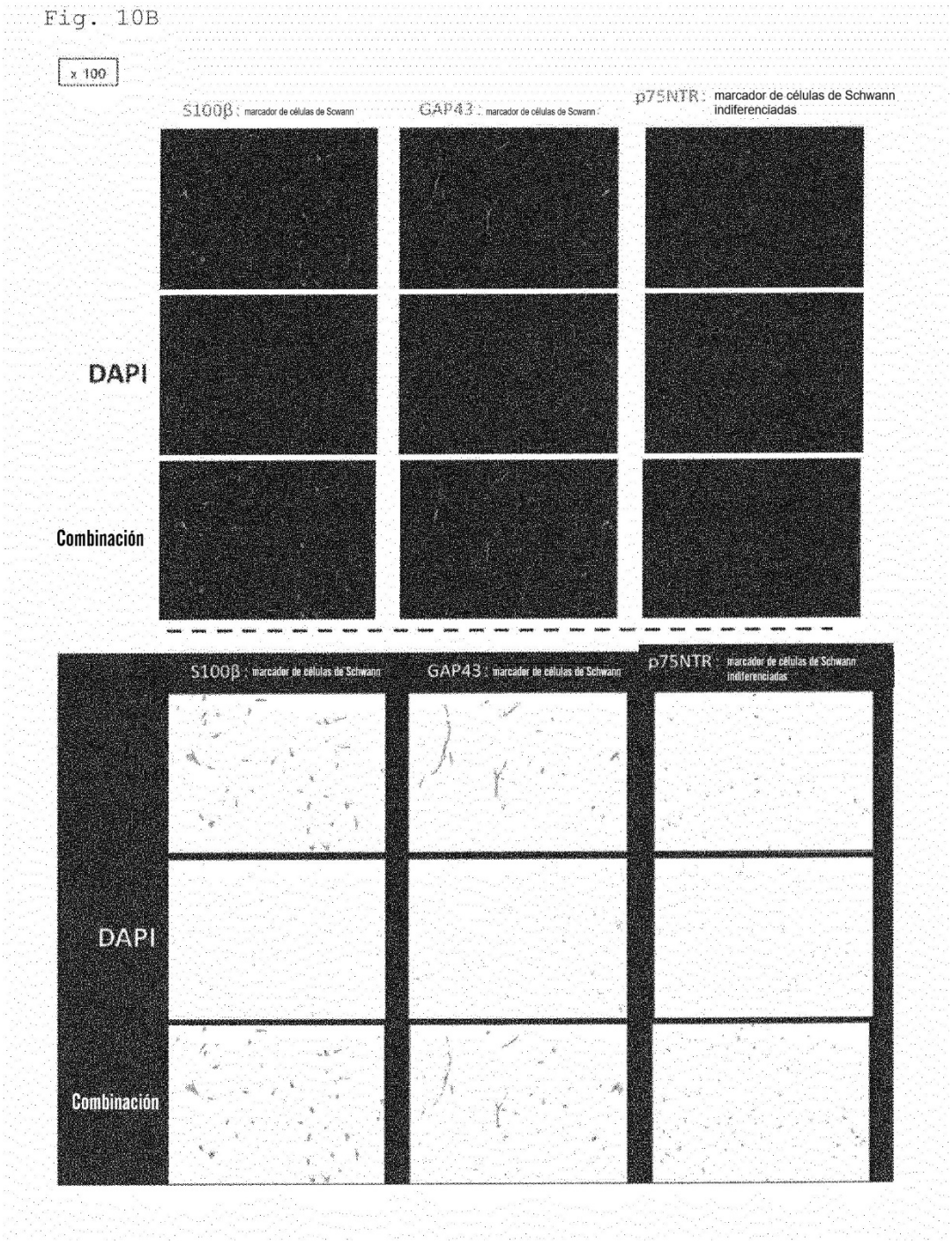

x 100
S100β : marcador de células de Schwann
GAP43 : marcador de células de Schwann
p75NTR : marcador de células de Schwann indiferenciadas
DAPI
Combinación
S100β : marcador de células de Schwann
GAP43 : marcador de células de Schwann
p75NTR : marcador de células de Schwann indiferenciadas
DAPI
Combinación

