

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 401**

51 Int. Cl.:

A61K 35/30

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2006 E 06737132 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013 EP 1855700**

54 Título: **Uso de células precursoras neuronales para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central**

30 Prioridad:

07.03.2005 US 659335 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.12.2013

73 Titular/es:

**SANBIO, INC. (100.0%)
231 SOUTH WHISMAN ROAD, SUITE A
MONTAIN VIEW, CA 94041-1522, US**

72 Inventor/es:

**DEZAWA, MARI y
MORI, KEITA**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 436 401 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

Uso de células precursoras neuronales para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central

5 **Antecedente de la invención****Campo de la invención**

10 La invención se refiere al tratamiento de lesiones del sistema nervioso central, particularmente al tratamiento del ictus.

Descripción de la técnica relacionada

15 Las lesiones pueden formarse en el tejido del sistema nervioso central ("SNC") por numerosos motivos. Una de las causas que conducen a lesiones del SNC es el ictus. El ictus se caracteriza por una pérdida súbita de circulación en un área del cerebro, dando como resultado una pérdida correspondiente de función neurológica. Denominado también accidente cerebrovascular o síndrome de ictus, el ictus es un término no específico que abarca un grupo heterogéneo de causas patofisiológicas, que incluyen trombosis, embolismo, y hemorragia. Informes recientes indican una incidencia que excede los 500.000 nuevos casos de ictus de todos los tipos por año. El ictus es una causa principal de muerte y discapacidad. Combinando todos los tipos de ictus, es la tercera causa de muerte y la primera de discapacidad. En las tendencias actuales, este número se proyecta hasta alcanzar un millón por año para el año 2050. Cuando los costes directos (cuidado y tratamiento) y los costes indirectos (pérdida de productividad) de los ictus se consideran conjuntamente, los ictus cuestan a la sociedad de los Estados Unidos 43.300 millones de dólares por año. Los ictus se clasifican actualmente bien como hemorrágicos o como isquémicos. El ictus isquémico agudo se refiere a los ictus producidos por trombosis o embolismo y representa un 80% de todos los ictus.

Los cuatro síndromes de ictus isquémicos neuroanatómicos principales están producidos por la interrupción de sus respectivas distribuciones cerebrovasculares.

30 Las oclusiones de la arteria cerebral anterior afectan principalmente a la función del lóbulo frontal, produciendo un estado mental alterado, un pensamiento deteriorado, debilidad de la extremidad inferior contralateral e hipoestesia, y apraxia del modo de andar.

35 Las oclusiones de la arteria cerebral media (MCA) producen comúnmente hemiparesis contralateral, hipoestesia contralateral, hemianopsia ipsilateral (ceguera en un lado del campo visual), y mirada dirigida preferentemente hacia el lado de la lesión. Es común la agnosia, y puede dar como resultado afasia receptiva o expresiva si se produce la lesión en el hemisferio dominante. Debido a que la MCA suministra la franja motora de la extremidad superior, la debilidad del brazo y de la cara es normalmente peor que la de la extremidad inferior.

40 Las oclusiones de la arteria cerebral posterior afectan a la visión y al pensamiento, produciendo hemianopsia homónima, ceguera cortical, agnosia visual, estado mental alterado, y deterioro de la memoria.

45 Las oclusiones de la arteria vertebrobasilar son notoriamente difíciles de detectar debido a que producen una amplia variedad de déficits en los nervios craneales, cerebelares, y el tronco encefálico. Estos incluyen vértigo, nistagmo, diplopía, déficits del campo visual, disfagia, disartria, hipoestesia facial, síncope, y ataxia. La disminución del dolor y la sensación de temperatura se producen en lado ipsilateral y contralateral del cuerpo. En contraste, los ictus anteriores producen fallos solo en un lado del cuerpo.

50 Estas oclusiones pueden producirse por una variedad de motivos. Pueden surgir embolias procedentes del corazón, las arterias extracraneales o, raramente, la circulación del lado derecho (embolia paradójica). Las fuentes de embolia cardiogénica incluyen trombos valvulares (por ejemplo, en la estenosis mitral, endocarditis, válvulas prostéticas); trombos murales (por ejemplo, en el infarto de miocardio [IM], fibrilación atrial, cardiomiopatía dilatada); y mixomas atriales. IM se asocia con una incidencia del 2-3% del ictus embólico, de la cual, el 85% se produce en el primer mes tras el IM.

55 Los infartos lagunares representan el 13-20% de todos los infartos cerebrales e implican normalmente la vasculatura terminal pequeña del cerebro subcortical y del tronco encefálico. Los infartos lagunares se producen comúnmente en pacientes con enfermedad de los vasos pequeños, tal como diabetes e hipertensión. Se piensa que pequeñas embolias o un proceso in situ denominado lipohialinosis producen infartos lagunares. Los síndromes lagunares más comunes incluyen solamente motores, solamente sensoriales, e ictus hemiparéticos atáxicos. En virtud de su pequeño tamaño y localización subcortical bien definida, los infartos lagunares no conducen a deterioros en la cognición, memoria habla o nivel de consciencia.

65 Los sitios más comunes de oclusión trombótica son los puntos de las ramificaciones de la arteria cerebral, especialmente en la distribución de la arteria carótida interna. La estenosis arterial (es decir, flujo de sangre turbulento), aterosclerosis (es decir, placas ulceradas) y adherencia plaquetaria producen la formación de coágulos

de sangre que tanto embolizan como ocluyen la arteria, las causas menos comunes de trombosis incluyen policitemia, anemia falciforme, deficiencia de proteína C, displasia fibromuscular de las arterias cerebrales, y vasoconstricción prolongada procedente de trastornos de dolor de cabeza con migraña. Cualquier proceso que produzca disección de las arterias cerebrales puede producir ictus trombótico (por ejemplo, trauma, disección aórtica torácica, arteritis). Ocasionalmente, la hipoperfusión distal de una arteria estenótica u ocluida o la hipoperfusión de una región divisoria entre dos territorios arteriales cerebrales pueden producir ictus isquémico.

Volviendo al ictus hemorrágico, los términos hemorragia intracerebral (ICH) e ictus hemorrágico se utilizan de forma indistinta en la descripción y se consideran una entidad independiente de la transformación hemorrágica del ictus isquémico. ICH representa aproximadamente el 20% de todos los ictus y está asociado con tasas de mortalidad superiores que las de los infartos cerebrales. Los pacientes con ictus hemorrágico presentan déficits neurológicos focales similares pero tienden a estar más enfermos que los pacientes con ictus isquémico. Es más probable que los pacientes con hemorragias intracerebrales tengan dolor de cabeza, estado mental alterado, convulsiones, náuseas y vómitos, y/o marcada hipertensión; sin embargo, ninguno de estos hallazgos distingue de manera fiable entre ictus hemorrágico e isquémico.

En la ICH, la hemorragia se produce directamente en el parénquima cerebral. Se piensa que el mecanismo usual es una fuga procedente de pequeñas arterias intracerebrales dañadas por hipertensión crónica. Otros mecanismos incluyen diátesis con hemorragia, anticoagulación iatrogénica, amiloidosis cerebral y dependencia de cocaína. La ICH tiende a encontrarse en determinados sitios en el cerebro, que incluyen el tálamo, el putamen, el cerebelo, y el tronco encefálico. Además del área del cerebro lesionada por la hemorragia, el cerebro que la rodea puede quedar dañado por la presión producida por el efecto de la masa del hematoma. Se puede producir un aumento en la presión intracraneal. En los 30 días, la tasa de mortalidad del ictus hemorrágico es del 40-80%. Aproximadamente, el 50% de todas las muertes se produce en las primeras 48 horas.

Se conocen de forma convencional otras causas de lesiones en el SNC, incluyendo traumatismos y diversas enfermedades del SNC.

Tratar lesiones del SNC implica neurogénesis, es decir, la (re) generación de neuronas en una región de un tejido del paciente que es de interés, incluyendo, pero sin limitarse a la sustitución de las neuronas dañadas en una lesión del sistema nervioso central. Desafortunadamente, el tejido neuronal (SNC) es bien conocido por su limitada capacidad reparativa/regenerativa. La generación de nuevas neuronas en el adulto está restringida en última instancia a dos regiones, el revestimiento SVZ en los ventrículos laterales, y el área subgranular del giro dentado, la limitada sustitución neuronal se ha demostrado resultante de los citoblastos del precursor endógeno que han migrado desde el SVZ.

Se ha notificado algún éxito inicial con determinados métodos de neurogénesis, pero estos métodos no han sido clínicamente satisfactorios. De acuerdo con esto, se necesitan métodos y composiciones para superar los problemas señalados en la técnica para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central.

Jin y col. ("Comparison of ischemia-directed migration of neural precursor cells after intraatrial, intraventricular, or intravenous transplantation in the rat", *Neurobiology of Disease*, vol. 18 de marzo de 2005, pp. 366-374) divulgan una comparación de diferentes rutas de administración de producir de manera natural células precursoras neuronales, obtenidas a partir de la corteza cerebral embrionaria.

Sakanaka, M. (Resumen en inglés del documento JP 2004-129561) divulgan el aislamiento o la preparación de neurocitoblastos, o de células precursoras neuronales obtenidas cultivando la microglía.

En un aspecto, la invención se refiere a células precursoras neuronales para su uso en el tratamiento de una lesión del sistema nervioso central, donde las células precursoras neuronales se obtienen mediante transdiferenciación de citoblastos adherentes de médula en las células precursoras neuronales transfectando los citoblastos adherentes de médula con un vector que contiene las secuencias que codifican el dominio intracelular Notch, y donde la lesión del sistema nervioso central está producida por ictus isquémico o ictus hemorrágico.

En otro aspecto, la invención se refiere a una unidad formadora de injerto para su uso en el tratamiento de una lesión del sistema nervioso central que comprende células precursoras neuronales, donde las células precursoras neuronales se obtienen por transdiferenciación de citoblastos adherentes de médula en células precursoras neuronales transfectando los citoblastos adherentes de médula con un vector que contiene secuencias que codifican el dominio intracelular Notch, y un portador farmacéuticamente aceptable, donde la lesión del sistema nervioso central está producida por ictus isquémico o ictus hemorrágico.

En otro aspecto, la invención se refiere a células neuronales derivadas de citoblastos adherentes de médula (MNC) para su uso en el tratamiento de una lesión del sistema nervioso central que está producida por ictus isquémico o ictus hemorrágico, donde las MNC se obtienen (i) proporcionando citoblastos adherentes de médula; (ii) transdiferenciando los citoblastos adherentes de médula en células precursoras neuronales transfectando los citoblastos adherentes de médula con un vector que contiene las secuencias que codifican el dominio intracelular Notch; e (iii) inducir las células precursoras neuronales para formar células neuronales cultivando las células en presencia de 5 μ M de forskolina (FSK), 10 ng/ml de factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), y 10 ng/ml

de factor neurotrófico ciliar (CNTF).

En otro aspecto, la invención se refiere a una unidad formadora de injerto para su uso en el tratamiento de una lesión del sistema nervioso central que comprende células neuronales derivadas de citoblastos adherentes de médula, donde las células neuronales derivadas de citoblastos adherentes de médula se obtienen (i) proporcionando citoblastos adherentes de médula, (ii) transdiferenciando los citoblastos adherentes de médula en células precursoras neuronales transfecando los citoblastos adherentes de médula con un vector que contiene las secuencias que codifican el dominio intracelular Notch; e (iii) inducir las células precursoras neuronales para formar células neuronales cultivando las células precursoras neuronales en presencia de 5 μ M de forskolina (FSK), 10 ng/ml de factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), y 10 ng/ml de factor neurotrófico ciliar (CNTF), y un portador farmacéuticamente aceptable, donde la lesión del sistema nervioso central está producida por ictus isquémico o ictus hemorrágico.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los resultados del procedimiento MCAo.

La Figura 2 muestra los resultados del procedimiento MCAo.

La Figura 3 muestra los resultados del procedimiento MCAo.

La Figura 4 muestra los resultados del procedimiento MCAo.

La Figura 5 muestra los resultados del procedimiento MCAo.

La Figura 6 muestra los resultados del procedimiento MCAo.

La Figura 7 muestra los resultados del procedimiento MCAo.

La Figura 8 muestra los resultados del procedimiento MCAo.

La Figura 9 muestra los resultados del procedimiento MCAo.

La Figura 10 muestra los resultados del procedimiento MCAo.

La Figura 11 muestra los resultados del procedimiento MCAI.

La Figura 12 muestra los resultados del procedimiento MCAI.

La Figura 13 muestra los resultados del procedimiento MCAI.

La Figura 14 muestra los resultados del procedimiento MCAI.

La Figura 15 muestra los resultados del procedimiento MCAI.

La Figura 16 muestra los resultados del procedimiento MCAI.

La Figura 17 muestra los resultados del procedimiento MCAI.

La Figura 18 muestra los resultados del procedimiento MCAI.

La Figura 19 muestra los resultados del procedimiento MCAI.

La Figura 20 muestra los resultados del procedimiento MCAI.

La Figura 21 muestra los resultados del procedimiento TGI

La Figura 22 muestra los resultados del procedimiento TGI

La Figura 23 muestra los resultados del procedimiento TGI

La Figura 24 muestra los resultados del procedimiento TGI

La Figura 25 muestra los resultados del procedimiento TGI

La Figura 26 muestra los resultados del procedimiento TGI

La Figura 27 muestra los resultados del procedimiento TGI

La Figura 28 muestra los resultados del procedimiento TGI

5 La Figura 29 muestra los resultados histológicos de los Ejemplos.

La Figura 30 muestra los resultados histológicos de los Ejemplos.

La Figura 31 ilustra la recuperación funcional y la supervivencia del injerto.

10

La Figura 32 muestra los resultados del procedimiento MCAo.

La Figura 33 muestra los resultados del procedimiento MCAo.

15 La Figura 34 muestra los resultados del procedimiento MCAI.

La Figura 35 muestra los resultados del procedimiento MCAI:

La Figura 36 muestra los resultados del procedimiento TGI.

20

La Figura 37 muestra los resultados del procedimiento TGI.

La Figura 38 ilustra la supervivencia del injerto.

25 La Figura 39 ilustra la supervivencia del injerto.

La Figura 40 muestra los resultados de una prueba de barra de equilibrio. En el día 28 después del trasplante, la puntuación promedio para el grupo MNC mostró una significativa mejora, en comparación con los grupos MASC y del control. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

30

La Figura 41 muestra los resultados de una prueba de colocación de extremidades. Las puntuaciones promedio para el grupo MNC y el grupo MASC fueron significativamente diferentes que las del grupo del control en el día 21 y el día 28. No hubo diferencias significativas entre los grupos MNC y MASC. *: $p < 0,05$, **: $P < 0,01$.

