

# NUEVA LÍNEA CELULAR DE RETINA PARA SCREENING DE FÁRMACOS Y MEDICINA REGENERATIVA

**P** PATENTED TECHNOLOGY

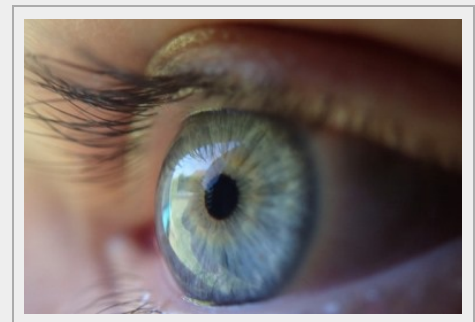
## CONTACT DETAILS:

Relaciones con la Empresa  
Oficina de Transferencia de Resultados de la Investigación-OTRI  
Universidad de Alicante  
Tel.: +34 96 590 99 59  
Email: [areaempresas@ua.es](mailto:areaempresas@ua.es)  
<http://innoua.ua.es>

## ABSTRACT

Investigadores de las Universidades de Valencia y Alicante han obtenido una nueva línea celular inmortal a partir de un cultivo de células de Müller de retinas de ratones adultos. Esta línea celular es la única en el mercado que expresa marcadores de fotorreceptores (rodopsina, recoverina, transducina, opsina azul, opsinas roja/verde) y responde a estímulos luminosos. Además, expresa marcadores de células madre y progenitoras que le permiten autorreproducirse y mantenerse como una línea celular estable y homogénea.

Se trata de un modelo único para investigar la función de los fotorreceptores in vitro que permite evaluar la efectividad clínica de fármacos, y es adecuada para terapias de regeneración en enfermedades neurodegenerativas de la retina. Se buscan empresas interesadas en adquirir esta nueva línea celular para su explotación comercial.



## INTRODUCTION

En mamíferos, el periodo de neurogénesis en la retina finaliza poco tiempo después del nacimiento, de modo que, en caso de muerte de los fotorreceptores, éstos no se pueden reemplazar, lo que conlleva una pérdida irreversible de la visión.

Sin embargo, una pequeña cantidad de células madre y progenitoras persisten en el margen de la retina madura de los mamíferos, lo que sugiere que el potencial neurogénico podría estar conservado. Este hecho hace pensar que se podría conseguir una terapia basada en la regeneración celular con células madre para restaurar la función visual en patologías oculares. En este sentido, para poder determinar su potencial terapéutico, es necesario identificar los factores que regulan la capacidad proliferativa de las células progenitoras de la retina, así como entender los mecanismos celulares y moleculares implicados en la diferenciación y función de las células progenitoras de la retina.

Las células de Müller actúan como precursores de diferentes tipos neuronales de la retina, ya que son capaces de regenerar distintos tipos de células tras una lesión. Así pues, las células de Müller podrían servir como células madre endógenas para reemplazar los fotorreceptores perdidos.

Debido al escaso número de células madre presentes en la retina, las líneas celulares pueden resultar muy útiles para estudiar la biología de las células madre de la retina, ya que permiten obtener poblaciones importantes de células puras que facilitan el estudio de los distintos procesos celulares y moleculares.

Existe pues la necesidad de proporcionar y caracterizar una nueva línea celular inmortal que suponga un buen modelo in vitro de estudio de la función de los fotorreceptores, que permita estudiar los defectos visuales relacionados con el daño de los

#### TECHNICAL DESCRIPTION

Con el objetivo de superar las limitaciones anteriormente descritas, la presente invención se refiere a una línea celular inmortalizada (denominada MU-PH1) obtenida a partir de un cultivo de células de Müller de retinas de ratones adultos (véase Figura 1).

Esta línea celular se encuentra depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Tipo (DSMZ), según establece el Tratado de Budapest.