Fig. 11A

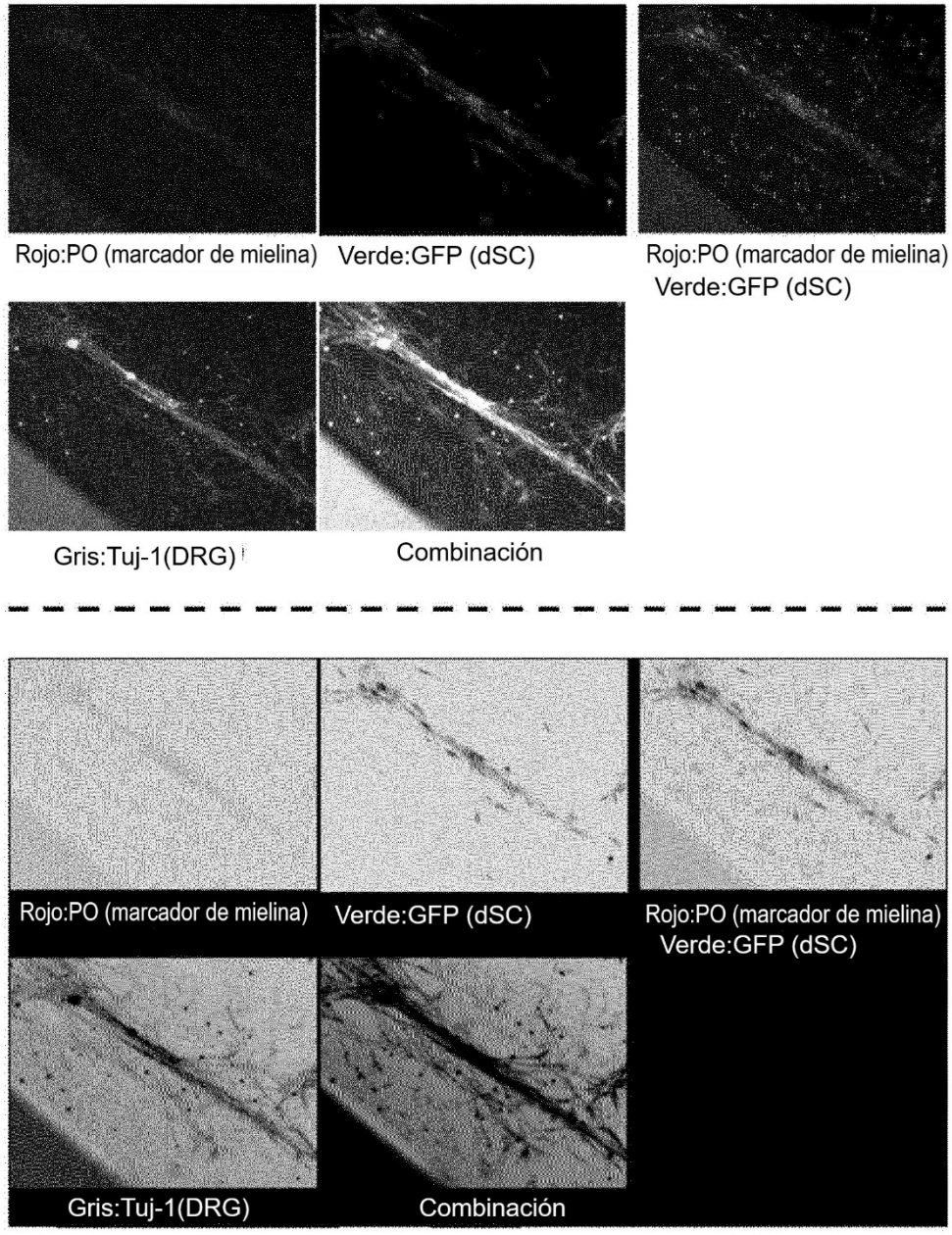

Rojo:PO (marcador de mielina)
Verde:GFP (dSC)
Rojo:PO (marcador de mielina)
Verde:GFP (dSC)
Gris:Tuj-1(DRG)
Combinación
Rojo:PO (marcador de mielina)
Verde:GFP (dSC)
Rojo:PO (marcador de mielina)
Verde:GFP (dSC)
Gris:Tuj-1(DRG)
Combinación

