

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 259**

51 Int. Cl.:
C12N 5/079 (2010.01)
A61K 35/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02738782 .8**
96 Fecha de presentación: **21.06.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1405906**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2004**

54 Título: **CÉLULAS DE SCHWANN DERIVADAS DE CÉLULAS ESTRÓMICAS DE MÉDULA ÓSEA.**

30 Prioridad:
22.06.2001 JP 2001190251

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.11.2011

73 Titular/es:
SANBIO, INC.
231 SOUTH WHISMAN ROAD, SUITE A
MOUNTAIN VIEW, CA 94041-1522, US

72 Inventor/es:
DEZAWA, Mari;
SAWADA, Hajime y
TAKANO, Masahiko

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 369 259 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Células de Schwann derivadas de células estrómicicas de médula ósea

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método *in vitro* para inducir la diferenciación de células estrómicicas de médula ósea en células de Schwann, a células de Schwann derivadas de células estrómicicas de médula ósea, a una composición farmacéutica para la regeneración neuronal que las comprende, y a un método para el tratamiento de enfermedades neuronales usando las células de Schwann y la composición.

Antecedentes de la técnica

10 Se cree que el daño al sistema nervioso, y particularmente al sistema nervioso central, incluyendo cerebro, médula espinal, y nervio óptico, es irreversible, conduciendo finalmente al proceso de degeneración. Los accidentes de tráfico y las lesiones deportivas, la isquemia, los tumores, la inflamación prolongada, la enfermedad degenerativa criptógena, y similares, están entre las causas de enfermedades neurológicas que se producen con una elevada incidencia entre la población, y son de importancia social urgente.

15 La irreversibilidad del daño del sistema central se atribuye al entorno neuroglial del tejido nervioso. El cerebro y la médula espinal tienen el mismo entorno neuroglial, que se describirá ahora usando el nervio óptico como un ejemplo de un nervio central.

20 1) En primer lugar, las fibras nerviosas sufren degeneración, y desaparecen gradualmente. Durante el proceso, las vainas de mielina que cubren los nervios también se degeneran, dejando restos celulares (véase la Fig. 1b). Las vainas de mielina formadas por oligodendrocitos contienen sustancias que inhiben fuertemente la regeneración y alargamiento de las fibras nerviosas⁽¹⁾.

25 2) Los astrocitos proliferan y se hacen más grandes, dando como resultado gliosis (véase Fig. 1b). Más específicamente, desplazan las fibras nerviosas, ocupando las localizaciones primarias e inhibiendo de ese modo físicamente la regeneración⁽²⁾. Los astrocitos que forman la gliosis presentan una morfología que contrasta considerablemente con la de los astrocitos normales, con un mayor número de procesos y formas intrincadamente complejas. Particularmente en el caso de lesión, el sitio de daño muestra numerosas capas de astrocitos apiladas ortogonalmente a la dirección de extensión de las fibras nerviosas y unidas juntas en sus procesos, que forman una estructura de barrera similar a una caperuza.

30 3) El procesamiento de los oligodendrocitos y sus sustancias de restos celulares, tales como mielina, después de la degeneración, es más lento en comparación con otros tejidos que se regeneran, tales como sistema nervioso periférico. La razón principal de esto es presumiblemente el grado muy bajo de infiltración de células inmunitarias periféricas, tales como macrófagos y monocitos, dando como resultado el procesamiento retrasado del residuo en las etapas tempranas.

Se han propuesto las siguientes explicaciones para la falta de regeneración de nervios ópticos.

35 1) Como se menciona anteriormente, los oligodendrocitos tienen un potente efecto inhibitor sobre la regeneración neuronal. Específicamente, se ha demostrado que la molécula Nogo, extraída de oligodendrocitos, es un inhibidor^(1,9). Los experimentos con sistemas en cultivo han mostrado que, durante la extensión de axones, los procesos que entran en contacto con las vainas de mielina de oligodendrocitos no solo detienen su extensión, sino que incluso retroceden (inhibición de contacto). Además, los axones no se extienden en áreas mielinizadas, y, en el cultivo, los procesos crecen para evitarlos.

40 2) Los astrocitos glióticos producen diversas sustancias inhibitoras, incluyendo proteoglicanos tales como sulfato queratina y sulfato de condroitina⁽³⁾.

45 3) Los nervios ópticos y todo el sistema nervioso central son silenciosos en exceso, incluso después de sufrir lesión. El sistema no está bajo vigilancia inmunitaria, y esto se considera en su lugar una desventaja para la regeneración. Por ejemplo, el sistema nervioso periférico descrito aquí más abajo difiere del nervio óptico incluso en la estructura de los neuroglia, y se ha comparado y estudiado como un sistema de regeneración, incluso aunque está compuesto del mismo tejido nervioso. Con la lesión del tejido nervioso periférico, las células inmunitarias, tales como macrófagos periféricos, se infiltran rápidamente (en unas pocas horas hasta un par de días) para procesar el residuo celular. Mientras tanto, se segregan citocinas en grandes cantidades, promoviendo la regeneración del tejido nervioso. Tal regeneración neuronal se produce en concierto con una cascada de fenómenos, conduciendo una reacción a otra, pero no se observa infiltración de macrófagos en el nervio óptico en las etapas tempranas. Esto se ha atribuido a la supresión de la actividad de macrófagos en el sistema nervioso central, incluyendo el nervio óptico⁽⁴⁾. Parece que esta función supresora surgió a fin de evitar la digestión macrofágica de redes neuronales centrales desarrolladas complejas. Por lo tanto, se ha conjeturado que la ausencia del primer desencadenante en los nervios ópticos es la que conduce a la degeneración en lugar de a la regeneración.

4) A fin de que se produzca la regeneración, es necesario un armazón estructural para inducir fibras nerviosas. Sin embargo, una vez que se ha producido la degeneración en los nervios ópticos, se pierde la ruta para la regeneración. En los nervios ópticos, cada oligodendrocito forma numerosas vainas de mielina sobre las fibras nerviosas, y los astrocitos rodean a las fibras mielinizadas y cubren a los haces de fibras no mielinizadas (véase la Fig. 2, parte inferior). La membrana basal está presente solo fuera de los astrocitos que forman la membrana limitante neuroglial, o en otras palabras, se puede considerar que todo el nervio óptico está dentro de una vaina de membrana basal única. En los nervios periféricos, la membrana basal sirve como una ruta para la regeneración. En consecuencia, una vez que se han degenerado las fibras nerviosas en el nervio óptico, ya no está presente la ruta que una vez existió para cada una de las fibras nerviosas.

Incluso los nervios periféricos, a diferencia de los nervios centrales, son capaces de regenerarse.

A diferencia de los nervios centrales, las células primarias de los nervios periféricos son células de Schwann. Todas las fibras nerviosas, ya estén mielinizadas o no mielinizadas, están cubiertas con células de Schwann (véase Fig. 2, parte superior). Las células de Schwann derivan de células de la cresta neural, mientras que los neuroglíocitos centrales (oligodendrocitos, astrocitos), que actúan de forma inhibitoria sobre la regeneración neuronal, derivan de tubos neurales, y por lo tanto las fuentes de diferenciación son diferentes.

Se cree que los nervios periféricos se regeneran de la siguiente manera.

1) Cuando los nervios periféricos sufren una lesión, tal como un corte, se produce la degeneración walleriana en el extremo periférico del sitio de la lesión (véase la Fig. 3). Las células de Schwann vuelven a un estado no diferenciado desde el tipo diferenciado formador de mielina, y entonces se activan para dividirse y proliferar, presentando una forma funicular. En los nervios periféricos, las fibras nerviosas individuales están rodeadas independientemente por células de Schwann, con el área externa cubierta por una membrana basal (véase la Fig. 2). Esto es, cada uno de los nervios reside dentro de una vaina de membrana basal separada. De este modo, incluso cuando se produce la degeneración, las células de Schwann activadas en la vaina de la membrana basal proliferan para formar una estructura funicular, proporcionando así un punto de apoyo para la reconstrucción de la red neural. Por lo tanto, la degeneración walleriana no es una degeneración en el sentido estricto, sino más bien la primera etapa hacia la regeneración.

2) Los macrófagos periféricos desempeñan un papel importante en el proceso de degeneración walleriana. Los macrófagos se infiltran rápidamente en el extremo periférico del sitio de lesión, procesando los restos de las fibras nerviosas degeneradas y la mielina (véase la Fig. 3), a la vez que también segregan citocinas, tales como IL-1, para activar las células de Schwann. Aunque no se pueden extraer conclusiones definitivas con respecto a la causa que induce la filtración de macrófagos, se han señalado a las propias células de Schwann como un candidato probable. En cualquier caso, se cree que las células de Schwann, activadas por las señales de macrófagos, sintetizan diversos factores indispensables para la regeneración, tales como el factor de crecimiento de nervios, que se explicará más abajo, y guían a la regeneración del nervio.

3) Las vainas de mielina de las células de Schwann tienen un bajo efecto inhibitorio⁽⁵⁾. Esto es una diferencia importante de la mielina de oligodendrocitos, que muestra un efecto inhibitorio. Además, se sabe que la composición de la proteína mielínica de las células de Schwann y de oligodendrocitos difiere.

De este modo, incluso cuando se lesionan, los neuroglíocitos centrales no vuelven a su estado diferenciado para sufrir diferenciación y proliferación, o alteran significativamente su forma, como lo hacen las células de Schwann de los nervios periféricos, sino que en su lugar mantienen su fenotipo relativamente diferenciado. Los nervios periféricos, por otro lado, se caracterizan por mostrar una respuesta rápida, muy flexible, a la lesión.

Se considera que las células de Schwann desempeñan el siguiente papel en la regeneración neural.

Las células de Schwann producen numerosos factores, y los segregan de manera difusa. Además, sus propias superficies de la membrana celular están cubiertas con una membrana basal, y están incluidos en ella componentes de la matriz extracelular. También se sabe que las moléculas de adhesión celular son expresadas en membranas de las células de Schwann, y se piensa que estos factores actúan como un conjunto para inducir la regeneración neural (véase Fig. 4).

1. Factores segregados

Se sabe que las células de Schwann producen muchos factores neurotróficos, entre los cuales los siguientes son los principales implicados en la regeneración: 1) la familia de neurotrofinas, que incluye el factor de crecimiento de nervios, el factor neurotrófico derivado del cerebro, neurotrofina 3, neurotrofina 4/5; 2) el factor neurotrófico ciliar; 3) la familia de FGF, que incluye el factor de crecimiento de fibroblastos ácido y básico; 4) la familia de insulina, que incluye el factor de crecimiento I y II similar a insulina; y 5) el factor de crecimiento transformante $\beta 2$ y $\beta 3$.

Estas neurotrofinas tienen efectos poderosos no solo sobre la supervivencia de las neuronas, sino también sobre el alargamiento de los axones, y similares. Otros factores también tienen efectos neurotróficos y efectos de

alargamiento de axones sobre los nervios, pero se considera que sus mecanismos de acción son autocrínicos, puesto que activan simultáneamente a las propias células de Schwann.

2. Componentes de la matriz extracelular

5 Estos incluyen fibronectina, laminina, colágeno tipo IV, y tenascina. Basándose en experimentos con sistemas cultivados, se cree que la fibronectina y la laminina desempeñan un papel de apoyo en la regeneración neural.

3. Moléculas de adhesión celular

Se ha identificado un gran número de moléculas de adhesión celular. La siguiente descripción se centrará en aquellas asociadas con las células de Schwann y la regeneración neural.

1) Superfamilia de inmunoglobulinas

10 NCAM (molécula de adhesión celular neural) y L1 son expresadas en membranas de las células de Schwann, y desempeñan papeles importantes como moléculas de adhesión durante el alargamiento de las fibras nerviosas a medida que entran en contacto con el armazón de las células de Schwann. Ambas están conectadas al citoesqueleto, y funcionan para mantener la forma de la célula, a la vez que también logran la activación intracelular a través del sistema de fosfato de inositol y la activación de canales de calcio. Además, MAG (glucoproteína asociada a mielina) es expresada entre células de Schwann después de que el alargamiento nervioso ha progresado
15 en cierto grado, y ha comenzado la remielinización de las fibras nerviosas.

2) Superfamilia de caderinas

20 Las caderinas son moléculas de adhesión celular dependientes de calcio, de las cuales se han identificado numerosos tipos. La caderina N está asociada particularmente con la regeneración neural. Al igual que NCAM y L1 de la superfamilia de inmunoglobulinas, esta molécula también desempeña un papel importante durante el alargamiento de las fibras nerviosas a medida que entran en contacto con y reconocen a células de Schwann.

3) Superfamilia de integrinas

25 Las integrinas son receptores celulares para los componentes de la matriz celular mencionados anteriormente. Son moléculas heterodiméricas compuestas de dos subunidades, α y β . Al igual que las cadherinas, también se piensa que están ligadas al citoesqueleto, y funcionan directamente en la transducción de señales entre células. Las células de Schwann expresan el subtipo $\alpha_6\beta_4$, que desempeña un papel en el proceso de remielinización durante la regeneración.