35 La Figura 42 muestra los resultados de la prueba del laberinto de agua de Morris. Para la configuración final, el tiempo de latencia promedio para el grupo MNC fue significativamente diferente que para los de los grupos MASC y del control.

40 La Figura 43 muestra los resultados del "ensayo de prueba espacial" del laberinto de agua. Entre los tres grupos, se obtuvieron los mejores resultados para el grupo MNC, y se obtuvieron diferencias estadísticas entre el grupo MNC y los otros grupos. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

La Figura 44 muestra los resultados del ensayo de Bederson llevado a cabo en el Ejemplo 9.

45 La Figura 45 muestra los resultados del EBST llevado a cabo en el Ejemplo 9.

La Figura 46 ilustra la supervivencia del injerto de acuerdo con el Ejemplo 9.

La Figura 47 muestra la supervivencia del injerto de acuerdo con el Ejemplo 9.

50

La Figura 48 muestra los resultados de la tinción de Nissl de acuerdo con el Ejemplo 9.

Descripción detallada de la invención

55 A. INTRODUCCIÓN

Los inventores han descubierto de forma inesperada y sorprendente que los problemas y limitaciones señalados anteriormente se pueden superar llevando a la práctica la invención divulgada en el presente documento, los inventores han descubierto de forma inesperada que es posible proporcionar NPC y/o MNC y administrar dichas NPC y/o MNC a un paciente que padece de una lesión del sistema nervioso central en una cantidad suficiente para facilitar la recuperación funcional del paciente.

60

El enfoque divulgado en el presente documento tiene algunas ventajas sobre la técnica anterior. En primer lugar, proporciona una relación dosis-respuesta que puede permitir a un médico personalizar el procedimiento quirúrgico para reparar la lesión del sistema nervioso central en un paciente según lo necesite cada paciente. En segundo lugar proporciona un enfoque alogénico para el injerto. Esto es útil para caracterizar las NPC y/o las MNC y/o las unidades

65

formadoras de injerto y proporcionar consistencia de GFU para GFU (o NPC para NPC, o MNC para MNC) ambas en términos de lotes de células y procedimientos de trasplante. Además, el uso de NPC permite una reconstrucción más precisa del sistema nervioso central, en comparación con el uso de otras células multipotentes. Esto es debido a que una significativa mayoría de células precursoras neuronales, más que de otros tipos de células multipotentes adoptara un destino celular de las células neuronales cuando se diferencian, más bien que se diferencien en otros tipos de células. Esto puede ser importante cuando se intenta proporcionar un control sobre el resultado del trasplante y se limitan las posibilidades de un crecimiento indeseable (o indiferenciado) de las células trasplantadas. Adicionalmente, el uso de MNC es deseable debido a que las células son células multipotentes más diferenciadas que pueden proporcionar una mejora de la recuperación funcional.

Se describirá ahora con más detalle la presente invención.

DEFINICIONES

“Administrar” significa proporcionar NPC y/o injertos inventivos a un paciente.

“Área” significa una región o volumen definido. Por ejemplo, un área del sistema nervioso central sería una región o volumen definido localizado en el sistema nervioso central.

“Acontecimiento isquémico del sistema nervioso central” o “acontecimiento isquémico del SNC” significa cualquier ocurrencia que da como resultado una falta de reducción fisiológicamente significativa de flujo sanguíneo en un área del sistema nervioso central de un paciente. En una realización preferida, un acontecimiento isquémico del SNC comprende un ictus isquémico.

“Lesión del sistema nervioso central” o “lesión del SNC” significa un área de tejido del sistema nervioso central neuronal dañada, con funcionamiento incorrecto, o enferma, o una penumbra que rodea dicho tejido del sistema nervioso central neuronal dañado, con funcionamiento incorrecto, o enfermo, dañado por un acontecimiento isquémico del SNC o por una hemorragia (por ejemplo, en una realización preferida, un ictus hemorrágico).

“Tejido del sistema nervioso central” significa un tejido convencionalmente asociado con el sistema nervioso central. Tejido cerebral y tejido de la médula espinal son ejemplos no limitantes de tejido del sistema nervioso central. Determinadas realizaciones de la presente invención se refieren al tejido del sistema nervioso central, donde el tejido del sistema nervioso central ha sido dañado por un acontecimiento isquémico. Dicho daño puede producirse como se entiende de manera convencional, debido a la privación de oxígeno, y otras cascadas y subproductos asociados con dicha privación y cascadas asociadas.

“Recuperación funcional” significa la recuperación de la función del SNC con respecto a una lesión del SNC tal como se ha determinado por la medida de los parámetros neurobiológicos característicos de esta función (es decir, CBF; EEG, expansión cortical, etc.), o por la medida de la función conductual (cría o sobresalto auditivo en modelos de murino, u otros modelos dados a conocer en el presente documento o conocidos en la técnica). La recuperación se determina por la tendencia de la variable medida a aproximarse a los valores observados en una población normal o del control. La recuperación funcional puede ser completa, es decir, la recuperación devuelve el valor del parámetro medio al valor observado en la población normal o del control, tal como se ha determinado por la metodología estadística adecuada. La recuperación funcional puede ser también incompleta o parcial. Por ejemplo, un paciente puede experimentar una recuperación funcional completa de un parámetro medido, o una recuperación del 75%, o una recuperación del 50%, etc.

“Área funcionalmente recuperada del sistema nervioso central” significa el tejido del SNC implicado anteriormente en una lesión y recuperado funcionalmente con posterioridad mediante la práctica de la presente invención.

“Unidad formadora de injerto” o “GFU” significa una composición que (1) comprende NPC y/o MNC junto con un portador farmacéuticamente aceptable, (2) que se pretende para la administración a un paciente. En una realización preferida, se contemplan expresamente las mezclas de NPC y MNC. En otras realizaciones preferidas, las NPC están sustancialmente presentes sin MNC. En otras realizaciones más preferidas, las MNC están sustancialmente presentes sin NPC.

“Citoblastos adherentes de médula” significa un tipo de célula multipotente mitótica que da lugar a una variedad de tipos de células; células de huesos (osteocitos), células de cartílago (condriocitos), células grasas (adipocitos), y otros tipos de células de tejido conectivo tales como las de los tendones.

“Células neuronales derivadas de MASC (MNC)” significa neuronas post-mitóticas que (1) se derivan de citoblastos adherentes de médula, y (2) que expresan marcadores neuronales inmunohistoquímicamente y presentan propiedades de neuronas en análisis electrofisiológicos. Las MNC se obtuvieron (i) proporcionando citoblastos adherentes de médula, (ii) transdiferenciando los citoblastos adherentes de médula en células precursoras neuronales transfectando los citoblastos adherentes de médula con un vector que contiene las secuencias que codifican el dominio intracelular Notch; e (iii) inducir las células precursoras neuronales para formar células

neuronales cultivando las células en presencia de 5 μ m de forskolina (FSK), 10 ng de factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y 10 ng/ml de factor neurotrófico ciliar (CNTF): Los métodos adecuados para generar MNC in vitro se pueden encontrar en el documento PCT/JP03/01260: Se pueden utilizar también MNC producidas utilizando otras técnicas conocidas en la materia en la práctica de esta invención, siempre que cumplan la definición de las MNC que se muestra en el presente documento. En una realización, las MNC humanas son MAP-2+, neurofilamento-M+, y beta tubulina III+ (es decir, TuJ-1+). Se pueden usar estos marcadores para aislar las MNC utilizando FACS tras la producción de las MNC utilizando las técnicas dadas a conocer en el documento PCT/JP03/01260. Se conocen de manera convencional los métodos adecuados para manipular las MNC, incluyendo aquellos métodos dados a conocer, por ejemplo, en la Patente de los estados Unidos 6. 833. 269 de Carpenter.

"MCAo" significa oclusión de la arteria cerebral media.

"MCAI" significa ligadura de la arteria cerebral media"

"Neurogénesis" significa la (re) generación de neuronas y tejido neuronal en una región de tejido de un paciente que es de interés, incluyendo, pero sin limitarse a la sustitución de neuronas dañadas en una lesión del sistema nervioso central.

"Células precursoras neuronales (NPC)" significa células que son mitóticas, expresan nestina y otros marcadores celulares específicos de células precursoras neurales / progenitoras neurales, y se derivan de MASC. Las NPC pueden diferenciarse en neuronas, glía, y oligodendrocitos, y precursores de cualquiera de las anteriores. Las NPC se obtienen por transdiferenciación de citoblastos adherentes de médula en las células precursoras neuronales transfectando los citoblastos adherentes de médula con un vector que contiene las secuencias que codifican el dominio intracelular Notch. En una realización, las NPC se pueden producir a partir de citoblastos adherentes de médula (MASC) de acuerdo con los métodos dados a conocer en el documento PCT/JP03/01260. Se pueden utilizar también NPC producidas utilizando otras técnicas conocidas en la materia en la práctica de esta invención, siempre que cumplan la definición de las NPC que se muestra en el presente documento. De forma preferible, las NPC comprenden NPC humanas, aunque están abarcadas también las NPC de otras especies de mamíferos en el alcance de esta invención. En una realización, las NPC, preferentemente las NPC humanas, son CD29+, CD90+, CD105+, CD31-, CD34- y CD45-. Se pueden utilizar estos marcadores para aislar las NPC, preferentemente las NPC humanas, utilizando FACS tras la producción de las NPC utilizando las técnicas dadas a conocer en el documento PCT/JP03/01260. Se conocen de manera convencional los métodos adecuados para manipular las NPC, incluyendo los métodos dados a conocer, por ejemplo, en la solicitud de patente de los Estados Unidos publicada 20020012903 de Goldman y col.

"Neurona(s)" significa cualquiera de las células conductoras de impulsos que constituyen el cerebro, la médula espinal, y los nervios que consisten en un cuerpo celular nucleado con una o más dendritas y un único axón. Bioquímicamente, las neuronas se caracterizan por reaccionar con los anticuerpos dirigidos contra Map, el neurofilamento-M, y la beta-tubulina III (es decir, TuJ-1. Las células neurales se caracterizan también por la presencia de sistetasas neurotransmisoras o de proteínas relacionadas con neurotransmisores y por la secreción de neurotransmisores, por ejemplo, neuropéptido Y y sustancia P.

"Neuronal" significa neuronas, glía, y oligodendrocitos, y los precursores de cualquiera de los anteriores.

"Paciente" significa un animal, normalmente un mamífero, y de forma más típica, un ser humano, que necesita tratamiento para una enfermedad o trastorno.

"Portador farmacéuticamente aceptable" significa cualquiera de todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes isotónicos crioprotectores y retardantes de la absorción, y similares, que son compatibles con la administración farmacéutica de las NPC o de las MNC. El uso de dichos medios y agentes es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con las NPC o con las MNC, se contempla su uso en la GFU inventiva.

"Sistémicamente" significa a través de, o a través de partes sustanciales del paciente.

"Tejido" significa una parte de un organismo que consiste en un agregado de células que tienen una estructura y función similares. Un tejido preferido, de acuerdo con la invención, es el tejido nervioso.

"TGI" significa isquemia global transitoria

"Trasplante", que se usa como sinónimo de "injerto", significa la sustitución de células no endógenas en un área del paciente. El trasplante puede ser alogénico, o sin células autotrasplantadas. El trasplante puede ser también autólogo, o autotrasplantarse células, por ejemplo, de un tejido a otro en el mismo paciente.

"Transdiferenciado" significa el desarrollo de una célula a lo largo de un linaje diferente del que se asocia clásicamente con este tipo de célula.

A. NPC Y SUS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

En una realización, las NPC se usan en la práctica de esta invención como parte de las GFU que se trasplantan a pacientes. Se intenta que las NPC crezcan y se diferencien en células neuronales que juegan un papel en la recuperación funcional de una lesión en el sistema nervioso central en el paciente. Por ejemplo, las NPC podrían diferenciarse en neuronas que secretan factores de crecimiento. Estos factores de crecimiento pueden tener una actividad trófica en neuronas dañadas y ayudan a su recuperación funcional. De esta manera, es posible el tratamiento de las lesiones del sistema nervioso central.

Las NPC preferidas y los métodos preferidos para proporcionar dichas NPC se divulgan en el documento PCT/JP03/01260, de Dezawa y col, titulado Method of Differentiating/Inducing Bone Marrow Interstitial Cells Into Nerve Cells and Skeleton Muscle Cells by Transferring Notch Gene ("Dezawa"). En particular, las "células precursoras neurales" de Dezawa, tal como se describe a lo largo de Dezawa y en particular en el Ejemplo 7, se pueden usar como las NPC de la presente invención. Dezawa divulga que las MASC pueden transdiferenciarse en células precursoras neurales que son entonces útiles como las NPC de la presente invención.

En realizaciones, las GFU pueden ser útiles en la práctica de esta invención. Los portadores farmacéuticamente aceptables útiles en las GFU de la presente invención pueden incluir: tampones isotónicos estériles, FRS, isolito, diluyentes estériles tales como agua, solución salina normal, aceites fijos, polietilenglicoles, propilenglicol, u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos o antifúngicos tales como ácido ascórbico, timerosal, timetoprim-sulfametoxazol, ácido nalidíxico, hipurato de metenamina o macrocristales de nitrofurantoína y similares; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como EDTA; tampones tales como acetatos, citratos, o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. Se puede ajustar el pH con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

En una realización, las unidades formadoras de injerto adecuadas para el uso en la presente invención comprenden composiciones estériles que comprenden las NPC. Para la administración intravenosa, los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados pueden incluir solución salina fisiológica, normasol, isolito, plasmalito, o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la GFU debe ser estéril (diferente de cualquier NPC o MNC que estén presentes) y debe ser fluida en la extensión en que exista de forma administrable fácil mediante jeringuilla (se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, utilizando materiales tales como lecitina, manteniendo un determinado tamaño de partículas en el caso de dispersión, e incluyendo tensioactivos). La GFU debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe preservar frente a la acción contaminante de los microorganismos tales como bacterias y hongos, tal como se ha descrito anteriormente. En determinados casos, será preferible incluir, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, cloruro de sodio, LiCl, butirato de Na, y ortovanadato de sodio en la GFU. Generalmente, las GFU inventivas se pueden preparar incorporando las NPC en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y opcionalmente otros diferentes de los enumerados anteriormente.