Fig. 11B

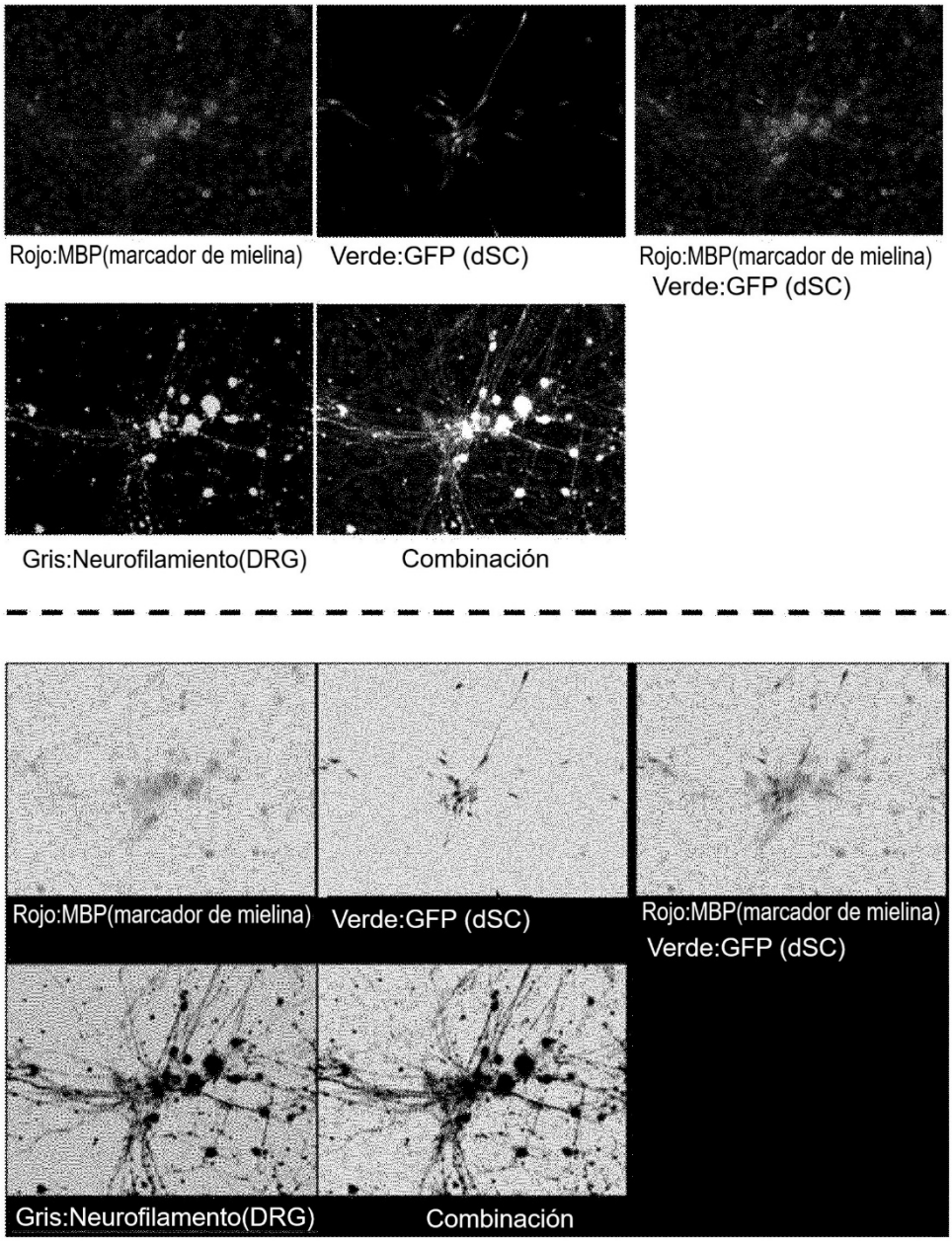

Rojo:MBP(marcador de mielina)
Verde:GFP (dSC)
Rojo:MBP(marcador de mielina)
Verde:GFP (dSC)
Gris:Neurofilamiento(DRG)
Combinación
Rojo:MBP(marcador de mielina)
Verde:GFP (dSC)
Rojo:MBP(marcador de mielina)
Verde:GFP (dSC)
Gris:Neurofilamento(DRG)
Combinación

