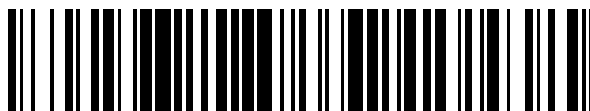


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 403**

51 Int. Cl.:
A61K 35/30 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08831016 .4**
- 96 Fecha de presentación: **04.09.2008**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2200621**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2010**

54 Título: **Procedimientos, composiciones farmacéuticas y artículos de fabricación para administrar células terapéuticas al sistema nervioso central animal**

30 Prioridad:
11.09.2007 US 971284 P
24.04.2008 US 109066

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.10.2012

73 Titular/es:
FREY II, WILLIAM H.
4800 CENTERVILLE ROAD APT. 216
WHITE BEAR LAKE, MINNESOTA 55127, US;
DANIELYAN, LUSINE y
GLEITER, CHRISTOPH H.

72 Inventor/es:
Frey II, William H.;
Danielyan, Lusine y
Gleiter, Christoph H.

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 388 403 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

Procedimientos, composiciones farmacéuticas y artículos de fabricación para administrar células terapéuticas al sistema nervioso central animal.

Antecedentes de la invención

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a células terapéuticas y composiciones farmacéuticas para administrar al tercio superior de la cavidad nasal de mamífero, permitiendo de este modo que las células terapéuticas eviten la barrera hemato-encefálica para prevenir y/o tratar el sistema nervioso central de mamífero dañado, en degeneración y/o lesionado.

10 Descripción de la técnica relacionada

Muchas afecciones neurológicas se producen por el daño en o la pérdida, es decir, muerte, de ciertas poblaciones celulares del sistema nervioso central mediante envejecimiento, enfermedad o lesión. Las células dañadas o destruidas en estas afecciones no están intrínsecamente sustituidas, por tanto, el sistema nervioso central está dañado y/o en degeneración con pérdida de función resultante. Pruebas recientes demuestran que la sustitución neuronal y la reconstrucción parcial del circuito neuronal es posible mediante terapias de trasplante celular. Gran parte del trabajo inicial en el campo ha usado terapias de células fetales. Sin embargo se ha demostrado más recientemente que el sistema nervioso de mamífero en desarrollo e incluso de adulto contiene una población de células madre neuronales multipotenciales no diferenciadas que presentan propiedades plásticas que son ventajosas para el diseño de estrategias regenerativas neuronales más eficaces para muchas de estas afecciones neurológicas.

Las afecciones, enfermedades y/o lesiones neurológicas que dan como resultado SNC dañado y/o en degeneración, es decir, muerte celular, comprenden enfermedad de Alzheimer, alteración cognitiva leve, alteración de la memoria asociada con la edad, enfermedad de Parkinson, enfermedad cerebrovascular que incluye ictus, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, esclerosis lateral amiotrófica familiar, demencia de cuerpos de Lewy, aterosclerosis, esquizofrenia, autismo, disquinesia tardía, esclerosis múltiple, trastornos de ataques, enfermedad de Wilson, parálisis supranuclear progresiva, síndrome de Hallervorden-Spatz, atrofia multisistémica, enfermedad de Huntington, degeneración ganglionar basal familiar, síndrome de Down, cataratas, hemocromatosis, talasemia, hemorragia cerebral, hemorragia subaracnoidea, lesión cerebral y lesión de médula espinal. Además, ciertos procedimientos médicos, por ejemplo, la cirugía de revascularización coronaria (CABG) están asociados con complicaciones neurológicas que dan como resultado daño y/o degeneración del sistema nervioso central y muerte celular concomitante. En el caso de CABG, la cirugía se realiza en más de 800.000 pacientes a nivel mundial cada año. Muchos de los procedimientos de CABG realizados están asociados con complicaciones neurológicas. Estas complicaciones varían desde ictus en hasta el 16% de los pacientes hasta deterioro cognitivo general teniendo el 50% de los pacientes alteración post-quirúrgica y teniendo lugar un deterioro progresivo en algunos pacientes a lo largo de los siguientes cinco años. Además en algunos pacientes de CABG se manifiesta un deterioro físico y conductual. Newman M F y col., N. Eng. J. Med. 344:395-402 (2001); Brillman J., Neurol. Clin. 11:475-495 (1993); Seines, O. A, Ann. Thorac. Surg. 67:1669-1676 (1999) son instructivos.

Se ha demostrado que las células madre neuronales sustituyen las células perdidas y que están muriendo y los circuitos neuronales perdidos en el SNC dañado y/o en degeneración en terapias de sustitución celular. Por ejemplo, el tratamiento de ratones con MPTP, un fármaco que destruye selectivamente las células dopaminérgicas en el tronco cerebral, seguido del injerto para una población de células madre neuronales, dio como resultado una población de células dopaminérgicas reconstituida compuesta de células tanto donadoras como huésped. Los estudios similares en ratones usando un modelo de lesión cerebral isquémica por hipoxia mostró que el trasplante de células madre neuronales aumentó la recuperación del sistema dañado (Park y col. (1999) J. Neurotrauma 16:675-687 y Park y col. (1997) Soc. Neurosci. Abst. 23:346). En pacientes con ictus, el trasplante de células de una línea celular neuronal humana mostró la mejora de la función neurológica. (Kondziolka D., y col., (2000) "Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke". Neurology. 55: 565-9). En un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer, el trasplante de células madre neuronales en las cortezas prefrontal y parietal alivió espectacularmente los déficits colinérgicos y la alteración de la memoria reciente asociada con EA. (Wang, Q., y col., (2006) "Neural stem cells transplantation in cortex in a mouse model of Alzheimer's disease". J Med Invest., 53: 61-9).

Además, en enfermedad de Parkinson, las neuronas que degeneran en el sistema nervioso central de mamífero comprenden las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. Las estrategias de sustitución de células actuales para pacientes con enfermedad de Parkinson avanzada comprenden injertos intra-cuerpo estriado de neuronas dopaminérgicas de sustancia negra de embriones humanos de 6 a 9 semanas de edad. Las mejoras clínicas se desarrollan gradualmente a lo largo de los primeros 6-24 meses después del trasplante (Olanow y col. (1996) Trends Neurosci. 19: 102-109 y Lindvall y col. (1999) Mov. Disord. 14:201-205). Se ha demostrado que los trasplantes de células madre de diferente origen, por ejemplo, hematopoyético, embrionario, dan como resultado varios beneficios

clínicos en pacientes con enfermedad de Parkinson grave (Freed, CR, y col. (Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. N Engl J Med 2001; 344: 710-719).

5 Se realizaron beneficios similares con pacientes con esclerosis múltiple progresiva (Ni XS, y col., (2006) "Autologous hematopoietic stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: report of efficacy and safety at three yr of follow up in 21 patients" Clin Transplant. 20: 485-9) (sugiriendo adicionalmente que el tratamiento de EM podría combinar la inmunomodulación con modalidades neuroprotectoras tales como terapia basada en células para conseguir el máximo beneficio clínico).

10 Además, el primer estudio de trasplante de cuerpo estriado de feto a adulto humano se ha realizado en tres pacientes sin demencia con enfermedad de Huntington moderadamente avanzada. La evaluación por formación de imágenes por resonancia magnética después de un año documentó la supervivencia y el desarrollo del injerto sin desplazamiento del tejido circundante. Todos los pacientes mejoraron en alguna medida en la función cognitiva (Kopyov y col. (1998) J. Exp. Neurol. 149:97-108). Véase también, Date y col. (1997) J. Exp. Neurol. 147: 10-17.

15 Cada uno de los modelos y procedimientos conocidos para terapias basadas en células terapéuticas requiere la intervención quirúrgica, es decir, trasplante de células madre neuronales usando técnicas de injerto invasivas y/o procedimientos de suministro sistémicos que no se dirigen a las áreas lesionadas del sistema nervioso central. Sería altamente ventajoso proporcionar células o una composición farmacéutica que proporcionaría célula terapéuticas incluyendo, pero sin limitación, células madre neuronales, de un modo no invasivo y altamente dirigido.

20 Por ejemplo, sería ventajoso suministrar tales células terapéuticas al sistema nervioso central en degeneración de tal forma que se evitara la exposición sistémica. Ninguna composición farmacéutica conocida actualmente proporciona tales ventajas. La presente invención proporciona células terapéuticas para aplicar al tercio superior de la cavidad nasal, evitando de este modo la barrera hemato-encefálica y administrando las células terapéuticas y otros compuestos directamente al sistema nervioso central.

25 Ciertas realizaciones de la presente invención comprenden antibióticos nasales y/o mucosales para ayudar a proteger al paciente sujeto de que las bacterias nasales migren a lo largo de la ruta neural seguido de las células terapéuticas y/o el compuesto farmacéutico aplicados. Tales antibióticos se conocen bien cuando se aplican tópicamente pero ninguno se administra como un pre-tratamiento, co-tratamiento y/o post-tratamiento, por vía sistémica y/o intranasal, junto con aplicación intranasal de células terapéuticas y/o compuesto farmacéutico.

30 Por ejemplo, en un estudio, la mupirocina untada en el interior de la nariz corta las tasas de infección a la mitad o superior. *Staphylococcus aureus* es un germen ampliamente distribuido que reside normalmente en los orificios nasales de aproximadamente el 25 al 30% de todos los pacientes hospitalizados sin causar daño. Pero esta bacteria puede contaminar los sitios quirúrgicos, causando infecciones graves y con frecuencia mortales, especialmente en personas con sistemas inmunes debilitados.

35 Otro estudio encontró que el xilitol nasal, un remedio sin receta vendido en herbolarios, puede reducir las bacterias nasales y su capacidad de agarrarse a e infectar células en la mucosa nasal. Otros estudios adicionales han encontrado que las defensas, un antibiótico natural encontrado en la mucosa en el ser humano, pueden proteger contra infección bacteriana y aumentar la función protectora inmune. Las defensas de mamífero son pequeños péptidos antimicrobianos catiónicos codificados por el huésped que se considera que son efectores de tipo antibiótico importantes de la inmunidad innata. Usando receptores de quimiocina en células dendríticas y linfocitos T, las defensas también pueden contribuir a la regulación de la inmunidad adaptativa del huésped contra invasión microbiana. Las defensas tienen considerable actividad adyuvante inmunológica y el enlace de las beta-defensas o quimiocinas seleccionadas a un antígeno de linfoma idiotípico ha proporcionado vacunas antitumorales potentes. El solapamiento funcional entre las defensas y las quimiocinas se refuerza por informes de que algunas quimiocinas tienen actividades antimicrobianas. Aunque muestran similitud en actividad y estructura terciaria global, la relación evolutiva entre las defensas y las quimiocinas todavía se tiene que determinar. (De Yang, y col., Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. Trends Immunol. Jun 2002; 23 (6): 291-6 12072367).

45 Además, se sabe bien que los agentes reguladores que comprenden factores tróficos y de crecimiento tales como la eritropoyetina (EPO), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factor de crecimiento de nervios (NGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) desempeñan un papel crucial en la supervivencia y diferenciación *in vitro* e *in vivo* de células madre (Erickson y col., Roles of insulin and transferring in neural progenitor survival and proliferation. J Neurosci Res. 2008 Feb 21; Bossolasco y col., Neuroglial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. Exp Neurol. 2005 Jun; 193(2): 312-25). La mayor supervivencia de células trasplantadas quirúrgicamente se mostró en el caso de aplicación simultánea de EPO (Kanaan y col., Exogenous erythropoietin provides neuroprotection of grafted dopamine neurons in a rodent model of Parkinson's disease. Brain Res. 12 ene 2006; 1068(1): 221-9). Sin embargo, no se sabe cómo introducir tales factores o agentes reguladores junto con la aplicación intranasal de células terapéuticas y/o composiciones farmacéuticas de las mismas al tercio superior de la cavidad nasal, evitando de este modo la barrera hemato-encefálica.

Además, se sabe bien que los agentes reguladores que comprenden diversos factores de crecimiento incluyendo factor de crecimiento de tipo insulina factor-I (IGF-I), factor de crecimiento de nervios (NGF) y factor de crecimiento

de fibroblastos básico (bFGF), regulan la supervivencia y la diferenciación de células nerviosas durante el desarrollo de los sistemas nervioso periférico y central. Los agentes reguladores tales como neurotrofinas también se requieren para el crecimiento de nervios durante el desarrollo (Tucker y col. (2001) *Nature Neurosci.* 4: 29-37). En el sistema nervioso maduro, estos factores tróficos mantienen las características morfológicas y neuroquímicas de las células nerviosas y refuerzan las conexiones sinápticas funcionalmente activas. Tales factores reguladores encuentran uso en la mejora de los procedimientos de terapias de sustitución celular de acuerdo con la presente invención.

Por ejemplo, el bFGF mejora la supervivencia y el crecimiento de neuronas *in vitro*. Además, el bFGF produce un potente efecto de promoción del crecimiento sobre neuronas implantadas *in vivo* cuando las neuronas implantadas están modificadas genéticamente para expresar el bFGF (Takayama y col. (1995) *Nat. Med.* 1: 53-8). Además, el implante de barras bioactivas basadas en polímero que secretan factor de crecimiento epidérmico y bFGF en tejido mesencefálico ventral fetal trasplantado da como resultado tanto características funcionales mejoradas como supervivencia celular aumentada (Tornqvist y col. (2000) *Exp. Neurol.* 164: 130-138).

También se ha demostrado que el factor de crecimiento de nervios (NGF) influye en el tejido injertado en el SNC. Por ejemplo, la afinidad de ChAT, un ensayo indicativo de la actividad de células colinérgicas, estaba significativamente elevada en neuronas colinérgicas que se trasplantaron en tejido cerebral que contenía un microgránulo liberador de NGF adyacente a las células injertadas (Mahoney y col. (1999) *Med. Sci.* 96: 4536-4539). También se ha demostrado que el IGF-I promueve la diferenciación de células madre neuronales de SNC de mamífero post-mitóticas e influye en la apoptosis de células progenitoras eritroideas humanas. Véase, por ejemplo, Arsenijevic y col. (1998) *J. Neurosci.* 18: 2118-2128; Tanigachi y col. (1997) *Blood* 90: 2244-2252; Reboarcetetal. (1996) *J. Biol. Reprod.* 55: 1119-1125; Muta y col. (1994) *J. Clin. Invest.* 94: 34-43; and, Muta y col. (1993) *J. Cell. Phys.* 156: 264-271. Adicionalmente, se ha demostrado que ciertas proteínas asociadas al crecimiento tales como GAP-43 y CAP-23 actúan promoviendo la regeneración de axones lesionados y pueden respaldar la regeneración en la médula espinal y el SNC. Véase, por ejemplo, Bomze y col. (2001) *Nature Neurosci.* 4: 38-43 y Woolf y col. (2001) *Nature Neurosci.* 4: 7-9.

La administración de agentes reguladores como un medio de mejora del resultado clínico de un mamífero que se ha sometido a una estrategia regenerativa neuronal, es decir, basada en células terapéuticas, sin embargo, se ha encontrado con dificultades. Generalmente, estos agentes no se pueden administrar por vía sistémica. Además muchos de estos agentes reguladores no cruzan de forma eficaz la barrera hemato-encefálica. La administración intracerebroventricular, aunque es posiblemente un procedimiento eficaz para suministrar agentes reguladores, es una técnica invasiva que no se prefiere en un entorno clínico. El implante de polímeros que contienen agentes reguladores también es invasivo y está además limitado por el radio relativamente pequeño que rodea el implante polimérico en el que el agente regulador es capaz de provocar un efecto. Adicionalmente, aunque se ha realizado modificación genética de las células trasplantadas para expresar agentes reguladores, la transfección estable y la supervivencia de las células después del implante continúa siendo problemática.

Sumario de la invención

Los problemas que se han mencionado anteriormente se resuelven, entre otras cosas, mediante las células terapéuticas de acuerdo con la reivindicación 1 y la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11. Las células terapéuticas de acuerdo con las reivindicaciones dependientes 2-10 y la composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones dependientes 12-15 representan realizaciones preferentes de la invención.