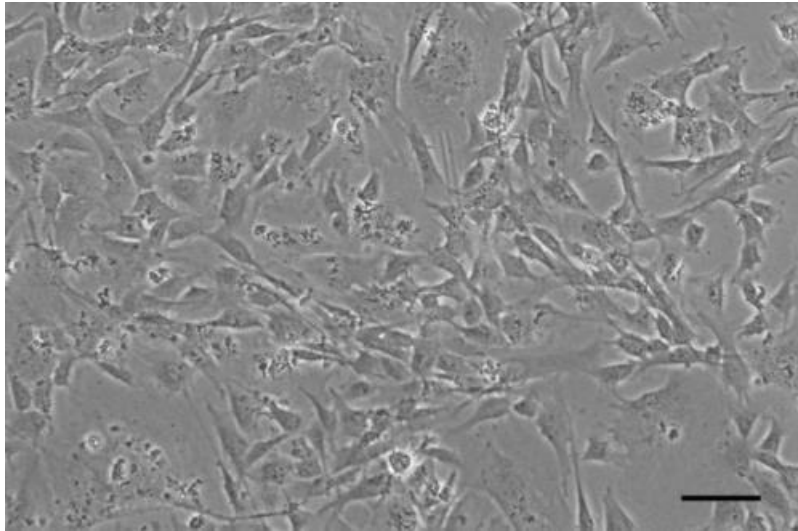


Figura 1: línea celular MU-PH1 en condiciones estándar de cultivo *in vitro*

Esta nueva línea celular se caracteriza porque:

- Expresa los marcadores de células neurales y de células progenitoras: nestina, alfa-tubulina, beta-III-tubulina, Abcg2 y Ascl1;
- Expresa los marcadores de fotorreceptores: recoverina y transducina de conos;
- Expresa los fotopigmentos: rodopsina, opsinas de conos (azul y roja/verde) y melanopsina;
- Expresa los receptores tipo Toll: TLR2;
- Expresa los receptores de melatonina MT1 y MT2;
- Es capaz de formar neuroesferas (véase Figura 2);
- No expresa marcadores de células bipolares, amacrinas, astrocitos, microglía o células endoteliales.

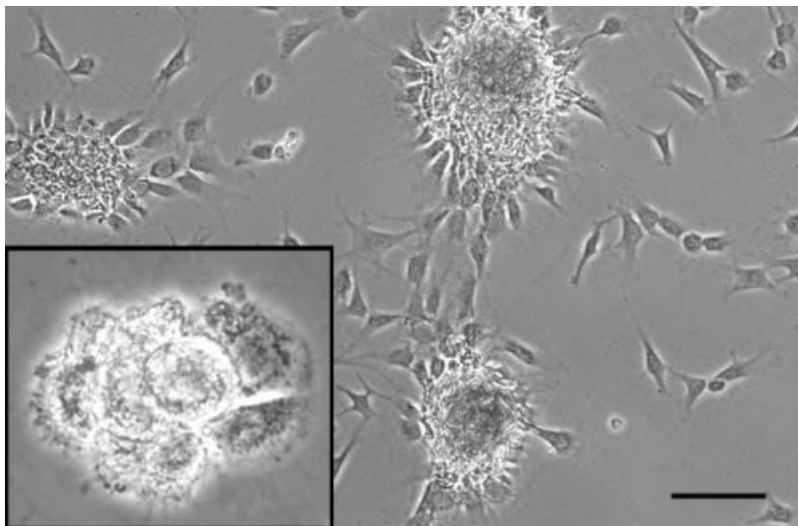


Figura 2: neuroesferas formadas en medio de cultivo químicamente definido

El procedimiento para obtener esta novedosa línea celular comprende las siguientes etapas:

1. Cultivar las retinas en un medio de cultivo apropiado, bajo unas determinadas condiciones de temperatura y en atmósfera controlada;
2. Llevar las células hasta semiconfluencia;
3. Purificar el cultivo.