Fig. 12A

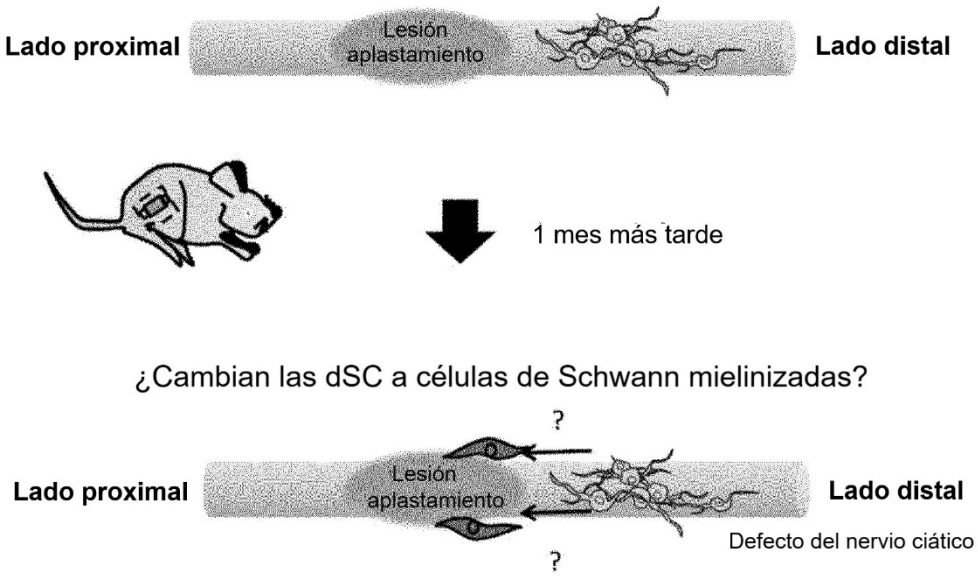

Lado proximal
Lesión aplastamiento
Lado distal
1 mes más tarde
¿Cambian las dSC a células de Schwann mielinizadas?
?
Lado proximal
Lesión aplastamiento
Lado distal
Defecto del nervio ciático
?