Es especialmente ventajoso formular las GFU de la invención en formas de dosificación unitarias formadoras de injerto para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria de formación de injerto tal como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar. En una realización, cada forma de dosificación de la GFU contiene una cantidad predeterminada de NPC calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitarias formadoras de injerto de la invención viene dictada y es directamente dependiente de las características únicas de las NPC, el efecto terapéutico concreto que se va a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de las NPC para el tratamiento de los individuos: El número de NPC en cada forma de dosificación unitaria formadora de injerto puede variar preferentemente entre aproximadamente 1000 células y aproximadamente 1 billón de células, preferentemente entre aproximadamente 10.000 células y aproximadamente 100 millones de células, de forma más preferible entre aproximadamente 50.000 células y aproximadamente 50 millones de células. La concentración de las NPC en cada forma de dosificación unitaria formadora de injerto puede variar preferentemente entre aproximadamente 100 células/μl y aproximadamente 100.000 células/μl, y de forma más preferible entre aproximadamente 1.000 células/μl y aproximadamente 50.000 células/μl.

Las GFU pueden incluirse en un recipiente, envase, o dispensador junto con las instrucciones para la administración. Los injertos se almacenan preferentemente a aproximadamente 37° C.

En determinadas realizaciones puede ser preferible marcar las NPC antes del trasplante. Esto puede ser deseable en modelos preclínicos (es decir, no humanos) con el fin de registrar la migración de las NPC trasplantadas, la diferenciación de las NPC trasplantadas, la supervivencia de las NPC trasplantadas, y así sucesivamente. Se pueden emplear diversos métodos de marcado de células dependiendo de las circunstancias preclínicas bajo las cuales se pueden leer las etiquetas. Por ejemplo, se pueden usar proteínas fluorescentes (proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja, etc.) como en circunstancias en las cuales se puede colocar un detector de forma adecuada próximo al sitio del trasplante.

Quando se analizan cerebros injertados en situaciones no clínicas, puede ser útil el análisis inmunohistoquímico. En una realización, las secciones cerebrales pueden inmunotefñirse por duplicado para la proteína fluorescente verde (GFP) u otras marcas de células, β -tubulina III, NeuN (una proteína específica de neuronas), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), o O4 (una proteína específica de oligodendrocito) para identificar perfiles neuronales, astrocíticos, gliales, u oligodendrocíticos. El número de perfiles positivos para un anticuerpo dado y el número de células que expresan la GFP puede estimarse de acuerdo con la fórmula de corrección de Abercrombie. Puede calcularse el volumen de distribución y los perfiles positivos totales de la GFP (u otra marca) determinando el área del cerebro que contiene al menos un 10% de perfiles positivos para GFP (u otra marca positiva) en cada quinta sección y multiplicando por la distancia entre las vistas anteriores del cerebro que contienen perfiles positivos para GFP (u otra marca positiva).

En una realización, cuando se marcan las NPC utilizando GFP, pueden ser útiles los siguientes materiales:

Materiales. NPC criopreservadas, PBS (Invitrogen 14190-136), HTS-FRS (BioLife Solutions 99-609-DV), suspensión madre de GFP-Lentivirus con un título de aproximadamente 10^7 /ml, bromuro de hexamidina (polibreno) ((Sigma (H-9268)-1 0 2 alícuotas congeladas @ 10 mg/ml), agua estéril, USP, Opti-MEM (Invitrogen), y suero de feto bovino (Hyclone).

Una suspensión madre de GFP-Lentivirus se puede obtener comercialmente, o prepararse utilizando kits comercialmente disponibles tales como el ViraPower Lentiviral Expression System (disponible de Invitrogen, Carlsbad CA). En particular, se puede combinar el Vector pLenti6/V5 Gateway con un casete GFP, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para producir de forma eventual suspensiones de GFP-lentivirus adecuadas.

En una realización, se puede llevar a cabo el marcado de acuerdo con los protocolos de transfección disponibles a partir del fabricante, tales como el sistema de Invitrogen anteriormente referido.

En otra realización, cuando se marcan NPC utilizando GFP, pueden ser útiles los siguientes procedimientos: los procedimientos de manipulación celular, excepto las etapas de centrifugaciones, se llevan a cabo preferentemente en una cabina de seguridad para riesgo biológico de nivel 2. Se puede preparar una disolución madre de polibreno disolviendo 10 mg de polibreno en 1 ml de agua estéril, USP, y filtrando a través de un filtro de 0,25 micras. La disolución madre filtrada resultante se puede dividir en alícuotas y almacenarse protegida de la luz a -20°C .

El día antes de la infección vírica, placas de NPC en un matraz T225 que contenía 30 ml del medio de cultivo celular a una densidad de 2 millones de células por matraz; y cultivos de células en una incubadora a 37°C con CO_2 al 5% durante la noche.

En el día de la infección vírica, descongelar la disolución madre de lentivirus a TA y la disolución madre de polibreno en un baño de agua a 37 grados C. En un tubo falcon de 50 ml, añadir 45 ml de FBS al 10% precalentado (37°C) en alfa MEM y 5 ml de disolución madre vírica descongelada para obtener un medio con una MOI de alrededor de 10. Añadir el polibreno descongelado a una concentración final de $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ (1.000 X dilución). Retirar el medio antiguo del matraz t225, y la mezcla vírica en el matraz y agitarlo hacia delante y hacia atrás 3-4 veces. Devolver el matraz a la incubadora a 37°C con CO_2 al 5%.

Al día siguiente, retirar completamente el medio vírico del matraz. Lavar 6 x 30 ml con FBS al 10% en alfa MEM. Recoger 5 ml de cada lavado para el ensayo de infectividad. Sustituir con medio de cultivo reciente, y volver a colocar el matraz en la incubadora.

Al día siguiente, cosechar las células infectadas víricas, hacer el recuento y volver a suspenderlas hasta un volumen total de 360 μl en HTS-FRS y transferir a un tubo de 1,5 ml estéril, un tubo de micrófuga exento de ADNasa, exento de ARNasa, exento de pirógeno. La concentración de células infectadas puede ajustarse para corresponder con un volumen de trasplante adecuado. Las células pueden mantenerse a continuación en hielo húmedo hasta el uso para la administración del injerto.

B. MNC, Y SUS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

En una realización, se utilizaron las MNC en la práctica de la presente invención como parte de los injertos que se trasplantaron en pacientes. El objetivo es que las MNC tengan un papel en la recuperación funcional de una región del tejido de un paciente que es de interés. De esta manera, es posible el tratamiento del sistema nervioso central.

Las MNC preferidas y los métodos preferidos para proporcionar dichas MNC se divulgan en el documento PCT/JP03/01260, de Dezawa y col., titulada Method of Differentiating/Inducing Bone Marrow Interstitial Cells Into Nerve Cells and Skeleton Muscle Cells by Transferring Notch Gene ("Dezawa"). En particular, las "células neurales" de Dezawa, tal como se describe a lo largo de Dezawa y en particular en el ejemplo 1, se pueden utilizar como las MNC de la presente invención. Dezawa divulga que los citoblastos adherentes de médula pueden transdiferenciarse en células neuronales que son entonces útiles como las MNC de la presente invención.

En una realización preferida, se pueden producir las MNC a partir de las NPC utilizando agentes neurotróficos. Los agentes neurotróficos útiles son el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), y el factor neurotrófico ciliar (CNTF). Los métodos adecuados para utilizar agentes neurotróficos con NPC in vitro se pueden encontrar en el documento PCT/JP03/01260.

En realizaciones, las GFU pueden ser útiles en la práctica de la presente invención. Los portadores farmacéuticamente aceptables útiles en las GFU de la presente invención pueden incluir: tampones isotónicos estériles, FRS, isolito, diluyentes estériles tales como agua, solución salina normal, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol, u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos o antifúngicos tales como ácido ascórbico, timerosal, trimetoprim-sulfametoxazol, ácido nalidíxico, hipurato de metenamina o macrocristales de nitrofurantoína y similares; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como EDTA; tampones tales como acetatos, citratos, o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. Se puede ajustar el pH con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

En una realización, las unidades formadoras de injerto adecuadas para el uso en la presente invención comprenden composiciones estériles que comprenden las MNC. Para la administración intravenosa, los portadores farmacéuticamente adecuados pueden incluir solución salina fisiológica, cremóforo EL.TM (BASF, Parsippany, N.J.), normasol, isolito, plasmalito, o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, las GFU deben ser estériles (diferentes de cualquier NPC o MNC que están presentes) y deben ser fluidas en la extensión que existan fácilmente de forma administrable mediante jeringuilla (se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, utilizando materiales tales como lecitina, manteniendo un determinado tamaño de partículas en el caso de dispersión, e incluyendo tensioactivos). La GFU debe ser estable bajo las condiciones de fabricación u almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de los microorganismos tales como bacterias y hongos, tal como se ha descrito anteriormente. En determinados casos, será preferible incluir, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, cloruro de sodio, LiCl, butirato de Na, y ortovanadato de sodio en la GFU. Generalmente, las GFU inventivas pueden prepararse incorporando las NPC en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y, opcionalmente, otros ingredientes de los anteriormente enumerados.

Es especialmente ventajoso formular las GFU de la invención en formas de dosificación unitarias formadoras de injerto para facilitar la administración ya la uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria formadora de injerto se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar. En una realización, cada forma de dosificación de la GFU contiene una cantidad predeterminada de las MNC calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéuticamente requerido. La memoria descriptiva para las formas de dosificación unitaria formadoras de injerto de la invención está dictada por y es directamente dependiente de las características únicas de las MNC, el efecto terapéutico concreto que se va a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de las MNC para el tratamiento de los individuos. El número de MNP en cada forma de dosificación unitaria formadora de injerto puede variar preferentemente entre aproximadamente 1000 células y aproximadamente 1 billón de células, preferentemente entre aproximadamente 10.000 células y aproximadamente 100 millones de células, de forma más preferible entre aproximadamente 50.000 células y aproximadamente 50 millones de células. La concentración de las MNC en cada forma de dosificación unitaria formadora de injerto puede variar preferentemente entre aproximadamente 100 células/μl, y aproximadamente 100.000 células/μl, y de forma más preferible entre aproximadamente 1.000 células/μl y aproximadamente 50.000 células/μl.

Las GFU pueden estar incluidas en un recipiente, un envase, o dispensador junto con las instrucciones para la administración. Los injertos se almacenan preferentemente a 4° C.

En determinadas realizaciones no clínicas puede ser deseable marcar las MNC antes del trasplante. Esto puede ser deseable a fin de registrar la migración de las MNC trasplantadas, los cambios adicionales para las MNC trasplantadas, la supervivencia de las MNC trasplantadas, y así sucesivamente. Se pueden emplear diversos métodos de marcado de células dependiendo de las circunstancias bajo las cuales se van a leer las marcas. Por ejemplo, se pueden usar proteínas fluorescentes (proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja, etc.) como en las circunstancias en las cuales se puede colocar un detector de forma adecuada próximo al sitio del trasplante. El marcado puede llevarse a cabo utilizando métodos convencionales, tales como el sistema GFP-lentivírico de Invitrogen señalado anteriormente.

Cuando se analizan cerebros injertados en situaciones no clínicas, el análisis inmunohistoquímico puede ser útil. En una realización, se pueden teñir por duplicado secciones del cerebro para la proteína fluorescente verde (GFP) u otras marcas de células, la β-tubulina III, NeuN (un proteína específica de neuronas), proteína ácida fibrilar glial (GFAP) o O4 (una proteína específica de oligodendrocito) para identificar los perfiles neuronales, astrocíticos, gliales, u oligodendrocíticos. El número de perfiles positivos para un anticuerpo dado y el número de células que expresan la GFP pueden estimarse de acuerdo a la fórmula de corrección de Abercrombie. El volumen de distribución y los perfiles totales positivos de la GFP (u otra marca) pueden calcularse determinando el área del cerebro que contiene al menos un 10% de perfiles positivos para la GFP (u otra marca positiva) en cada quinta sección y multiplicando por la distancia desde las vistas anteriores del cerebro que contienen perfiles positivos para la GFP (u otra marca

positiva). En una realización, las MNC pueden marcarse de forma fluorescente utilizando la infección retroviral mediante el vector pBabe neo-GFP. M. Dezawa y col., "Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells." *Eur J Neurosci.* 2001; 14: 1771-6. El procedimiento puede modificarse de tal manera que se pueden incorporar en el vector otras proteínas fluorescentes.

5

C. TRASPLANTE DE NPC

En una realización, las NPC y/o GFU de acuerdo con la invención se pueden administrar utilizando protocolos y rutas de administración convencionales, y las cantidades de NPC y/o GFU de acuerdo con la presente invención se pueden administrar solas o en combinación con otras sustancias o composiciones. Las rutas de administración pueden escogerse a partir de rutas convencionales de administración conocidas por un experto en la técnica.

10

Se contempla que el trasplante se puede llevar a cabo mediante una variedad de métodos, incluyendo, pero sin limitarse a infusión mediante una cánula, aguja o vía de inyección, o mediante implante en un portador, por ejemplo, una cápsula biodegradable, pero otras rutas de administración, están comprendidas también en el alcance de la invención.

15

Las NPC y/o las GPU de acuerdo con la invención se pueden administrar sistémicamente a un paciente, en cuyo caso las rutas de administración parenterales tales como la intravenosa (i.v.), o intraarterial (tal como a través de las arterias carótidas interna o externa) son rutas preferidas de administración sistémica. Se pueden adaptar las técnicas de administración sistémica a partir de las técnicas utilizadas generalmente para administrar células precursoras, tales como las dadas a conocer en D Lu y col., "Intraarterial Administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury." *J Neurotrauma.* Agosto de 2001; 18(8): 813-9.

20

En las realizaciones, las NPC y/o las GFU de acuerdo con la invención se pueden administrar localmente a una lesión del sistema nervioso central de un paciente. En una realización preferida, las NPC y/o las GFU de la presente invención se pueden administrar a través de una ruta intraparenquimal. Una ventaja de administrar las NPC y/o las GFU localmente a la lesión del sistema nervioso central de un paciente es que el sistema inmune del paciente puede ser menos activo en el interior de la barrera hematoencefálica. Por tanto, las posibilidades de rechazo inmune de las NPC por el hospedador se pueden reducir, y las posibilidades de supervivencia del injerto pueden aumentarse incluso aunque se puedan seguir necesitando inmunosupresores. Otra ventaja de la administración local es que es más precisa dirigiendo las NPC a la lesión del SNC.

25

30

Cuando se trasplanta en una lesión en el sistema nervioso central, el trasplante se puede llevar a cabo utilizando procedimientos quirúrgicos estereotácticos. En dichos procedimientos, se anestesia al paciente. La cabeza del paciente se coloca en un marco estereotáctico compatible con IMR y el microposicionador con el inyector se coloca sobre el cráneo. Se pueden realizar orificios de trépano en el cráneo del paciente utilizando un torno de dentista u otro instrumento adecuado para exponer áreas del duramen exactamente por encima de los sitios diana.