Numerosos investigadores han intentado en las pasadas décadas la regeneración de nervios centrales. Lo siguiente es un resumen de esos intentos.

30 1) La regeneración se ha logrado cortando porciones de nervios periféricos de la mano o del pie, y autoinjertándolas en los nervios centrales. De este modo, los nervios periféricos poseen presumiblemente un entorno que promueve la regeneración de nervios centrales. Tales estudios comenzaron con la investigación de Aguayo et al. en Canadá en 1983⁽⁸⁾.

35 2) Como se menciona anteriormente, los propios nervios centrales actúan para suprimir la regeneración neural. Se han publicado informes sobre los efectos inhibidores de proteínas relacionadas con mielina previamente conocidas, incluyendo el factor Nogo, que se describió en el año 2000 en la revista Nature⁽⁹⁾. Según varios informes, la introducción de anticuerpos frente a estos factores, para neutralizarlos, puede inducir cierto grado de regeneración en los nervios centrales.

3) La regeneración es promovida por los dos tipos siguientes de trasplante celular.

40 a) Reposición de neuronas degeneradas para reconstruir la red neural. Este enfoque emplea células madre neuronales y neuronas embrionarias.

45 b) Reconstrucción mediante trasplante de células capaces de inducir regeneración neural (neuroglíocitos), en lugar de reponer las neuronas actuales. Se ha intentado usar células de Schwann derivadas de nervios periféricos, neuroglíocitos derivados de nervios centrales, o ependimocitos derivados de nervios centrales, que tienen factores neurotróficos introducidos, células de soporte derivadas de nervios olfativos, células madre neuronales, y similares.

Ambos métodos tienen ventajas y desventajas, pero aún no se ha desarrollado ningún método revolucionario.

50 Los presentes inventores han estado implicados durante muchos años en el desarrollo de métodos de regeneración neuronal y restablecimiento de la función. Nos hemos centrado particularmente en un método que emplea células de Schwann que sostienen la estructura tisular de nervios periféricos como se describe en 3)-b) anteriormente. Las células de Schwann están presentes en nervios periféricos, y se ha demostrado que son capaces de inducir regeneración no solo de su propio tejido nervioso periférico, sino también del sistema nervioso central, que su

trasplante en sitios de lesión proporciona un punto de apoyo para regenerar fibras y conduce a la regeneración neural efectiva, y que la mielina, que es responsable de la transmisión neural por saltos como elemento indispensable para el funcionamiento normal de los nervios, también se puede reconstruir mediante trasplante de células de Schwann. También se ha confirmado en experimentos con animales que el trasplante de células de Schwann conduce a la regeneración de nervios ópticos cortados (sistema nervioso central).

No obstante, se encuentran diversas dificultades cuando se aplica a seres humanos el procedimiento relativamente simple de recoger células de Schwann en experimentos con animales. Por ejemplo, puesto que las células de Schwann están presentes en los nervios periféricos, es necesario extraer muestras de nervios de las manos o pies, y aislar las células, dejando de ese modo un daño en el donante después de la extracción. Como dificultad adicional, la capacidad proliferante limitada de células de Schwann derivadas de adultos requiere un mayor período de tiempo para el cultivo a gran escala. Además, las células de la cresta neural, que se cree que se diferencian en células de Schwann, solo se pueden extraer de nervios periféricos embrionarios.

Por lo tanto, esta situación ha necesitado la provisión de un sustituto de células de Schwann naturales que se pueda usar para el tratamiento de regeneración neural, y que se pueda obtener en grandes cantidades mediante cultivo.

Se han encontrado células madre neuronales en porciones del cerebro de adultos, y estas se diferencian en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, etc., del sistema nervioso (véase la Fig. 5). Sin embargo, solo hay un número muy pequeño de tales células madre, y es necesaria la craneotomía para obtenerlas. Además, investigación reciente ha demostrado, en contra de la teoría de las capas germinales, que algunos tipos de células pueden ser capaces de diferenciarse en tipos completamente diferentes (véase la Fig. 6). A día de la presentación de la presente solicitud, se ha sabido que las células estromáticas de médula ósea son células madre mesenquimatosas o células precursoras que no solo llevan a cabo una función de sostén hematopoyética, sino que pueden ellas mismas diferenciarse en osteoblastos, células endoteliales vasculares, células del músculo esquelético, adipocitos, células del músculo liso, y similares⁽¹⁰⁾; no obstante, no existe ninguna bibliografía que sugiera la posibilidad de que las células estromáticas de médula ósea puedan ser capaces de diferenciarse en células de Schwann derivadas de células de la cresta neural, ni se ha establecido ningún método para tal diferenciación o inducción.

A la luz de esta situación, se ha intentado la experimentación e investigación en la diferenciación e inducción de células de Schwann usando células estromáticas de médula ósea en lugar de células de la cresta neural, que son tan difíciles de obtener, como se menciona anteriormente. Las células estromáticas de médula ósea son fáciles de extraer mediante punción de médula ósea en pacientes ambulatorios, y tienen una elevada potencia de proliferación, y de este modo permiten el cultivo a gran escala en un período de tiempo relativamente corto.

Descripción de la invención

Como resultado de la experimentación repetida, los presentes inventores son los primeros en tener éxito induciendo la diferenciación de células estromáticas de médula ósea en células de Schwann con un grado elevado de eficiencia mediante una operación de múltiples etapas. Además, se confirmó que la regeneración real y alargamiento de los nervios se produjo al trasplantar las células de Schwann derivadas de células estromáticas de médula ósea, obtenidas mediante el método de inducción de la diferenciación, en nervios ópticos dañados (sistema nervioso central), y de este modo se ha completado la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para inducir a las células estromáticas de médula ósea a diferenciarse *in vitro* en células de Schwann derivadas de células estromáticas de médula ósea, que comprende las etapas de:

(1) recoger células estromáticas de médula ósea procedentes de médula ósea, y cultivar las células en un medio de cultivo esencial estándar suplementado con un suero;

(2) añadir un agente reductor al medio de cultivo, y cultivar después las células;

(3) añadir un agente inductor de la diferenciación, a saber, ácido retinoico, al medio de cultivo, y cultivar posteriormente las células; y

(4) añadir al medio de cultivo un agente que aumenta el AMP cíclico, o un análogo de AMP cíclico, a saber, forskolina, y un factor que estimule la diferenciación y supervivencia de neuroglíocitos, y cultivar posteriormente las células para obtener las células de Schwann derivadas de células estromáticas de médula ósea.

Las células de Schwann derivadas de células estromáticas de médula ósea obtenidas mediante el método mencionado anteriormente pueden estar comprendidas en una composición farmacéutica para la regeneración neural.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una ilustración de los cambios que se producen en neuroglíocitos del nervio óptico tras la lesión. Aquí, la Fig. 1a muestra el estado de un nervio óptico normal, y la Fig. 1b muestra el estado de un nervio óptico lesionado.

La Fig. 2 es una ilustración de las diferencias estructurales entre nervios periféricos y nervios centrales (incluyendo nervios ópticos).

La Fig. 3 es una ilustración de la degeneración walleriana de un nervio periférico. La fibra nerviosa normal está envainada por células de Schwann, y el exterior está cubierto además por una membrana basal continua (Fig. 3a). Con la lesión, el extremo periférico de la fibra nerviosa degenera en restos de mielina, que son procesados por macrófagos que se aproximan (Fig. 3b), y, tras el procesamiento de lo que queda, las células de Schwann activadas proliferan dentro del tubo de la membrana basal que queda (Fig. 3c), conduciendo la remielinización, para completar la fibra nerviosa regenerada (Fig. 3d). ("Peripheral Nerve injury and Repair", traducción supervisada por Y. Ikuta, Yodogawa Publications, Fig. 5.1, revisado 1991).

La Fig. 4 es un listado gráfico de factores neurotróficos asociados con células de Schwann. Las células de Schwann producen factores segregados, componentes de la matriz extracelular y moléculas de adhesión celular que trabajan en concierto para la regeneración.

La Fig. 5 es un diagrama esquemático para la diferenciación de células neurales.

La Fig. 6 es una ilustración de la diferenciación mediante la cual, contrariamente a la teoría de las capas germinales, ciertas células pueden ser inducidas en tipos celulares completamente diferentes.

La Fig. 7 es una composición de fotografías inmunofluorescentes en lugar de un dibujo, que muestra los rasgos de células estrómicadas de médula ósea antes de que se haya inducido la diferenciación.

La Fig. 8 es una composición de fotografías inmunofluorescentes en lugar de un dibujo, que muestra los rasgos de células de Schwann derivadas de células estrómicadas de médula ósea en comparación con células de Schwann naturales.

La Fig. 9 es una composición de micrografías (micrografía de contraste de fases) en lugar de un dibujo, que muestra los rasgos de células de Schwann derivadas de células estrómicadas de médula ósea obtenidas mediante el método de inducción de la diferenciación de la invención, en comparación con células de Schwann naturales.

La Fig. 10 es una composición de micrografías (micrografía de contraste de fases) en lugar de un dibujo, que muestra la morfología de células de Schwann derivadas de células estrómicadas de médula ósea obtenidas mediante el método de inducción de la diferenciación de la invención, y células obtenidas por el mismo método, omitiendo algunas de las etapas, en comparación con células de Schwann naturales y células estrómicadas de médula ósea naturales.

La Fig. 11 es un sumario, en forma de diagrama de flujo, del método de inducción de la diferenciación de la invención.

La Fig. 12 es un par de micrografías inmunohistológicas mediante láser confocal en lugar de un dibujo, que muestran la regeneración de un nervio óptico después del trasplante de células de Schwann derivadas de células estrómicadas de médula ósea, usando GAP43 como indicador.

La Fig. 13 es un par de micrografías inmunohistológicas mediante láser confocal en lugar de un dibujo, que muestran la regeneración de un nervio óptico después del trasplante de células de Schwann derivadas de células estrómicadas de médula ósea, usando FITC, TexRed y Alexa633 como indicadores.

La Fig. 14 es una micrografía inmunohistológica mediante láser confocal en lugar de un dibujo, que muestra la regeneración de un nervio ciático después del trasplante de células de Schwann derivadas de células estrómicadas de médula ósea, usando como indicador GAP43.

La Fig. 15 es un conjunto de micrografías inmunohistológicas mediante láser confocal en lugar de un dibujo, que muestran la regeneración de nervio ciático después del trasplante de células de Schwann derivadas de células estrómicadas de médula ósea, usando GFP, neurofilamento y MAG.

La Fig. 16 es un par de micrografías inmunohistológicas mediante láser confocal en lugar de un dibujo, que muestran la regeneración de nervio ciático después del trasplante de células de Schwann derivadas de células estrómicadas de médula ósea, usando GFP, neurofilamento y MAG.

La Fig. 17 es otro par de micrografías inmunohistológicas mediante láser confocal en lugar de un dibujo, que muestran la regeneración de nervio ciático después del trasplante de células de Schwann derivadas de células estrómicadas de médula ósea, usando GFP, neurofilamento y MAG.

La Fig. 18 es otro par de micrografías inmunohistológicas mediante láser confocal en lugar de un dibujo, que muestran la regeneración de nervio ciático después del trasplante de células de Schwann derivadas de células estrómicadas de médula ósea, usando GFP, neurofilamento y MAG.

Descripción detallada de la invención

Según un modo de la presente invención, se proporciona un método de inducción de células estrómicadas de médula ósea para que se diferencien *in vitro* en células de Schwann derivadas de células estrómicadas de médula ósea, que comprende las etapas de:

(1) recoger células estrictóicas de médula ósea procedentes de médula ósea, y cultivar las células en un medio de cultivo esencial estándar suplementado con un suero;

(2) añadir un agente reductor al medio de cultivo, y cultivar posteriormente las células;

5 (3) añadir un agente inductor de la diferenciación, a saber, ácido retinoico, al medio de cultivo, y cultivar posteriormente las células; y

(4) añadir al medio de cultivo un agente que aumenta el AMP cíclico, o un análogo de AMP cíclico, a saber, forskolina, un factor estimulante de la diferenciación y supervivencia de neuroglíocitos, y cultivar posteriormente las células para obtener las células de Schwann derivadas de células estrictóicas de médula ósea.

10 La densidad de las células en la etapa (1) puede ser 50% de confluencia, y las células se subcultivan preferiblemente hasta cuatro generaciones.

15 El medio de cultivo esencial estándar puede ser la modificación alfa de Eagle del Medio Esencial Mínimo (M4526, Sigma), y el suero puede ser suero fetal de ternera (14-501F, Lote nº 61-1012, BioWhittaker Co.). El suero se puede añadir a una concentración de 20%. El agente reductor es un reactivo de SH, y el reactivo de SH es preferiblemente β-mercaptoetanol (214-18, Lote nº MOM75820, Nacalay Tesque). La concentración del agente reductor puede ser 1 nM a 10 nM, preferiblemente 10 nM a 5 mM, y más preferiblemente 100 μM a 2 mM. El tiempo de cultivo en la etapa (2) puede ser 1 hora a 5 días, preferiblemente 12-48 horas, y más preferiblemente 18-30 horas. La concentración de reactivo mencionado anteriormente es la concentración en el medio de cultivo con la cual las células están en contacto directo (lo mismo para reactivos citados más abajo).