Dada la situación que se ha descrito anteriormente existe una necesidad de células terapéuticas y/o composiciones farmacéuticas para su uso en el suministro eficaz y no invasivo al sistema nervioso central dañado y/o en degeneración.

La presente invención se refiere, entre otras cosas, a la prevención y/o el tratamiento del sistema nervioso central dañado y/o en degeneración debido a una enfermedad u otra afección que causa la pérdida o muerte de células del SNC. Específicamente, la presente invención proporciona células terapéuticas, una composición farmacéutica y un artículo de fabricación para su uso en el transporte de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una célula terapéutica al SNC mediante aplicación intranasal al tercio superior de la cavidad nasal, evitando de este modo la barrera hemato-encefálica y eludiendo la exposición sistémica indeseada así como procedimientos de suministro invasivos.

Diversas realizaciones de la presente invención comprenden la prevención intranasal, pre-tratamiento, post-tratamiento y/o como un componente de la composición farmacéutica que comprende células terapéuticas de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente o agentes de mejora del suministro para mejorar el suministro de la célula terapéutica o células terapéuticas al SNC. Otras realizaciones más comprenden al menos un antibiótico aplicado por vía intranasal y/o por vía sistémica como un pre-tratamiento, un co-tratamiento (administrado simultáneamente o como un componente de la composición terapéutica que comprende células terapéuticas) y/o un dispositivo de post-tratamiento para proteger al paciente durante la terapia de células terapéuticas. Otras realizaciones más comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente regulador para administrar al tercio superior de la cavidad nasal de mamífero como un pre-tratamiento, post-tratamiento y/o como parte de la composición farmacéutica que comprende las células terapéuticas. Otras realizaciones más comprenden

al menos un agente inmunosupresor aplicado por vía intranasal y/o por vía sistémica como un pre-tratamiento, un co-tratamiento (administrado simultáneamente o como un componente de la composición terapéutica que comprende células terapéuticas) y/o un dispositivo de post-tratamiento para mejorar la viabilidad de las células terapéuticas *in vivo* durante la terapia con células terapéuticas. La presente invención encuentra uso en la mejora del resultado clínico de un mamífero que se ha sometido a una estrategia regenerativa neuronal que comprende la evitación de la barrera hemato-encefálica de células terapéuticas transportadas directamente al SNC del mamífero.

Diversas realizaciones de la invención se refieren a células terapéuticas y composiciones terapéuticas para prevenir y tratar lesión y degeneración de neurológica, es decir, pérdida y muerte celular dentro del SNC y los efectos resultantes, incluyendo, pero sin limitación, tratar la pérdida de memoria y mejorar la pérdida de memoria debido a isquemia cerebral y/o neurodegeneración para pacientes con riesgo de, o diagnosticados de, ciertas afecciones médicas tales como enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, deterioro de la memoria asociado con la edad, enfermedad de Parkinson, enfermedad cerebrovascular incluyendo ictus, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, esclerosis lateral amiotrófica familiar, demencia de cuerpos de Lewy, aterosclerosis, esquizofrenia, autismo, disquinesia tardía, esclerosis múltiple, trastornos por ataque, enfermedad de Wilson, parálisis supranuclear progresiva, síndrome de Hallervorden-Spatz, atrofia multisistémica, enfermedad de Huntington, degeneración ganglionar basal familiar, síndrome de Down, cataratas, hemocromatosis, talasemia, hemorragia cerebral, hemorragia subaracnoidea, lesión cerebral, lesión de médula espinal y trastornos metabólicos que afectan al SNC.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Como se usa en el presente documento, "sistema nervioso central" (SNC) se refiere al cerebro y a la médula espinal y a los tejidos asociados.

Como se usa en el presente documento, "trastornos y enfermedades neurológicas del SNC" se refiere a enfermedades y afecciones cerebrales que comprenden isquemia, es decir, isquemia cerebral, isquemia, ictus, neurodegeneración, complicaciones neurológicas que surgen de enfermedades tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Wilson, demencia de cuerpos de Lewy, esclerosis múltiple, trastorno por ataques, ataxia cerebelosa, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis lateral amiotrófica, autismo, trastornos afectivos, trastornos por ansiedad, trastornos metabólicos que afectan al SNC y/ esquizofrenia; daño celular; daño de nervios de trastornos cerebrovasculares tales como ictus en el cerebro o en la médula espinal, de infecciones del SNC incluyendo meningitis y VIH, de tumores del cerebro y la médula espinal, enfermedades priónicas y trastornos del SNC que se producen por envejecimiento normal (por ejemplo, anosmia), lesión craneal y/o cerebral o lesión de médula espinal y cualquier otra enfermedad y afección médica mencionada en el presente documento con pérdida, daño y degeneración de células neurológicas.

Una "cantidad eficaz" de células y/o agente es una cantidad suficiente para prevenir, tratar, reducir y/o mitigar los síntomas y/o causas subyacentes de cualquiera de los anteriores trastornos o enfermedades. En algunos casos, una "cantidad eficaz" es suficiente para eliminar los síntomas de esas enfermedades y, probablemente, superar la propia enfermedad. Preferentemente, una cantidad eficaz de la célula sujeto en el intervalo de dosis de $50 \cdot 10^8$ células para aplicación crónica o única y/o una cantidad eficaz de agente en el intervalo de dosis de 0,001 -2,0 mg/kg proporciona un concentración tisular de 10-10 células por mililitro de tejido y de agente en el intervalo de aproximadamente 10^{-13} molar a aproximadamente 10^{-5} molar, pero las concentraciones pueden ser superiores suponiendo que se evite la toxicidad.

En el contexto de la presente invención, los términos "tratar" y "terapia" y similares se refieren a aliviar, ralentizar la progresión, profilaxis, atenuación o cura de la enfermedad o afección existente que ha causado o está causando la muerte celular en el SNC. "Prevenir", como se usa en el presente documento, se refiere a aplazar, retrasar, ralentizar, inhibir o detener, reducir o mitigar de otro modo la aparición de tales enfermedades o trastornos. Se prefiere que se aplique una cantidad lo suficientemente grande de la célula o células y/o agente o agentes con niveles de tóxicos para proporcionar un nivel eficaz de actividad frente a la enfermedad. Las células terapéuticas de la presente invención se pueden usar con cualquier animal, tal como un mamífero o un pájaro (aviar), más preferentemente un mamífero. Las aves de corral son un ave preferente. Los mamíferos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, ratas, ratones, gatos, perros, caballos, vacas, ovejas, cerdos y más preferentemente seres humanos.

Se define en el presente documento que "célula o células terapéuticas" comprenden al menos una célula o tipo de célula, por ejemplo y sin limitación, una célula madre neuronal, que se transporta mediante aplicación intranasal al tercio superior de la cavidad nasal del sujeto y al SNC dañado y/o en degeneración del sujeto que se está sometiendo a terapia de sustitución celular. La célula o células terapéuticas se pueden obtener de cualquier fuente y pueden estar en diversos estadios de diferenciación del desarrollo siempre que la célula o las células terapéuticas sean suficientes para prevenir o reducir los síntomas neurológicos morfológicos y/o conductuales del trastorno, enfermedad y/o afección neurológica que se está tratando con la terapia de sustitución celular. Además, se reconoce que la célula o las células terapéuticas pueden ser heterólogas o autólogas al huésped. Con heterólogo se quiere decir que la célula terapéutica se obtiene de un mamífero diferente del sujeto paciente, mientras que una célula terapéutica autóloga se obtiene del sujeto paciente, se manipula *ex vivo* y se transporta de vuelta al SNC del sujeto

paciente mediante procedimientos de la presente invención. Los linfocitos terapéuticos también se pueden administrar al tercio superior de la cavidad nasal usando la presente invención para abordar tanto el sistema nervioso central como el sistema linfático. Los linfocitos funcionan como parte de las defensas del cuerpo e incluyen linfocitos citolíticos naturales (células NK), linfocitos T y linfocitos B. Tales células pueden ser útiles en el tratamiento de tumores cerebrales y otros trastornos del SNC y linfáticos. Una discusión adicional de las células terapéuticas se lleva a cabo más adelante, cada uno de tales aspectos se incluye en la definición de "células terapéuticas". En la presente invención, las células terapéuticas no comprenden células madre embrionarias humanas.

Como se usa en el presente documento, "agente regulador" se refiere a cualquier molécula que tenga un efecto de crecimiento, proliferativo, de diferenciación o trófico sobre una célula donadora trasplantada de la presente invención. Cualquier agente regulador que sea capaz de regular el desarrollo de la célula donadora trasplantada puede administrarse. Véase, por ejemplo, Mackay-Sim y col., (2000). Prog. Neurobiol. 62:527-559, incorporada en el presente documento como referencia. Una discusión adicional del agente o los agentes reguladores se realiza más adelante, cada uno de tales aspectos se incluye en la definición de "agente regulador".

En el contexto de la presente invención, los términos "tratar" y "terapia" y "terapéutico" y similares se refieren a aliviar, ralentizar la progresión, profilaxis, atenuación o cura de un SNC dañado o en degeneración que implica la pérdida o muerte de células del SNC. La definición comprende además aplazar, retrasar, ralentizar, inhibir o detener, reducir o mitigar de otro modo el daño o degeneración del SNC que implica la pérdida o muerte de células del SNC. Las células terapéuticas de la presente invención se pueden usar con cualquier animal, tal como un mamífero o un pájaro (ave), más preferentemente un mamífero. Las aves de corral son un ave preferente. Los mamíferos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, ratas, ratones, gatos, perros, caballos, vacas, ovejas, cerdos y más preferentemente seres humanos.

Como se usa en el presente documento, los términos "diferenciar" y "madurar" se refieren a la progresión de una célula desde un estadio de tener el potencial de diferenciarse en al menos dos linajes celulares diferentes a convertirse en una célula especializada. Tales términos se pueden usar de forma intercambiable para los fines de la presente invención. El término "linaje" se refiere a todos los estadios del tipo celular en desarrollo, desde la célula precursora más temprana hasta una célula completamente madura (es decir, una célula especializada). Por consiguiente, las células terapéuticas transportadas de la presente invención se pueden obtener de un linaje celular multipotencial, preferentemente un linaje neuronal y pueden estar en cualquier estadio de diferenciación. Por tanto, la presente invención incluye células terapéuticas que están programadas naturalmente para diferenciarse en solamente en un tipo de linaje. Estos tipos de células pueden incluir algunas especies de fibroblastos o simplemente astrogliá diferenciada, neuronas, oligodendrocitos, microglía o células endoteliales y se pueden obtener o solamente aislar del tejido de un donante muerto.

Se analizan otros aspectos de estos términos más adelante, cada uno de tales aspectos se incluye en la definición de los términos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula madre multipotencial" se refiere a una célula capaz de diferenciarse en una diversidad de linajes. Las células terapéuticas multipotenciales, por ejemplo, madre, se caracterizan por su capacidad de someterse a proliferación celular continua, de regenerar copias exactas de sí mismas (auto-renovación), de generar un gran número de descendencia celular regional y de elaborar nuevas células en respuesta a lesión o enfermedad. En la presente invención, la definición de "célula madre multipotencial" excluye células madre embrionarias humanas. Una "población multipotencial de células" se refiere a una composición de células capaz de diferenciarse en menos de todos los linajes de células pero al menos en dos linajes celulares. Los estudios actuales han demostrado que las células madre multipotenciales de una región no neurológica no están restringidas en linaje a su origen de desarrollo, pero pueden generar neuronas específicas de región cuando se exponen a las apropiadas claves ambientales (Lamga y col (2001) J. Neurosci. 20:8727-8735).

Una "célula madre neuronal" se define en el presente documento como una célula multipotencial que es una célula multipotencial inmadura y no comprometida que existe en el sistema nervioso (Ourednik y col. (1999) Clinical Genetics 56:267-278). En condiciones específicas, la célula madre neuronal es capaz de producir células hijas que pueden diferenciarse terminalmente en neuronas y glía (es decir, astrocitos (tipo I y II) y oligodendrocitos). Existen tanto en el sistema nervioso en desarrollo como en el sistema nervioso adulto. Una caracterización detallada de las propiedades de las células madre neuronales se puede encontrar, por ejemplo, en McInnes y col (1999) Clin. Genet. 56:267-278.

Una "célula progenitora neuronal" es una célula no diferenciada que se obtiene de una célula madre neuronal y que se ha comprometido a una ruta particular de diferenciación, no muestra automantenimiento y en condiciones apropiadas se diferenciará en neuroblastos (células generadoras de neuronas) o fibroblastos (células generadoras de glía). El uso de tales linajes celulares neuronales multipotenciales para trasplante se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Snyder y col. (1992) Cell 68:33, donde se han injertado líneas celulares neuronales multipotenciales en el cerebelo de rata para formar neuronas y células gliales. Véase también Campell y col. (1995) Neuron 15:1259-1273; Fishell y col. (1995) Development 121:803-812; y, Olsson y col (1995) Eur. J. Neurosci. 10:71-85.

Se define en el presente documento que "Isquemia" o un episodio o afección isquémica comprende una afección

isquémica en la que el cerebro o partes del cerebro no reciben suficiente flujo sanguíneo para mantener la función neurológica normal, dando como resultado una pérdida o muerte de células del SNC y daño concomitante y/o degeneración del SNC. Diversas afecciones y/o enfermedades pueden causar isquemia incluyendo, pero sin limitación, ictus. Algunos de los trastornos y enfermedades neurológicas del SNC que se definen y analizan en el presente documento están caracterizados por cierto nivel de isquemia. Los trastornos y las enfermedades neurológicas del SNC definidas y analizadas en el presente documento son susceptibles a tratamiento con la célula terapéutica de la presente invención.

Una "cantidad eficaz" de células terapéuticas y/o componente o componentes de la composición farmacéutica de la presente invención que comprende células terapéuticas es una cantidad suficiente para prevenir, tratar, reducir y/o mitigar los síntomas, daño neuronal y/o causas subyacentes de cualquiera de los trastornos o enfermedades a los que se ha hecho referencia. En algunos casos, una "cantidad eficaz" es suficiente para eliminar los síntomas de estas enfermedades y para superar la propia enfermedad. Para fines ilustrativos solamente, los regímenes de tratamiento ilustrativos que se refieren generalmente a los agentes terapéuticos desvelados en el presente documento, incluyendo intervalos de dosificación, volúmenes y frecuencia se proporcionan a continuación:

El intervalo de dosificación eficaz para agentes de mejora del suministro, agentes reguladores, agentes inmunosupresores y/o antibióticos comprende 0,0001-1,0 mg/kg.

Un rango de dosificación más preferente puede ser 0,005-1,0 mg/kg.

El intervalo de dosificación más preferente puede ser 0,05-1,0 mg/kg.

La "cantidad eficaz" de células terapéuticas, es decir, intervalo de dosificación eficaz comprende 50 células -10⁸ células

Un intervalo de dosificación más preferente para células terapéuticas comprende 10³ células -10⁸ células.

El intervalo de dosificación mucho más preferente para las células terapéuticas comprende 10⁴ células -10⁸ células.

El intervalo de volumen de dosificación (aplicable a pulverizadores o gotas nasales) puede ser 0,015 ml-1,0 ml.

El intervalo de volumen de dosificación preferente (aplicable a pulverizadores o gotas nasales) puede ser 0,03 ml-0,6 ml.

Las concentraciones cerebrales que probablemente se pueden conseguir con los intervalos de dosificación que se han proporcionado anteriormente son para una única dosis: 10-10⁸ células por ml de tejido y 0,1 nM - 5 μM. A lo largo del curso de un plan de tratamiento multidosis, la concentración cerebral máxima puede ser tan alta como 10⁶ células por ml de tejido y 50 μM para agentes de mejora de suministro, agentes reguladores, agentes inmunosupresores y antibióticos.