35

En una realización, se puede llevar a cabo un paso de aguja que utiliza una aguja de calibre 26 y una microjeringuilla Hamilton (u otra jeringuilla de tamaño adecuado), donde la aguja se guía manualmente a los sitios del injerto utilizando imágenes IMR para asegurar la colocación adecuada de las NPC y/o las GFU. Se pueden realizar inyecciones, preferentemente como inyecciones en bolo en el(los) sitio(s) del injerto. Las velocidades de infusión pueden variar, preferentemente los volúmenes de infusión son de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, de forma más preferible de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, y de forma aún más preferible de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0 $\mu\text{l}/\text{min}$. En una realización, la aguja puede mantenerse en su lugar durante un periodo de tiempo, que varía preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 minutos, de forma más preferible aproximadamente 5 minutos, tras la infusión. Tras el periodo donde la aguja se mantiene en su lugar, la aguja se puede elevar una distancia corta, preferentemente aproximadamente 1 mm a aproximadamente 10 mm, de forma más preferible aproximadamente 2 mm y a continuación mantenerse en su lugar durante un periodo de tiempo adicional, que varía aproximadamente desde 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, de forma más preferible aproximadamente 15 minutos. A continuación puede retirarse la jeringuilla del paciente, el sitio de la herida se puede cerrar en capas anatómicas, y vigilar al paciente durante la recuperación de la anestesia.

40

45

50

Se pueden administrar analgésicos (por ejemplo, buprenorfina) y antibióticos (por ejemplo, cefazolina, 50 mg/kg, IM, un par de veces al día x 5 días), según sea necesario, como parte de los procedimientos quirúrgicos/postquirúrgicos. El tratamiento con antibióticos puede continuarse después de la cirugía durante un lapso de tiempo ampliado, preferentemente de hasta 30 días después de la cirugía, para suprimir la infección oportunista.

55

Se pueden encontrar técnicas adicionales para el implante en K S Bankiewicz y col., "Technique for bilateral intracranial implantation of cells in monkeys using an automated delivery system." *Cell Transplantation*, 9(5): 595-607 (2000).

60

En determinadas realizaciones, se pueden administrar agentes inmunosupresores junto con los injertos inventivos y/o las NPC. Estos agentes pueden ayudar a suprimir el rechazo de las NPC por el sistema inmune del paciente, particularmente cuando el injerto y/o las NPC se administran de forma sintética. Los ejemplos de inmunosupresores

65

útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a antimetabolitos tales como azatioprina, agentes alquilantes tales como ciclofosfamida, antagonistas del ácido fólico tales como metotrexato o mercaptopurina (6-MP), micofenolato (CellCept), ciclosporina-A y Tacrolimus (FK-506). Un agente inmunosupresor preferido es CsA. CsA se puede obtener a partir de una variedad de fuentes, que incluyen Sandimmune® en inyección; fabricada por Novartis Pharma AG, Basel, Suiza para Novartis Pharmaceuticals Corporation (Novartis), East Hanover, NJ.

Se pueden administrar agentes inmunosupresores mediante una variedad de rutas, que incluyen la oral, i.p., e i.v. La dosificación de agentes inmunosupresores puede variar de acuerdo con la naturaleza del agente inmunosupresor y el paciente. En una realización, el agente inmunosupresor puede dosificarse dos días antes del trasplante y continuar a intervalos adecuados posteriormente. En una realización, el agente inmunosupresor puede dosificarse comenzando el día del injerto (aproximadamente cuatro horas después del procedimiento) y continuar a intervalos de 24 horas posteriormente. Los intervalos de dosificación pueden variar preferentemente desde aproximadamente 0,5 mg/kg/día hasta aproximadamente 100 mg/kg/día, de forma más preferible desde aproximadamente 5 mg/kg/día hasta aproximadamente 75 mg/kg/día, de forma aún más preferible desde aproximadamente 5 mg/kg/día hasta aproximadamente 50 mg/kg/día. Se pueden administrar inyecciones intravenosas como un bolo, a una velocidad que varía preferentemente entre aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,100 ml/minuto, de forma más preferible a aproximadamente 0,050 ml/minuto.

Las NPC y/o las GFU de acuerdo con la invención se pueden administrar utilizando protocolos y rutas de administración convencionales, y las cantidades de NPC y/o GFU que se van a administrar a los pacientes se pueden optimizar técnicas convencionales de determinación del intervalo de dosificación. Las NPC y/o las GFU de acuerdo con la presente invención se pueden administrar solas o en combinación con otras sustancias o composiciones. Las rutas de administración pueden escogerse a partir de rutas de administración convencionales conocidas por un experto en la técnica.

Se contempla que el trasplante se llevará a cabo mediante una variedad de métodos, incluyendo, pero sin limitarse a la infusión a través de una cánula, aguja o vía de inyección, o mediante implante en un portador, por ejemplo, una cápsula biodegradable, pero otras rutas de administración, están también comprendidas en el alcance de la invención.

En las realizaciones, las NPC y las GFU de acuerdo con la invención se pueden administrar localmente a una lesión del sistema nervioso central de un paciente. En realización preferida, las NPC y/o las GFU de la presente invención pueden administrarse a través de una ruta intraparenquimal. Una ventaja de administrar las NPC y/o las GFU localmente a una lesión del sistema nervioso central de un paciente es que el sistema inmune del paciente es menos activo en el interior de la barrera hematoencefálica. Por tanto, se pueden reducir las posibilidades de rechazo inmune de las NPC por el hospedador, y pueden aumentar las posibilidades de supervivencia del injerto incluso aunque se puedan necesitar todavía agentes inmunosupresores. Otra ventaja de la administración local es que es más precisa dirigiendo las NPC a la lesión del SNC.

D. TRASPLANTE DE CÉLULAS NEURONALES DERIVADAS DE MASC

En una realización, las MNC y las GFU de acuerdo con la invención se pueden administrar utilizando protocolos y rutas de administración convencionales, y las cantidades de MNC y/o GFU que se van a administrar a los pacientes se pueden optimizar utilizando técnicas convencionales de determinación del intervalo de dosificación. Las MNC y/o las GFU de acuerdo con la presente invención pueden administrarse solas o en combinación con otras sustancias o composiciones. Las rutas de administración pueden escogerse a partir de rutas de administración convencionales conocidas por un experto en la técnica.

Se contempla que el trasplante se llevará a cabo mediante una variedad de métodos, incluyendo, pero sin limitarse a la infusión a través de una cánula, aguja o vía de inyección, o mediante implante en un portador, por ejemplo, una cápsula biodegradable, pero otras rutas de administración, están también comprendidas en el alcance de la invención.

En las realizaciones, las MNC y las GFU de acuerdo con la invención se pueden administrar localmente a una lesión del sistema nervioso central de un paciente. En realización preferida, las MNC y/o las GFU de la presente invención pueden administrarse a través de una ruta intraparenquimal. Una ventaja de administrar las MNC y/o las GFU localmente a una lesión del sistema nervioso central de un paciente es que el sistema inmune del paciente es menos activo en el interior de la barrera hematoencefálica. Por tanto, se pueden reducir las posibilidades de rechazo inmune de las MNC por el hospedador, y pueden aumentar las posibilidades de supervivencia del injerto incluso aunque se puedan necesitar todavía agentes inmunosupresores. Otra ventaja de la administración local es que es más precisa dirigiendo las MNC a la lesión del SNC.

Cuando se trasplanta en una lesión en el sistema nervioso central, se puede llevar a cabo el trasplante utilizando procedimientos quirúrgicos estereotácticos. En dichos procedimientos, se anestesia al paciente. La cabeza del paciente se coloca en un marco estereotáctico compatible con IMR y el microposicionador con el inyector se coloca

sobre el cráneo. Se pueden realizar orificios de trépano en el cráneo del paciente utilizando un torno de dentista u otro instrumento adecuado para exponer áreas del duramen exactamente por encima de los sitios diana.

En una realización, se puede llevar a cabo un paso de aguja que utiliza una aguja de calibre 26 y una microjeringuilla Hamilton (u otra jeringuilla de tamaño adecuado), donde la aguja se guía manualmente a los sitios del injerto utilizando imágenes IMR para asegurar la colocación adecuada de las MNC y/o las GFU. Se pueden realizar inyecciones, preferentemente como inyecciones en bolo en el(los) sitio(s) del injerto. Las velocidades de infusión pueden variar, preferentemente los volúmenes de infusión son de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 µl/min, de forma más preferible de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 µl/min, y de forma aún más preferible de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0 µl/min. En una realización, la aguja puede mantenerse en su lugar durante un periodo de tiempo, que varía preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 minutos, de forma más preferible aproximadamente 5 minutos, tras la infusión. Tras el periodo donde la aguja se mantiene en su lugar, la aguja se puede elevar una distancia corta, preferentemente aproximadamente 1 mm a aproximadamente 10 mm, de forma más preferible aproximadamente 2 mm y a continuación mantenerse en su lugar durante un periodo de tiempo adicional, que varía aproximadamente desde 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, de forma más preferible aproximadamente 15 minutos. A continuación puede retirarse la jeringuilla del paciente, el sitio de la herida se puede cerrar en capas anatómicas, y vigilar al paciente durante la recuperación de la anestesia.

Se pueden administrar analgésicos (por ejemplo, buprenorfina) y antibióticos (por ejemplo, cefazolina, 50 mg/kg, IM, un par de veces al día x 5 días), según sea necesario, como parte de los procedimientos quirúrgicos/postquirúrgicos. El tratamiento con antibióticos puede continuarse después de la cirugía durante un lapso de tiempo ampliado, preferentemente de hasta 30 días después de la cirugía, para suprimir la infección oportunista.

Se pueden encontrar técnicas adicionales para el implante en K S Bankiewicz y col., "Technique for bilateral intracranial implantation of cells in monkeys using an automated delivery system." *Cell Transplantation*, 9(5): 595-607 (2000).

En determinadas realizaciones, se pueden administrar agentes inmunosupresores junto con los injertos inventivos y/o las MNC. Estos agentes pueden ayudar a suprimir el rechazo de las MNC por el sistema inmune del paciente. Los ejemplos de inmunosupresores útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a antimetabolitos tales como azatioprina, agentes alquilantes tales como ciclofosfamida, antagonistas del ácido fólico tales como metotrexato o mercaptopurina (6-MP), micofenolato (CellCept), ciclosporina-A y Tacrolimus (FK-506). Un agente inmunosupresor preferido es CsA. CsA se puede obtener a partir de una variedad de fuentes, que incluyen Sandimmune® en inyección; fabricada por Novartis Pharma AG, Basel, Suiza para Novartis Pharmaceuticals Corporation (Novartis), East Hanover, NJ.

Se pueden administrar agentes inmunosupresores mediante una variedad de rutas, que incluyen la oral, i.p., e i.v. La dosificación de agentes inmunosupresores puede variar de acuerdo con la naturaleza del agente inmunosupresor y el paciente. En una realización, el agente inmunosupresor puede dosificarse dos días antes del trasplante y continuar a intervalos adecuados posteriormente. En una realización, el agente inmunosupresor puede dosificarse comenzando el día del injerto (aproximadamente cuatro horas después del procedimiento) y continuar a intervalos de 24 horas posteriormente. Los intervalos de dosificación pueden variar preferentemente desde aproximadamente 0,5 mg/kg/día hasta aproximadamente 100 mg/kg/día, de forma más preferible desde aproximadamente 5 mg/kg/día hasta aproximadamente 75 mg/kg/día, de forma aún más preferible desde aproximadamente 5 mg/kg/día hasta aproximadamente 50 mg/kg/día. Se pueden administrar inyecciones intravenosas como un bolo, a una velocidad que varía preferentemente entre aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,100 ml/minuto, de forma más preferible a aproximadamente 0,050 ml/minuto.

E. OBSERVACIONES EXPERIMENTALES Y VENTAJAS DE LAS NPC

Aunque la presente invención contempla el trasplante autólogo y el alogénico de las NPC, incluyendo las composiciones farmacéuticas que comprenden las NPC, es preferible el trasplante alogénico (unidades formadoras de injerto de la misma especie). En una realización, el trasplante alogénico imita el escenario clínico donde puede tener lugar el trasplante alogénico de las NPC en pacientes que padecen una lesión del sistema nervioso central. Se divulgan en el presente documento los resultados del trasplante estereotáxico de las NPC, de acuerdo con la invención, en los cerebros de ratas Sprague-Dawley macho adultas que se han sometido a oclusión de la arteria cerebral media (MCAo), ligadura de la arteria cerebral medio (MCAI) o isquemia global transitoria (TGI). Estos modelos son útiles en la comprensión de la eficacia de la presente invención en el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central. Se puede encontrar una descripción adicional de estos modelos en la bibliografía, particularmente en C. Borlongan y col., "Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinoma-derived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats." *Exp Neurol*. 1998; 149: 310-21; y C. Borlongan y col., "Glial cell survival is enhanced during melatonin-induced neuroprotection against cerebral ischemia." *FASEB J*. 2000; 14: 1307-17. Cada animal con ictus recibió un injerto que comprendía una de tres dosis de células: aproximadamente 40.000, 100.000 y 200.000 NPC viables (estos números se entienden que se aproximan a los utilizados a partir de ahora en el presente documento). El trasplante se llevó a cabo a aproximadamente 6 semanas después del ictus, y los animales se sometieron a inmunosupresión diariamente con ciclosporina-A (10 mg/kg, i.p.) a

lo largo del tiempo de supervivencia posterior al trasplante. El comportamiento locomotor y cognitivo de las ratas trasplantadas se caracterizó semanalmente durante un periodo de 4 semanas después del trasplante, y de nuevo una vez a las 12 semanas después del trasplante. Se examinó el examen histológico de la extensión de la isquemia cerebral y de la supervivencia del injerto en animales seleccionados de forma aleatoria a las 5 semanas y a las 12 semanas después del trasplante.

Se utilizaron los siguientes ensayos en la determinación de los resultados de los procedimientos de operación del ictus y del trasplante tal como se muestra con más detalle a continuación. La manera de llevar a cabo estos ensayos se muestra en otra parte en el presente documento, y sería también comprensible para un experto en la técnica.