Fig. 12B

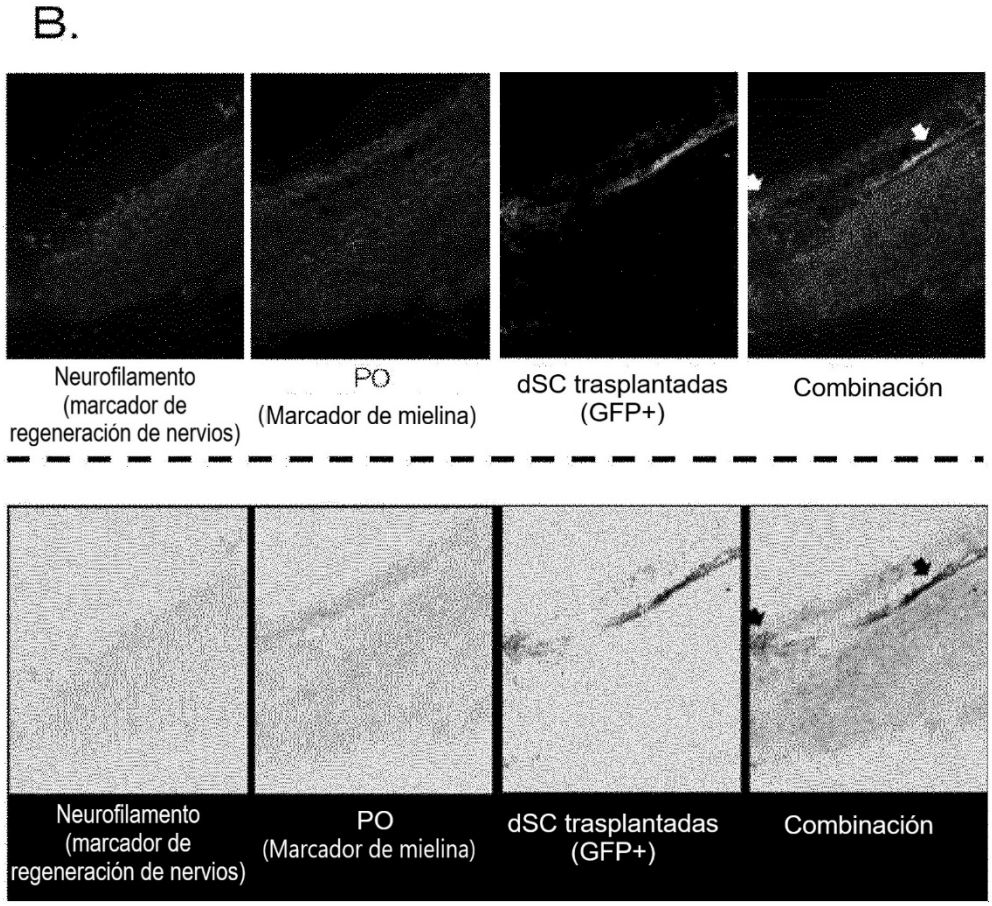

B.
Neurofilamento (marcador de regeneración de nervios)
PO (Marcador de mielina)
dSC trasplantadas (GFP+)
Combinación
Neurofilamento (marcador de regeneración de nervios)
PO (Marcador de mielina)
dSC trasplantadas (GFP+)
Combinación

Fig. 12C

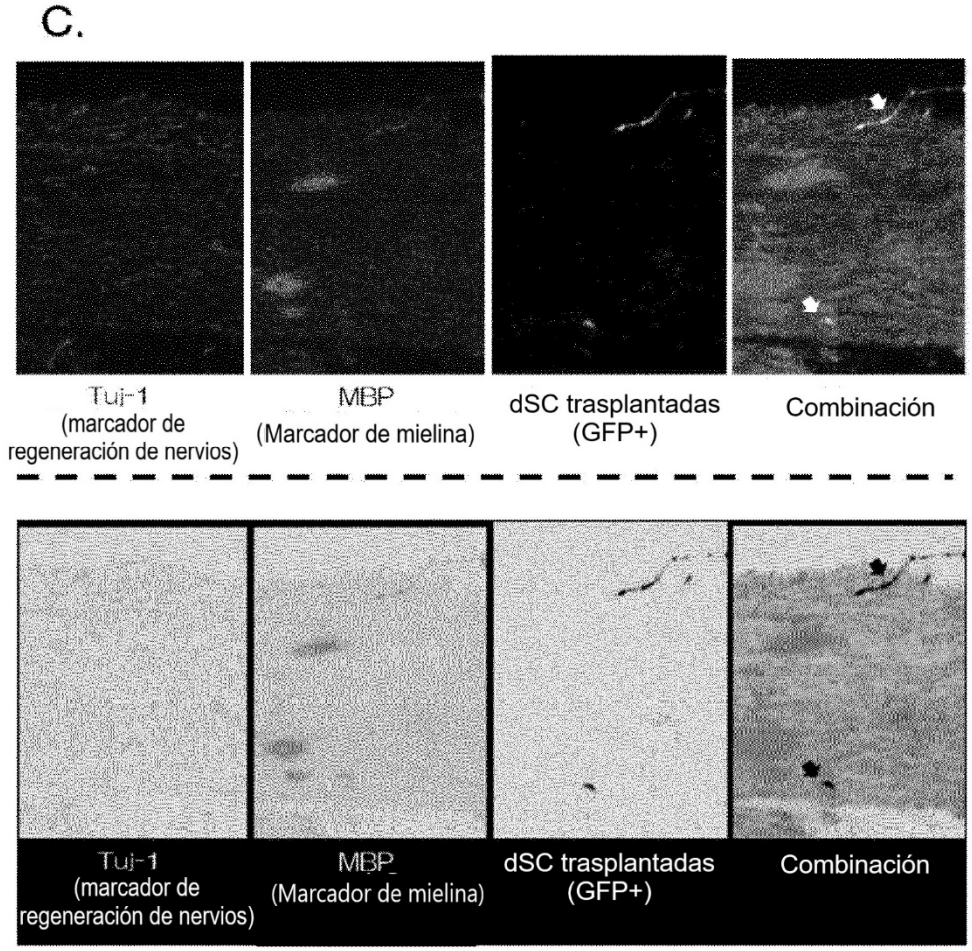

C.
Tuj-1
(marcador de regeneración de nervios)
MBP
(Marcador de mielina)
dSC trasplantadas
(GFP+)
Combinación
Tuj-1
(marcador de regeneración de nervios)
MBP
(Marcador de mielina)
dSC trasplantadas
(GFP+)
Combinación

Fig. 13A

A.