Por lo tanto, la presente invención proporciona células terapéuticas y composiciones farmacéuticas para mejorar terapias basadas en células usadas para regenerar tejido neuronal que se ha dañado o que está sometiéndose a degeneración por cualquier enfermedad o trastorno del SNC, es decir, pérdida o muerte de células del SNC. Los trastornos del SNC que pertenecen al alcance de la presente invención comprenden, por ejemplo, lesión craneal, lesión de médula espinal, ictus e isquemia. Los trastornos del SNC que pertenecen al alcance de la presente invención también comprenden enfermedades neurodegenerativas tales como, pero sin limitación, enfermedades y afecciones cerebrales que comprenden isquemia, es decir, isquemia cerebral, isquemia, ictus, neurodegeneración, complicaciones neurológicas que surgen de enfermedades tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Wilson, demencia de cuerpos de Lewy, esclerosis múltiple, ataxia cerebelosa, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis lateral amiotrófica, trastornos afectivos, trastornos por ansiedad, autismo y/o esquizofrenia; lesión celular; lesión de nervios de trastornos cerebrovasculares tales como ictus en el cerebro o la médula espinal, de infecciones del SNC que incluyen meningitis y VIH, de tumores del cerebro y la médula espinal, enfermedades priónicas y trastornos del SNC que se producen por el envejecimiento normal (por ejemplo, anosmia), lesión cerebral, lesión de la médula espinal y/o trastornos metabólicos que afectan al SNC.

Por consiguiente, las realizaciones de la presente invención encuentran utilidad en mejorar la regeneración o reparación de tejido neuronal dañado en un animal que se ha sometido a una estrategia regenerativa neuronal, es decir, basada en células, que comprende una aplicación intranasal a través del tercio superior de la cavidad nasal del animal sujeto, evitando de este modo la barrera hematoencefálica de al menos una célula terapéutica al SNC del mamífero para tratar una enfermedad o trastorno neurológico del SNC que implica isquemia y/o pérdida o muerte de células del SNC.

Se conocen en la técnica estrategias regenerativas neuronales que comprenden el trasplante de células donadoras al SNC de un huésped. Sin embargo, no se sabe cómo evitar la barrera hematoencefálica con células terapéuticas, transportando por tanto tales células directamente al SNC dañado o en degeneración de un sujeto huésped mediante aplicación intranasal al tercio superior de la cavidad nasal. La célula terapéutica se puede ayudar en el transporte por al menos un agente de mejora del suministro, en la viabilidad mediante al menos un agente

inmunosupresor y/o regular el desarrollo mediante al menos un agente regulador, mientras que el paciente puede protegerse de que las bacterias de la mucosa eviten la barrera hematoencefálica mediante el uso de al menos un antibiótico, como se analizará adicionalmente más adelante, algunos de los componentes pueden administrarse por vía sistémica y/o por vía intranasal.

5 Ruta de transporte para evitar la barrera hematoencefálica

El nervio olfativo

Las células terapéuticas y/o composición o composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar para la administración a tejido inervado por el nervio olfativo y que está localizado en el tercio superior de la cavidad nasal. Las células terapéuticas y/o la composición o composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden suministrar al área olfativa mediante aplicación al tercio superior de la cavidad nasal.

Las fibras del nervio olfativo son axones no mielinizados de células receptoras olfativas que están localizadas en el tercio superior de la mucosa nasal. Las células receptoras olfativas son neuronas bipolares con abultamientos cubiertos por cilios de tipo pelo que se proyectan al interior de la cavidad nasal. En el otro extremo, los axones de estas células se reúnen en agregados y entran en la cavidad craneal en el techo de la nariz. Rodeados por un delgado tubo de piamadre, los nervios olfativos cruzan el espacio subaracnoideo que contiene LCR y entran en los aspectos inferiores de los bulbos olfativos. Una vez que las células terapéuticas y/o la composición o las composiciones farmacéuticas de la presente invención se han aplicado al tercio superior de la cavidad nasal, las células terapéuticas y/o la composición o composiciones terapéuticas de la presente invención se pueden someter a transporte a través de la mucosa nasal y al interior del bulbo olfativo y otras áreas del SNC, tales como el núcleo olfativo anterior, corteza frontal, formación del hipocampo, núcleos amigdalinos, núcleo basal de Meynert, hipotálamo, mesencéfalo, cerebelo, médula espinal cervical y similares.

Transporte neuronal

Las células terapéuticas y/o la composición o composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar al sujeto mediante aplicación al tercio superior de la cavidad nasal del sujeto mamífero. La aplicación de las células terapéuticas y/o la composición o composiciones farmacéuticas de la presente invención de este modo garantiza que las células terapéuticas y/o la composición o composiciones farmacéuticas se transportan al SNC, cerebro y/o médula espinal a lo largo de una ruta neural con pérdida sistémica y exposición sistémica reducidas. Una ruta neuronal incluye el transporte en el interior o a lo largo de una neurona, a través o mediante el sistema linfático que acompaña a una neurona, a través de o mediante un espacio perivascular de un vaso sanguíneo que acompaña a una neurona o ruta neuronal, a través de o mediante una adventicia de un vaso sanguíneo que acompaña a una neurona o ruta neuronal o a través de un sistema hemangiolinfático.

La presente invención comprende las células terapéuticas y/o la composición o composiciones farmacéuticas para su uso en el transporte mediante una ruta neuronal en lugar de a través del sistema circulatorio, de tal manera que los agentes reguladores que son incapaces de cruzar, o solamente con dificultad, la barrera hematoencefálica desde el torrente sanguíneo al cerebro se pueden suministrar al sistema linfático, SNC, cerebro y/o médula espinal. Las células terapéuticas y/o la composición o composiciones farmacéuticas de la presente invención, una vez pasada la barrera hematoencefálica y en el SNC, después se pueden suministrar a diversas áreas del cerebro o la médula espinal a través de canales linfáticos, a través de un espacio perivascular o transporte a través de o a lo largo de neuronas. En una realización, las células terapéuticas migran a la región de daño y/o degeneración dentro del SNC.

El uso de una ruta neuronal para transportar un agente regulador al cerebro, médula espinal u otros componentes del sistema nervioso central obvia el obstáculo presentado por la barrera hematoencefálica de tal manera que las medicaciones, es decir, células terapéuticas y/o composiciones farmacéuticas de la presente invención que normalmente no pueden cruzar la barrera se pueden suministrar directamente al SNC, por ejemplo, al cerebro y la médula espinal. Además, la presente invención puede proporcionar el suministro de un nivel más concentrado de las células terapéuticas y/o la composición o composiciones farmacéuticas de la presente invención a células neuronales ya que las células terapéuticas y/o la composición o composiciones farmacéuticas de la presente invención no se diluyen en fluidos presentes en el torrente sanguíneo. Como tal, la invención proporciona el suministro mejorado de las células terapéuticas y/o la composición o composiciones farmacéuticas de la presente invención al SNC incluyendo el cerebro y/o la médula espinal.

50 La ruta neuronal olfativa

Una realización incluye el suministro del agente regulador al sujeto de tal modo que el agente regulador se transporta al SNC, por ejemplo, el cerebro y/o médula espinal a lo largo de una ruta neuronal olfativa. Típicamente, tal realización incluye la administración del agente regulador al tejido inervado por el nervio olfativo y en el interior de la cavidad nasal. La ruta neuronal olfativa inerva principalmente el epitelio olfativo en el tercio superior de la cavidad nasal, como se ha descrito anteriormente. La aplicación del agente regulador a un tejido inervado por el nervio olfativo puede suministrar el agente regulador a neuronas o células dañadas del SNC, cerebro y/o médula espinal. Las neuronas olfativas inervan este tejido y pueden proporcionar una conexión directa al SNC, cerebro y/o médula espinal debida, se piensa, a su papel en la olfacción.

El suministro a través de la ruta neuronal olfativa puede emplear el sistema linfático que viaja con el nervio olfativo a las diversas áreas cerebrales y desde ahí al sistema linfático dural asociado con porciones del SNC, tal como la médula espinal. El transporte a lo largo del nervio olfativo también puede suministrar agentes reguladores a un bulbo olfativo. Una ruta perivascular y/o una ruta hemangiolinfática, tal como canales linfáticos que se extienden en el interior de la adventicia de vasos sanguíneos cerebrales puede proporcionar un mecanismo adicional para el transporte de agentes reguladores terapéuticos al cerebro y la médula espinal de tejido innervado por el nervio olfativo.

Las células terapéuticas y/o las composiciones farmacéuticas de las mismas pueden administrarse al nervio olfativo, por ejemplo, a través del epitelio olfativo localizado en el tercio superior de la cavidad nasal. Tal administración puede emplear el transporte anterógrado y retrógrado extracelular o intracelular (por ejemplo, transneuronal) del agente regulador que entra a través de los nervios olfativos en el cerebro y sus meninges, en el tronco encefálico o en la médula espinal. Una vez que las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica de las mismas se ha dispensado en o sobre tejido innervado por el nervio olfativo, las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica y/o componentes de la misma se pueden transportar a través del tejido y viajar a lo largo de neuronas olfativas hasta áreas del SNC que incluyen el tronco encefálico, el cerebelo, la médula espinal, líquido cefalorraquídeo, bulbo olfativo y estructuras corticales y subcorticales.

La barrera hematoencefálica se evita en la presente invención por las células terapéuticas y/o composición o composiciones farmacéuticas que comprenden células terapéuticas mediante aplicación al tercio superior de la cavidad nasal. Las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica de la invención migran de la mucosa nasal a través de forámenes en la placa cribiforme a lo largo de la ruta neuronal olfativa y al SNC. Véase el Ejemplo 1 más adelante que proporciona pruebas experimentales de que la barrera hematoencefálica se evita de la manera planteada como hipótesis.

La administración a la cavidad nasal empleando una ruta neuronal por tanto puede suministrar células terapéuticas, que incluyen, pero sin limitación, células eucariotas y células madre y/o una composición farmacéutica que comprende las células terapéuticas de la presente invención al sistema linfático, tronco encefálico, cerebelo, médula espinal y estructuras corticales y subcorticales. Las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica de la presente invención en solitario pueden facilitar este movimiento al SNC, es decir, cerebro y/o médula espinal. Como alternativa, un vehículo y/o un agente o agentes de mejora del suministro pueden ayudar en el transporte de las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica de la presente invención al y a lo largo de la ruta neuronal. La administración de una célula terapéutica y/o composición farmacéutica de la presente invención al tercio superior de la cavidad nasal por tanto evita la barrera hematoencefálica a través de un sistema de transporte desde la mucosa nasal y/o el epitelio al SNC, es decir, el cerebro y la médula espinal.

Las células terapéuticas y/o la composición o composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar para la administración a tejido innervado por los nervios olfativos. Tales sistemas nerviosos pueden proporcionar una conexión directa entre el entorno externo y el cerebro, proporcionando por tanto el suministro ventajoso de un agente regulador al SNC, que incluye el cerebro, el tronco encefálico y/o la médula espinal. Las células terapéuticas y/o la composición o composiciones farmacéuticas de la presente invención son incapaces de cruzar o cruzan de forma ineficaz la barrera hematoencefálica desde el torrente sanguíneo hasta el cerebro. Por lo tanto, las células terapéuticas y/o la composición o composiciones farmacéuticas inventivas se pueden suministrar mediante el nervio olfativo en lugar de a través del sistema circulatorio. Esto permite el suministro eficaz de las células terapéuticas y/o la composición o composiciones farmacéuticas de la presente invención al SNC, cerebro o médula espinal sin pérdida o exposición sistémica.

El agente o agentes inmunosupresores y/o antibiótico o antibióticos se pueden suministrar de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención por vía sistémica o al tercio superior de la cavidad nasal en solitario o en combinación farmacéutica que comprende célula o células terapéuticas.

Rutas alternativas

Las rutas alternativas a la ruta del nervio olfativo que se han analizado anteriormente comprenden rutas a lo largo de otros nervios que innervan la cavidad nasal, por ejemplo, la ruta trigeminal, bien conocida por el experto en la técnica.

Células terapéuticas

La célula o las células terapéuticas de la presente invención se pueden suministrar desde cualquier tejido de mamífero fetal o adulto, incluyendo médula ósea o tejidos neuronales, incluyendo tejido del hipocampo, epitelio olfativo, bulbo olfativo, zona subventricular, cerebelo, médula espinal, corteza (es decir, corteza motora o somatosensorial), cuerpo estriado, prosencéfalo basal (neuronas colinérgicas), mesencéfalo ventral (células de la sustancia negra) y el locus cerúleo (células de neuroadrenalina del sistema nervioso central). Además, la célula o las células terapéuticas pueden incluir, pero sin limitación, células madre neuronales y/o multipotentes, células progenitoras neuronales, células modificadas genéticamente, linfocitos T y/o células autólogas. En la presente invención, las células terapéuticas no comprenden células madre embrionarias humanas.

El sistema nervioso central animal en desarrollo y adulto contiene una población de células madre neuronales y

células progenitoras que son de particular interés en la presente invención como células terapéuticas. Los procedimientos de aislamiento y trasplante de diversas células progenitoras neuronales obtenidas de diferentes tejidos en diferentes estadios del desarrollo se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, corteza de estriado (Winkler et al. (1998) *Mol. Cell. Neurosci.* 11: 99-116; Hammang y col. (1997) *Exp. Neurol.* 147: 84-95); corteza (Brustle y col. (1998) *Nat. Biotechnol.* 16: 1040-1044 y Sabate y col. (1995) *Nat. Genet.* 9: 256-260); telencéfalo humano (Flax y col. (1998) *Nature* 392: 18-24 y Vescovi y col. (1999) *Neuron* 11: 951-966); hipocampo (Gage y col. (1995) *J. Neurobiol.* 36: 249-266 y Suhonen y col. (1996) *Nature* 383: 624-627); prosencéfalo basal (Minger y col. (1996) *Exp. Neurol.* 141: 12-24); mesencéfalo ventral (Winkler y col. (1998) *Mol. Cell. Neurosci.* 11: 99-116; Svendsen y col. (1996) *Exp. Neurol.* 137: 376-388; Hammang y col. (1997) *Exp. Neurol.* 147: 84-95; Studer y col. (1997) *Nat. Neurosci.* 1: 290-295; Milward y col. (1997) *J. Neurosci. Res.* 50: 862-871); y zona subventricular (Milward y col. (1997) *Milward y col. (1997) J. Neurosci. Res.* 50: 862-871). Cada una de estas referencias se incorpora en el presente documento como referencia. Además, los procedimientos para el aislamiento de la progenie de células madre neuronales y el procedimiento para promover su diferenciación también se pueden encontrar en la Patente de Estados Unidos N° 6.071.889 y la Patente de Estados Unidos N° 6.103.530, que se incorporan ambas en el presente documento por referencia.

Las células terapéuticas de la presente invención también pueden tener origen paraneuronal. Un ejemplo preferente de tal célula es la célula cromafín medular adrenal. Véase, por ejemplo, Bjorklund y col. (1985) *Neural Grafting in the Mammalian CNS* (Ámsterdam: Elsevier), pp. 3-11, y Lindvall y col. (1997) *Ann. Neurol.* 22: 457-468, que demuestran la utilidad de las células cromafines para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

Las células terapéuticas de la presente invención que no son de origen neural, pero que se han alterado para producir una sustancia de interés neurológico, también pertenecen al alcance inventivo. Un tipo celular preferente es un fibroblasto de prepucio humano, que se obtiene y se cultiva de forma sencilla (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.060.048). Tales células preferentemente están genéticamente alteradas usando procedimientos conocidos en la técnica para expresar factores de crecimiento neuronal, neurotransmisores, neuropéptidos o enzimas implicadas en el metabolismo cerebral. Véase por ejemplo, Gage y col. (1987) *Neurosci.* 23: 795-807; Rosenberg y col. (1988) *Science* 242: 1575-1578; Shimohama y col. (1989) *Mol. Brain Res.* 5: 271-278; que se incorporan de este modo como referencia. Como alternativa, las células terapéuticas obtenidas de un origen no neuronal, tales como de células epidérmicas, pueden convertirse o transdiferenciarse en diferentes tipos de células neuronales. Véase por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.087.168.