20 El agente inductor de la diferenciación es ácido retinoico (todo-trans) (R-2625, Sigma). La concentración del agente inductor de la diferenciación puede ser 0,001 ng/ml a 1 μg/ml, preferiblemente 1 ng/ml a 200 ng/ml, y más preferiblemente 10 ng/ml a 60 ng/ml. En la etapa (3), el medio de cultivo usado en la etapa (2) se puede intercambiar con medio reciente que contiene agente inductor de la diferenciación, después de que la etapa (2) se haya terminado. El medio de cultivo reciente es idéntico al medio de cultivo usado en la etapa (1), excepto que contiene el agente inductor de la diferenciación. El tiempo de cultivo para la etapa (3) puede ser 1 hora a 30 días, preferiblemente 12 horas a 7 días, y más preferiblemente 2-4 días.

25 El agente que aumenta el AMP cíclico, o análogo de AMP, es forskolina (344273, Calbiochem). La concentración del agente que aumenta el AMP cíclico o de análogo de AMP cíclico puede ser 0,001 ng/ml a 100 μg/ml, preferiblemente 100 ng/ml a 50 μg/ml, y más preferiblemente 1 μg/ml a 10 μg/ml.

30 El factor estimulante de la diferenciación y supervivencia de neuroglíocitos puede ser aquel seleccionado del grupo que consiste en neuregulina, factor de crecimiento AA derivado de plaquetas (396-HB, Peprotech EC, Ltd.), factor de crecimiento de fibroblastos básico (100-18B, Peprotech EC, Ltd.), o sus mezclas. La neuregulina está disponible como HeregulinTM (396-11B, R&D Corp.). La concentración del factor estimulante de la diferenciación y supervivencia de neuroglíocitos puede ser 0,001 ng/ml a 100 μg/ml, con un concentración de preferiblemente 0,1 ng/ml a 100 ng/ml, y más preferiblemente 1 ng/ml a 10 ng/ml para el factor de crecimiento AA derivado de plaquetas, y una concentración de preferiblemente 10 ng/ml a 1 μg/ml, y más preferiblemente 100 ng/ml a 300 ng/ml para el factor de crecimiento de fibroblastos básico. El tiempo de cultivo en la etapa (4) puede ser 1 hora a 30 días, y preferiblemente 4 a 10 días.

La invención se puede usar para proporcionar una composición farmacéutica para la regeneración neural, que comprende las células de Schwann derivadas de células estrictóicas de médula ósea.

40 La enfermedad neural puede ser tratada trasplantando las células de Schwann derivadas de células estrictóicas de médula ósea mencionadas anteriormente, o composición farmacéutica para la regeneración neural que las comprende, en un paciente con enfermedad neural, para provocar la regeneración de las células neurales con las que está asociada la enfermedad.

45 A lo largo de la presente memoria descriptiva, la expresión "células estrictóicas de médula ósea" se refiere a células en la médula ósea que no son del sistema hemopoyético y se consideran capaces de diferenciarse en células del hueso, cartílago, etc. Las células estrictóicas de médula ósea son positivas para Thy1.2 y (β1-integrina), y negativas para CD34, como se muestra en las fotografías inmunofluorescentes de la Fig. 7. Pueden ser positivas o negativas para S-100 (proteína de unión a calcio). Se usaron anticuerpos para Thy1.2, β1-integrina y CD34.

50 A lo largo de la presente memoria descriptiva, la expresión "células de Schwann naturales" se refiere a células de Schwann recogidas de los nervios periféricos de organismos vivos, a saber, ganglios de la raíz dorsal. Como se observa en la fotografía inmunofluorescente superior de la Fig. 8, son positivas para S-100.

55 A lo largo de la presente memoria descriptiva, la expresión "células de Schwann derivadas de células estrictóicas de médula ósea" se refiere a células de Schwann que (1) se asemejan mucho en morfología a las células de Schwann naturales, y no revierten a la forma de células estrictóicas de médula ósea por subcultivo, (2) muestran la misma reacción que las células de Schwann con respecto a P75 (receptor del factor de crecimiento de nervios (NGF), baja

afinidad), S-100, GFAP (proteína ácida fibrilar glial, un tipo de filamento intermedio), nestina (un tipo de filamento intermedio), y O4 (un marcador para células productoras de mielina, tales como células de Schwann y oligodendrocitos), basado en inmunotinción como se muestra en las fotografías inmunofluorescentes inferiores de la Fig. 8, y (3) tienen rasgos similares a las células de Schwann naturales en su capacidad neurogénica, pero se pueden distinguir de las células de Schwann naturales debido a sus historias de diferenciación distintas. Los anticuerpos para P75, S-100, GFAP, nestina y O4 se obtuvieron de las siguientes fuentes: anti-receptor del factor de crecimiento de nervios, Boehringer Mannheim, 1198645; anti-S-100, z-311, Dako Corp.; anti-proteína ácida fibrilar glial, L-1812, Dako Corp.; anti-nestina, BMS4353, Bioproducts; anti-O4, 1518925, Boehringer Mannheim.

La médula ósea se trató en múltiples etapas según la invención, como se muestra en la micrografía de la Fig. 9.

Las células estrómicas (fotografías derecha superior e inferior en la Fig. 9) muestran la misma morfología que las células de Schwann naturales (fotografía izquierda en la Fig. 9).

La Fig. 10 muestra la morfología de células estrómicas de médula ósea obtenidas mediante el método de inducción de la diferenciación de células estrómicas de médula ósea según la invención, sin las etapas (2) a (4) o algunos de los reactivos usados allí. La micrografía en la izquierda superior en la Fig. 10 muestra células de Schwann naturales. La micrografía en la derecha superior muestra células estrómicas de médula ósea antes del tratamiento. La micrografía central superior muestra los resultados mediante el método de inducción de la diferenciación de células estrómicas de médula ósea según la invención, llevado a cabo sin omisión de las etapas (2) a (4), y se observa que el método de la invención produjo células que muestran una morfología similar a las células de Schwann naturales. La micrografía en la derecha superior se obtuvo con omisión de la etapa (4), y las micrografías en la izquierda inferior y centro inferior se tomaron sin el agente inductor de la diferenciación ácido retinoico y sin forskolina en la etapa (3) y en la etapa (4), respectivamente.

De este modo, se demostró que el tratamiento de múltiples etapas descrito en las etapas (2) a (4), anteriormente, induce la diferenciación de células estrómicas de médula ósea en células de Schwann derivadas de células estrómicas de médula ósea con una eficiencia elevada.

La expresión "eficiencia elevada", como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva, significa que el método de inducción de la diferenciación de la invención convierte una proporción elevada de las células estrómicas de médula ósea originales en las células de Schwann finales derivadas de células estrómicas de médula ósea. La eficiencia elevada del método inductor de la diferenciación de la invención es 50% o mayor, preferiblemente 75% o mayor, más preferiblemente 90% o mayor, y de forma muy preferible 95% o mayor. Aunque se conoce cada una de las etapas individuales descritas anteriormente, la selección y combinación óptima de las etapas según la presente invención se descubrió por primera vez por los presentes inventores, y el descubrimiento es muy significativo. Específicamente, aunque se sabía que las células estrómicas de médula ósea son células madre mesenquimatosas o células precursoras que son capaces de ser inducidas para que se diferencien en osteoblastos, células endoteliales vasculares, células del músculo esquelético, adipocitos, células del músculo liso, y similares, como se explica anteriormente, no se sabía si las células estrómicas de médula ósea se podrían diferenciar realmente en células de Schwann derivadas de la cresta neural, y nadie había logrado con éxito esto a pesar del fuerte deseo de hacerlo. Los presentes inventores, aunque no desean estar constreñidos por ninguna teoría, conjeturan que el tratamiento con un agente reductor en la etapa (2) produce un choque en las células, mientras que el tratamiento con ácido retinoico en la etapa (3) devuelve a las células a las condiciones iniciales, después de lo cual el tratamiento con forskolina y un factor estimulante de la diferenciación y supervivencia de neuroglíocitos en la etapa (4) induce a la diferenciación de las células.

Las células estrómicas de médula ósea se pueden recoger y someter a tratamiento que implica múltiples etapas según la presente invención, para inducir su diferenciación en células que tienen los mismos rasgos que las células de Schwann naturales con respecto a la capacidad neurogénica, con eficiencia elevada. Trasplantando las células de Schwann derivadas de células estrómicas de médula ósea en el sistema nervioso periférico y central, ha sido posible inducir la regeneración y alargamiento de nervios lesionados.

Como se explica anteriormente, el hecho de que las células de Schwann naturales se deben de recoger de nervios periféricos presenta una dificultad para la aplicación a seres humanos. Por otro lado, las células estrómicas de médula ósea son fáciles de obtener, sin dañar el cuerpo humano. Además, puesto que las células tienen una tasa de crecimiento elevado, y por lo tanto se pueden suministrar rápidamente en grandes cantidades, la presente invención hace posible una aplicación más amplia de células estrómicas de médula ósea para una variedad de trastornos del sistema nervioso.

Otra ventaja importante proporcionada por las células estrómicas de médula ósea es su idoneidad para el trasplante autólogo. La recogida de las células estrómicas de médula ósea del propio sujeto, su inducción para que se diferencien, y el trasplante de las células diferenciadas en los nervios no produce reacción de rechazo, y por lo tanto no requiere inmunosupresores o similares, lo que debería de permitir que se logre la regeneración de una manera más estable. Puesto que las células estrómicas de médula ósea también se pueden obtener a partir de bancos de médula ósea, este método es también práctico desde el punto de vista del suministro.

Como será manifiesto mediante los ejemplos proporcionados más abajo, las células de Schwann derivadas de células estrómicadas de médula ósea obtenidas por la presente invención se consideran ampliamente aplicables para la regeneración de nervios periféricos o nervios centrales. Debido a sus diferentes historias de diferenciación inducida como se menciona anteriormente, son células modificadas artificialmente, que son distintas de las células de Schwann naturales. Se pueden proporcionar en forma de una composición farmacéutica para la regeneración neural. Las células de Schwann derivadas de células estrómicadas de médula ósea son adecuadas para el trasplante autólogo como se explica anteriormente, pero también se pueden trasplantar alogénicamente. Esto es debido a que las células del sistema nervioso no son susceptibles al ataque del sistema inmunitario, y por lo tanto se puede evitar la reacción de rechazo usando células donantes con antígenos de histocompatibilidad coincidente procedentes de un banco de médula ósea. La composición farmacéutica también puede contener vehículos, tampones, sales, excipientes, y similares, farmacéuticamente aceptables. La composición se puede inyectar directamente en el sitio afectado, o se puede introducir en un tubo hueco para el trasplante en el sitio de un nervio central o periférico dañado.

Aunque los nervios periféricos son capaces intrínsecamente de regenerarse, se sabe que no se pueden regenerar sobre saltos de varios centímetros; tales casos también se consideran incluidos entre las aplicaciones prácticas a nervios periféricos.

Las condiciones de los nervios centrales en las que se considera imposible la reconstrucción engloban una amplia gama de condiciones diferentes, incluyendo daño de la médula espinal relacionado con lesión, o daño cerebrovascular, y enfermedades que van desde el glaucoma con ceguera hasta enfermedades degenerativas, tales como Parkinson, que tienen una tasa de incidencia estimada elevada entre la población. La composición farmacéutica descrita aquí se puede usar para la regeneración de muchos y diversos tipos de nervios centrales. La investigación sobre métodos de regeneración neural para las condiciones mencionadas anteriormente es una necesidad social urgente, y se cree que la presente invención tiene aplicación directa para el cuerpo humano.

La invención se explicará ahora con mayor detalle a través de los siguientes ejemplos, entendiendo que los ejemplos de ningún modo son limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Diferenciación inducida de células estrómicadas de médula ósea en células de Schwann derivadas de células estrómicadas de médula ósea

La Fig. 11 es un resumen en forma de diagrama de flujo del proceso de tratamiento para inducir diferenciación.