10 TABLA 1. PARÁMETROS DE EFICACIA DEL TRASPLANTE DE LAS NPC

<u>Ensayo</u>	<u>Objetivo</u>
EBST	Desvela déficits locomotores tras el ictus y la recuperación tras el trasplante
Examen neurológico	Desvela anomalías sensorimotoras tras el ictus y la recuperación tras el trasplante
Laberinto de agua de Morris	Desvela déficits cognitivos tras el ictus y la recuperación tras el trasplante
Histología de TTC	Desvela la extensión del infarto cerebral
GFAP	Desvela la extensión del infarto cerebral y la respuesta inmune del hospedador al trasplante
Vector vírico de GFP	Desvela la supervivencia y la migración de las NPC injertadas
Neu-N	Desvela la expresión fenotípica neuronal de las NPC injertadas

Leyenda: EBST, ensayo de balanceo del cuerpo en elevación, TTC, cloruro de trifeniltetrazolio; GFAP, proteína ácida fibrilar glial

Los datos obtenidos en los siguientes Ejemplos desvelaron que, en los modelos estudiados, los animales trasplantados con NPC presentaron mejoras significativas en el comportamiento locomotor y cognitivo en comparación con su comportamiento inicial antes del trasplante. Las dos dosis mayores de aproximadamente 100.000 y aproximadamente 200.000 células promovieron mejores efectos conductuales en comparación con dosis más bajas de células de aproximadamente 40.000 células, sugiriendo de esta manera una relación dosis-respuesta. Se observó una recuperación sólida de los déficits conductuales inducidos por ictus en los tres tipos de ictus tan pronto como una semana después del trasplante y mantenida durante el periodo de cuatro semanas después del trasplante. Se observaron mejoras significativas en el comportamiento motor (utilizando el ensayo del balanceo del cuerpo en elevación y el ensayo de Bederson) en los tres tipos de ictus. En contraste, las mejoras significativas en el comportamiento cognitivo (utilizando el laberinto de agua de Morris) fueron más sólidas y estables en los animales trasplantados con MCAo y TGI en comparación con los animales trasplantados con MCAI. Todos los animales trasplantados con ictus tenían un aspecto sano y no fueron observables efectos abiertamente adversos durante el periodo del estudio.

El tipo de ictus parece ser un factor en la recuperación funcional, porque aunque todos los animales con ictus presentaron mejoras significativas en el comportamiento motor, los animales trasplantados con MCAo y TGI mostraron una mejor recuperación en el comportamiento cognitivo en comparación con los animales trasplantados con MCAI. La demostración de la recuperación significativa de las funciones motoras y cognitivas en los animales trasplantados con MCAo y TGI sugiere que estos dos modelos de ictus que produjeron daño en los ganglios basales y el hipocampo, respectivamente, son sensibles al trasplante de NPC. Extrapolar estas observaciones a la aplicación clínica indicaría que los pacientes con ictus en los ganglios basales fijos y en el hipocampo pueden beneficiarse del trasplante de NPC.

Los resultados histológicos a las 5 y 12 semanas después del trasplante indican que la supervivencia del injerto de las NPC medio en los efectos funcionales observados. Los datos sugieren que trasplantar 100.000 y 200.000 NPC produjo mejor recuperación conductual que la dosis inferior de 40.000 células. Los análisis correlacionales entre la supervivencia del injerto y los efectos conductuales apoyan adicionalmente que la supervivencia de las NPC promovió la recuperación motora y cognitiva en animales con ictus. Para resaltar, se determinó la supervivencia del injerto utilizando el enfoque de marcado del lentivirus, y esta estrategia se mostró fiable para marcar las NPC injertadas. Además, con este método, se registró fácilmente la migración de las NPC.

Dependiendo del tipo de ictus, parece que cuanto mayor es el daño cerebral, como se observa en MCAo y MCAI, mejor es la migración de las NPC. En contraste, el daño en el mesencéfalo producido por la TGI parece haber dado como resultado una menor migración de las células. La capacidad observada de las NPC de viajar largas distancias en el sitio de la lesión indica su potencial para migrar y ejercer efectos reparadores sobre sitios diana específicos de ictus. Los resultados proporcionados en los siguientes Ejemplos apoyan la observación de que las NPC que migran es más probable que se diferencien en fenotipos neuronales. Existen muchos factores que pueden haber contribuido a esta diferenciación preferente de las células migradas, incluyendo, pero sin limitarse al microentorno del hospedador y al tipo de ictus (localización y grado/tipo de muerte celular).

F. OBSERVACIONES EXPERIMENTALES Y VENTAJAS DE LAS MNC

Aunque esta invención contempla el trasplante autólogo y alogénico de las MNC, incluyendo las composiciones farmacéuticas que comprenden las MNC, es preferible el trasplante alogénico (unidades formadoras de injertos de la misma especie). En una realización, el trasplante alogénico imita el escenario clínico donde puede tener lugar el trasplante alogénico de las MNC en pacientes que padecen de lesiones del sistema nervioso central. Los resultados de los ensayos en animales del trasplante alogénico de las MNC en modelos animales de ictus se proporcionan en la Sección J a continuación. Estos modelos son útiles en la comprensión de la eficacia de la presente invención en el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central.

Los resultados en la Sección H sugieren que el grupo de las MNC mostró significativas mejoras en los ensayos de evaluación conductual en comparación con el grupo del control y MASC. En el análisis histológico, el volumen del infarto medido a los 41 días después de la MCAo no muestra significativas diferencias entre los tres grupos. En comparación con MASC, las MNC demostraron una relación de supervivencia mayor y una proporción más grande de MNC que la positividad mostrada por el marcador neuronal y la extensión de neuritas en el cerebro del hospedador.

El grupo de MASC demostró ligeras mejoras en los ensayos de evaluación conductual en comparación con el grupo del control, pero no tanto como el grupo de las MNC.

Otra ventaja del trasplante de las MNC de acuerdo con la invención es la mayor tasa de supervivencia de las MNC en comparación, por ejemplo, con las MASC multipotentes. Un mes después del trasplante, se detectaron aproximadamente 30-45% de las MNC trasplantadas mientras se detectaron solo un 10-20% de las MASC trasplantadas. La mayor tasa de supervivencia de las MNC puede proporcionar una ventaja en la recuperación funcional.

En el actual estudio, algunas MNC en la corteza, el cuerpo estriado y el hipocampo demostraron la extensión de neuritas en el cerebro del hospedador, que no podían conservarse en el grupo de las MASC. Por tanto, las significativas mejoras conductuales en el grupo de las MNC sugirieron que las MNC trasplantadas mantuvieron características neuronales en el cerebro del hospedador, y contribuyeron a la recuperación funcional en el modelo MCAO de rata.

G. EJEMPLOS DE NPC

Se entiende que los Ejemplos que se muestran en el presente documento son ilustrativos, y no limitantes en ninguna manera del alcance de la presente invención.

Procedimientos experimentales: Todos los animales recibieron inicialmente cirugía de ictus con MCAo, MCAI o TGI. A aproximadamente seis semanas después de la cirugía, los animales se sometieron a ensayo en el ensayo del balanceo del cuerpo en elevación, el ensayo de Bederson, y la tarea del laberinto de agua de Morris. Solo los animales que presentaron significativos déficits motores se utilizaron posteriormente para la cirugía de trasplante y se asignaron de manera aleatoria a uno de los siguientes tratamientos. En la Tabla 2 se proporciona el tamaño de la muestra para cada brazo del estudio.

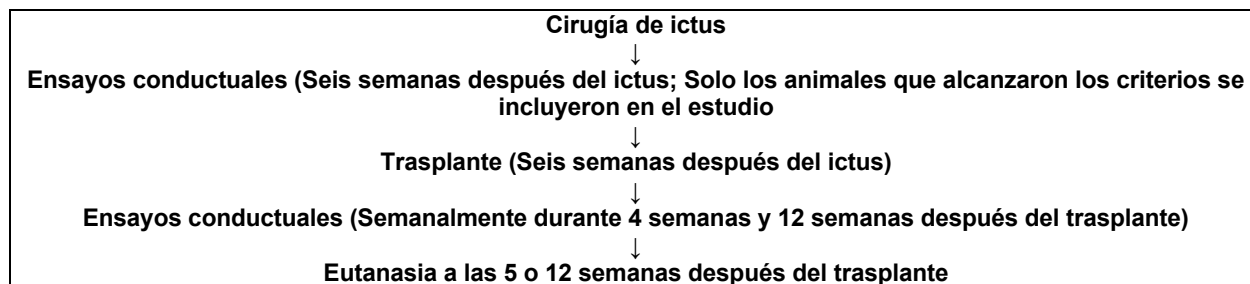
TABLA 2. CONDICIONES DE TRATAMIENTO

Ratas totales utilizadas en este estudio			
Tipo de injerto	Dosis de células (Aprox.)	Tipo de ictus	Tamaño de la muestra
NPC	40.000	MCAo	8
		MCAI	10
		TGI	8
	100.000	MCAo	10
		MCAI	10
		TGI	8
	200.000	MCAo	10
		MCAI	10
		TGI	8

Todos los animales se sometieron a cirugía para el ictus, recibieron trasplantes de 3 pases de aguja (MCAo y MCAI) o 2 pases de aguja (TGI) y se trataron diariamente con ciclosporina-A (10 mg/kg, i.p.).

Los animales se sometieron semanalmente a ensayos durante las primeras 4 semanas después del trasplante. La mitad de los animales se sometieron a eutanasia a las 5 semanas después del trasplante para realizar los análisis histológicos de infarto cerebral y supervivencia del injerto, la expresión fenotípica y la migración. El resto de animales se sometieron a ensayo de nuevo conductualmente y se sometieron a eutanasia posteriormente a las 12 semanas después del ictus a fin de evaluar los efectos conductuales e histológicos a largo plazo de las NPC. Por

claridad, se proporciona a continuación un diagrama esquemático.



Marcado de células utilizando el sistema del vector GFP-Lentivírico: El Dr. Didier Trono, de la Universidad de Ginebra (Ginebra, Suiza) suministró el sistema GFP-Lentivirus. Las NPC se marcaron utilizando el siguiente esquema general. Se toleraron las variaciones menores en el método

Materiales necesarios

- 10 mg / ml de disolución madre de polibreno / filtrada estéril (Sigma)
- Medio Opti-MEM (Gibco / Invitrogen)
- Suero de feto bovino con antibióticos (Penicilina / Estreptomicina)
- Placa de 6 pocillo, aproximadamente 1×10^6 células San-Bio
- Suspensión vírica

Procedimiento detallado

1. Medio celular caliente en incubadora a 37° C.
2. Añadir polibreno a 10 µg / ml.
- (Añadir 10 µl de una disolución madre de polibreno a 10 ml de medio. Mezclar bien).
3. En un tubo separado, añadir 1 ml de suspensión vírica a 1 ml de medio conteniendo polibreno.
4. Descongelar rápidamente una alícuota de células SanBio en un baño de agua a 37° C. Enjuagar el vial con etanol al 70%; secar con toallita.
5. Añadir el contenido completo a un tubo de centrifuga de 15 ml conteniendo 10 ml de PBS precalentado; mezclar suavemente y centrifugar a 1000 rpm en una centrifuga clínica de baja velocidad, temperatura ambiente, 5 minutos.
6. Pipetear suavemente el sobrenadante y volver a suspender el aglomerado celular en 2 ml de medio precalentado conteniendo virus (procedente de la etapa 3).
7. Transferir el contenido a un pocillo de una placa de 6 pocillos en la incubadora a 37° C, incubar durante 3 horas.
8. Lavar las células en 10 ml de PBS precalentado, dos veces.
9. Volver a suspender las células en 20 µl de PBS o medio de elección. Transferir a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Mantener en hielo. Las células están listas para el trasplante.

Ensayos conductuales: Los animales se sometieron a las siguientes medidas conductuales sensorimotoras y cognitivas en los estudios de farmacología de las NPC de acuerdo con la invención:

- Ensayo de balanceo del cuerpo en elevación (EBST)
- Laberinto de agua de Morris
- Escala neurológica de Bederson

Ensayo de balanceo del cuerpo en elevación (EBST)

El ensayo de balanceo del cuerpo en elevación (EBST) mide los reflejos posturales básicos y la función asimétrica del tronco. Se ha demostrado que el ensayo EBST muestra un déficit de larga duración tras la oclusión de la arteria cerebral media. "Physiol Behav. 1995; 58: 909-17. Véanse también C. Borlongan y col., "Early assessment of motor dysfunctions aids in successful occlusion of the middle cerebral artery." Neuroreport. 1998b; 9: 3615-21. Se ha evaluado también en paradigmas de trasplante neural para el ictus crónico. C. Borlongan y col., "Early assessment of motor dysfunctions aids in successful occlusion of the middle cerebral artery." Neuroreport. 1998; 9: 3615-21.

EBST implica sujetar el animal por su cola y registrar la dirección de los balanceos. El aparato de ensayo consistió en una placa de plexiglás transparente (40 x 40 x 35,5). Se agarró suavemente al animal por la base de la cola, y se elevó por la cola hasta que el hocico del animal estuvo a altura de 2 pulgadas (5 cm) por encima de la superficie. La dirección del balanceo, tanto a la izquierda como a la derecha, se contó una vez que los animales movieron lateralmente la cabeza aproximadamente 10 grados desde la posición intermedia del cuerpo. Tras un único balanceo, el animal se volvió a colocar en la caja de plexiglás y se dejó mover libremente durante 30 segundos antes

del reensayo. Estas etapas se repitieron 20 veces para cada animal. Normalmente, las ratas intactas presentan un 50% de sesgo del balanceo, esto es, el mismo número de balanceos a la derecha y a la izquierda. Un 75% de sesgo del balanceo indicaría 15 balanceos en una dirección y 5 en la otra durante 20 ensayos. Los trabajos anteriores con el EBST han señalado que los animales lesionados presentan > 75% de actividad sesgada en el balanceo un mes después de la lesión nigroestriatal; la asimetría es estable durante hasta seis meses.

Examen neurológico de Bederson

La escala neurológica de Bederson mide las tareas sensorimotoras. J. Bederson y col., "Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination." Stroke. 1986; 17: 472-6; M. Altumbabic, "Intracerebral hemorrhage in the rat: effects of hematoma aspiration." Stroke. 1998; 29: 1917-22. El trabajo previo ha mostrado un déficit medible en el tiempo tal como se midió mediante el modelo de Bederson en los modelos de ictus con el MCAo y el MCAI en ratas.

Alrededor de una hora después del EBST, el examen neurológico de Bederson se llevó a cabo tras los procedimientos anteriormente descritos. Se obtuvo una puntuación neurológica de cada rata utilizando 4 ensayos que incluyen:

(a) observación de hacer un círculo ipsilateral de forma espontánea, puntuado desde 0 (no hacer un círculo) hasta 3 (hacer un círculo de manera continua);

(b) retracción contralateral de la pata trasera, que mide la capacidad del animal de sustituir la pata trasera después de desplazarla lateralmente en 2 a 3 cm, puntuada desde 0 (sustitución inmediata) a 3 (sustitución después de minutos o sin sustitución)

(c) capacidad de pasear por una barra de equilibrio, puntuada desde 0 para una rata que atraviesa fácilmente una barra de 80 cm de longitud y 2,4 cm de anchura hasta 3 para una rata incapaz de permanecer sobre la barra durante 10 segundos, y

(d) agarre bilateral de las patas delanteras, que mide la capacidad de mantenerse sobre una varilla de acero de 2 mm de diámetro, puntuada desde 0 para una rata con un comportamiento de agarre normal de las patas delanteras hasta 3 para una rata incapaz de agarrarse con las patas delanteras.