La célula o las células terapéuticas de la presente invención pueden alterarse genéticamente antes del trasplante en el huésped. Como se usa en el presente documento, la expresión "genéticamente alterado" se refiere a una célula en la que se ha introducido un ácido nucleico extraño, por ejemplo, ADN. El ácido nucleico extraño puede introducirse mediante una diversidad de técnicas que incluyen, pero sin limitación, transfección mediada por fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE, microinyección, transformación viral, fusión de protoplastos y lipofección. La célula alterada genéticamente puede expresar el ácido nucleico extraño de un modo transitorio o a largo plazo. En general, la expresión transitoria tiene lugar cuando el ADN extraño no se integra establemente en el ADN cromosómico de la célula transfectada. Por el contrario, la expresión a largo plazo de ADN extraño tiene lugar cuando el ADN extraño se ha integrado establemente en el ADN cromosómico de la célula transfectada.

Tales genes de interés incluyen enzimas que sintetizan neurotransmisores (es decir, tirosina hidrolasa (TH) y colinacetiltransferasa). Tales procedimientos se conocen comúnmente en la técnica. Por ejemplo, se han aislado células donadoras terapéuticas de diversas regiones del cerebro y en diferentes estadios del desarrollo y se han inmortalizado mediante alteración genética. Por ejemplo, las células olfativas y del cerebelo se han inmortalizado usando el oncogen *myc* viral (*v-myc*) para generar líneas celulares con fenotipos neuronales y gliales (Ryder y col. (1990) *J. Neurobiol.* 21: 356). Estudios similares por Snyder y col. ((1992) *Cell* 68: 33) dieron como resultado líneas celulares neuronales multipotenciales que se injertaron en el cerebelo de rata para formar neuronas y células gliales. En otros estudios se inmortalizaron células neuroepiteliales murinas con un vector retroviral que contenía *c-myc* y se cultivaron con factores de crecimiento para formar tipos celulares diferenciados similares a astrocitos y neuronas (Barlett y col. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3255).

Además, las células modificadas genéticamente terapéuticas suministradas por vía intranasal de la presente invención pueden comprender factores biológicos que pueden entrar en el SNC y liberar sustancias que son deficitarias o que están ausentes en el SNC de los pacientes. Por ejemplo, en enfermedades de almacenamiento de lípidos y trastornos metabólicos hereditarios tales como fenilcetonuria (PKU), enfermedad de Wilson, Tay Sachs, enfermedades de almacenamiento lisosomales o enfermedad de Nieman Pick, puede haber una enzima ausente en el cerebro desde el nacimiento. Las células terapéuticas de la presente invención pueden comprender esa enzima ausente específica. Tales células terapéuticas modificadas genéticamente se pueden suministrar después al tercio superior de la cavidad nasal, donde las células evitan la barrera hematoencefálica y entran en el cerebro para llevar a cabo la función metabólica ausente. Más generalmente, las células terapéuticas modificadas genéticamente de la presente invención pueden actuar como mini factores biológicos que producen y liberan uno o más de los siguientes: una enzima, un factor de crecimiento, un agente antiinflamatorio, un neurotransmisor, un neuromodulador, un antioxidante, etc. que pueden beneficiar al sujeto que necesita los mismos. Como alternativa, las células modificadas genéticamente terapéuticas de la presente invención pueden comprender células secretoras de hormona liberadora de gonadotropina modificadas genéticamente para aumentar la fertilidad en sujetos que lo necesitan.

Agentes de mejora del suministro

Ciertos compuestos, es decir, agentes de mejora del suministro, se pueden usar por la presente invención para ayudar a las células terapéuticas en el suministro al sistema nervioso central y a las regiones dañadas en el mismo. Un agente de mejora del suministro preferente comprende hialuronidasa, que se ha observado que aumenta muy significativamente el suministro de células terapéuticas al SNC cuando se aplica al tercio superior de la cavidad nasal como un pretratamiento administrado en una cantidad eficaz antes de la célula terapéutica de la presente invención o como un componente de la composición farmacéutica que comprende células terapéuticas de la presente invención o como un compuesto separado administrado por vía intranasal al tercio superior de la cavidad nasal sustancialmente de forma simultánea como las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica. Se piensa que la hialuronidasa actúa sobre el ácido hialurónico en la matriz extracelular para mejorar el suministro de células terapéuticas y/o composiciones farmacéuticas que comprenden células terapéuticas al SNC. El Ejemplo 2 más adelante ilustra el aumento de la eficacia mediante tal agente de mejora del suministro sobre el suministro de las células terapéuticas al SNC.

Los agentes de mejora del suministro alternativos comprenden neuregulina, actividad inductora de migración y factor inhibidor de leucemia. Estos agentes de mejora del suministro, por ejemplo, hialuronidasa, agentes lipófilos, neuregulina, actividad inductora de migración y factor inhibidor de leucemia se pueden usar individualmente o en cualquier combinación para mejorar el suministro de las células terapéuticas al SNC de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, al menos un agente de mejora del suministro se puede usar como un pretratamiento al transporte de las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica y/o como un componente de la composición farmacéutica que comprende células terapéuticas.

Los agentes de mejora de suministro alternativos que mejoran adicionalmente el suministro a través de la mucosa de las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica que comprende células terapéuticas de la presente invención comprenden un inhibidor enzimático, particularmente inhibidores de proteasas como se conoce bien por los expertos en la materia. Los inhibidores de proteasa pueden incluir, pero con limitación, antipaína, arfamenina A y B, HCl de benzamidina, AEBSF, CA-074, inhibidor de calpaína I y II, calpeptina, pepstatina A, actinonina, amastatina, bestatina, boroleucina, captopril, cloroacetil-HOLeu-Ala-Gly-NH₂, DAPT, diprotina A y B, ebelactona A y B, foroximitina, leupeptina, pepstatina A, fosforamidona, aprotinina, puromicina, BBI, inhibidor de la tripsina de semilla de soja, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, E-64, quimostatina, 1,1 O-fenantrolina, EDTA y EGTA.

Otros agentes de mejora de suministro alternativos adicionales pueden incluir, pero sin limitación, tensioactivos, sales biliares, dihidrofusidatos, agentes bioadhesivos, aditivos fosfolípidos, micelas mixtas, liposomas o vehículos, alcoholes, enaminas, polímeros catiónicos, compuestos donadores de NO, moléculas anfipáticas de cadena larga, mejoradores de la penetración hidrófobos pequeños; derivados de sodio o un ácido salicílico, ésteres de glicerol de ácido acetoacético, ciclodextrina o derivados de beta-ciclodextrina, ácidos grasos de cadena media, agentes quelantes, aminoácidos o sales de los mismos, N-acetil aminoácidos o sales de los mismos, agentes mucolíticos, enzimas dirigidas específicamente a un componente de membrana seleccionado, inhibidores de la síntesis de ácidos grasos e inhibidores de la síntesis del colesterol. La presente invención contempla el uso de uno o más, es decir, al menos uno, de los agentes de mejora de suministro anteriores, en solitario o en combinación con las células terapéuticas como un compuesto farmacéutico en una cantidad eficaz.

Agentes reguladores

Ciertos agentes reguladores para regular, entre otras cosas, el crecimiento y la diferenciación de las células terapéuticas suministradas dentro del SNC pertenecen al alcance de la presente invención e incluyen, por ejemplo, una cantidad eficaz de agentes reguladores que promueven la supervivencia de las células donadoras modulando la respuesta inmune e inflamatoria. Tales agentes reguladores incluyen, por ejemplo, ciclosporina y diversos otros inmunomoduladores incluyendo interleucinas (es decir, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10); factores de necrosis tumoral (es decir, TNF-alfa y TNF-beta); e interferones (es decir, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, IFN-omega e IFN-tau); y cualquier variante biológicamente activa de los mismos. Se pueden encontrar detalles adicionales con respecto a la administración de estos agentes inmunomoduladores en la Patente de Estados Unidos N° de Serie 09/733.168 titulada "Methods for Administering a Cytokine to the Central Nervous System and the Lymphatic System", presentada el 9 de diciembre de 2000, incorporada en el presente documento por referencia.

Los agentes reguladores adicionales que encuentran uso en la invención incluyen CAP23, una proteína asociada a citoesqueleto principal y de unión de calmodulina y GAP43, una proteína asociada a crecimiento neuronal. Véase por ejemplo, Frey y col. (2000) J. Cell. Biol. 7: 1443-1453. Otros agentes de interés incluyen la Proteína Osteogénica 1 (OP-1), que es una proteína morfogénica que estimula el crecimiento, la diferenciación y el mantenimiento de la diferenciación (Patente de Estados Unidos N° 6.153.583); sonic hedgehog, un polipéptido que se ha demostrado que promueve la supervivencia de neuronas dopaminérgicas (Miao y col. (1996) Cell Transplant 55:2-17); diversos otros factores de crecimiento gliales (Patentes de Estados Unidos N° 5.716.930; 6.147.190 y 5.530.109) y cualquier variante biológicamente activa de los mismos. Todas estas referencias se incorporan en el presente documento por referencia.

Otros agentes reguladores de interés y que pertenecen al alcance de la presente invención comprenden factores de

crecimiento. Como se usa en el presente documento, "factor de crecimiento" se refiere a un polipéptido capaz de regular el desarrollo de la célula donadora trasplantada. Los factores de crecimiento útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, miembros de la familia de neurotrofina (es decir, factor de crecimiento de nervios (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BON F), neurotrofina-3 (NT-3) y neurotrofina-4 (NT4, también conocida como NT-4/5 o NT-5); factores de crecimiento de fibroblastos (FGF, es decir, factor de crecimiento de fibroblastos básico); la familia del factor de crecimiento epidérmico (es decir, EGF, TGF.alfa, anfiregulina, factor de crecimiento de tipo EGF de unión a heparina (HB-EGF), batakeluina (BTC) y el grupo de neuregulina); factor de crecimiento derivado de plaquetas; insulina; factores de crecimiento similares a la insulina (es decir, IGF-1 e IGF-2); factor neurotrófico ciliar (CNTF), familia del factor neurotrófico derivado de línea celular de glía (GONF) (es decir, GONF y neurturina (NTN), persefina (PSP) y artemina (ART)); superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (es decir, las subfamilias incluyen TGF beta 1, TGF beta 2, TGF beta 3, TGF beta 4, TGF beta 5, activina, inhibina, decapentapléjico); factores de diferenciación del crecimiento (GOF) (es decir, GOF1, GOF2, GOF3, GOF5, GOF6, GOF7, GOF8, GOF9, GOF9B, GOF10, GOF11 y GOF15); nexina derivada de glía; factor neurotrófico dependiente de actividad (AONF); factor de crecimiento glial (GGF); y similares. Se reconoce adicionalmente que cualquier variante biológicamente activa de estos factores de crecimiento también es útil en la presente invención.

El agente regulador de la presente invención puede ser de cualquier especie animal incluyendo, pero sin limitación, de roedor, aviar, canina, bovina, porcina, equina y, preferentemente, de ser humano. Preferentemente, el agente regulador es de la misma especie que el animal que se somete a tratamiento.

Las variantes biológicamente activas de polipéptidos reguladores (es decir, factores de crecimiento, tales como IGF-I, NGF y FGF básica, citoquinas, etc.) también están incluidas por las células terapéuticas y las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Tales variantes deben conservar la actividad biológica del agente regulador, particularmente la capacidad de regular el desarrollo de la célula donadora (es decir, promover la supervivencia, mantener el fenotipo deseado y/o regular las claves del desarrollo producidas por la célula donadora). Por ejemplo, cuando el polipéptido regulador es un factor de crecimiento, tal como IGF-I, NGF-I o un miembro de la familia de FGF, se conservará la capacidad de unirse a sus respectivos sitios de receptor. Tal actividad de unión a receptor se puede medir usando bioensayos convencionales.

Uno de tales agentes reguladores, un factor de crecimiento, que es útil en la presente invención es IGF-I. La expresión "IGF-I" como se usa en el presente documento se refiere al factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I), un péptido de cadena única que tiene 70 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 7600 Dalton. El factor de crecimiento similar a insulina I estimula la mitosis y procesos de crecimiento asociados con el desarrollo celular. La secuencia de aminoácidos y de nucleótidos para IGF-I se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo la Patente de Estados Unidos N° 5.324.639 que desvela la secuencia de IGF-I humano, Genbank N° de Acceso X15726, que desvela la secuencia de IGF-I bovino; y Genbank N° de Acceso X06043 que desvela la secuencia de IGF-I de rata. Cada una de estas referencias se incorpora en el presente documento por referencia.

En otra realización de la presente invención, el agente regulador puede comprender un miembro de la familia de FGF de factores de crecimiento y/o variantes biológicamente activas de los mismos. La familia del factor de crecimiento de fibroblastos incluye un grupo de proteínas relacionadas estructuralmente que se une a heparina con alta afinidad. Los miembros de la familia de FGF tienen actividad mitogénica e inducen la proliferación de una amplia diversidad de tipos celulares. Los miembros de la familia de FGF también participan en la angiogénesis, diferenciación, migración celular, desarrollo embrionario y mantenimiento/supervivencia neuronal. El término "FGF" como se usa en el presente documento se refiere a un miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos que incluye, por ejemplo, FGF-1 (FGF ácido), FGF-2 (FGF básico), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-8, FGF-9, FGF-98 o un fragmento o variante de los mismos biológicamente activo. La secuencia de aminoácidos y los procedimientos para preparar muchos de los miembros de la familia de FGF se conocen bien en la técnica.

En otra realización de la presente invención, el agente regulador puede ser un factor de crecimiento de nervios (NGF) o una variante biológicamente activa del mismo. El NGF se aisló originalmente como un complejo que tiene un peso molecular de 130 kDa y un coeficiente de sedimentación de 7S. Este complejo de 7S incluye tres tipos de subunidades, portando la subunidad "beta" todas las actividades biológicas de NGF. El factor de crecimiento de nervios estimula la mitosis y los procesos de crecimiento de células, particularmente de células nerviosas, y regula el desarrollo (es decir, influye en la reparación, supervivencia y diferenciación). La secuencia de aminoácidos preferente para pre-pro-NGF humano y NGF maduro humano se proporcionan en la Patente de Estados Unidos N° 5.288.622, que se incorpora en el presente documento por referencia.

El NGF usado en la presente invención puede estar en su forma sustancialmente purificada, nativa, producida recombinantemente o en una forma sintetizada químicamente. Por ejemplo, el NGF se puede aislar directamente de células que expresan de forma natural NGF. El NGF se puede producir también recombinantemente en un sistema de expresión de célula eucariota o procariota como se describe en Edwards y col. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 2456; la Patente de Estados Unidos N° 5.986.070; y la Patente de Estados Unidos N° 6.005.081; que se incorporan todas en el presente documento como referencia. Como alternativa, el agente regulador de la presente invención puede comprender eritropoyetina (EPO), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF). Cada uno de los agentes reguladores descritos en el presente documento desempeña un papel crucial en la supervivencia y diferenciación *in vivo* de las células terapéuticas de los presentes procedimientos inventivos y

composiciones farmacéuticas.