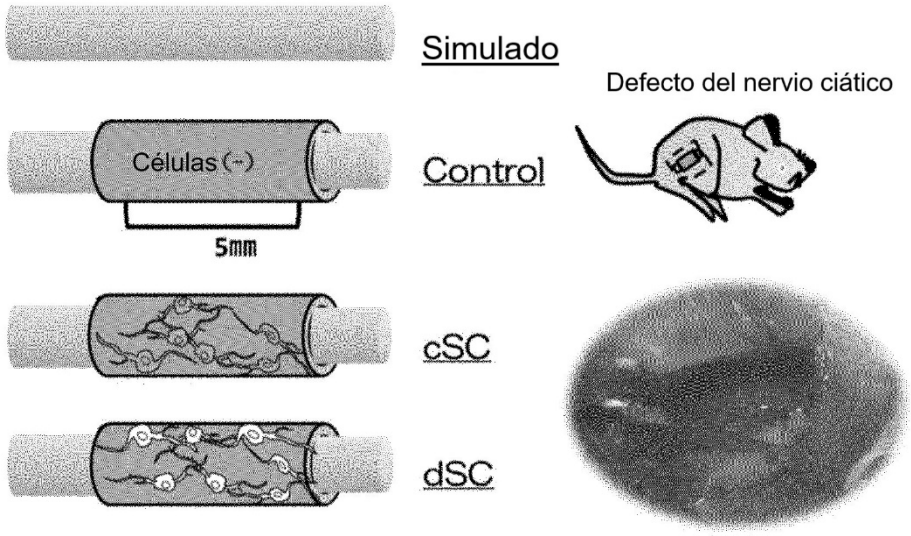

Simulado
Defecto del nervio ciático
Células (-)
Control
5mm
cSC
dSC

Fig. 13B

B. Imágenes macroscópicas de nervios puenteados

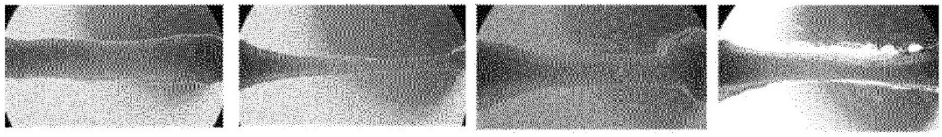


Fig. 13C

C. Imágenes de tinción de mielina de la sección transversal de tejido nervioso en regeneración

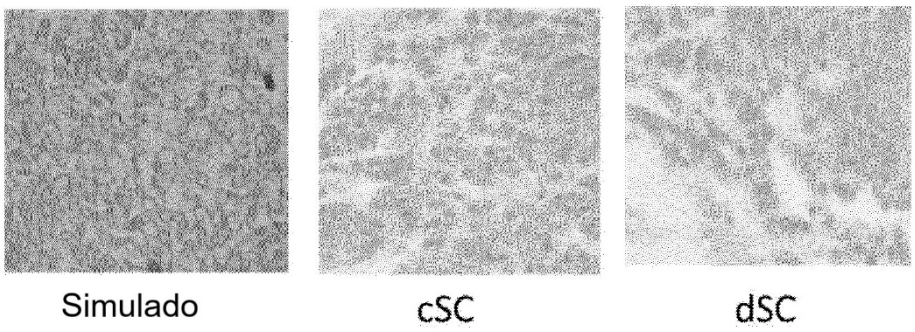


Fig. 13D