Caracterización de la línea celular MU-PH1 (véase Figura 3):

- Expresan marcadores gliales, de células neurales y de células progenitoras;
- Expresan de forma estable los marcadores de células de Müller: vimentina, S-100 y glutamina sintetasa;
- Expresan marcadores de fotorreceptores: recoverina (conos y bastones), transducina de conos, rodopsina (fotopigmento específico de bastones), y opsinas azul y roja/verde (fotopigmentos específicos de conos);
- Expresan melanopsina (opsina expresada específicamente por las células ganglionares de la retina);
- Expresan los receptores de melatonina MT1 y MT2;
- Forman neuroesferas;
- Son sensibles a la luz;
- No se ha detectado la expresión de otros marcadores celulares: GFAP, Chx10, Pax6, CD35 o Notch1;
- No se observan cambios morfológicos en las células cultivadas, ni inducción de TNF-alfa en ninguna de las condiciones ensayadas;
- Los ensayos de viabilidad han demostrado que la línea celular muere en presencia de compuestos inductores de estrés oxidativo y que distintos compuestos antioxidantes y/o neuroprotectores son capaces de modificar la viabilidad celular;
- Los experimentos realizados han demostrado que la población celular es homogénea;
- La línea celular está exenta de contaminación con otros tipos de células.

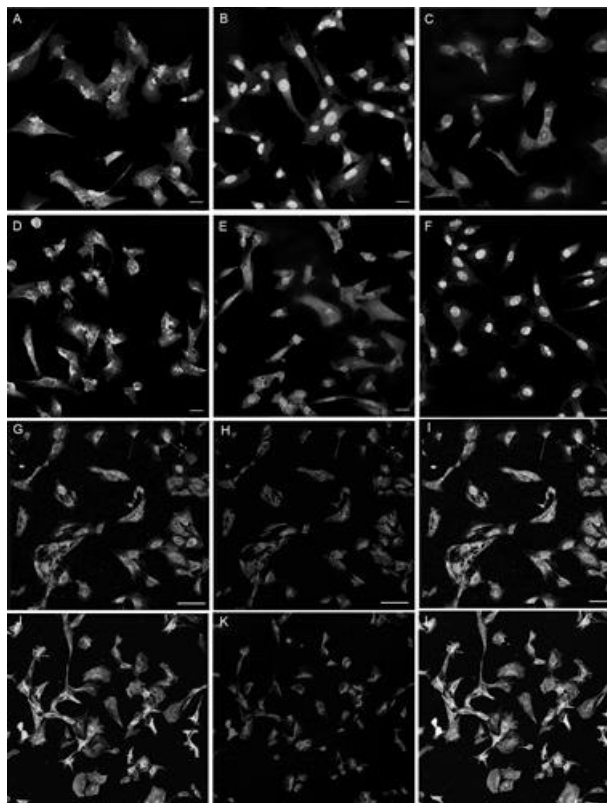


Figura 3: imagen confocal de las células MU-PH1 cultivadas in vitro en condiciones estándar e inmunoteñidas con anticuerpos contra: [A: opsina roja/verde; B: opsina azul; C: transducina; D: rodopsina; E: recoverina; F: melanopsina; G-I: doble marcaje de rodopsina-vimentina; J-L: doble marcaje de rodopsina-nestina]

#### ADVANTAGES AND INNOVATIVE ASPECTS

Las líneas celulares se utilizan como modelos in vitro para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares asociados a los

procesos de proliferación, diferenciación, regeneración y muerte celular.

Actualmente, se utilizan líneas celulares de retina con diferentes fenotipos para el cribado de compuestos potencialmente tóxicos o neuroprotectores para la retina, por ejemplo: 661W de fotorreceptores tipo cono, ARPE-19 de epitelio pigmentario, R28 de precursores neuronales, RGC-5 de células ganglionares, y MIO-M1 de glía de Müller; sin embargo, ninguna de estas líneas celulares disponibles en el mercado, exhiben los fenotipos característicos de los fotorreceptores tipo bastón (las neuronas mayoritarias de la retina).