La administración de una cantidad eficaz de al menos un agente regulador, es decir, por vía intranasal al tercio superior de la cavidad nasal, en solitario y/o en combinación con las células terapéuticas, regulará el desarrollo de la célula terapéutica transportada al SNC. El término “regula el desarrollo” en el presente documento tiene por objeto significar, entre otras cosas, que el agente regulador potencia la supervivencia, diferenciación, desarrollo axonal, desarrollo dendrítico y/o proliferación de la célula terapéutica transportada; mejora la adhesión de las células terapéuticas transportadas a los tejidos circundantes (es decir, incorporación en el tejido parenquimal); mejora la capacidad de las células terapéuticas transportadas de establecer conexión sináptica con las neuronas del huésped (es decir, mejora la formación de fibra nerviosa en las células donadoras; aumenta las distancias de proyección de fibra nerviosa de las células donadoras o mejora el destino de la fibra nerviosa de las células donadoras); y/o instruye a la célula terapéutica transportada para comprometerse con un linaje neuronal específico (es decir, adoptar un destino celular neuronal (neuronas GABA-érgicas, neuronas dopaminérgicas, neuronas colinérgicas, neuronas del hipocampo y similares), astrocítico u oligodendrocítico). Se reconoce adicionalmente que un agente regulador puede potenciar la supervivencia de una célula donadora trasplantada modulando la respuesta inmune del sujeto. Con “modular” se quiere decir la regulación negativa de la respuesta inmune o inflamatoria (es decir, influir en la función inmune sistémica, presentación de antígenos, producción de citocinas, proliferación de linfocitos y entrada de linfocitos y macrófagos en el SNC).

Además, se sabe que la administración del agente regulador “regula el desarrollo” de la célula donadora trasplantada de forma invasiva influyendo en las claves del desarrollo liberadas por las células donadoras trasplantadas (es decir, promueve a la célula donadora para liberar neurotransmisores tales como dopamina, acetilcolina, GABA u otros factores neuroprotectores). Como tal, la función y reparación (es decir, formación de fibra nerviosa mejorada, distancias de proyección de fibra nerviosa y/o densidad de fibra nerviosa) del tejido huésped circundante se puede mejorar.

El suministro de una cantidad eficaz de uno o más, es decir, de al menos un agente regulador al SNC de un mamífero se puede conseguir mediante administración de una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente eficaz de este agente. Como alternativa, una cantidad eficaz del al menos un agente regulador se puede suministrar por vía intranasal al tercio superior de la cavidad nasal y/o por vía sistémica como un pretratamiento, co-tratamiento y/o pos-tratamiento a la aplicación de la composición farmacéutica y/o la célula o células terapéuticas de la presente invención. Con “cantidad eficaz” se quiere decir, entre otras cosas, la concentración de agente regulador que sufiiciente para provocar el efecto terapéutico deseado con respecto a la regulación del desarrollo de una célula donadora, como se describe en el presente documento. Por consiguiente, una cantidad eficaz del agente regulador aumenta el resultado clínico de la terapia de sustitución celular en comparación con animales tratados solamente con la estrategia de sustitución celular. Como tal, una dosis terapéuticamente eficaz se puede ensayar mediante una reducción en los déficits neuronales asociados con el trastorno del SNC que se está tratando y por tanto se caracteriza por una mejora los síntomas clínicos.

Los procedimientos para cuantificar el alcance del daño neurológico y para determinar si el trastorno del SNC se ha tratado se conocen bien por los expertos en la materia. Tales procedimientos incluyen, pero sin limitación, procedimientos histológicos, ensayos de marcador molecular y análisis funcional/conductual. Por ejemplo, la integración funcional mejorada de las células donadoras y/o la función mejorada y la reparación de tejido neuronal circundante se puede ensayar examinando la restauración de diversas funciones que incluyen la cognitiva, sensorial, motora y endocrina. Los ensayos motores incluyen los que cuantifican el movimiento rotacional alejándose del lado en degeneración del cerebro y los que ensayan el equilibrio, la coordinación, la lentitud del movimiento, rigidez y temblores. Los ensayos cognitivos incluyen ensayos de memoria y aprendizaje espacial. Los ensayos específicos usados para determinar el tratamiento de una enfermedad neurológica variarán dependiendo del trastorno.

Las actividades biológicas deseadas beneficiosas para la regulación del desarrollo de la célula terapéutica transportada incluyen, por ejemplo, potenciación de la supervivencia y/o proliferación de las células terapéuticas transportadas; mejora en la capacidad de la célula terapéutica transportada de establecer conexión sináptica con las neuronas del huésped; y/o instrucción a la célula terapéutica transportada para comprometerse con un linaje neuronal específico. En la técnica se conocen procedimientos para ensayar tales acontecimientos. Por ejemplo, una mejora en la supervivencia de las células terapéuticas transportadas después de la administración del agente regulador se puede ensayar usando diversas exploraciones no invasivas tales como tomografía axial computarizada (exploración TAC o exploración TC), formación de imágenes por resonancia magnética nuclear o resonancia magnética (RMN o RM) o exploraciones de tomografía de emisión de positrones (PET). Como alternativa, la supervivencia de la célula terapéutica transportada se puede ensayar post-mórtem mediante examen microscópico de la región del trasplante de la célula terapéutica transportada. La región de las células terapéuticas transportadas se puede identificar, por ejemplo, ensayando con respecto a marcadores moleculares específicos para las células terapéuticas transportadas o como alternativa, mediante incorporación anterior de colorantes marcadores. Tales colorantes incluyen, por ejemplo, microesferas marcadas con rodamina o fluoresceína, fast blue o marcadores histoquímicos introducidos a través de retrovirus.

La cantidad eficaz dependerá de muchos factores que incluyen, por ejemplo el trastorno del SNC que se está tratando, el tipo de célula donadora trasplantada al mamífero y la capacidad de respuesta del sujeto que se está sometiendo a tratamiento. Se reconoce adicionalmente que la cantidad terapéuticamente eficaz dependerá del tipo de regulación del desarrollo de la célula terapéutica transportada que se desea (es decir, potenciación de la supervivencia y/o proliferación de la célula terapéutica transportada; mejora de la capacidad de la célula terapéutica transportada de establecer conexión sináptica con las neuronas del huésped; regulación de las claves del desarrollo liberadas por las células terapéuticas transportadas; o función y reparación mejorada del tejido neuronal circundante). Los procedimientos para determinar la eficacia y la dosificación se conocen por los expertos en la materia.

Por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson, las neuronas que se degeneran son las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. Se conocen estrategias de sustitución celular para pacientes con enfermedad de Parkinson avanzada e incluyen, por ejemplo, injertos intracuerpo estriado de neuronas dopaminérgicas de sustancia negra de embriones humanos de 6 a 9 semanas de edad (Olanow y col. (1996) Trends Neurosci. 19: 102-109 y Lindvall y col. (1999) Mov. Disord. 14: 201-205). El suministro de agentes reguladores farmacológicamente activos a regiones del cerebro afectadas por la enfermedad de Parkinson (es decir, mesencéfalo y sustancia negra) se conoce en la técnica, sin embargo, no en combinación con el suministro intranasal de células terapéuticas de tal modo que se evite la barrera hematoencefálica.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" de un agente regulador en combinación con células terapéuticas transportadas y/o composiciones farmacéuticas que comprenden células terapéuticas de la presente invención para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson usando el procedimiento de administración de la presente invención será suficiente para reducir o disminuir los síntomas clínicos de la enfermedad de Parkinson. Como tal, una cantidad eficaz del agente regulador (es decir, factor de crecimiento) administrado mediante los procedimientos de la presente invención aumentará las estrategias de sustitución celular realizadas bajo la presente invención para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Por consiguiente, los procedimientos de la presente invención aumentan la supervivencia y/o mejoran el estado clínico de los animales tratados en comparación con los animales tratados solamente con la estrategia de sustitución celular. La mejora en el estado clínico de la enfermedad de Parkinson incluye, por ejemplo, mejora en la eficacia de injerto mesencefálico ventral en términos de disminución rotacional inducida por apomorfina, un aumento en la densidad de la reinervación del cuerpo estriado y un aumento en la supervivencia neuronal (Tornqvist y col. (2000) Exp. Neurol. 164: 130-138).

La enfermedad de Huntington está caracterizada por neurodegeneración progresiva, particularmente en el cuerpo estriado y la corteza, que induce deterioros graves en las funciones tanto motoras como cognitivas. Las terapias de sustitución celular actuales sustituyen las conexiones de inhibidor del cuerpo estriado con otras estructuras tales como el globo pálido a través del implante de células precursoras de cuerpo estriado. El suministro de agentes reguladores farmacológicamente activos a regiones del cerebro que están afectadas por la enfermedad de Huntington (es decir, núcleo caudado-putamen, tálamo, diencefalo, cerebelo y corteza frontal), se conocen en la técnica, aunque nunca en conexión con células terapéuticas y/o composiciones farmacéuticas que comprenden células terapéuticas de la presente invención, en la que se evita la barrera hematoencefálica.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" de un agente regulador para el tratamiento de la enfermedad de Huntington usando el procedimiento de administración de la presente invención será suficiente para reducir o disminuir los síntomas clínicos de la enfermedad de Huntington. Por tanto, una cantidad eficaz del agente regulador (es decir, factor de crecimiento) aumentará las estrategias de sustitución celular realizadas comúnmente bajo la presente invención para el tratamiento de la enfermedad de Huntington. Como tal, los procedimientos que se han descrito anteriormente aumentan la supervivencia y/o mejoran el estado clínico de los animales tratados en comparación con animales tratados solamente con estrategia de sustitución celular. La mejora en el estado clínico incluye, por ejemplo, la desinhibición de la salida del pálido, hiperactividad locomotora reducida, recuperación de comportamiento motor y cognitivo complejo y restitución de nuevos sistemas de aprendizaje de hábitos en el cuerpo estriado lesionado. Véase, por ejemplo, Bjorklund y col. (1994) Functional Neural Transplantation (Raven, N.Y.), pp. 157-195; Dunnett y col. (1995) Behav. Brain Res. 66: 133-142; Kendall y col. (1998) Nat. Med. 4: 727-729; Palfi y col. (1998) Nat. Med. 4: 963-966; Brasted y col. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 10524-10529; y Wictorin y col. (1992) Prog. Neurobiol. 38: 611-639; que se incorporan todas en el presente documento como referencia. La administración de los agentes reguladores mediante los procedimientos de la presente invención será suficiente para mejorar el resultado clínico de la terapia de sustitución celular. Tales ensayos se pueden usar de forma sencilla por el experto en la materia para determinar el intervalo de dosificación y/o agente regulador apropiado de elección para el tratamiento eficaz de la enfermedad de Huntington.

El daño isquémico al SNC (y pérdida y muerte celular resultante) se puede producir, por ejemplo, por parada cardiaca u oclusión de arteria coronaria u oclusión de arteria cerebral o ictus. Los circuitos neuronales del SNC dañados después de un acontecimiento isquémico se han reconstruido usando diversas estrategias de sustitución celular. Por ejemplo, para acontecimientos de isquemia focal, se ha realizado el implante de cuerpo estriado embrionario en el cuerpo estriado dañado (Hodges y col. (1994) Functional Neural Transplantation (Raven, N.Y.), pp. 347-386) y el implante de neuronas obtenidas de una línea celular de teratocarcinoma humana (Borlongan y col. (1998) Exp. Neurol. 149: 310-321 y Borlongan y col. (1998) Neuroreport 9: 3703-3709). Véase también, por ejemplo, Hodges y col. (1996) Neurosci. 72: 959-988, Sorensen y col. (1996) Exp. Neurol. 138: 227-235, y Sinden y col.

(1997) Neurosci. 81: 599-608.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" de un agente regulador para el tratamiento de lesión isquémica será suficiente para reducir o disminuir los síntomas clínicos del acontecimiento isquémico. Como tal, una cantidad eficaz del agente regulador aumentará las células terapéuticas de acuerdo con la presente invención para el tratamiento de una lesión isquémica. La mejora en el estado clínico incluye, por ejemplo, una reducción en el tamaño del infarto, edema y/o déficits neurológicos (es decir, recuperación mejorada de función motora, sensorial, vestibulo motora y/o somatosensorial). Las mejoras incluyen adicionalmente una reducción en los déficits neuronales y por tanto, mejoran la recuperación de la función motora, sensorial, vestibulo motora y/o somatosensorial.

Los procedimientos para determinar si se ha tratado un acontecimiento isquémico, particularmente con respecto a la reducción del daño isquémico que incluye tamaño de infarto, edema y desarrollo de déficits neuronales se conocen bien por los expertos en la materia. Por ejemplo, después de lesión isquémica, existe un aumento significativo en la densidad de sitios de unión a omega 3 (benzodiazepina de tipo periférico) (Benazodes y col. (1990) Brain Res. 522: 275-289). Los elementos para detectar sitios omega 3 se conocen y se pueden usar para determinar el alcance del daño isquémico. Véase por ejemplo, Gotti y col. (1990) Brain Res. 522: 290-307 y referencias citadas en la misma. Como alternativa, se puede usar la Proteína Asociada a Crecimiento-43 (GAP-43) como un marcador para nuevo crecimiento axonal después de un acontecimiento isquémico. Véase, por ejemplo, Stroemer y col. (1995) Stroke 26: 2135-2144 y Vaudano y col. (1995) J. Neurosci 15: 3594-3611. El efecto terapéutico se puede medir también mediante habilidades motoras mejoradas, función cognitiva, percepción sensorial, habla y/o una disminución en la propensión a ataques en el mamífero que se somete a tratamiento. Tales ensayos funcionales/conductuales usados para evaluar la función sensorimotora y de reflejos se describen en, por ejemplo, Bederson y col. (1986) Stroke 17: 472-476, OeRyck y col. (1992) Brain Res. 573: 44-60, Markgraf y col. (1992) Brain Res. 575: 238-246, Alexis y col. (1995) Stroke 26: 2338-2346. El aumento de la supervivencia neuronal se puede medir también usando la Escala de Ictus Escandinava (SSS) o el Índice de Barthel. Tales ensayos se pueden usar de forma sencilla por el experto en la materia para determinar el intervalo de dosificación y/o el agente regulador apropiado de elección para el tratamiento eficaz de un acontecimiento isquémico.

Para los fines de la regulación del desarrollo de una célula o células terapéuticas de la presente invención después de transporte intranasal en el SNC con evitación de la barrera hematoencefálica en un mamífero, la cantidad terapéuticamente eficaz o dosis de un agente regulador puede comprender de aproximadamente 0,002 mg/kg a aproximadamente 2,0 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0,03 mg/kg a aproximadamente 0,6 mg/kg de peso corporal. Como alternativa, el agente regulador puede administrarse a 0,0004, 0,001, 0,005, 0,007, 0,009, 0,01, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8 ó 2,0 mg/kg de peso corporal. Se reconoce adicionalmente que puede ser preferente un intervalo de dosis menor de ciertos agentes reguladores (es decir, ADNF). En estas realizaciones, el agente regulador se puede administrar de aproximadamente 0,1 ng/kg a aproximadamente 20 ng/kg. Como alternativa, el agente regulador se puede administrar a 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 2, 4, 8, 12, 15, 18 y 19 ng/kg de peso corporal.

Agentes antibióticos

En diversas realizaciones, la presente invención puede comprender además una cantidad eficaz de al menos un antibiótico o como alternativa se puede usar al menos un pretratamiento de antibiótico o antibióticos administrado antes de la composición farmacéutica al tercio superior de la cavidad nasal, o cualquier combinación de la misma, para proteger al paciente que se está sometiendo a terapia de células terapéuticas. Además, el antibiótico o los antibióticos se pueden suministrar como un pretratamiento, co-tratamiento y/o pos-tratamiento por vía sistémica y/o mediante aplicación al tercio superior de la cavidad nasal. La utilidad de tal elemento antibiótico en la presente invención es reducir el riesgo de que las bacterias que se encuentran en la cavidad nasal puedan entrar en los tejidos nasales en el tercio superior de la cavidad nasal durante la aplicación de la célula o las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica, cruzar la barrera hematoencefálica e infectar otros tejidos dentro del SNC. Los tejidos particulares de interés incluyen, pero sin limitación, el cerebro, meninges, sangre, médula espinal y otros tejidos periféricos. Es preferible pretratar y/o tratar simultáneamente al paciente con un antibiótico o antibióticos cuando el agente o los agentes de mejora del suministro, por ejemplo, hialuronidasa, se aplican al tercio superior de la cavidad nasal.