Se extrajeron células estrómicadas a partir de la médula ósea de ratas adultas (ratas Wistar) y se cultivaron. El medio de cultivo usado fue Modificación Alfa de Eagle de Medio Esencial Mínimo, suplementado con 20% de suero fetal de ternero. Tras subcultivar hasta cuatro generaciones para alcanzar una confluencia del 50%, se añadió β -mercaptoetanol hasta una concentración de 1 mM a la disolución de cultivo, durante un período de 24 horas. El medio se cambió después por medio que contiene 35 ng/ml de ácido retinoico. Este último medio de cultivo fue también Modificación Alfa de Eagle de Medio Esencial Mínimo suplementado con 20% de suero fetal de ternero. Después de 3 días, el medio de cultivo se cambió nuevamente por medio que contiene 5 μ M de forskolina, 5 ng/ml de factor de crecimiento derivado de plaquetas AA, 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico, y 200 ng/ml de HeregulinTM. Las células se inmunotifieron después de 7 días. Basándose en la reacción con los anticuerpos para P75, O4, S-100, GFAP y nestina, las células mostraron reactividades equivalentes a las células de Schwann naturales (véase la Fig. 8). Las células estrómicadas de médula ósea se indujeron para ser morfológicamente similares a células de Schwann naturales (véase la Fig. 9).

Ejemplo 2: Regeneración de nervio central (nervio óptico dañado)

Las células obtenidas en el Ejemplo 1 se recogieron mediante tratamiento con tripsina, y se combinaron con matriz extracelular Matrigel derivada de tumor EHS de ratón (40234A, Collaborative Biomedical Products), y después se trasplantaron tras ser empaquetadas en tubos artificiales (cartucho de fibra hueca HIP10-43, Amicon), que se suturaron entonces a nervios ópticos dañados (sistema nervioso central) de ratas adultas (Wistar).

La Fig. 12 muestra los resultados del marcado con GAP43 (proteína 43 asociada al crecimiento, una proteína expresada durante el crecimiento y alargamiento de fibras nerviosas), 10 días después del trasplante. Las flechas azules indican los orígenes del injerto, y las flechas rojas indican las puntas de fibras que se regeneran. Se observa alargamiento significativo de fibras nerviosas con las células estrómicadas de médula ósea inducidas a diferenciarse (derecha), en comparación con las células estrómicadas de médula ósea sin tratar (izquierda). La distancia del alargamiento de las fibras nerviosas y el número de fibras aumentó con el número de semanas.

En la Fig. 13 se muestran los resultados en la tercera semana después del injerto. Aquí, FITC, mostrado en verde, es la detección inmunohistológica de fibras marcadas anterógradas obtenidas inyectando la subunidad B de la toxina del cólera en el cuerpo vítreo, a fin de marcar específicamente solo las fibras del nervio óptico, y muestra la regeneración de fibras nerviosas en los tubos artificiales. TexRed, mostrado en rojo, representa las células estrómicadas de médula ósea marcadas previamente con Brd-U. Alexa663, mostrado en azul, representa MAG

(glucoproteína asociada a mielina). Se observó regeneración de los nervios ópticos en los tubos artificiales empaquetados con células de médula ósea, y, al poner en contacto a estas con las células estrómicadas de médula ósea marcadas con Brd-U, se confirmó la formación de mielina.

Ejemplo 3: Regeneración de nervio periférico (nervio ciático)

- 5 Se dañaron los nervios ciáticos de ratas adultas (ratas Wistar), y se inocularon con tubos artificiales empaquetados con células estrómicadas de médula ósea a las que se les indujo para que se diferenciaron.

La Fig. 14 muestra los resultados con el marcado con GAP43 (proteína 43 asociada al crecimiento), 7 días después del trasplante. Las flechas azules indican los orígenes del injerto, y las flechas rojas indican las puntas de las fibras que se regeneran. Se observa que las fibras nerviosas están alargadas con las células estrómicadas de médula ósea a las que se indujo para que se diferenciaron (derecha), en comparación con Matrigel (matriz extracelular) sola (izquierda). La distancia del alargamiento de las fibras nerviosas y el número de fibras aumentó con el número de semanas.

En la Fig. 15 se muestran los resultados en la cuarta semana después del injerto. Aquí, GFP (proteína fluorescente verde), mostrada en verde, representa las células estrómicadas de médula ósea iluminadas introduciendo el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) usando un retrovirus. MAG, mostrado en azul, representa proteína de mielina, y neurofilamento, mostrado en rojo, representa fibras nerviosas regeneradas. La Fig. 15 muestra claramente la excelente regeneración del nervio ciático hacia la cuarta semana después del trasplante.

Las Fig. 16, Fig. 17 y Fig. 18 muestran los resultados de la regeneración de nervios ciáticos hacia la cuarta semana tras el trasplante. GFP, mostrada en verde, representa células estrómicadas de médula ósea iluminadas mediante introducción del gen de la proteína fluorescente verde; MAG, mostrada en azul, representa detección de la proteína de mielina MAG usando el marcador fluorescente Alexa633; y el Neurofilamento, mostrado en rojo, representa fibras nerviosas regeneradas, detectadas usando el marcador fluorescente rojo Alexa546. Las Figs. 16 a 18 indican claramente la regeneración total de los nervios ciáticos (nervios periféricos) hacia la cuarta semana después del trasplante. Esto es, se puede ver que las fibras regeneradas (neurofilamento) entraban en contacto con las células estrómicadas de médula ósea iluminadas en verde con GFP, y que las células estrómicadas de médula ósea expresan la proteína de mielina MAG para formar mielina.

Referencias

1. Schwab, ME *et al.*: Rat CNS myelin and a subtype of oligodendrocytes in culture represent a nonpermissive substrate for neurite growth and fibroblast spreading. *J Neurosci* 8: 2381-2393, 1988
2. Hall, S *et al.*: Electron microscopic study of the interaction of axons and glia at the site of anastomosis between the optic nerve and cellular or acellular sciatic nerve grafts. *J Neurocytol* 18: 171-184, 1989
3. Snow, DM *et al.*: Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite out-growth in vitro. *Exp Neurobiol* 109: 111-130, 1990
4. Blaugrund, E *et al.*: Disappearance of astrocytes and invasion of macrophages following crush injury of adult rodent optic nerves: implications for regeneration. *Exp Neurol* 118: 105-115, 1992
5. Bastmeyer, M *et al.*: Similarities and differences between fish oligodendrocytes and Schwann cells in vitro. *Glia* 11: 300-314, 1994
6. Vidal-Sanz, M *et al.*: Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci* 7: 2894-2909, 1987
7. Dezawa, M *et al.*: The role of Schwann cells during retinal ganglion cell regeneration induced by peripheral nerve transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 1401-1410, 1997
8. Aguayo, A. J. *et al.*: A potential for axonal regeneration in neurons of the adult mammalian nervous system. In *Nervous System Regeneration*, B. Haber, J. R. Perez-Polo, G. A. Hashim and A.M.G. Stella eds., p.327-340, Alan R. Liss, Nueva York, 1983
9. Chen, M. S. *et al.*: Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403: 434-439, 2000
10. Taito, M., professor, (Tohoku University), "Studies in establishing differentiation function maintaining cell lines and using them for reconstruction of biohistological function", NEDO 1999 Teian Kobo Jigyo Seika Hokoku: 97S09-003.

REIVINDICACIONES

1. Un método para inducir a las células estrómicas de médula ósea a que se diferencien *in vitro* en células de Schwann derivadas de células estrómicas de médula ósea, que comprende las etapas de:
- 5 (1) cultivar células estrómicas de médula ósea obtenidas de médula ósea en un medio de cultivo esencial estándar suplementado con un suero;
- (2) añadir un agente reductor a dicho medio de cultivo, y cultivar posteriormente dichas células;
- (3) añadir ácido retinoico a dicho medio de cultivo, y cultivar posteriormente dichas células; y
- (4) añadir a dicho medio de cultivo forskolina y un factor estimulante de la diferenciación, supervivencia y crecimiento, que actúa sobre nervios y neuroglíocitos, y cultivar posteriormente dichas células para obtener dichas células de Schwann derivadas de células estrómicas de médula ósea.
- 10 2. El método como se define en la reivindicación 1, en el que dicho medio de cultivo esencial estándar es un medio esencial mínimo modificado alfa de Eagle.
3. El método como se define en la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dicho suero es suero fetal de ternero.
- 15 4. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho agente reductor es un reactivo que contiene sulfhidrilo.
5. El método como se define en la reivindicación 4, en el que dicho reactivo que contiene sulfhidrilo es β -mercaptoetanol.
6. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de dicho agente reductor está entre 1 nM y 10 mM.
- 20 7. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tiempo de cultivo en la etapa (2) está entre 1 hora y 5 días.
8. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de dicho ácido retinoico está entre 0,001 ng/ml y 1 μ g/ml.
- 25 9. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tiempo de cultivo en la etapa (3) está dentro de 30 días.
10. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de dicha forskolina está entre 0,001 ng/ml y 100 μ g/ml.
11. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho factor estimulante de la diferenciación y supervivencia de neuroglíocitos se selecciona del grupo que consiste en neuregulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas AA, factor de crecimiento de fibroblastos básico, y sus mezclas.
- 30 12. El método como se define en la reivindicación 11, en el que dicha neuregulina es heregulina, un subtipo de la misma.
13. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de dicho factor estimulante de la diferenciación y supervivencia de neuroglíocitos está entre 0,001 ng/ml y 100 μ g/ml.
- 35 14. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tiempo de cultivo en la etapa (4) está dentro de 30 días.

Fig.1

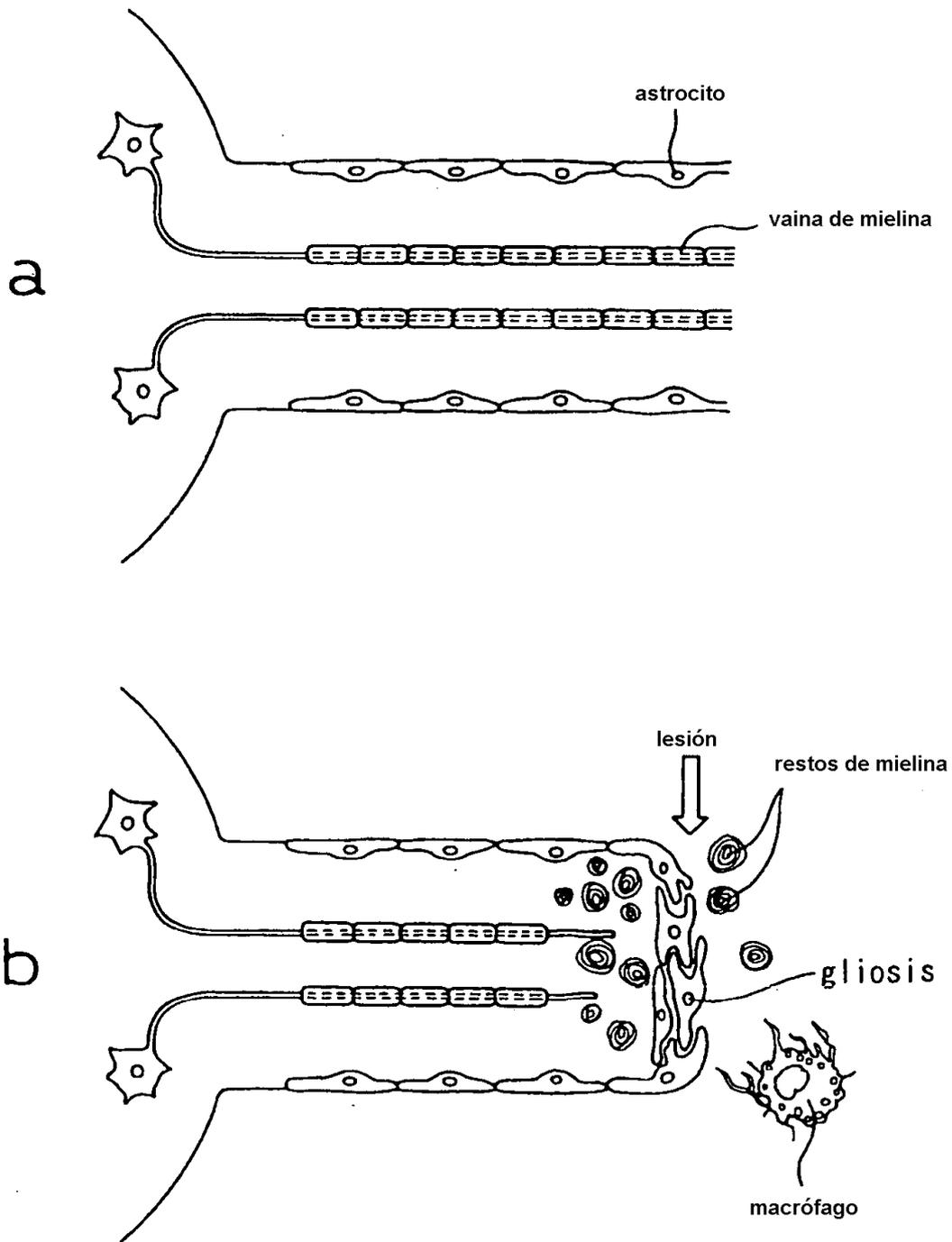
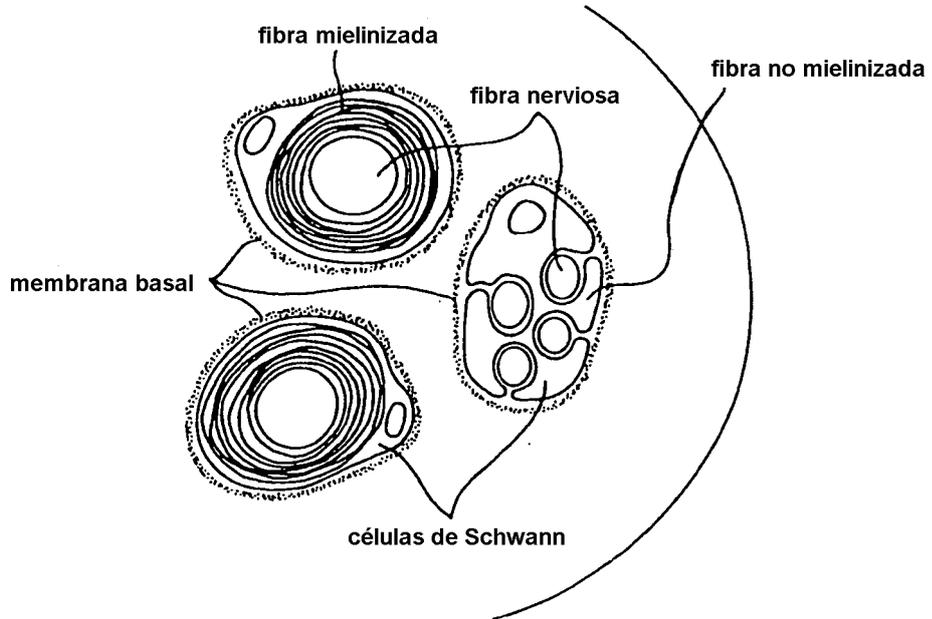