Las puntuaciones de los 4 ensayos, que se han llevado a cabo durante un periodo de aproximadamente 15 minutos, se añadieron para proporcionar una puntuación del déficit neurológico (puntuación máxima posible, 12).

Laberinto de agua de Morris (MWM)

El laberinto de agua de Morris evalúa algunos aspectos del funcionamiento cognitivo, incluyendo la adquisición y retención de tareas, estrategias de búsqueda, y perseverancia. La tarea del laberinto de agua se presume que es sensible al daño en algunas áreas del cerebro afectadas por MCAo que incluyen el cuerpo estriado y la corteza frontal.

Aproximadamente una hora después del examen neurológico de Bederson, se introdujeron en el laberinto de agua de Morris a fin de evaluar la memoria espacial. El laberinto de agua de Morris consiste en un depósito hinchable, de 6 pies de diámetro y 3 pies de profundidad (182,88 cm de diámetro y 91,44 cm de profundidad). El depósito se rellenó con 12 cm de agua y se volvió opaco añadiendo 300 ml de leche. Una plataforma elevada 11 cm fabricada de plexiglás con una superficie circular de 10 cm de diámetro se colocó en 1 de 4 posiciones en la piscina. La plataforma está 1 cm por debajo de la superficie del agua y de esta manera queda oculta a la vista del animal en el agua. La piscina se divide en cuatro cuadrantes de áreas superficiales iguales. La rata del ensayo se colocó en la piscina frente a un lateral del depósito y se liberó en 1 de 4 posiciones de partida (norte, sur, este, u oeste), que se determinaron de forma aleatoria, y se localizaron de manera arbitraria a distancias iguales del borde de la piscina. La plataforma estaba situada en la parte intermedia del cuadrante suroeste 25 cm a partir del borde de la piscina. El punto de partida se cambió después de cada ensayo. Se proporcionaron al animal aproximadamente 60 segundos para encontrar la plataforma y se dejó descansar sobre la plataforma aproximadamente 30 segundos y se volvió a colocar posteriormente en la posición de partida, durante un total de 3 ensayos a partir de las posiciones de partida determinadas de forma aleatoria. Si la rata no conseguía encontrar la plataforma sumergida en aproximadamente 60 segundos, se colocaba sobre la plataforma y se la dejaba descansar sobre la plataforma durante aproximadamente 30 segundos. Tras el periodo de descanso, la rata volvía al depósito y se sometía a ensayo de nuevo durante 2 ensayos más. El día del adiestramiento consistió en 3 ensayos. El día del ensayo se llevó a cabo en el día 2 (para el ensayo de prueba, véase más adelante). Después de cada ensayo de adiestramiento y de ensayo, la rata se colocó a continuación en la jaula sobre la parte superior de una manta calefactora. Se vigilaron las rutas de nado mediante una videocámara conectada a un ordenador a través de un analizador de imágenes. El tiempo de latencia del escape para alcanzar la plataforma y la longitud de la ruta de nado del animal para encontrar la plataforma se utilizaron para evaluar la adquisición de la tarea del laberinto de agua. La velocidad de natación = longitud de la ruta / latencia del escape se utilizaron para evaluar la actividad motora de las ratas en esta tarea. Para evaluar el

recuerdo de la posición de la plataforma, se llevó a cabo un ensayo de prueba de 60 segundos sin plataforma en la piscina durante el día 2; se controló el porcentaje de tiempo transcurrido en la posición original de la plataforma.

Cirugía de ictus con MCAo. Todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo en condiciones asépticas. Los procedimientos de ictus con MCAo se tomaron de la bibliografía, en particular de C. Borlongan y col., "Chronic cyclosporine-A injection in rats with damaged blood-brain barrier does not impair retention of passive avoidance." *Neurosci Res.* 1998, 32: 195-200. La determinación en cada animal de la oclusión satisfactoria se alcanzó utilizando un láser Doppler que desveló una significativa reducción (> 75%) en el flujo de sangre cerebral durante la oclusión de 1 hora. MCAo produjo un daño estriatal consistente.

Cirugía de ictus con MCAI: El procedimiento quirúrgico con MCAI se describe generalmente en Y. Wang y col., "Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor Protects Against Ischemia-Induced Injury in the Cerebral Cortex." 1997, *J. Neuroscience*; 17 (1): 4341-4348. Se utilizó también el láser Doppler para verificar la ligadura arterial. MCAI produce daño cortical consistente.

Cirugía de ictus con TGI. Se utilizó una técnica de oclusión de 4 vasos. Bajo anestesia profunda, los animales recibieron una incisión cervical en la línea media ventral. Las arterias vertebrales se aislaron a través de los forámenes alares de la primera vértebra cervical y se utilizaron microsujeciones para ligar ambas arterias carótidas comunes durante 15 minutos. Esta técnica ha mostrado producir isquemia cerebral global, con daño hipocámpico consistente.

Células precursoras neuronales: SanBio, Inc (Mountain View CA) proporcionó células precursoras neuronales. Estas células se produjeron generalmente de acuerdo con las enseñanzas del documento PCT/JP03/01260.

Procedimientos de injerto: Todos los procedimientos de injerto se llevaron a cabo en condiciones asépticas. Bajo anestesia de equitesina (3 ml/kg i.p.) (se sometieron a comprobación los animales para los reflejos de dolor), se implantaron a los animales NPC directamente en el cuerpo estriado para la MCAo, en la corteza para la MCAI o en el hipocampo para la TGI, utilizando una cánula de implante del calibre 26. Véanse, generalmente Y. Wang y col., "Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor Protects Against Ischemia-Induced Injury in the Cerebral Cortex" 1997, *J. Neuroscience*; 17 (11): 4341-4348 y C. Borlongan y col., "Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinoma-derived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats." *Exp Neurol.* 1998; 149: 310-21. Se obtuvieron NPC criopreservadas utilizando los métodos dados a conocer en el presente documento. Se llevaron a cabo los recuentos celulares para la viabilidad, utilizando el método de exclusión del Azul de Tripano, antes del trasplante e inmediatamente después del trasplante del último animal receptor. Las dosis de células predeterminadas estaban (40.000, 100.000 y 200.000) estaban referidas al número de células viables. Se llevó a cabo la cirugía de trasplante en un lapso de tiempo comprendido en las 2 horas después de la descongelación de las células. La velocidad de infusión fue de 1 µl de disolución celular por minuto. Tras la infusión, se permitió un periodo de absorción de 3 minutos antes de que se retrajera la aguja. Una manta calefactora y un termómetro rectal mantuvieron la temperatura corporal a aproximadamente 37 grados C a lo largo de la cirugía y hasta la recuperación de la anestesia.

Análisis estadístico: Se analizaron los datos conductuales utilizando medidas repetidas de ANOVA con significancia estadística ajustada a $p < 0,05$. Los ensayos posthoc incluyeron los ensayos de la t en cuestión para desvelar diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las condiciones de tratamiento.

Ejemplo 1: Resultados de MCAo – Semanalmente durante cuatro semanas después del trasplante

Los animales del ensayo experimentaron el procedimiento MCAo tal como se ha descrito anteriormente, y se sometieron a evaluación semanalmente durante cuatro semanas después del trasplante con los resultados siguientes.

EBST: Para el ensayo semanal durante las cuatro semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló efectos significativos del tratamiento principal ($F_{2, 21} = 57,06$, $p < 0,0001$) (Figura 1). Se observaron también efectos significativos dependientes de la dosis ($200.000 > 100.000 > 40.000$). Se redujo significativamente la asimetría motora en cada una de las cuatro semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,0001$), observándose la recuperación más sólida una semana después del trasplante ($p < 0,0001$), y presentándose una recuperación estable durante las tres semanas posteriores después del trasplante. Los ensayos posthoc desvelaron que la significativa reducción en la asimetría motora a 1 semana después del trasplante no difiere a través de las tres dosis de células, pero se observaron efectos dependientes de la dosis a las 2, 3 y 4 semanas después del trasplante ($p < 0,05$) (Figura 2).

Ensayo de Bederson: Para el ensayo semanal durante las cuatro semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 21} = 9,65$, $p < 0,001$) (Figura 3). Las dosis mayores de 200.000 y 100.000 células promovieron una mejora superior en las puntuaciones del déficit neurológico que la dosis baja de 40.000 células ($p < 0,01$). Las mejoras en las puntuaciones de déficit neurológico se redujeron significativamente en cada una de las cuatro semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial (p

< 0,0001), con una tendencia hacia una mejora superior en el tiempo donde los animales trasplantados se comportaron mejor a las 2, 3 y 4 semanas después del trasplante en comparación con 1 semana después del trasplante ($p < 0,0001$). Los ensayo posthoc desvelaron que la significativa reducción en las puntuaciones de déficit neurológico a 1 semana después del trasplante no difiere a través de las tres dosis de células, pero dosis elevadas de 100.000 y 200.000 produjeron una mejor recuperación que la dosis baja de 40.000 células a las 2 semanas ($p < 0,05$), y se observaron efectos dependientes de la dosis ($200.000 > 100.000 > 40.000$ a las 3 y 4 semanas después del trasplante ($p < 0,05$) (Figura 4).

Adquisición de MWM: Para el ensayo semanal durante las cuatro semanas después del trasplante, el ANOVA completo no desveló efectos significativos del tratamiento principal ($F_{2, 21} = 2,87$, $p = 0,08$) (Figura 5). Parece existir una tendencia hacia una adquisición de MWM más larga durante el periodo de 4 semanas después del trasplante tal como se desveló por los tiempos de adquisición más largos a 2, 3 y 4 semanas en comparación con el valor inicial y 1 semana después del trasplante ($p < 0,01$) (Figura 6).

Ensayo de prueba de MWM: Tiempo para encontrar la plataforma. Para el ensayo semanal durante las cuatro semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 21} = 61,33$, $p < 0,0001$) (Figura 7). Las dosis mayores de 200.000 y 100.000 células promovieron un tiempo de localización de la plataforma significativamente más corto que la dosis baja de 40.000 células ($p < 0,0001$). Las mejoras en el tiempo para encontrar la plataforma se redujeron significativamente en cada una de las cuatro semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,0001$, con una tendencia hacia una mejora superior en el tiempo donde los animales trasplantados llevaron a cabo mejor a las 2, 3 y 4 semanas después del trasplante en comparación con 1 semana después del trasplante ($p < 0,0001$). Los ensayos posthoc desvelaron que dosis mayores de 200.000 y 100.000 produjeron tiempos significativamente más cortos para encontrar la plataforma que la dosis baja de 40.000 células a lo largo del periodo de 4 semanas después del trasplante, con una clara respuesta dependiente de la dosis ($200.000 > 100.000 > 40.000$) observada a las 1 y 4 semanas después del trasplante ($p < 0,05$) (Figura 8).

Ensayo de prueba de MWM: Tiempo pasado en el área de la plataforma. Para el ensayo semanal durante las cuatro semanas después del trasplante, el ANOVA global desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 21} = 15,19$, $p < 0,0001$) (Figura 9). Las dosis mayores de 200.000 y 100.000 células promovieron el empleo de tiempos significativamente más largos en el área de la plataforma que la dosis baja de 40.000 células ($p < 0,01$). Los gastos de tiempo en el área de la plataforma aumentaron significativamente en cada una de las cuatro semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,0001$), con una tendencia hacia una mejora superior durante el tiempo donde los animales trasplantados llevaron a cabo mejor a las 3 y 4 semanas después del trasplante en comparación con 1 y 2 semanas después del trasplante ($p < 0,0001$). Los ensayos posthoc desvelaron que dosis mayores de 200.000 y 100.000 produjeron gastos de tiempo significativamente más largos en el área de la plataforma que la dosis baja de 40.000 células a lo largo del periodo de 4 semanas después del trasplante ($p < 0,05$) (Figura 10).

Ejemplo 2: Resultados de MCAI – semanalmente durante cuatro semanas después del trasplante.

Los animales del ensayo experimentaron el procedimiento MCAI tal como se ha descrito anteriormente, y se sometieron a evaluación semanalmente durante cuatro semanas después del trasplante con los siguientes resultados.

EBST: Para el ensayo semanal durante las cuatro semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 24} = 76,30$, $p < 0,0001$) (Figura 11). Las dosis mayores de 200.000 y 100.000 células produjeron una recuperación superior de la asimetría motora que la dosis baja de 40.000 células ($p < 0,0001$). La asimetría motora se redujo significativamente en cada una de las cuatro semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,0001$), desplegándose una recuperación superior a las 2, 3, y 4 semanas después del trasplante. Los ensayos posthoc desvelaron que dosis de células mayores redujeron significativamente la asimetría motora mejor que la dosis baja, con efectos dependientes de la dosis ($200.000 > 100.000 > 40.000$) observados a 1 semana después del trasplante ($p < 0,05$) (Figura 12).

Ensayo de Bederson: Para el ensayo semanal durante cuatro semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 24} = 3,65$, $p < 0,05$) (Figura 13). La dosis más elevada de 200.000 células promovió una mejora superior en las puntuaciones de déficit neurológico que la dosis baja de 40.000 células. (Figura 13). Las mejoras en las puntuaciones de déficit neurológico se redujeron significativamente en cada una de las cuatro semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,0001$) y fueron estables en el tiempo ya que no hubo diferencias significativas entre las dosis de células a través de las puntuaciones neurológicas efectuadas semanalmente ($p > 0,005$). Los ensayos posthoc desvelaron que la dosis más elevada de 200.000 células produjo una recuperación superior que la dosis baja de 40.000 células a las 3 y 4 semanas ($p < 0,01$); no se encontraron otras diferencias significativas entre las dosis de células en los puntos temporales iniciales después del trasplante ($p > 0,05$) (Figura 14)

Adquisición de MWM: Para el ensayo semanal durante las cuatro semanas después del trasplante, el ANOVA completo no desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 24} = 5,78-16$, $p > 0,05$) (Figura 15). Parece existir una tendencia hacia un tiempo de adquisición de MWM más largo durante las 4 semanas después del trasplante tal como desvelaron los tiempos de adquisición más largos a las 1, 2, 3 y 4 semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,0001$) (Figura 16).