Los antibióticos ilustrativos para su uso en la presente invención comprenden mupirocina, defensina, gentamicina, geneticina, cefminoxima, penicilina, estreptomocina, xilitol u otro antibiótico, en solitario o en combinación para ayudar en la protección al paciente que está recibiendo una célula o células terapéuticas y/o composición farmacéutica de la presente invención. El uso de tales antibióticos dentro de tratamientos nasales está ampliamente descrito en la bibliografía como se reconocerá de forma sencilla por el experto habitual, sin embargo, no se describe tal tratamiento nasal junto con la aplicación intranasal de células terapéuticas y/o composiciones farmacéuticas que comprenden células terapéuticas al tercio superior de la cavidad nasal por lo que se evita la barrera hematoencefálica.

Agentes inmunosupresores

Las realizaciones alternativas de la presente invención pueden comprender además una cantidad eficaz de al menos un agente inmunosupresor para mejorar la viabilidad de la célula o las células terapéuticas mediante la protección de respuesta inflamatoria y/o activación de las células inmunocompetentes del huésped. El agente o los agentes inmunosupresores pueden suministrarse como un pretratamiento, simultáneamente con la célula o células terapéuticas y/o la composición farmacéutica y/o un pos-tratamiento de la célula o las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica. Tal terapia inmunosupresora en combinación con la célula o las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica aplicada al tercio superior de la cavidad nasal mejorará la supervivencia de tales células.

Cuando las células inmunocompetentes del huésped del SNC, mucosa nasal y la ruta neuronal entre la mucosa nasal y el SNC detectan las células terapéuticas aplicadas de la presente invención, puede producirse respuesta inflamatoria y/o activación de las células inmunocompetentes del huésped. Esta serie de acontecimientos disminuirá la supervivencia de la célula o las células terapéuticas. Por lo tanto, se pueden emplear un agente o agentes de inmunosupresión antes de, durante y/o después de la aplicación de la célula o las células terapéuticas al tercio superior de la cavidad nasal para desempeñar un papel crucial en la supervivencia y viabilidad de las células terapéuticas. El agente o los agentes de inmunosupresión pueden aplicarse por vía intranasal al tercio superior de la cavidad nasal y/o por vía sistémica. Los agentes inmunosupresores convencionales y bien conocidos que se pueden usarse en solitario o en combinación en la presente invención comprenden ciclosporina A, tacrolimus, prednisolona, azatioprina, metilprednisolona, mofetil micofenilato y sirolimus. Otros agentes inmunosupresores comprenden la aplicación de células modificadas genéticamente que expresan el ligando Fas.

Composición farmacéutica

Además de la cantidad eficaz de al menos una célula terapéutica administrada al tercio superior de la cavidad nasal del mamífero, una composición farmacéutica se puede aplicar o administrar al tercio superior de la cavidad nasal. Tal composición farmacéutica puede comprender, además de la cantidad eficaz de al menos una célula terapéutica, por ejemplo, la composición puede comprender al menos un agente regulador como se ha descrito anteriormente, al menos un agente de mejora del suministro como se ha descrito anteriormente, al menos un antibiótico y/o al menos un agente inmunosupresor, todos como se han descrito anteriormente y como se analizará adicionalmente más adelante. La composición farmacéutica de la presente invención se puede combinar con pre-, co- y post-tratamiento con cualquier combinación sistémica y/o aplicación al tercio superior de la cavidad nasal del al menos un agente regulador, agente de mejora del suministro, antibiótico y/o agente inmunosupresor.

Entre las alternativas que se pueden combinar con células terapéuticas en la composición farmacéutica están agentes de mejora de suministro, tales como agentes lipófilos, que pueden mejorar la absorción del agente regulador a través de la mucosa o el epitelio de la cavidad nasal para alcanzar las células dañadas y/o en degeneración en el SNC. El agente regulador se puede mezclar con un agente lipófilo o adyuvante en solitario o en combinación con un vehículo o se puede combinar con uno o varios tipos de sustancias micelares o liposomales. Entre las sustancias lipófilas preferentes está los liposomas catiónicos que incluyen uno o más de fosfatidilcolina, lipofectina, DOTAP o similares.

Un agente de mejora del suministro preferente comprende hialuronidasa que se ha observado que aumenta muy significativamente el suministro de células terapéuticas al SNC cuando se aplica al tercio superior de la cavidad nasal como un pretratamiento a la célula terapéutica de la presente invención o como un componente de la composición farmacéutica que comprende células terapéuticas de la presente invención. Los agentes de mejora del suministro alternativos comprenden neuregulina y actividad inductora de migración. Estos agentes de mejora del suministro, por ejemplo hialuronidasa, agentes lipófilos, neuregulina y actividad inductora de migración se pueden usar individualmente o en cualquier combinación para mejorar el suministro de las células terapéuticas al SNC de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, al menos un agente de mejora del suministro se puede usar como un pretratamiento para el transporte de las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica y/o como un componente de la composición farmacéutica que comprende células terapéuticas.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además al menos un antibiótico o como alternativa se puede usar un pretratamiento de antibiótico antes de la aplicación de la composición farmacéutica al tercio superior de la cavidad nasal o cualquier combinación de los mismos para proteger al paciente que se está sometiendo a terapia con células terapéuticas. Además, el antibiótico puede suministrarse como un pretratamiento, co-tratamiento y/o postratamiento administrado por vía intranasal y/o por vía sistémica. La utilidad de tal elemento antibiótico en la presente invención es reducir el riesgo de que las bacterias que se encuentran en la cavidad nasal puedan entrar en los tejidos nasales en el tercio superior de la cavidad nasal durante la aplicación de la célula o las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica, cruzar la barrera hematoencefálica e infectar otros tejidos dentro del SNC. Los tejidos particular de interés incluyen, pero sin limitación, el cerebro, meninges, sangre, médula espinal y otros tejidos periféricos. Es preferente pretratar y/o tratar simultáneamente al paciente con un antibiótico cuando se aplica un agente de mejora de suministro tal como hialuronidasa, en solitario o en una composición farmacéutica, al tercio superior de la cavidad nasal.

Los antibióticos ilustrativos para su uso en la presente invención comprenden mupirocina, defensina, gentamicina, geneticina, cefminoxima, penicilina, estreptomina, xilitol u otro antibiótico, en solitario o en combinación para ayudar en la protección al paciente que está recibiendo la célula o las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica de la presente invención. El uso de tales antibióticos dentro de tratamientos nasales está ampliamente descrito en la bibliografía como se reconocerá de forma sencilla por el experto habitual.

La presente invención puede comprender adicionalmente al menos un agente inmunosupresor, suministrado como un pretratamiento, simultáneamente con la célula o las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica y/o postratamiento de la célula o las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica. Tal terapia inmunosupresora en combinación con la célula o las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica aplicada al tercio superior de la cavidad nasal mejorará la supervivencia de tales células. Cuando las células inmunocompetentes del huésped del SNC, mucosa nasal y la ruta neuronal entre la mucosa nasal y el SNC detectan las células terapéuticas aplicadas de la presente invención pueden producirse respuesta inflamatoria y/o activación de las células inmunocompetentes del huésped. Esta serie de acontecimientos disminuirá la supervivencia de la célula o las células terapéuticas. Por lo tanto se pueden emplear un agente o agentes de inmunosupresión antes de, durante y/o después de la aplicación de la célula o las células terapéuticas al tercio superior de la cavidad nasal para desempeñar un papel crucial en la supervivencia y la viabilidad de las células terapéuticas. El agente o los agentes de inmunosupresión se pueden aplicar por vía intranasal al tercio superior de la cavidad nasal y/o por vía sistémica. Los agentes inmunosupresores convencionales y bien conocidos que se pueden usar en solitario o en combinación en la presente invención comprenden ciclosporina A, tacrolimus, prednisolona, azatioprina, metilprednisolona, mofetil micofenilato y sirolimus. Otro agente inmunosupresor comprende la aplicación de células modificadas genéticamente que expresen el ligando Fas.

Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender cualquier aditivo, vehículo y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable que pueda promover la transferencia de este agente dentro o a través de un tejido innervado por el nervio trigeminal o el nervio olfativo o a lo largo o a través de una ruta neuronal.

Con "vehículo farmacéuticamente aceptable" se quiere decir un vehículo que se usa convencionalmente en la técnica para facilitar el almacenamiento, administración y/o la actividad biológica de la célula o las células terapéuticas, el agente o agentes reguladores, el agente o agentes de mejora del suministro, el antibiótico o antibióticos y/o el agente inmunosupresor en una composición farmacéutica de la presente invención. Un vehículo también puede reducir cualquier efecto secundario indeseable de los componentes de tal composición farmacéutica. Un vehículo adecuado debe ser estable, es decir, incapaz de reaccionar con otros ingredientes en la formulación. No debe producir efectos adversos locales o sistémicos significativos en receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas para el tratamiento. Tales vehículos se conocen generalmente en la técnica.

Los vehículos adecuados para las diversas realizaciones de la presente invención incluyen los usos convencionalmente para macromoléculas estables grandes tales como albúmina, gelatina, colágeno, polisacárido, monosacáridos, polivinilpirrolidona, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), aminoácidos poliméricos, aceites fijos, oleato de etilo, liposomas, glucosa, sacarosa, lactosa, manosa, dextrosa, dextrano, celulosa, manitol, sorbitol, polietilenglicol (PEG) y similares. Una composición farmacéutica adicional puede comprender micropartículas, compuestos orgánicos e inorgánicos que sirven como un material de adherencia para la célula o las células y conglomerados celulares que se pueden transportar al SNC en diversas realizaciones de la presente invención, disminuyendo de este modo la pérdida de células transportadas desde la mucosa nasal al SNC. Estos compuestos pueden incluir varios tipos de moléculas adhesivas, geles (que sirven como un material de encapsulación/inclusión para las células), componentes de matriz o matrices extracelulares y partículas orgánicas y/o inorgánicas tales como fibrina o partículas de fibronectina-carbono o arcilla y dextrano y su composición.

El agua, solución salina, dextrosa acuosa y glicoles son vehículos líquidos preferentes, particularmente (cuando son isotónicos) para soluciones. El vehículo se puede seleccionar de diversos aceites que incluyen los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato sódico, monoestearato de glicerol, cloruro sódico, leche desnatada seca, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Las composiciones se pueden someter a recursos farmacéuticos convencionales, tales como esterilización y pueden contener aditivos farmacéuticos convencionales, tales como conservantes, agentes estabilizantes, agentes humectantes o emulsionantes, sales para ajustar la presión osmótica, tampones y similares. Cuando el vehículo es un líquido se prefiere que el vehículo sea hipotónico o isotónico con los líquidos corporales y tenga un pH dentro del intervalo de 4,5-8,5.

Otros componentes aceptables en la composición farmacéutica comprenden, sin limitación, agentes modificadores de la isotonicidad tales como agua, solución salina y tampones que incluyen fosfato, citrato, succinato, ácido acético y otros ácidos orgánicos o sus sales. Típicamente, el vehículo farmacéuticamente aceptable también incluye uno o más estabilizantes, agentes reductores, antioxidantes y/o agentes quelantes de antioxidantes. El uso de tampones, estabilizantes, agentes reductores, antioxidantes y agentes quelantes en la preparación de composiciones basadas en proteínas, particularmente composiciones farmacéuticas, se conoce bien en la técnica. Véase Wang y col. (1980) J. Parent. Drug Assn. 34(6): 452462; Wang y col. (1988) J. Parent. Sci. Tech. 42: S4-S26 (Supplement); Lachman y

col. (1968) Drug and Cosmetic Industry 102(1): 36-38, 40, y 146-148; Akers (1988) J. Parent. Sci. Tech. 36(5): 222-228; y Methods in Enzymology, Vol. XXV, ed. Colowick and Kaplan, "Reduction of Disulfide Bonds in Proteins with Dithiothreitol," por Konigsberg, pp. 185-188.

5 Diversas realizaciones de la composición farmacéutica de la presente invención comprenden tampones adecuados tales como acetato, adipato, benzoato, citrato, lactato, maleato, fosfato, tartrato, borato, tri(hidroximetil aminometano), succinato, glicina, histidina, las sales de diversos aminoácidos o similares o combinaciones de los mismos. Véase Wang (1980) anteriormente en la página 455. Las sales e isotonicantes adecuados incluyen cloruro sódico, dextrosa, manitol, sacarosa, trehalosa o similares.

10 Diversas realizaciones de la composición farmacéutica de la presente invención pueden comprender adicionalmente agentes reductores adecuados, que mantienen la reducción de cisteínas reducidas, incluyen ditiotreitól (DTT también conocido como reactivo de Cleland) o ditioeritrol del 0,01% al 0,1% p/p, acetilcisteína o cisteína del 0,1% al 0,5% (pH 2-3); y tioglicerol del 0,1% al 0,5% (pH 3,5 a 7,0) y glutatión. Los antioxidantes adecuados incluyen bisulfito sódico, sulfito sódico, metabisulfito sódico, tiosulfato sódico, sulfoxilato de formaldehído sódico y ácido ascórbico. Los agentes quelantes adecuados, que quelan metales traza para evitar la oxidación catalizada por metal traza de cisteínas reducidas incluyen citrato, tartrato, ácido etilendiamintetraacético (EDTA) en sus sales disódicas, tetrasódicas y disódicas de calcio y ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). Véase, por ejemplo, Wang (1980) anteriormente en páginas 457-458 y 460-461, y Akers (1988) anteriormente en páginas 224-227.

20 Diversas realizaciones de la composición farmacéutica de la presente invención pueden comprender adicionalmente uno o más conservantes tales como fenol, cresol, ácido paraaminobenzoico, BDSA, sorbitrato, clorhexidina, cloruro de benzalconio, o similares. Los estabilizantes adecuados incluyen hidratos de carbono tales como trehalosa o glicerol. La composición puede incluir un estabilizante tal como uno o más de celulosa microcristalina, estearato de magnesio, manitol o sacarosa para estabilizar, por ejemplo, la forma física de la composición; y uno o más de glicina, arginina, colágeno hidrolizado o inhibidores de proteasa para estabilizar, por ejemplo, la estructura química de la composición.

25 Diversas realizaciones de la composición farmacéutica de la presente invención pueden comprender también agentes de suspensión adecuados tales como carboximetilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa, ácido hialurónico, alginato, condroitín sulfato, dextrano, maltodextrina, sulfato de dextrano o similares. La composición puede incluir un emulsionante tal como polisorbato 20, polisorbato 80, pluronic, trioleína, aceite de semilla de soja, lecitinas, escualeno y escualanos, sorbitán trioleato o similares.

30 La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente al menos un antimicrobiano tal como alcohol fenil etílico, fenol, cresol, cloruro de benzalconio, fenoxietanol, clorhexidina, timerosol o similares. Los espesantes adecuados incluyen polisacáridos naturales tales como mananos, arabinanos, alginato, ácido hialurónico, dextrosa o similares; y los sintéticos tales como los hidrogeles de PEG de bajo peso molecular; y los agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente pueden incluirse en la composición farmacéutica de la presente invención.

35 La composición farmacéutica inventiva puede comprender adicionalmente un adyuvante tal como bromuro de cetiltrimetil amonio, BDSA, colato, desoxicolato, polisorbato 20 y 80, ácido fusídico o similares. Los azúcares adecuados incluyen glicerol, treosa, glucosa, galactosa, manitol y sorbitol.