Fig.2

Sistema nervioso periférico



Nervio óptico

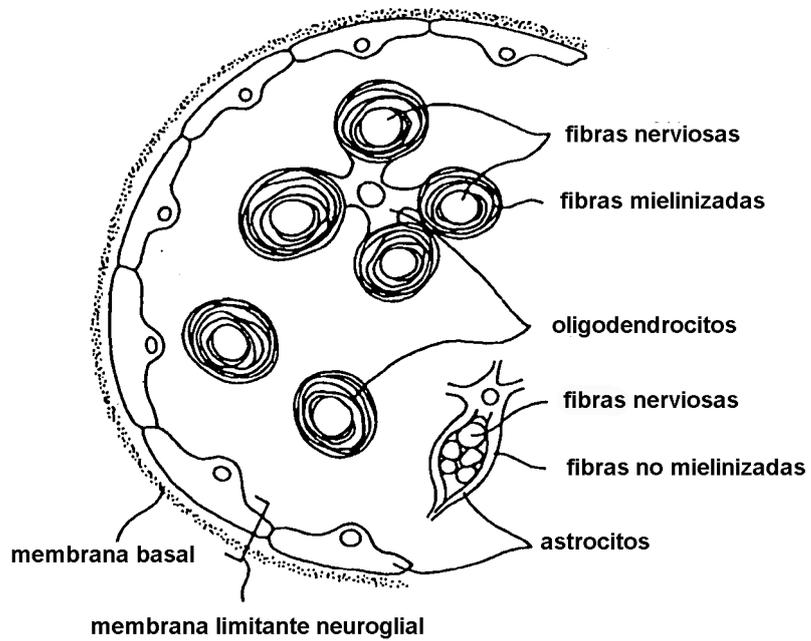


Fig.3

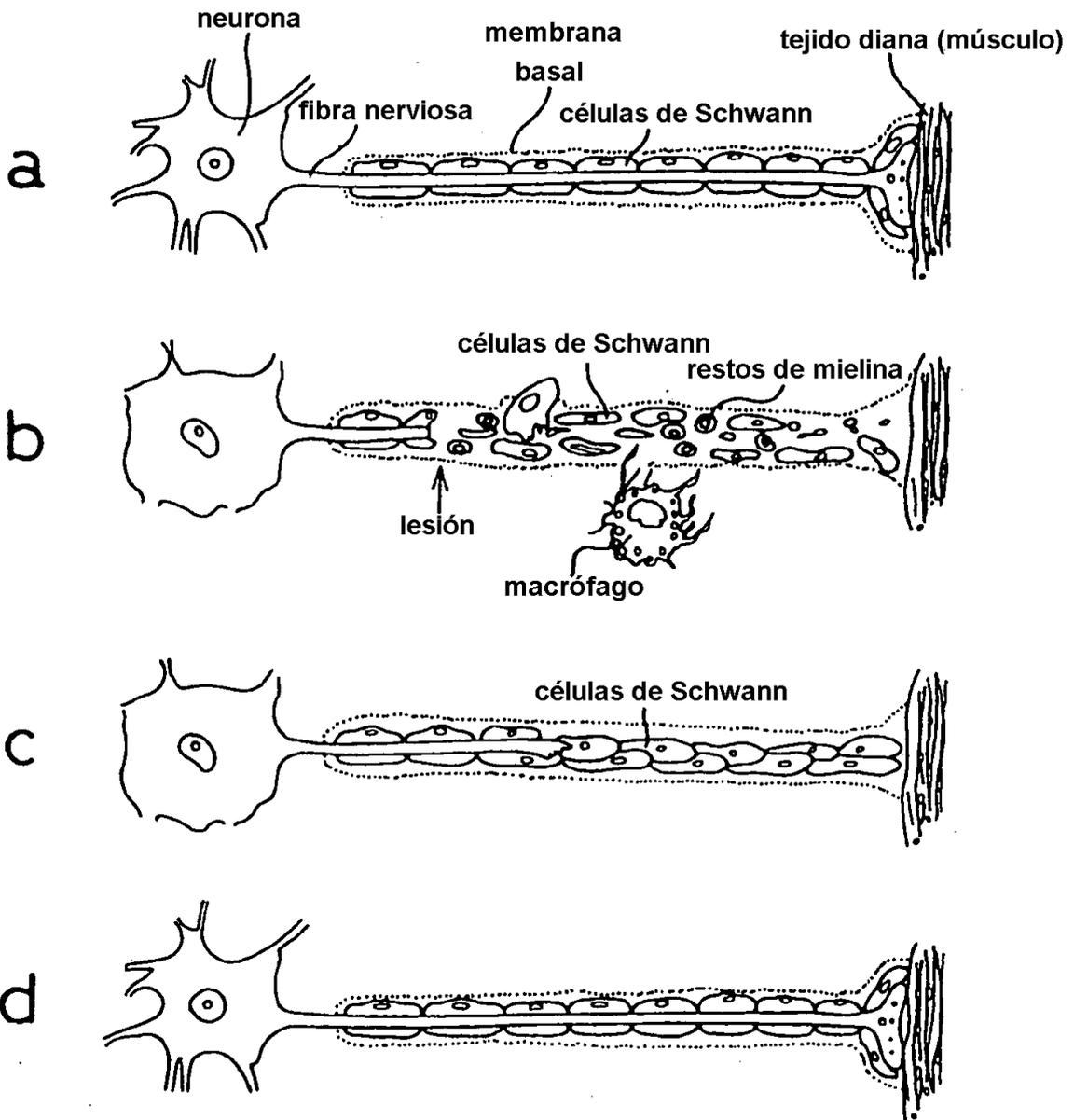


Fig.4

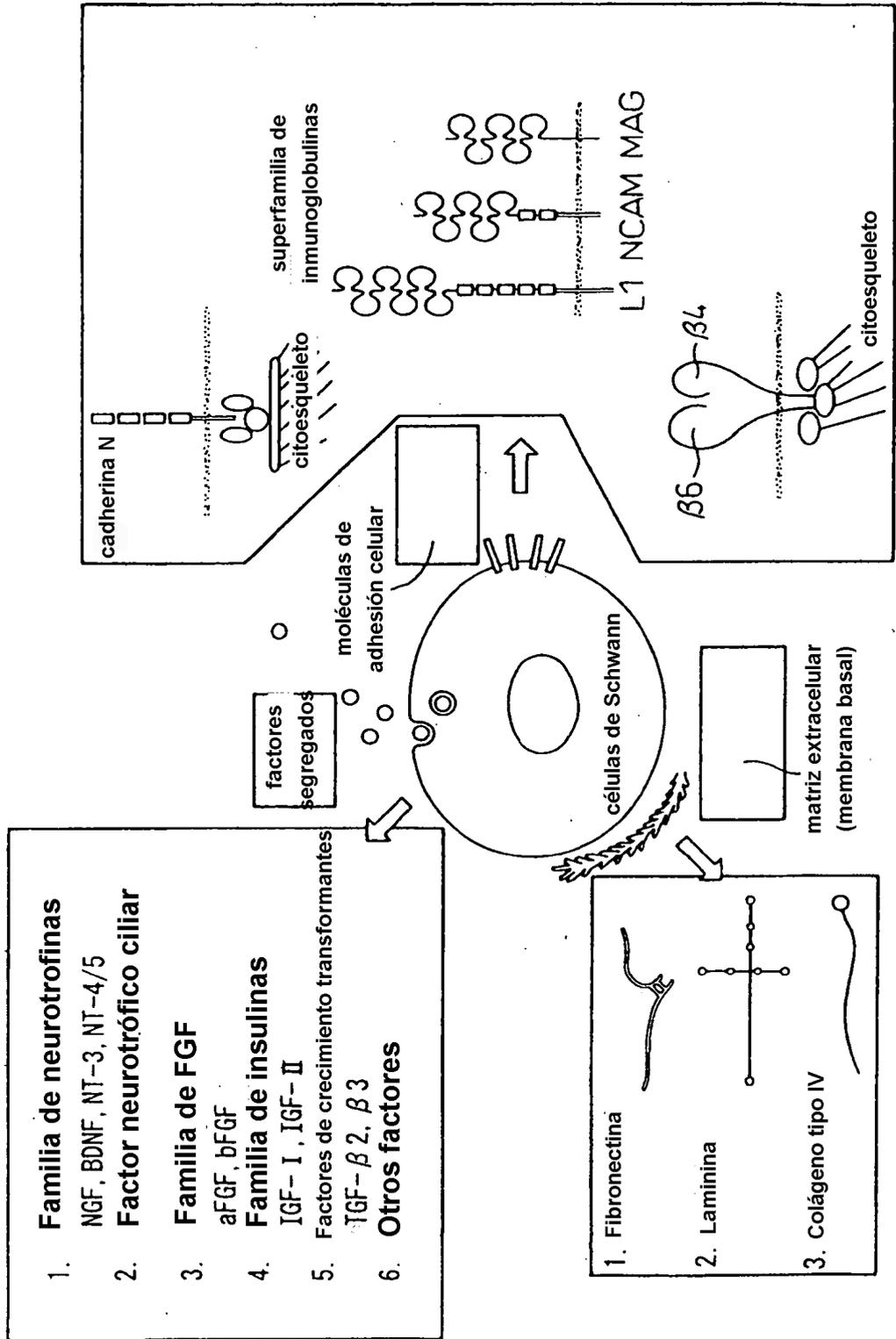


Fig.5

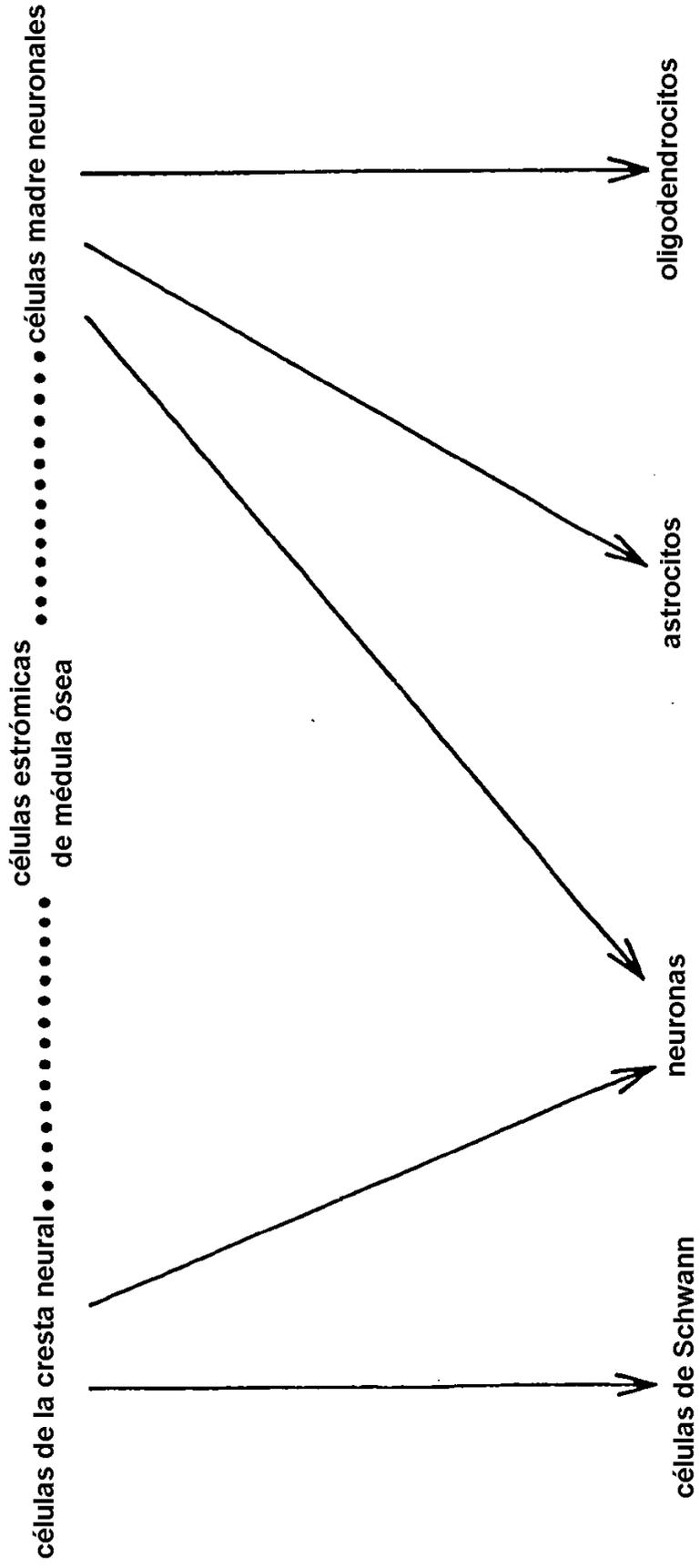