En este sentido, la nueva línea celular MU-PH1:

- Es la única que expresa espontáneamente los marcadores de bastón rodopsina y recoverina;
- Tiene capacidad para responder a los estímulos luminosos;
- Es la única de estas características obtenida a partir de un cultivo de células de Müller de retinas de ratones adultos: no se ha utilizado ningún ADN viral para su immortalización (a diferencia de 661W, que se immortalizó con el gen del antígeno-T SV40; y de R28 y RGC-5, que se immortalizaron con el gen Psi2 12S E1A), por lo que la nueva línea celular no ha sufrido alteraciones genéticas en el proceso de immortalización;
- Puesto que derivan de ratones adultos (a diferencia de 661W, que proceden de un ratón de 8 días de edad; de R28, que proceden de una rata de 6 días; y de RGC-5, que proceden de una rata de 1 día) constituyen un modelo más adecuado para investigar la función de los fotorreceptores in vivo e in vitro, y por tanto, para el screening de fármacos para el tratamiento de enfermedades y/o trastornos de la retina en humanos;
- En presencia de los estímulos adecuados, la línea celular es capaz de perder la diferenciación, rediferenciarse e inducir la expresión del gen LIN28, lo que indica que MU-PH1 podría estar implicado en procesos de regeneración de la retina.

#### CURRENT STATE OF DEVELOPMENT

Esta novedosa línea celular (MU-PH1) se encuentra disponible para su comercialización a nivel internacional. Actualmente, no existe en el mercado ninguna línea celular con las características anteriormente descritas.

#### MARKET APPLICATIONS

Existe un gran interés comercial por parte de empresas internacionales de los sectores Farmacéutico, Biotecnológico, Agroalimentario y Cosmético, que demandan líneas celulares estables que expresen marcadores propios de las células del tejido del que derivan. En este sentido, esta novedosa línea celular (MU-PH1) se puede usar:

1. Para evaluar la eficacia clínica de fármacos (cribado o screening) en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la retina, o que cursan con pérdida y/o muerte de los fotorreceptores:
  - Retinosis pigmentaria;
  - Retinopatía diabética;
  - Distrofia de conos;
  - Degeneración macular asociada a la edad;
  - Edema macular diabético;
  - Oclusión de la vena retiniana;
  - Enfermedad de Stargardt;
  - Enfermedad de Usher;
  - Glaucoma;
  - Neurodegeneración de la retina;
  - Alteraciones visuales asociadas a la enfermedad de Parkinson;
  - Distrofias retinianas en general.
2. Para evaluar la toxicidad de los fármacos en el tratamiento de los desórdenes de la retina.
3. Para identificar nuevas dianas terapéuticas con las que poder diseñar fármacos más eficientes.
4. Para evaluar la eficacia de la terapia génica celular.
5. Como modelo para el estudio de trasplantes sin necesidad de llevar a cabo un enriquecimiento previo del cultivo.

La línea celular MU-PH1 tiene un alto potencial de mercado porque:

- a) El tratamiento de las patologías anteriormente descritas es mayoritariamente farmacológico;
- b) La evolución de mercado de los fármacos para el tratamiento de las patologías retinianas es creciente.

#### COLLABORATION SOUGHT

Se buscan empresas interesadas en adquirir esta novedosa línea celular (MU-PH1) para su explotación comercial mediante:

- Acuerdos de licencia de la patente;
- Búsqueda de oportunidades de financiación para probar nuevas aplicaciones;

Respecto a las posibles empresas licenciatarias de esta nueva línea celular, se encuentran:

1. Empresas farmacéuticas que investigan nuevos fármacos para el tratamiento de las distintas enfermedades retinianas (especialmente aquellas que cursan con afectación de los fotorreceptores);
2. Empresas farmacéuticas que trabajan en terapias celulares regenerativas con fines terapéuticos de enfermedades retinianas;
3. Empresas que se dedican a comercializar distintos tipos de líneas celulares.

#### INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

El material biológico se encuentra depositado en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Tipo (número de depósito: DSMZ ACC3187), según se establece en el Tratado de Budapest (28 de abril de 1977).

La línea celular MU-PH1 se encuentra protegida mediante solicitud de patente:

- Número de solicitud: P201201274
- Fecha de solicitud: 21/12/2012

#### MARKET APPLICATION (4)

Biología  
Biología Molecular y Biotecnología  
Farmacéutica, Cosmética y Oftalmológica  
Medicina y Salud