40 Diversas realizaciones de la composición farmacéutica de la presente invención pueden comprender adicionalmente uno o más de un aditivo de mejora de la solubilidad, preferentemente una ciclodextrina; un aditivo hidrófilo, preferentemente un monosacárido u oligosacáridos, un aditivo promotor de la absorción, preferentemente un colato, un desoxicolato, un ácido fusídico o un quitosano; un tensioactivo catiónico, preferentemente un bromuro de cetil trimetilamonio; un aditivo de mejora de la viscosidad, preferentemente para promover el tiempo de permanencia de la composición en el sitio de administración, preferentemente una carboximetilcelulosa, una maltodextrina, un ácido algínico, un ácido hialurónico o un condroitilsulfato; o una matriz de liberación sostenida, preferentemente un polianhídrido, un poliortoéster, un hidrogel, un sistema de depósito de liberación lenta de partículas, preferentemente un coglicólido de polilactida (PLG), una espuma de depósito, una microesfera de almidón o un sistema bucal derivado de celulosa; un vehículo basado en lípidos, preferentemente una emulsión, un liposoma, un niosoma o una micela. La composición puede incluir un aditivo desestabilizador de bicapa, preferentemente una fosfatidil etanolamina; un aditivo fusogénico, preferentemente un hemisuccinato de colesterol.

45 La composición farmacéutica puede incluir adicionalmente un compuesto solubilizante para aumentar la estabilidad del agente regulador o variante biológicamente activa del mismo. Para IGF-I, un agente solubilizador preferente incluye un grupo guanidinio que es capaz de mejorar su solubilidad. Los ejemplos de tales compuestos solubilizadores incluyen el aminoácido arginina así como los análogos de aminoácido de arginina que conservan la capacidad de mejorar la solubilidad de IGF-I o una variante biológicamente activa del mismo a pH 5,5 o superior. Tales análogos incluyen, sin limitación, dipéptidos y tripéptidos que contienen arginina. Con "mejora de la solubilidad" se quiere decir aumentar la cantidad de factor de crecimiento o variante biológicamente activa del mismo que se puede disolver en solución a pH 5,5 o superior en presencia de un compuesto que contiene guanidinio en comparación con al cantidad de esta proteína que se puede disolver a pH 5,5 o superior en una solución con los

mismos componentes pero que carece del compuesto que contiene guanidinio. La capacidad de un compuesto que contiene guanidinio para mejorar la solubilidad del factor de crecimiento o variante biológicamente activa del mismo se puede determinar usando procedimientos bien conocidos en la técnica. En general, se conoce como proporcionar la concentración del compuesto solubilizador presente en la composición en el intervalo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 M y, por ejemplo, en el caso del compuesto de arginina, en un intervalo de concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 200 mM.

Estas listas de vehículos y aditivos de ningún modo son completas y un experto habitual en la técnica puede elegir excipientes de la lista GRAS (considerada generalmente segura) de productos químicos permitidos en las preparaciones farmacéuticas y los que están permitidos actualmente en las formulaciones tópicas y parenterales.

Además, el procedimiento para formular una composición farmacéutica se conoce generalmente en la técnica. Una discusión extensa de la formulación y selección de vehículos, estabilizantes e isomolitos farmacéuticamente aceptables se puede encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences (18^a ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pa., 1990), incorporada en el presente documento por referencia.

Para los fines de la presente invención, la composición farmacéutica como se describe en el presente documento se puede formular en una dosificación unitaria y en una forma tal como una solución, suspensión o emulsión para la aplicación al tercio superior de la cavidad nasal. La composición farmacéutica a aplicar y administrar al tercio superior de la cavidad nasal al tejido inervado por las neuronas olfativas puede estar en forma de un polvo, un gránulo, una solución, una pulverización (por ejemplo, un aerosol), una pomada, una infusión, una gota o una composición de liberación prolongada, tal como un disco polimérico. Otras formas de composiciones para administración incluyen una suspensión de un particulado, tal como una emulsión, un liposoma, un inserto que libera la composición farmacéutica lentamente y similares. Las fórmulas en polvo o granulares de la composición farmacéutica pueden combinarse con una solución y con un agente de dilución, dispersión o regulador tensioactivo. La composición puede estar también en forma de un polvo liofilizado, que puede convertirse en solución, suspensión o emulsión antes de la administración. La composición farmacéutica que comprende al menos un agente regulador está preferentemente esterilizada mediante filtración por membrana y se almacena en recipientes monodosis o multidosis tales como viales o ampollas selladas.

Administración de las células terapéuticas y/o compuestos farmacéuticos

La administración de las células terapéuticas de acuerdo con la invención puede incluir aplicación de las células terapéuticas en solitario o formular las células terapéuticas con uno o más de los compuestos que se han descrito anteriormente, como composiciones farmacéuticas y administrar las composiciones farmacéuticas a un sujeto animal o huésped incluyendo un paciente humano, por vía intranasal al tercio superior de la cavidad nasal. Las células terapéuticas y otros componentes de la composición farmacéutica de las mismas, por ejemplo, agente de mejora del suministro, agente regulador, antibiótico y/o agente inmunosupresor pueden administrarse en una de una diversidad de dosis suficientes para proporcionar una cantidad eficaz en el punto de acción deseado de la célula terapéutica y/o componente de composición farmacéutica. Las dosis para seres humanos y otros mamíferos puede variar de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1-10 mg/kg. Como se ha señalado, el agente o los agentes de mejora del suministro, el agente o los agentes reguladores, el antibiótico o los antibióticos y/o el agente o los agentes inmunosupresores se pueden suministrar como pretratamiento, cotratamiento y/o postratamiento con la célula o las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica, en solitario o como un componente de la composición farmacéutica y, cuando no está comprendida en la composición farmacéutica, se pueden suministrar por vía sistémica o al tercio superior de la cavidad nasal.

Para la aplicación al tercio superior de la cavidad nasal como suspensiones, aerosoles, pulverizadores o gotas, la célula o las células terapéuticas y/o la composición o las composiciones farmacéuticas se pueden preparar de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica. Las composiciones se pueden preparar como suspensiones de células en soluciones que pueden comprender sales tales como solución salina, componentes tales como tampones fosfato, succinato o citrato para mantener el pH, agentes osmorreguladores y osmóticos tales como taurina y conservantes adecuados, promotores de la absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica. Los medios de aplicación de una composición farmacéutica por vía intranasal al tercio superior de la cavidad nasal puede ser en una diversidad de formas tales como polvo, pulverizador, gel o gotas nasales.

Otras formas de composiciones para la administración de células terapéuticas y/o composiciones farmacéuticas o elementos de los mismos incluyen una suspensión de un particulado tal como una emulsión, un liposoma o en una forma de liberación sostenida para prolongar la presencia del agente farmacéuticamente activo en un individuo. Las formas en polvo granulares de la composición farmacéutica pueden combinarse con una solución y con un agente de dilución, dispersante o tensioactivo. Las composiciones adicionales para la administración incluyen un bioadhesivo para conservar el agente en el sitio de administración en el tercio superior de la cavidad nasal, por ejemplo, un pulverizador, pintura o hisopo aplicado a la mucosa. Un bioadhesivo puede referirse a polímeros hidrófilos, naturales o sintéticos, que, mediante la denominación de hidrófilo, pueden ser solubles o hinchables en agua y que son compatibles con la composición farmacéutica. Tales adhesivos funcionan adhiriendo las

- 5 formulaciones a los tejidos de la mucosa del tercio superior de la cavidad nasal. Tales adhesivos pueden incluir, pero sin limitación, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa, dextrano, goma guar, polivinilpirrolidona, pectinas, almidones, gelatina, caseína, polímeros de ácido acrílico, polímeros de ésteres de ácido acrílico, copolímeros de ácido acrílico, polímeros vinílicos, copolímeros vinílicos, polímeros de alcoholes vinílicos, polímeros de alcoxi, polímeros de óxido de polietileno, poliéteres y combinaciones de los mismos. La combinación puede estar también en forma de polvo liofilizado, que puede convertirse en solución, suspensión o emulsión antes de la administración. La composición farmacéutica está preferentemente esterilizada mediante filtración por membrana y se almacena en recipientes monodosis o multidosis tales como viales o ampollas selladas.
- 10 La composición farmacéutica puede formularse en una forma de liberación sostenida para prolongar la presencia del agente activo en el individuo tratado. Muchos procedimientos de preparación de una formulación de liberación sostenida se conocen en la técnica y se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences. Generalmente, las células terapéuticas, la composición terapéutica y/o los componentes de la composición farmacéutica, es decir, el agente de mejora del suministro, agente regulador, antibiótico y/o agente inmunosupresor pueden estar atrapados
- 15 en matrices semipermeables de polímero hidrófobos sólidos. Las matrices se pueden conformar hasta dar películas o microcápsulas. Las matrices pueden incluir, pero sin limitación, poliésteres, copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato, polilactidas, poliglicolato de polilactato, hidrogeles, etilvinilacetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, geles de ácido hialurónico y suspensiones de ácido algínico. Las microcápsulas adecuadas también incluir hidroximetilcelulosa o gelatina y poli-metil metacrilato.
- 20 También se pueden usar microemulsiones o los sistemas de suministro de fármacos coloidales tales como liposomas y microesferas de albúmina.

Sistemas de suministro

- 25 Las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica comprende células terapéuticas y/o componentes de la composición farmacéutica de la presente invención pueden dispensarse adicionalmente y aplicarse por vía intranasal al tercio superior de la cavidad nasal como un pulverizador nasal en polvo o líquido, suspensión, gotas nasales, un gel, película o pomada, a través de un tubo o catéter, mediante jeringa, mediante pack-tail, mediante torunda (una pequeña almohadilla absorbente plana), mediante tampón nasal o mediante infusión submucosa. Las células terapéuticas y/o una composición farmacéutica de las mismas se pueden administrar al tercio superior de la cavidad nasal mediante un dispositivo de suministro. El suministro de fármaco nasal se puede llevar a cabo usando
- 30 dispositivos que incluyen, pero sin limitación, recipientes monodosis, pulverizadores con bomba, goteros, frascos lavadores, pulverizadores sin aire y libres de conservantes, nebulizadores (dispositivos usados para cambiar la medicación líquida a una forma particulada en aerosol), inhaladores de dosis graduada e inhaladores de dosis graduada presurizada. En algunos aspectos está contenida una cantidad de dosificación eficaz precisa en un parche bioadhesivo que se coloca directamente dentro y sobre el tercio superior de una cavidad nasal.

- 35 Las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica que comprende células terapéuticas y/o componentes de la composición terapéutica de la presente invención puede suministrarse de forma cómoda al tercio superior de la cavidad nasal en forma de un pulverizador de aerosol usando un envase presurizado o un nebulizador y un propulsor adecuado que incluye, pero sin limitación, diclorofluorometano, tricolorfluorometano, diclorotetrafluoroetano, hidrocarburos, aire comprimido, nitrógeno o dióxido de carbono. Un sistema de aerosol requiere que el propulsor sea inerte con respecto a las células terapéuticas y/o la composición farmacéutica como se entenderá de forma sencilla por el experto habitual. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede controlarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad graduada de forma precisa.

- 45 Los medios para suministrar células terapéuticas o la composición farmacéutica que comprende células terapéuticas y/o componentes de la composición farmacéutica de la presente invención al tercio superior de la cavidad nasal como un polvo pueden estar en una forma tal como microesferas suministradas por un dispositivo insuflador nasal (un dispositivo para soplar un gas, polvo o vapor en una cavidad del cuerpo) o cartucho de aerosol presurizado. El insuflador produce una nube finamente dividida del polvo seco o microesferas. El insuflador puede proporcionarse por medios para garantizar la administración de una cantidad graduada sustancialmente de la composición farmacéutica. El polvo o las microesferas deben administrarse en una forma seca dispensable en aire. El polvo o las
- 50 microesferas se pueden usar directamente con un insuflador que está provisto de un frasco o recipiente para el polvo o las microesferas. Como alternativa, el polvo o las microesferas se pueden cargar en una cápsula tal como una cápsula de gelatina u otro dispositivo de una sola dosis adaptado para la administración nasal. El insuflador puede tener medios tales como una aguja para abrir mediante rotura la cápsula u otros dispositivos para proporcionar orificios a través de los cuales se pueden suministrar chorros de la composición en polvo al tercio superior de la cavidad nasal. En esta realización, las células terapéuticas se pueden deshidratar y/o liofilizar con rehidratación posterior en la mucosa nasal.
- 55

Dosificación intermitente y cíclica

- 60 En diversas realizaciones de la invención, las células terapéuticas y/o una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de las células terapéuticas y/o los componentes de la composición farmacéutica pueden administrarse como una dosis única y de una vez o como alternativa, las células terapéuticas y/o los componentes

de la composición farmacéutica se pueden administrar más de una vez e intermitentemente. Con “administración intermitente” se pretende significar la administración de una cantidad eficaz de células terapéuticas y/o los componentes de la composición farmacéutica, seguido de un periodo de tiempo de interrupción, que después es seguido por otra administración de una cantidad eficaz, etc. La administración de la cantidad eficaz de células terapéuticas y/o los componentes de la composición farmacéutica puede conseguirse de un modo continuo, tal como, por ejemplo, con una formulación de liberación sostenida o se puede conseguir de acuerdo con un régimen de dosificación diaria deseado, tal como, por ejemplo, con una, dos, tres o más administraciones por día. Con “periodo de tiempo de interrupción” se quiere decir una interrupción de la administración de liberación sostenida continua o diaria de las células terapéuticas y/o los componentes de la composición farmacéutica. El periodo de tiempo de interrupción puede ser más largo o más corto que el periodo de administración de liberación sostenida continua o diaria. Durante el periodo de tiempo de interrupción, las células terapéuticas y/o los componentes del nivel de la composición farmacéutica en el tejido pertinente están sustancialmente por debajo del nivel máximo obtenido durante el tratamiento. La longitud preferente del periodo de interrupción depende de la concentración de la dosis eficaz y la forma de las células terapéuticas y/o los componentes de la composición farmacéutica usada. El periodo de interrupción puede ser al menos 2 días, preferentemente es al menos 4 días, más preferentemente es al menos 1 semana y generalmente no supera un periodo de 4 semanas. Cuando se usa una formulación de liberación sostenida, el periodo de interrupción tiene que extenderse para tener en cuenta el mayor tiempo de permanencia del agente regulador en el sitio de la lesión. Como alternativa, la frecuencia de administración de la dosis eficaz de la formulación de liberación sostenida puede disminuirse en consecuencia. Un programa de administración intermitente de células terapéuticas y/o los componentes de la composición farmacéutica puede continuar hasta que se haya conseguido el efecto terapéutico y finalmente el tratamiento de la enfermedad o el trastorno.

En otra realización más, la administración intermitente de la cantidad o las cantidades eficaces de células terapéuticas y/o los componentes de la composición farmacéutica es cíclica. Con “cíclica” se pretende decir la administración intermitente acompañada por pausas en la administración, variando los ciclos de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2, 3, 4, 5 ó 6 meses. Por ejemplo, el programa de administración puede ser administración intermitente de la dosis eficaz de células terapéuticas y/o los componentes de la composición farmacéutica, en la que se da una única dosis a corto plazo una vez por semana durante 4 semanas, seguido de una pausa en la administración intermitente durante un periodo de 3 meses, seguido de administración intermitente mediante administración de una dosis única a corto plazo dada una vez por semana durante 4 semanas, seguido de una pausa en la administración intermitente durante un periodo de 3 meses, etc. Como otro ejemplo, una dosis única a corto plazo se puede dar una vez por semana durante 2 semanas seguido de una pausa en la administración intermitente durante un periodo de 1 mes, seguido de una dosis única a corto plazo dada una vez por semana durante 2 semanas, seguido de una pausa en la administración intermitente durante un periodo de 1 mes, etc. Un programa de administración intermitente cíclico de células terapéuticas y/o los componentes de la composición farmacéutica a un sujeto puede continuar hasta que se haya conseguido el efecto terapéutico deseado y finalmente el tratamiento del trastorno o la enfermedad.