Fig.6

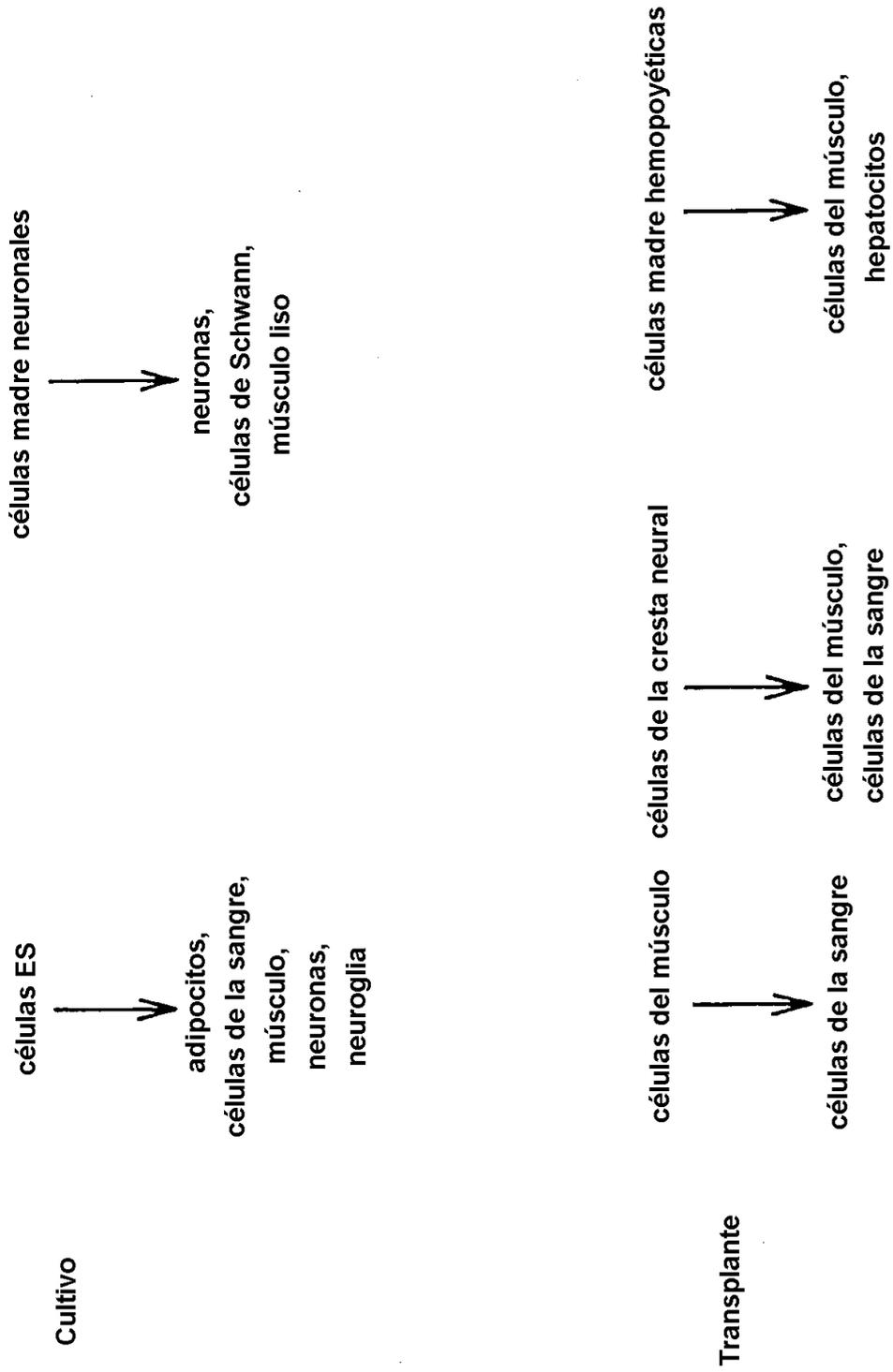


Fig.7

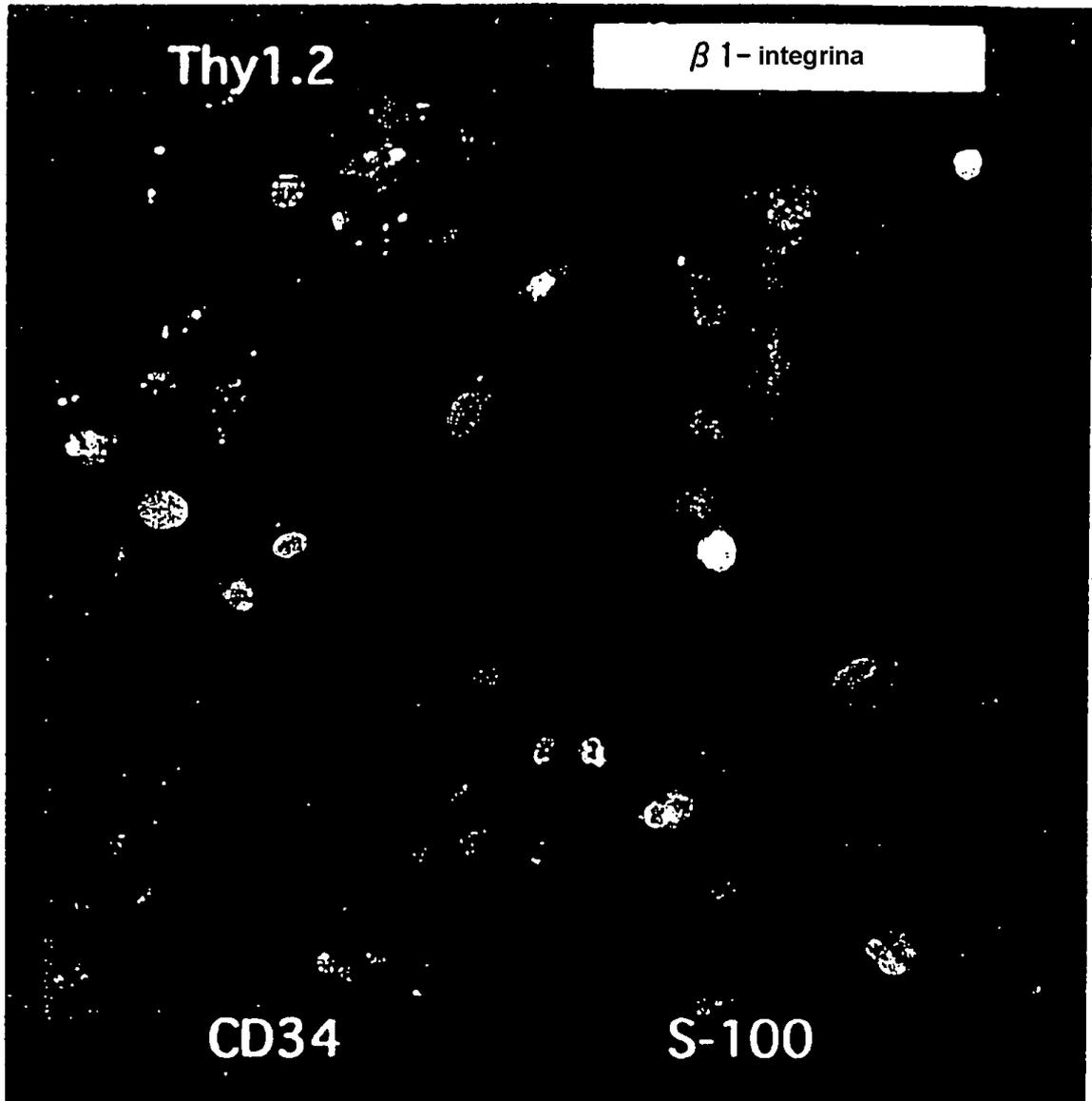


Fig.8

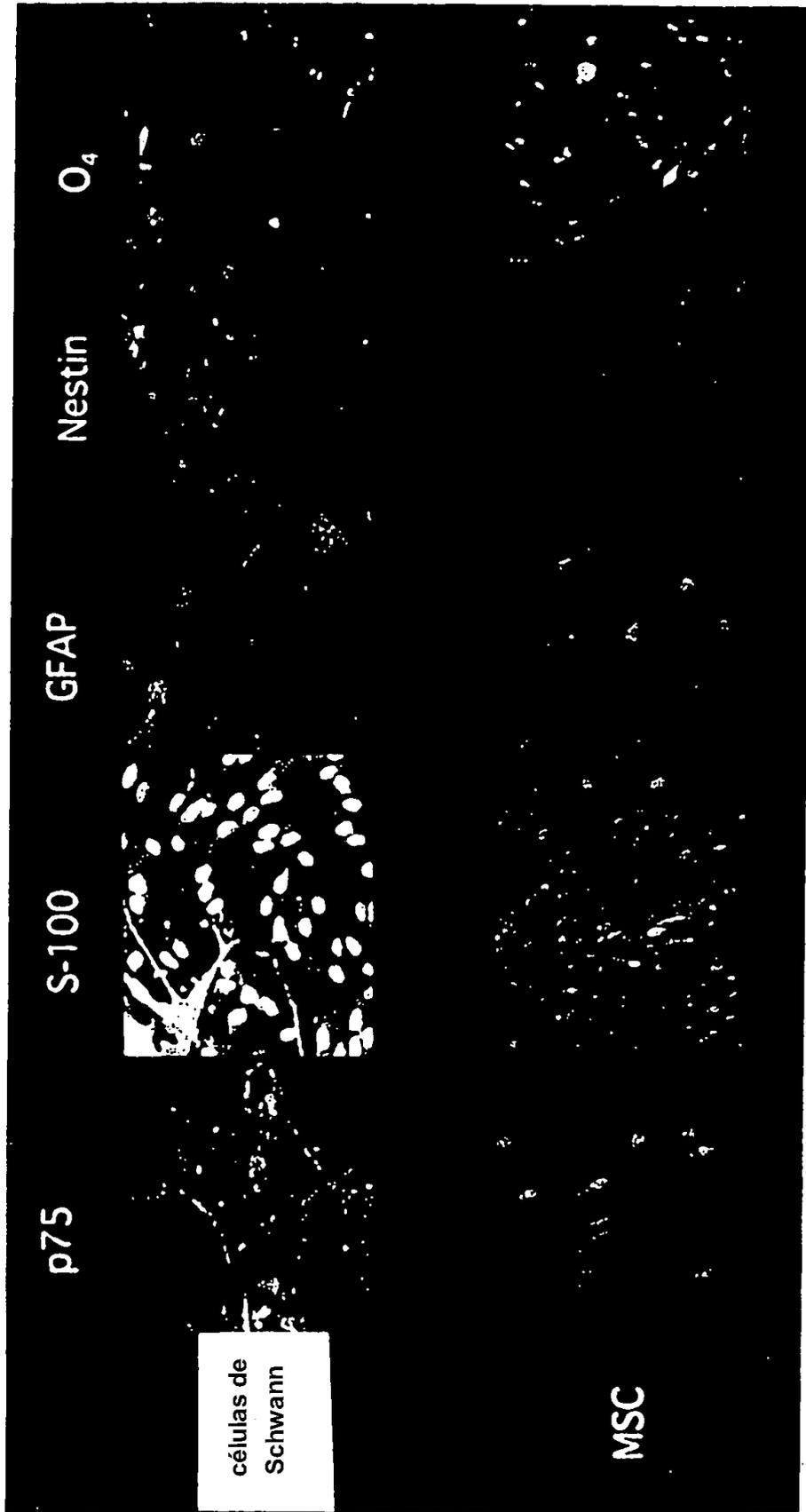


Fig.9

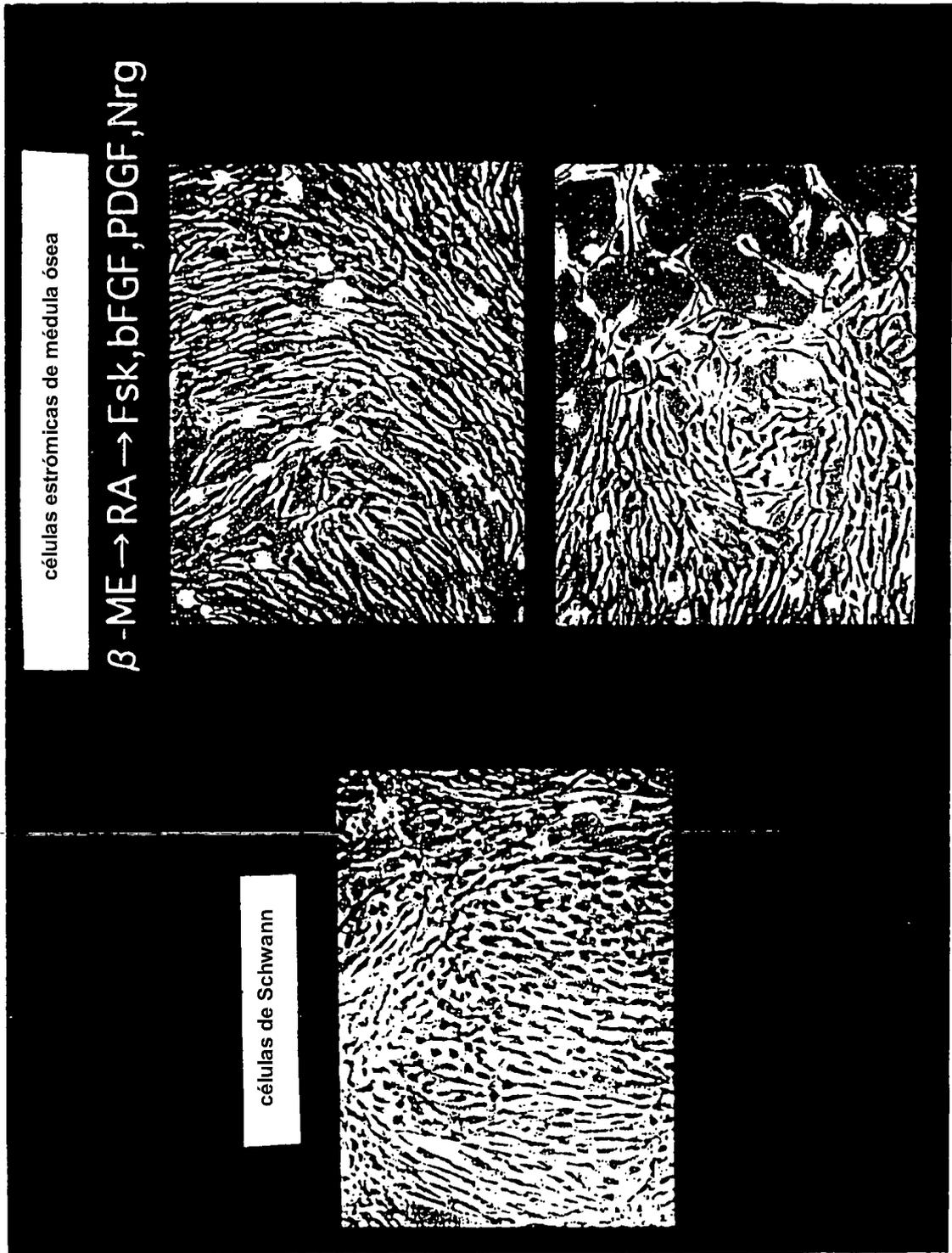


Fig.10

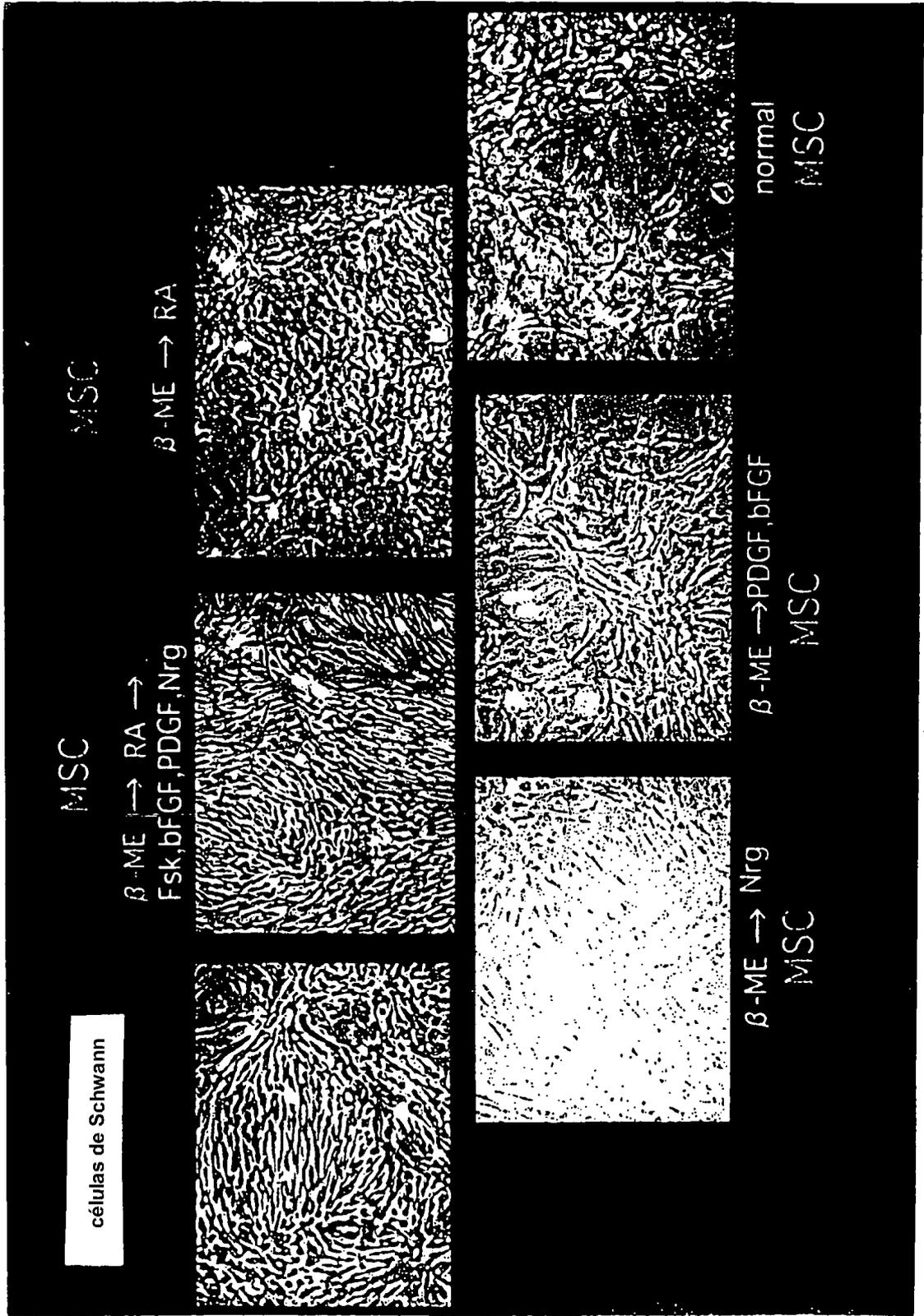