Ensayo de prueba de MWM: Tiempo para encontrar la plataforma. Para el ensayo semanal durante las cuatro semanas después del trasplante, el ANOVA completo no desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 24} = 0,62$, $p = 0,55$) (Figura 17). Durante el tiempo después del trasplante, se señalaron tiempos significativamente más largos en la localización de la plataforma ($p < 0,001$) (Figura 18).

Ensayo de prueba de MWM. Tiempo pasado en el área de la plataforma. Para el ensayo semanal durante las cuatro semanas después del trasplante, el ANOVA completo no desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 24} = 2,01$, $p = 0,16$) (Figura 19). Aunque hubo una tendencia de tiempos más largos pasados en el área de la plataforma durante el periodo de 4 semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,001$), se observaron solo efectos transitorios dependientes de la dosis a 1 semana después del trasplante ($p < 0,05$), y no en los otros periodos de tiempo de ensayo semanalmente ($p > 0,05$) (Figura 20).

Ejemplo 3: Resultados de TGI – Semanalmente durante cuatro semanas después del trasplante

Los animales de ensayo experimentaron el procedimiento TGI tal como se ha descrito anteriormente, y se sometieron a evaluación semanalmente durante cuatro semanas después del trasplante con los siguientes resultados.

Ensayo de Bederson; Para el ensayo semanal durante las cuatro semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 23} = 47,33$, $p < 0,001$) (Figura 21). Las dosis mayores de 200.000 y 100.000 células promovieron una mejora superior en las puntuaciones de déficit neurológico que la dosis baja de 40.000 células ($p < 0,0001$). Las mejoras en las puntuaciones de déficit neurológico se redujeron significativamente en cada una de las cuatro semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,0001$). Los ensayos posthoc desvelaron que la reducción significativa en las puntuaciones de déficit neurológico a 1 semana después del trasplante no difieren a través de las tres dosis de células, pero las dosis elevadas de 100.000 y 200.000 produjeron una recuperación superior que la dosis baja de 40.000 células a las 2, 3 y 4 semanas ($p < 0,005$) y se observaron efectos dependientes de la dosis ($200.000 > 100.000 > 40.000$) a las 4 semanas después del trasplante ($p < 0,05$) (Figura 22).

Adquisición de MWM. Para el ensayo semanal durante las cuatro semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 23} = 9,88$, $p < 0,001$) (Figura 23). Sin embargo, este significativo efecto del tratamiento se consiguió solo debido a que la dosis más elevada de 200.000 células produjo una mejora transitoria significativa en la adquisición de tareas a 1 semana después del trasplante en comparación con las otras dos dosis de 100.000 y 40.000 células ($p < 0,005$). Posteriormente, se señalaron tiempos de adquisición más largos a las 2, 3 y 4 semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial y 1 semana después del trasplante ($p < 0,005$) (Figura 24).

Ensayo de prueba de MWM. Tiempo para encontrar la plataforma. Para el ensayo semanal durante las cuatro semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 23} = 30,98$, $p < 0,0001$) (Figura 25). Las dosis mayores de 200.000 y 100.000 células promovieron un tiempo de localización significativamente más corto de la plataforma que la dosis baja de 40.00 células ($p < 0,0001$). Las mejoras en el tiempo para encontrar la plataforma se redujeron significativamente en cada una de las cuatro semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,0001$), con una tendencia hacia una mejora superior durante el tiempo donde los animales trasplantados llevaron a cabo mejor a las 3 y 4 semanas después del trasplante en comparación con 1 y 2 semanas después del trasplante ($p < 0,0001$). Los ensayos posthoc desvelaron que la dosis mayor de 200.000 células produjo tiempos significativamente más cortos para encontrar la plataforma que las otras dosis de 100.000 y 40.000 células a las 2 y 3 semanas después del periodo de trasplante ($p < 0,05$), mientras que las dos dosis mayores ejercieron una mejora superior para encontrar la plataforma en comparación con la dosis de células baja a las 4 semanas después del trasplante ($p < 0,05$) (Figura 26).

Ensayo de prueba de MWM: Tiempo pasado en el área de la plataforma. Para el ensayo semanal durante las cuatro semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 23} = 54,06$, $p < 0,0001$) (Figura 27). Se observaron significativos efectos dependientes de la dosis ($200.000 > 100.000 > 40.000$) durante el periodo de 4 semanas después del trasplante ($p < 0,0001$). Además, durante el periodo de 4 semanas después del trasplante, se pasaron tiempos más largos en el área de la plataforma ($p < 0,0001$). Los ensayos posthoc desvelaron que las dosis mayores de 200.000 y 100.000 produjeron tiempos pasados en el área de la plataforma significativamente más largos que la dosis baja de 40.000 células a las 3 y 4 semanas después del periodo de trasplante ($p < 0,05$). A las 2 semanas después del trasplante, solo la dosis de células más elevada produjo un tiempo pasado en el área de la plataforma significativamente más largo en comparación con las otras dos

dosis de células ($p < 0,05$) (Figura 28).

Ejemplo 4: Examen histológico a las 5 semanas después del trasplante

Los animales seleccionados de forma aleatoria se sometieron a eutanasia a las 5 semanas después del trasplante (véase la Tabla 3). Los exámenes histológicos se limitaron a las 2-3 muestras de cerebro de cada dosis y tipo de ictus. De acuerdo con esto, se llevaron a cabo los análisis cuantitativos sobre la supervivencia y la migración del injerto basándose en la epifluorescencia de GFP. Para los otros parámetros histológicos, específicamente utilizando diferentes marcadores de anticuerpos para detectar la expresión fenotípica, solo se proporciona una descripción general.

Supervivencia del injerto de NPC. La epifluorescencia de GFP desveló la supervivencia del injerto dependiente de la dosis ($200.000 > 100.000 > 40.000$) a través de los tres tipos de ictus ($F_{8, 32} = 33,9$, $p < 0,0001$) (Figura 29). Los recuentos de células promedio desvelaron células positivas para GFP que la dosis menor de 40.000 células dieron como cifras bajas de supervivencia de injertos positivos para GFP, aunque ambas dosis mayores de 100.000 y 200.000 dieron como resultado números mayores de supervivencia de injertos positivos para GFP. Estas observaciones fueron consistentes para los animales trasplantados con MCAo, MCAI y TGI. Sin embargo, cuando se calcularon los porcentajes para cada dosis de células, no se obtuvieron diferencias significativas ($F_{8, 32} = 1,67$, $p > 0,05$) (Figura 30) en el porcentaje de supervivencia del injerto a través de las 3 dosis.

TABLA 3. Histología cinco semanas después del trasplante

Tipo de injerto NPC	Dosis de células	Tipo de ictus	Tamaño de la muestra
	40.000	MCAo	4
		MCAI	5
		TGI	
	100.000	MCAo	5
		MCAI	5
	200.000	MCAo	5
		MCAI	5
		TGI	4

Correlaciones positivas entre la supervivencia del injerto y la recuperación funcional: Los análisis de regresión desvelaron que cuanto mayor es el número de injertos de NPC que sobreviven ($200.000 > 100.000 > 40.000$) superior es la mejora funcional (Figura 31)

Migración del injerto de NPC: La epifluorescencia de GFP desveló que la mayoría (aprox. 55%-85%) de las células trasplantadas permaneció en el sitio de trasplante original (Figura 32). En los animales trasplantados con MCAo, algunas células positivas para GFP podrían identificarse fácilmente en los sitios de trasplante estriatal originales (62%); en animales trasplantados con MCAI, las células positivas para GFP permanecieron en los sitios de trasplante cortical originales (86%). Sin embargo, parece que los animales trasplantados con MCAo y MCAI presentaron más migración de células injertadas en comparación con los animales trasplantados con TGI. No obstante, cuando se observó la migración, las células injertadas permanecieron en el área diana general, en que se observó la migración del injerto en MCAo en el cuerpo estriado, en MCAI en el interior de la corteza, y en TGI, en el interior del hipocampo. La migración del injerto en MCAo y MCAI se caracterizó por células injertadas que revestían la penumbra isquémica en el cuerpo estriado y la corteza, respectivamente. Además, para MCAo, se observó una migración de células medial a lateral (1,8 mm) y dorsal a ventral (2,3 mm) a lo largo de la penumbra isquémica estriatal. Para MCAI, se observó una migración de células medial a lateral (4,4 mm). Para los animales trasplantados con TGI, la migración del injerto se caracterizó por SBDP positivas para GFP identificadas en las regiones CA2 y CA3 (1,6 mm y 0,7 mm de separación, respectivamente, desde el sitio de trasplante de CA1 original).

Expresión fenotípica de NPC: Las células NPC injertadas fueron positivas para GFAP (aproximadamente 5%) y muy pocas células (2-5 células por cerebro) fueron también positivas para NeuN. Ambos marcadores se localizaron simultáneamente con GFP. Estas observaciones fueron consistentes para todas las dosis y los tres tipos de ictus.

Ejemplo 5: Resultados de MCAo a las doce semanas después del trasplante

A las doce semanas después del trasplante, los animales del ensayo que experimentaron el procedimiento TGI tal como se ha descrito anteriormente se sometieron a evaluación con los resultados siguientes.

EBST: Para el ensayo de 12 semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 9} = 11,84$, $p < 0,005$) (Figura 32). El ensayo posthoc desveló asimetría motora significativamente reducida a las 12 semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,001$).

Ensayo de Bederson: Para el ensayo de 12 semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 9} = 41,83$, $p < 0,001$) (Figura 32). El ensayo posthoc desveló déficits neurológicos significativamente reducidos a las 12 semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,001$).

5 Adquisición de MWM: para el ensayo de 12 semanas después del trasplante, el ANOVA completo no desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 9} = 0,36$, $p = 0,71$) (Figura 33). Estos resultados no indicaron diferencias significativas en la adquisición de MWM entre el valor inicial y 12 semanas después del trasplante.

10 Ensayo de prueba de MWM: Tiempo para encontrar la plataforma. Para el ensayo de 12 semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 9} = 6,18$, $p < 0,05$) (Figura 33). El ensayo posthoc desveló un tiempo para encontrar la plataforma significativamente reducido a las 12 semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,001$).

15 Ensayo de prueba de MWM. Tiempo pasado sobre el área de la plataforma. Para el ensayo de 12 semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 9} = 6,18$, $p < 0,05$) (Figura 33). El ensayo posthoc un tiempo en el área de la plataforma significativamente aumentado a las 12 semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,001$).

20 **Ejemplo 6: resultados de MCAI a las doce semanas después del trasplante**

A las doce semanas después del trasplante, los animales del ensayo que experimentaron el procedimiento MCAI se sometieron a evaluación con los siguientes resultados.

25 EBST. Para el ensayo de 12 semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 9} = 23,02$, $p < 0,0005$) (Figura 34). El ensayo posthoc desveló asimetría motora significativamente reducida a las 12 semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,0001$).

30 Ensayo de Bederson: Para el ensayo de 12 semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 9} = 9,29$, $p < 0,01$) (Figura 34). El ensayo posthoc desveló déficits neurológicos significativamente reducidos a las 12 semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,0001$).

35 Adquisición de MWM: Para el ensayo de 12 semanas después del trasplante. El ANOVA completo no desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 9} = 1,37$, $p = 0,30$) (Figura 35). Estos resultados no indican diferencias significativas en la adquisición de MWM entre el valor inicial y las 12 semanas después del trasplante.

40 Ensayo de prueba de MWM: Tiempo para encontrar la plataforma. Para el ensayo de 12 semanas después del trasplante, el ANOVA completo no desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 9} = 0,26$, $p = 0,78$) (Figura 35). Estos resultados no indican diferencias significativas en el ensayo de prueba de MWM, es decir, con la plataforma disponible, entre el valor inicial y las 12 semanas después del trasplante.

45 Ensayo de prueba de MWM: Tiempo pasado sobre el área de la plataforma. Para el ensayo de 12 semanas después del trasplante, el ANOVA completo no desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 9} = 0,15$, $p = 0,86$) (Figura 35). Estos resultados no indican significativas diferencias en el ensayo de prueba de MWM, es decir, sin la plataforma, entre el valor inicial y las 12 semanas después del trasplante.

50 **Ejemplo 7: Resultados del TGI a las doce semanas después del trasplante**

A las doce semanas después del trasplante, los animales del ensayo que experimentaron el procedimiento TGI tal como se ha descrito anteriormente se sometieron a evaluación con los siguientes resultados.

55 Ensayo de Bederson: Para el ensayo de 12 semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 9} = 184,02$, $p < 0,0001$) (Figura 36). El ensayo posthoc desveló déficits neurológicos significativamente reducidos a las 12 semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,0001$).

60 Adquisición de MWM. Para el ensayo de 12 semanas después del trasplante, el ANOVA completo no desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 9} = 0,31$, $p = 0,74$) (Figura 37). Estos resultados no indican diferencias significativas en la adquisición de MWM entre el valor inicial y las 12 semanas después del trasplante.

65 Ensayo de prueba de MWM; Tiempo para encontrar la plataforma. Para el ensayo de 12 semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 9} = 5,14$, $p < 0,05$) (Figura 37). El ensayo posthoc desveló un tiempo para encontrar la plataforma significativamente reducido a las 12 semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,0001$).

Ensayo de prueba de MWM: Tiempo pasado sobre el área de la plataforma. Para el ensayo de 12 semanas después del trasplante, el ANOVA completo desveló significativos efectos del tratamiento principal ($F_{2, 9} = 4,39$, $p < 0,05$) (Figura 37). El ensayo posthoc desveló un tiempo en el área de la plataforma significativamente aumentado a las 12 semanas después del trasplante en comparación con el valor inicial ($p < 0,0001$).

Ejemplo 8: Examen histológico a las 12 semanas después del trasplante

Los animales restantes se sometieron a eutanasia a las 12 semanas después del trasplante (véase la Tabla 4). Se llevaron a cabo los análisis cuantitativos de la supervivencia y la migración del injerto basándose en la epifluorescencia de GFP y otros parámetros inmunohistoquímicos, específicamente, utilizando diferentes marcadores de anticuerpos para detectar la expresión fenotípica.