Para los fines de regular el desarrollo de las células terapéuticas y, por lo tanto, reducir o prevenir la manifestación clínica del trastorno neurológico que se está tratando, la administración intranasal de una o más dosis terapéuticamente eficaces de al menos un agente regulador puede tener lugar en el intervalo de minutos, horas, días o incluso semanas desde la aplicación inicial de las células terapéuticas y/o la composición o las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Por ejemplo, la dosis terapéutica inicial del al menos un agente regulador se puede administrar en el intervalo de aproximadamente 2 a 4 horas, en el intervalo de aproximadamente 2 a 6 horas, en el intervalo de aproximadamente 8 horas, en el intervalo de aproximadamente 10 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 24 horas, en el intervalo de aproximadamente 36 horas, 48 horas, 72 horas, o aproximadamente 96 horas o más después de la aplicación de las células terapéuticas y/o la composición o las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Se pueden administrar una o más dosis adicionales del agente regulador durante horas, días o semanas después de la dosis inicial. Además, al animal que se somete a terapia de regeneración de sustitución celular de acuerdo con realizaciones de la presente invención se le puede administrar agentes reguladores adicionales y/o células terapéuticas y/o composiciones farmacéuticas intermitentemente a lo largo del tiempo de acuerdo con una estrategia de cuidado del paciente. Por tanto, por ejemplo, a un animal que se está sometiendo a terapia de sustitución celular se le puede administrar una o más dosis terapéuticamente eficaces del agente o los agentes reguladores, células terapéuticas y/o composición o composiciones farmacéuticas de la presente invención de la misma antes, durante o después de la aplicación inicial. De forma similar, el agente de mejora de suministro, el agente o los agentes inmunosupresores y/o el agente o agentes antibióticos se pueden administrar antes, durante o después de la aplicación inicial de las células terapéuticas y/o la composición o las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Los marcos de administración intermitentes y cíclicos proporcionados en el presente documento son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes de ningún modo. Los expertos en la materia reconocerán diversos marcos/frecuencias de administración para casos individuales.

La presente invención se puede comprender mejor con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos tienen por objeto ser representativos de realizaciones específicas de la invención y no tienen por objeto limitar el ámbito de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Células terapéuticas que evitan la barrera hematoencefálica después de la aplicación intranasal al tercio superior de la cavidad nasal en un modelo de rata de la enfermedad de Parkinson

5 La hipótesis de que las células terapéuticas podrían de hecho evitar la barrera hematoencefálica se ensayó por los inventores en roedores (ratones y ratas) sanos y en ratas tratadas con 6-OHDA para crear un modelo de enfermedad de Parkinson. En este ejemplo se administraron por vía intranasal células madre mesenquimales, es decir, células eucariotas al tercio superior de la cavidad nasal de ratones sanos adultos y a ratas lesionadas unilateralmente con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) para modelar el SNC dañado y/o en degeneración de pacientes con enfermedad de Parkinson. Adicionalmente, las células de glioma se administraron por vía intranasal al tercio superior de la cavidad nasal de ratas sanas jóvenes. En el intervalo de una (1) hora de la administración/aplicación, ambos tipos celulares alcanzaron el bulbo olfativo, corteza, hipocampo, cuerpo estriado y el cerebelo de los animales sanos. En el modelo de rata de 6-OHDA de enfermedad de Parkinson, las células se detectaron 4 horas después de la administración. Es probable que las células puedan haber alcanzado el cerebro en ambos casos en menos de una hora. Después de que las células hubieran cruzado la placa cribiforme se observaron dos rutas de migración: (1) migración al bulbo olfativo y también a otras partes del cerebro incluyendo la corteza y el cuerpo estriado; y (2) entrada en el líquido cefalorraquídeo con movimiento a lo largo de la superficie de la corteza seguida de entrada en el parénquima cerebral.

Ejemplo 2 –Efecto del agente de mejora de suministro sobre el transporte de las células terapéuticas después de aplicación intranasal al tercio superior de la cavidad nasal

20 Se evaluó la eficacia del suministro intranasal de células terapéuticas al cerebro después de aplicación intranasal de células madre mesenquimales de rata (MSC) marcadas con CFDA o colorante de Hoechst al tercio superior de la cavidad nasal de ratones C57 b1/6 de siete semanas de edad, evitando por tanto la barrera hematoencefálica en la administración y aplicación y transporte de las células terapéuticas.

25 Inicialmente, los animales se dividieron en tres grupos (n = 5 en cada grupo): 1) el grupo A recibió solamente células terapéuticas intranasales; 2) el grupo B recibió el agente de mejora del suministro hialuronidasa por vía intranasal 30 minutos antes de la aplicación intranasal de células; 3) el grupo C recibió el vehículo por vía intranasal (24 1-11 PBS). Una hora después de la aplicación de las células, los animales se sacrificaron con anestesia, los cráneos se congelaron a -80 °C y se seccionaron más tarde en cortes sagitales u horizontales (201-lm) montados en medio que contiene DAPI o PI y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia.

30 Las células marcadas con colorante de Hoechst aparecieron en todas las capas del bulbo olfativo, cuerpo estriado, corteza, en la pared y en la proximidad del ventrículo lateral y del cerebelo de animales en el grupo A, las células terapéuticas suministradas por vía intranasal en solitario. En el bulbo olfativo, las células estaban distribuidas a lo largo de todas las capas en los animales del grupo A y B. La administración intranasal de hialuronidasa (100 U/animal en el grupo B) aumentó el número de MSC en el cerebro, especialmente en el bulbo olfativo cuando se comparó con los del grupo A.

35 La distribución de MSC en diferentes capas de corteza en los grupos A y B sugiere la migración de las células terapéuticas desde la superficie al parénquima. Se localizaron numerosas células en el espacio subaracnoideo en vecindad estrecha con las MSC que ya habían alcanzado la capa superior de la corteza. Algunas de estas células tenían procesos que sugerían progreso en su diferenciación. Una gran cantidad de las MSC marcadas con CFDA aplicada por vía intranasal permanecía en la cavidad nasal superior (flechas en la Figura 2 D) 1 hora después de la aplicación indicando que la migración de células terapéuticas de la mucosa nasal a través de la placa cribiforme al cerebro podría continuar posiblemente durante varias horas y a lo mejor incluso días.

40 Se observó una migración paso a paso de células desde la superficie de la corteza a las capas profundas después de que una cierta densidad de células se haya alcanzado en una capa; los agregados de células en las capas profundas aparecen solamente en proximidad de filas de células colocadas más próximas a la superficie de la corteza.

Ejemplo 3 – Migración dirigida de células terapéuticas a la lesión en el SNC después de la aplicación intranasal al tercio superior de la cavidad nasal

50 Ya que los resultados obtenidos y que se han descrito anteriormente en el Ejemplo 2 muestran que, además de la corteza, el bulbo olfativo y el cerebelo, las células terapéuticas aplicadas por vía intranasal aparecieron también en el área del cuerpo estriado, se decidió investigar si la neurodegeneración puede dirigirse a la migración de células aplicadas al lado de la lesión usando un modelo con una lesión unilateral con 6-OHDA en ratas adultas.

55 Se indujo daño en el cuerpo estriado en ratas adultas mediante inyección unilateral (hemisferio izquierdo) de la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) para inducir un modelo de tipo de Parkinson. Las células se aplicaron en dos grupos de animales (n = 5 en cada uno): 1) sin o 2) con tratamiento con hialuronidasa intranasal (200 U/animal) 30 minutos antes de la administración intranasal de las células tres días después de la lesión. Los cerebros de animales se retiraron 4 horas después de la aplicación de las células y se congelaron a -80 °C. Para mostrar los

cambios degenerativos en el cuerpo estriado izquierdo (lesionado) después de la lesión con 6-OHDA se tomaron 10 rodajas horizontales de cada animal del área de 5 mm a 8 mm desde el bregma y se tiñeron para tirosina hidroxilasa (TH).

5 A diferencia de la intensa tinción para prácticamente todo el cuerpo estriado con TH en el lado no lesionado, la expresión de TH en el lado lesionado estaba claramente disminuida. La exploración de las rodajas de cerebro con microscopía de fluorescencia mostró una notable diferencia en el número de células entre los lados lesionados y contralateral: la mayoría de las MSC marcadas con CFDA se encontró en el bulbo olfativo (OB), la corteza al nivel de la lesión y dentro del cuerpo estriado lesionado mientras que solamente muy pocas células se encontraron en el cuerpo estriado, corteza y OB del hemisferio contralateral. Algunas MSC se encontraron ocasionalmente en las rodajas teñidas para TH. De forma muy interesante, muy pocas de las MSC que se encontraron en OB expresaron TH, mientras que la mayoría de las células localizadas en la corteza en proximidad de la lesión eran positivas a TH.

10 Estos resultados proporcionan pruebas de la migración preferencial de células madre dirigidas al sitio de la lesión en roedores lesionados con 6-OHDA. Además se demostró el mejor suministro al cerebro de células madre de médula ósea en el hemisferio lesionado en comparación con las del lado no lesionado usando una realización de la presente invención.

Ejemplo 4 –Células terapéuticas que comprenden células tumorales que evitan la barrera hematoencefálica después de la aplicación intranasal al tercio superior de la cavidad nasal en el modelo de Parkinson

20 Este estudio investiga si no solamente las células madre terapéuticas sino también las células tumorales se pueden suministrar o no al cerebro después de la administración intranasal. Se consiguió administración intranasal de las células de glioma Phi-Yellow humanas y de T406 marcadas con CFDA al tercio superior de la cavidad nasal de ratas de 1 día de edad (n =5). Una hora después de la administración se sacrificaron los animales. Se procesaron secciones sagitales (20 !-1 m) de las cabezas enteras de los animales (incluyendo el cráneo y el cerebro) mediante microscopía de fluorescencia. Las células de glioma marcadas con CFDA se identificaron en la cavidad nasal, placa cribiforme, bulbo olfativo, corteza frontal y área del hipocampo.

25 En este estudio, se demostró el suministro intranasal de células eucariotas (células madre así como células tumorales) en los cerebros intactos y lesionados de roedores. Los tumores cerebrales consisten en tumores intracraneales que se producen de división celular anormal o incontrolada. Esto puede tener lugar en el cerebro, las meninges, los nervios craneales o en vasos sanguíneos o linfáticos del sistema nervioso central. La mayoría de los tumores cerebrales primarios tienen lugar en la fosa craneal posterior en niños (es decir, glioma de tronco encefálico) y en la porción anterior de los hemisferios cerebrales en adultos. Los tumores cerebrales pediátricos representan aproximadamente un cuarto de los cánceres pediátricos. Existen aproximadamente más de 10.000 muertes por año en los Estados Unidos debido a tumores cerebrales. La mayoría de los tumores cerebrales primarios se originan de células gliales en el sistema nervioso central. Sin embargo, los tumores cerebrales secundarios que se desarrollan a partir de cánceres en otro lugar en el cuerpo y metastatizan a cerebros son incluso más comunes. Los tumores pueden metastatizar al cerebro desde los pulmones, la piel, riñón, mama, colon y otros órganos.

40 Los tumores cerebrales son difíciles de tratar debido a que la mayoría de los agentes quimioterapéuticos no cruzan de forma sencilla la barrera hematoencefálica y no es posible retirar de forma segura y exitosamente ciertos tipos de tumores cerebrales, por ejemplo, gliomas de tronco encefálico, debido a su localización cerca de áreas de cerebro que controlan funciones del sistema autónomo clave tales como respiración, función cardíaca, etc.

45 Actualmente los investigadores que desarrollan y ensayan nuevos productos terapéuticos para tumores cerebrales necesitan implantar quirúrgicamente células tumorales en el cerebro de un animal para crear un modelo de tumor cerebral animal que se puede usar para ensayar nuevos fármacos. En el presente documento los presentes inventores demuestran que las células tumorales pueden introducirse de forma no invasiva en el cerebro administrando las mismas al tercio superior de la cavidad nasal y que la hialuronidasa y otros agentes se pueden usar para facilitar este procedimiento. Por tanto, este ejemplo demuestra que se puede crear un modelo de tumor cerebral de forma no invasiva sin los problemas asociados con neurocirugía e implante directo de células tumorales usando realizaciones de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Células terapéuticas, pero no células madre embrionarias humanas, para su uso en el tratamiento un sistema nervioso central dañado o en degeneración o lesionado de un animal, causado el daño o la degeneración por una enfermedad o afección neurológica que da como resultado la pérdida o muerte de células del sistema nervioso central, comprendiendo dicho tratamiento:
- 5 aplicar las células terapéuticas al tercio superior de la cavidad nasal del animal; y permitir que las células terapéuticas accedan al sistema nervioso central dañado evitando la barrera hematoencefálica.
2. Células terapéuticas para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo dicho tratamiento adicionalmente administrar las células terapéuticas a un tejido inervado por el nervio olfativo, en el que la al menos una célula terapéutica evita la barrera hematoencefálica para acceder al sistema nervioso central dañado; y
- 10 minimizar el suministro sistémico de las células terapéuticas en el exterior del sistema nervioso central.
3. Células terapéuticas para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dicho tratamiento adicionalmente aplicar al tercio superior de la cavidad nasal del animal al menos un agente de mejora del suministro en una cantidad eficaz dentro de una composición farmacéutica que comprende las células terapéuticas o antes de aplicar las células terapéuticas.
- 15 4. Células terapéuticas para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en las que el al menos un agente de mejora del suministro comprende uno del grupo que consiste en hialuronidasa, agentes lipófilos, factor inhibidor de leucemia, actividad inductora de migración y neuregulina.
5. Células terapéuticas para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en las que las células terapéuticas comprenden al menos una del grupo que consiste en células eucariotas y células madre.
- 20 6. Células terapéuticas para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dicho tratamiento adicionalmente aplicar la al menos una célula terapéutica al tercio superior de la cavidad nasal del animal en una cantidad fisiológicamente eficaz para proporcionar acción terapéutica que comprende sustitución de células perdidas y/o que están muriendo en el sistema nervioso central dañado.
- 25 7. Células terapéuticas para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en las que la enfermedad o afección neurológica comprende al menos una del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer e isquemia.
8. Células terapéuticas para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dicho tratamiento adicionalmente pretratar el tercio superior de la cavidad nasal con al menos un antibiótico en una cantidad eficaz antes de aplicar las células terapéuticas.
- 30 9. Células terapéuticas para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dicho tratamiento adicionalmente proporcionar en una cantidad eficaz al menos uno del grupo que consiste en antibiótico, agente regulador y agente inmunosupresor dentro de una composición farmacéutica que comprende las células terapéuticas o antes de aplicar las células terapéuticas.
- 35 10. Células terapéuticas para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dicho tratamiento adicionalmente aplicar una composición farmacéutica que comprende las células terapéuticas al tercio superior de la cavidad nasal del animal en una cantidad fisiológicamente eficaz para proporcionar acción terapéutica y comprende sustitución de células perdidas y/o que están muriendo en el sistema nervioso central dañado.
- 40 11. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un sistema nervioso central dañado o en degeneración o lesionado de un animal, causado el daño o la degeneración por una enfermedad o afección neurológica que da como resultado la pérdida o muerte de células del sistema nervioso central, que comprende:
 - células terapéuticas, pero no células madre embrionarias humanas, en la que el tratamiento comprende administrar la composición farmacéutica al tercio superior de la cavidad nasal del animal; y permitir que las células terapéuticas accedan al sistema nervioso central dañado evitando la barrera hematoencefálica
- 45 12. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende células terapéuticas de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-10.
13. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 11 ó 12, que comprende además al menos uno del grupo que consiste en agente de mejora de suministro, antibiótico, agente inmunosupresor y agente regulador.
- 50 14. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el agente de mejora del suministro es al menos uno del grupo que consiste en hialuronidasa, agentes lipófilos, factor inhibidor de leucemia, actividad de inducción de migración y neuregulina
15. Células terapéuticas o compasión farmacéutica para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en las que el animal es un mamífero.