Fig.11

Recoger y cultivar células estrómicas procedentes de médula ósea de ratas adultas (raza Wistar)

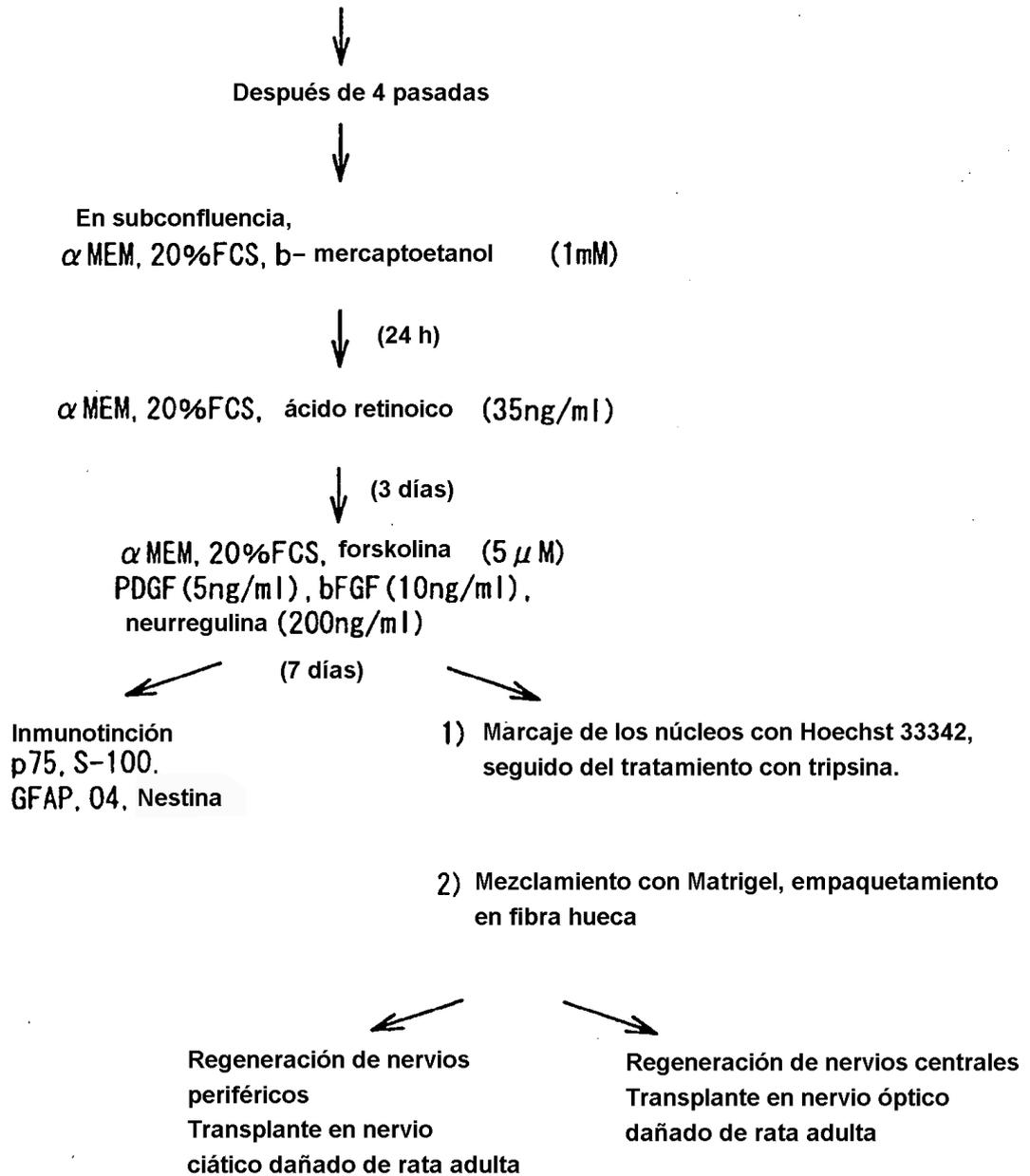


Fig.12

Transplante en nervio óptico dañado
(marcaje con GAP43 en el 10º día)