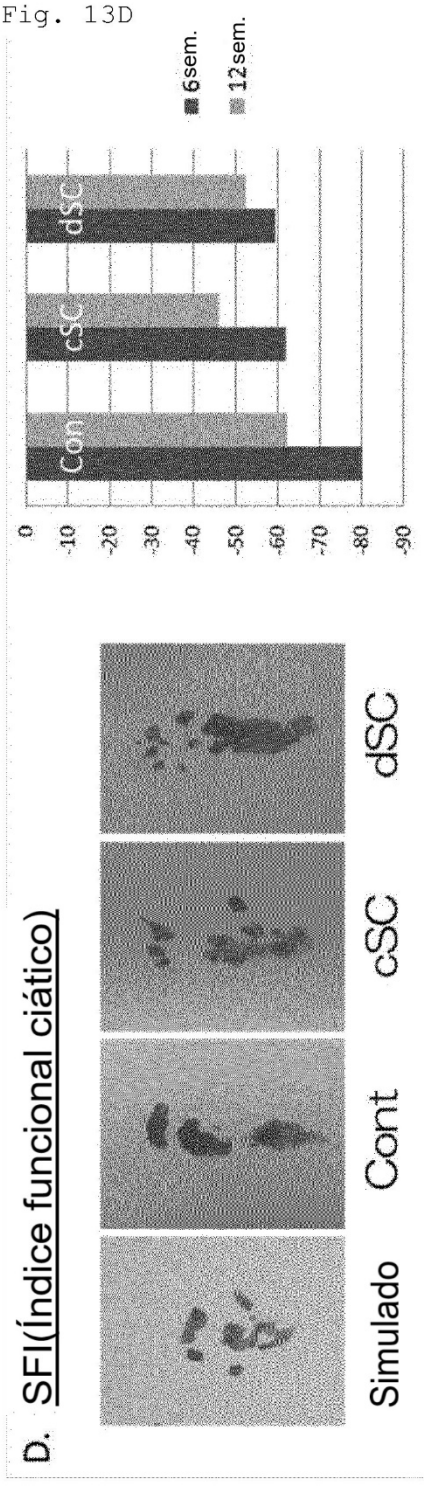

D. SFI(Índice funcional ciático)
Simulado
Cont
cSC
dSC
Con
cSC
dSC
6sem.
12sem.
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
-90

Fig. 13E

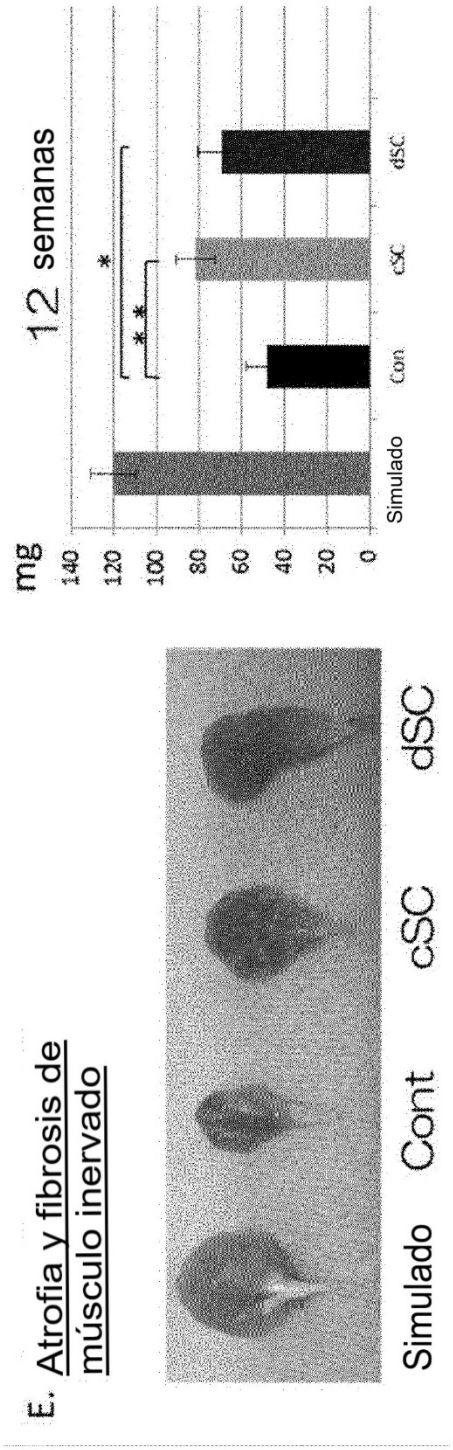

E. Atrofia y fibrosis de músculo inervado
Simulado
Cont
cSC
dSC
mg
12 semanas
140
120
100
80
60
40
20
0
Simulado
Con
cSC
dSC
*
**

Fig. 14