células estólicas de
médula ósea no tratadas

células estrómicas de médula ósea
inducidas a la diferenciación

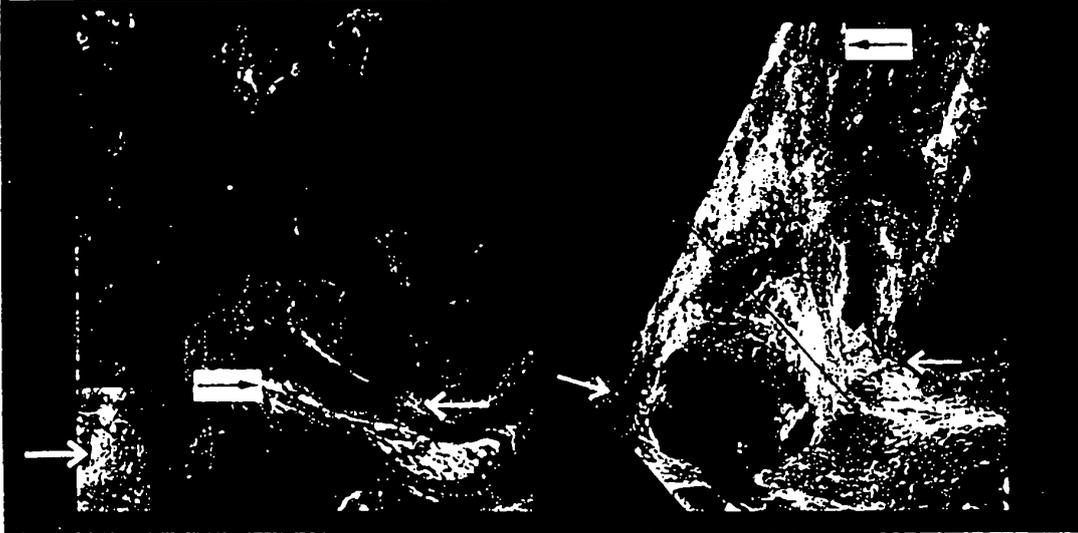


Fig.13

Nervio óptico - 3 semanas después del trasplante de células MSC



FITC: toxina del cólera TexRed:Brd-U-MSC Alexa633:MAG

Fig.14

Transplante en nervio ciático dañado
(marcaje con GAP43 en el 7º día)

células estrómicas de médula
ósea inducidas a la diferenciación

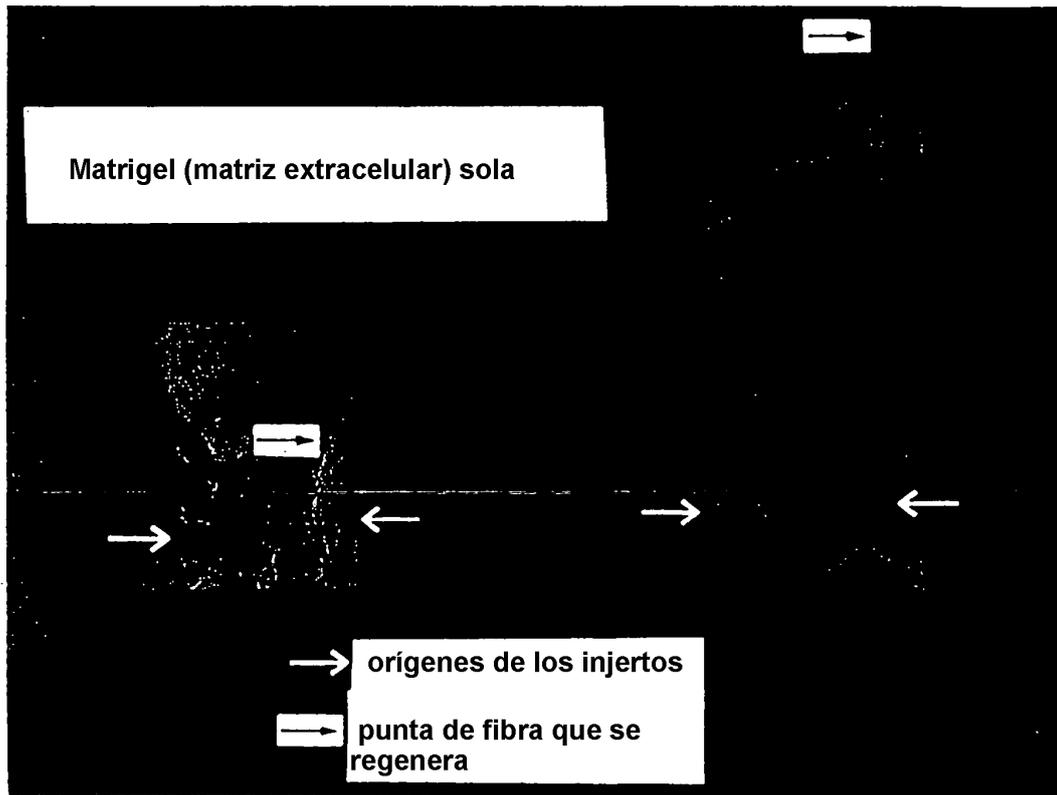


Fig.15

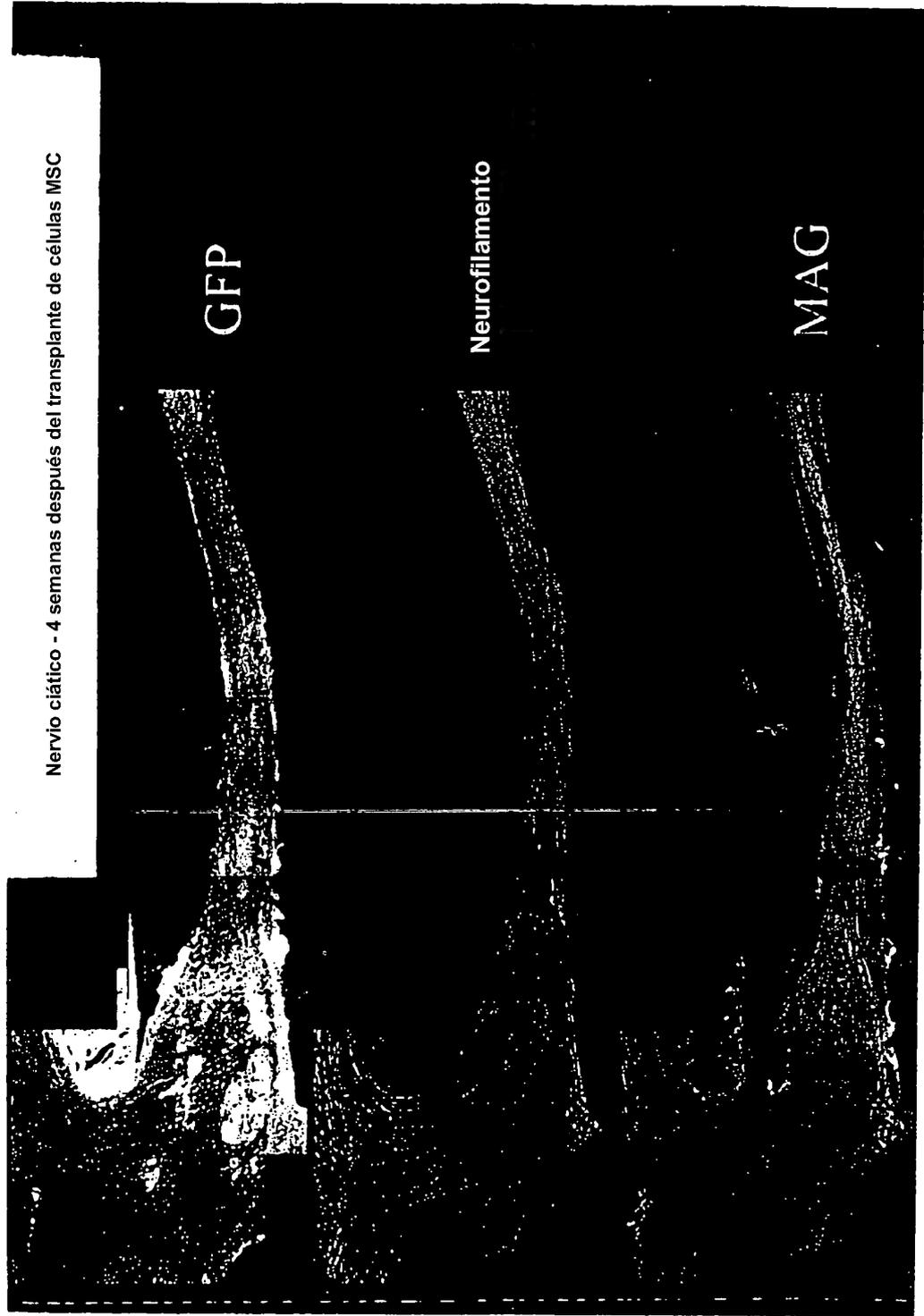


Fig.16

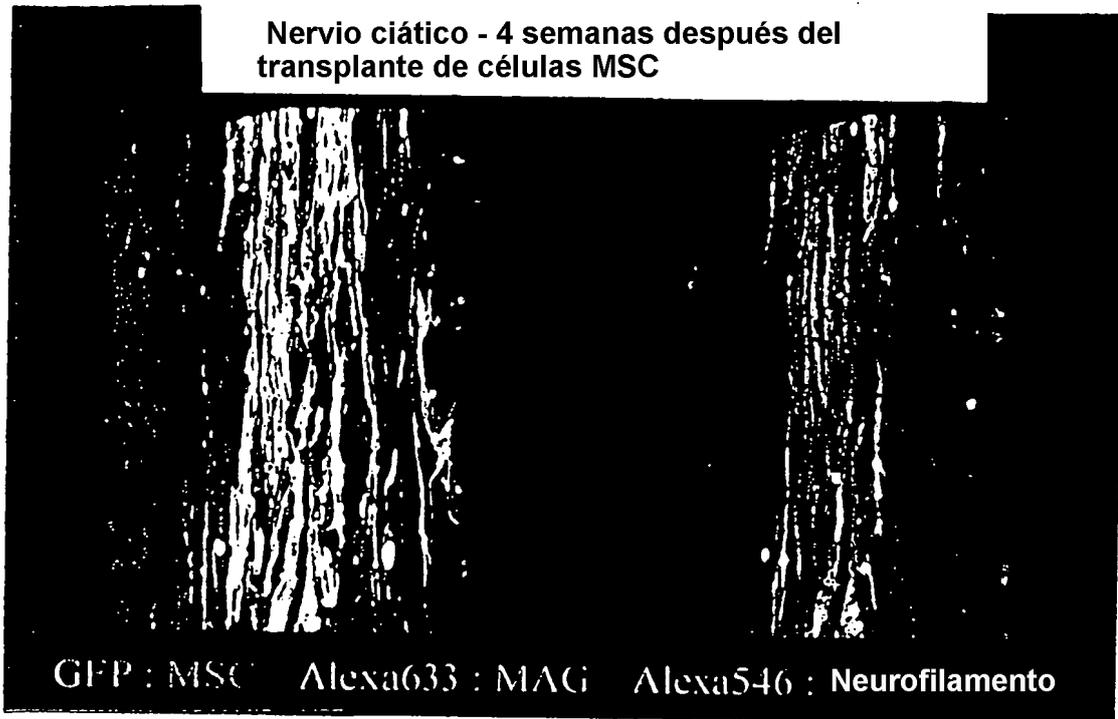


Fig.17

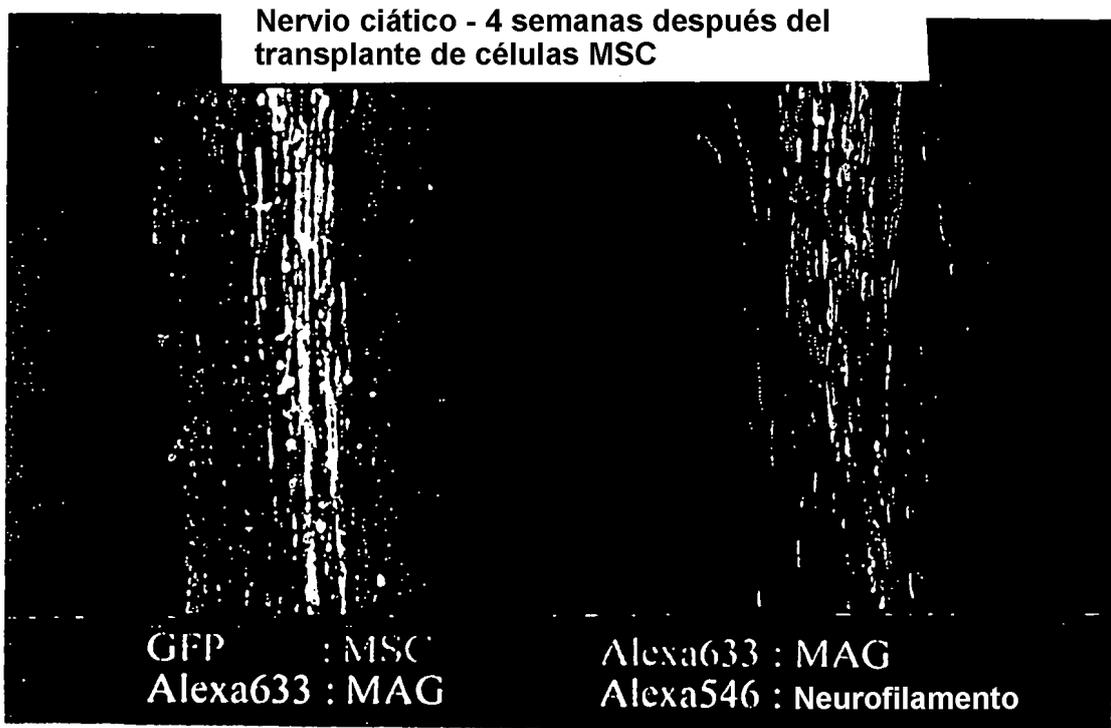


Fig.18