TABLA 4. Histología doce semanas después del trasplante

Tipo de injerto NPC	Dosis de células	Tipo de ictus	Tamaño de la muestra
	40.000	MCAo	4
		MCAI	4
		TGI	4
	100.000	MCAo	4
		MCAI	4
		TGI	4
	200.000	MCAo	4
		MCAI	4
		TGI	4

Supervivencia del injerto de NPC: La epifluorescencia de GFP desveló una supervivencia parcial del injerto dependiente de la dosis ($200.000 = 100.000 > 40.000$) a través de los tres tipos de ictus ($F_{8, 27} = 14,88$, $p < 0,0001$) (Figura 38). Los recuentos de células promedio de las células positivas para GFP desvelaron que la dosis menor de 40.000 dio como resultado cifras bajas de injertos positivos para GFP que sobrevivían, mientras que las dosis mayores de 100.000 y 200.000 dieron como resultado números mayores de injertos positivos para GFP que sobrevivían. Estas observaciones fueron consistentes para los animales trasplantados con MCAo, MCAI y TGI. Sin embargo, cuando se calcularon los porcentajes de cada dosis de células, no se obtuvieron diferencias significativas ($F_{8, 27} = 1,37$, $p > 0,05$) (Figura 39) en el porcentaje de supervivencia de los injertos a través de las 3 dosis. Esto sugiere que el porcentaje de supervivencia del injerto a dosis bajas y altas se mantuvo, potencialmente por inmunosupresión de CsA.

Migración del injerto de NPC: De acuerdo con los resultados de la histología de 5 semanas, la epifluorescencia de GFP desveló que la mayoría (aprox. 655-90%) de las células trasplantadas permanecieron en el sitio del trasplante original. En los animales trasplantados con MCAo, podían identificarse fácilmente algunas células positivas para GFP en los sitios de trasplante estriatales originales (72%), en los animales trasplantados con MCAI, las células positivas para GFP permanecieron en los sitios de trasplante cortical originales (64%), y; en los animales trasplantados con TGI, las células positivas para GFP permanecieron en los sitios hipocámpicos originales (91%). Parece que los animales trasplantados con MCAo y MCAI presentaron más migración de células injertadas en comparación con los animales trasplantados con TGI. Además, cuando se observó la migración, las células injertadas permanecieron en el área diana general, en que se observó la migración del injerto en MCAo en el interior del cuerpo estriado, en MCAI en el interior de la corteza, y en TGI en el interior del hipocampo. Además la migración del injerto en MCAo y MCAI se caracterizó por células injertadas que revestían la penumbra isquémica en el cuerpo estriado y la corteza, respectivamente. Además, para MCAo, se observó una migración de células medial a lateral (2,0 mm) y dorsal a ventral (25 mm) de células a lo largo de la penumbra isquémica estriatal. Para MCAI, se observó una migración de células medial a lateral (5,5 mm). Para los animales trasplantados con TGI, la migración del injerto se caracterizó por SBDP positivas para GFP identificadas en las regiones CA2 y CA3 (1,6 mm y 0,8 mm de separación, respectivamente, desde el sitio de trasplante CA1 original).

Expresión fenotípica de NPC: con respecto a los tipos de ictus y a las dosis, la tasa de supervivencia aproximada es del 15%: en estos sitios de trasplante originales, la mayoría de las células retienen su apariencia globulosa, y no son positivas para NeuN o GFAP. Sin embargo, en los animales trasplantados con MCAo, unas pocas de estas células presentan NeuN y GFAP. Se detectaron células positivas para GFP que migraron a lo largo de la penumbra estriatal, la penumbra cortical y CA3 de MCAo, MCAI, y animales trasplantados con TGI, respectivamente. A su vez, la inmunotinción de NeuN desvela que estas células expresan dicho marcador para las neuronas maduras. Globalmente, aproximadamente un 25% de células positivas para GFP que sobreviven son positivas para NeuN con respecto a los tipos de ictus y dosis; en las células que han migrado lejos del sitio del trasplante, aproximadamente un 60% son positivas para NeuN. Estas células presentan morfología neuronal, caracterizada por procesos elaborados y largos, que son abundantes en animales trasplantados con MCAo. Además, el microscopio de epifluorescencia de GFP desveló que se encuentra distinta morfología neuronal en cada tipo de ictus, así como un contacto célula a célula en el injerto de NPC. Algunas células (aproximadamente un 5% del total y con respecto a los tipos de ictus y a las dosis) presentan la morfología de célula glial que se confirmó mediante la tinción de GFAP. La mayoría, si no todas, de las células positivas para GFAP se encontraron próximas o en el interior de vasos sanguíneos.

Patología del tejido hospedador de injerto. No hubo evidencias de formación de tumor utilizando la tinción de Nissl en el cuerpo estriado; la corteza, o el hipocampo.

Ejemplo 9. Ensayo de NPC adicional en modelos de ictus

El objetivo de este estudio fue examinar los beneficios terapéuticos de las NPC en animales con ictus. Se utilizaron los ensayos conductuales para desvelar las funciones motoras y neurológicas de los animales con ictus trasplantados. El trasplante se llevó a cabo 1 mes después del ictus, y los animales se sometieron a inmunosupresión diariamente con ciclosporina-A (CsA, 10 mg/kg, i.p.) a lo largo del tiempo de supervivencia de un mes después del trasplante. El comportamiento locomotor y neurológico de las ratas trasplantadas se caracterizó en los días 7, 14 y 28 después del trasplante. El resultado del trasplante satisfactorio, tal como se desveló mediante la determinación de un intervalo de dosis de NPC eficaz, se evaluó utilizando el comportamiento locomotor y el comportamiento neurológico.

Hubo 3 condiciones de tratamiento. 0 (medio solo), dosis baja de 90k de NPC, y dosis alta de 180 k de NPC, el número de animales para cada condición de tratamiento correspondió a un tamaño de muestra requerido para los análisis estadísticos (n010 por grupo). Los animales que no alcanzaron los criterios para los déficits conductuales (actividad de balanceo sesgada un 75% y una puntuación de 2,5 en el examen neurológico) no se incluyeron en el estudio. Normalmente, la mayor parte de animales con ictus alcanzó dichos criterios, con al menos 8 sujetos necesarios para proporcionar análisis estadísticos conclusivos. Todos los animales se sometieron a inmunosupresión (10 mg/kg de CsA, i.p., diariamente) a lo largo del estudio.

Todos los animales recibieron inicialmente cirugía de ictus con MCAo. A las cuatro semanas después de la cirugía, los animales se ensayaron con el EBST, seguido una hora después por el examen neurológico de Bederson. Solo los animales que presentaron significativos déficits motores y neurológicos se utilizaron posteriormente para la cirugía de trasplante y se asignaron de forma aleatoria a uno de los siguientes tratamientos:

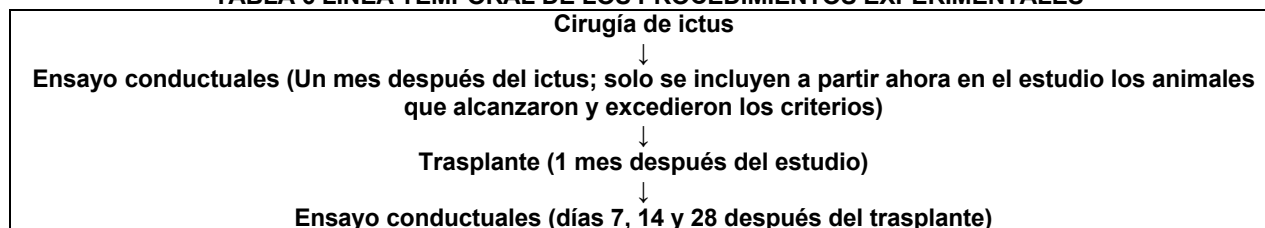
TABLA 5. CONDICIONES DE TRATAMIENTO

Tipo de injerto	Dosis de células	Tipo de ictus	Tamaño de la muestra
NPC	90.000	MCAo	10
NPC	180.000	MCAo	10
Vehículo	0	MCAo	10

Leyenda: Todos los animales experimentaron cirugía de ictus, recibieron Trasplantes estriatales (MCAo) y se trataron con CsA crónica.

Los animales se introdujeron de nuevo a la misma batería de ensayos conductuales en los días 7, 14 y 28 después del trasplante. Por claridad, se proporciona a continuación un diagrama esquemático.

TABLA 6 LÍNEA TEMPORAL DE LOS PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES



Todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo en condiciones asépticas. Los animales se sometieron a anestesia con equitesina (300 mg/kg, i.p.) y se comprobaron para los reflejos de dolor. Bajo anestesia profunda, los animales se sometieron a cirugía de oclusión con MCA. La técnica de oclusión con MCA implica la inserción de un filamento de sutura a través de la arteria carótida para alcanzar la unión de la MCA, bloqueando de esta manera el flujo de sangre procedente de la arteria carótida común, así como del círculo de Willis. La arteria carótida común derecha se identificó y aisló a través de una incisión cervical de la línea media ventral. El tamaño del filamento era de 4-0, preparado a partir de sutura estéril, no absorbible (Ethicon, Inc), con el diámetro de la punta cónica de la sutura con un tamaño de calibre 24 a 26 utilizando un cemento de caucho. Aproximadamente 15 a 17 mm de filamento de la sutura se insertaron desde la unión de las arterias carótidas externa e interna para bloquear la MCA. La MCA derecha se ocluyó durante una hora; una hora de oclusión de la MCA da como resultado generalmente un infarto máximo. Además, la longitud y el tamaño de la punta del émbolo se ha encontrado que produce una oclusión de MCA completa en animales que pesan entre 250 y 350 g. Una manta calefactora y un termómetro rectal promueven el mantenimiento de la temperatura corporal en los límites normales. Para determinar la oclusión y la perfusión satisfactorias, se utilizó un láser Doppler. La sonda Doppler se colocó al nivel del duramen directamente por encima de la de la región estriatal del infarto esperada (AP: +2,0, ML: ± 2,0, y DV: -4,0 mm) para medir el flujo de sangre cerebral antes, durante y después de la oclusión.

Todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo en condiciones asépticas. Bajo anestesia de equitesina (3 ml/kg i.p) (los animales se comprobaron para los reflejos de dolor), se implantaron a los animales las NPC o el vehículo directamente en el cuerpo estriado (0,5 mm anterior a bregma, 2,8 mm lateral a la línea media y 5,0 mm por debajo de la superficie dural) utilizando una cánula para implante del calibre 28. Las NPC humanas criopreservadas se obtuvieron de SanBio, Inc, y se descongelaron justo antes de la cirugía de trasplante. Se llevaron a cabo los recuentos celulares de viabilidad, utilizando el método de exclusión del Azul Tripano, antes del trasplante e inmediatamente después del trasplante del último animal receptor. Las dosificaciones celulares predeterminadas (90.000 y 180.000) se basaron en estudios pilotos que demostraban que estas dosificaciones están comprendidas en el intervalo de dosificación terapéuticamente eficaz.

Se llevó a cabo la cirugía de trasplante en las 2 horas después de la descongelación de las células. La velocidad de infusión fue de 1 µl de disolución de células por minuto. Tras la infusión, se permitió un periodo de absorción de 3 minutos antes de que la aguja se retrajera. Se utilizó un pase de aguja, pero hubo 3 depósitos dorsoventrales, donde cada sitio recibió 3 µl de disolución de células: Una manta calefactora y un termómetro rectal mantuvieron la temperatura corporal a aproximadamente 37° C durante la cirugía y tras la recuperación de la anestesia.

La cirugía de ictus con MCAo de una hora produjo desequilibrios conductuales consistentes a un mes después del ictus como se desveló por la actividad de balanceo significativamente sesgada y los déficits neurológicos en el EBST y el examen de Bederson, respectivamente, en comparación con el comportamiento previo al ictus de los animales en ambos ensayos. Las comparaciones por parejas entre el comportamiento posterior al ictus y previo al ictus desvelaron significativos desequilibrios en ambos ensayos ($p < 0,0001$) en todos los animales con ictus incluidos en este estudio.

Tras las asignaciones aleatorias de los animales con ictus, a cualquier vehículo, dosis baja de 90k de NPC, o dosis alta de 180 k de NPC, el ANOVA desveló significativos efectos del tratamiento para ambos ensayos ($p < 0,0001$). Las comparaciones por parejas entre grupos de tratamiento desvelaron que los animales con ictus, tanto inicialmente como 7 días después del trasplante fueron trasplantados con NPC, sin tener en cuenta la dosis, presentaron significativas mejoras de los déficits conductuales en comparación con los animales con ictus tratados con vehículo ($p < 0,05$). Esta recuperación conductual de los animales con ictus a los que se trasplantaron NPC fue mantenida al día 14 y al día 28 después del trasplante, en que las GFU de NPC sin tener en cuenta de nuevo la dosis, promovieron una significativa atenuación de los desequilibrios motores y neurológicos en comparación con el vehículo de tratamiento ($p < 0,0001$). El examen más cercano de las dos dosis de NPC desveló que la dosis alta de 180k produjo una significativa mejora superior de los déficits conductuales en comparación con la dosis baja de 90k a lo largo de todos los días del ensayo posteriores al trasplante para EBST ($p < 0,01$), y en los días 14 y 28 días del ensayo después del trasplante para Bederson ($p < 0,0005$). En las Figuras 44-45 se muestran los resultados.

Los presentes datos conductuales demostraron los sólidos beneficios terapéuticos de las NPC en que la recuperación conductual que se detectó tan pronto como el día 7 después del trasplante. Los resultados desvelaron además que el resultado positivo de los injertos de NPC fue estable hasta el día 28 después del trasplante (periodo de corte del estudio). Aunque una dosis baja y alta de NPC promovió beneficios funcionales, la dosis alta proporcionó una recuperación conductual significativamente mejor que la dosis baja.

Todos los animales con ictus en este estudio se sometieron a inmunosupresión. Como los animales con ictus tratados con vehículo no presentan ninguna recuperación conductual observable, esto eliminó los posibles efectos beneficiosos de confusión de las CsA inmunosupresoras tal como se ha observado anteriormente en los estudios que incorporan la administración del fármaco en un periodo previo al ictus, durante o inmediatamente después del ictus. La recuperación conductual observada se limita a animales con ictus a los que se han trasplantado NPC, lo que indica que la fuente de los efectos terapéuticos no es probable que sea la inmunosupresión per se, sino que proceda de las células injertadas.

Se llevaron a cabo las tinciones de la hematoxilina y Eosina (H&E) y la tinción de Nissl para medir el área máxima infartada en cada animal utilizando un sistema de formación de imágenes NIH. Para calcular el volumen del infarto, se utilizó la siguiente fórmula = 2 mm (grosor de la oblea) x [suma del área del infarto en las obleas de cerebro (mm^2)].

Un mes después del trasplante, los animales seleccionados de forma aleatoria se sometieron a eutanasia para la inmunohistoquímica. Se procesaron los tejidos utilizando el método ABC normalizado que utiliza los siguientes procedimientos. Se examinaron tejidos seccionados con cryostat de 20 µm a un aumento de 4X y se digitalizaron utilizando un programa informático con herramientas de imagen basado en PC. Las secciones de cerebro se codificaron enmascaradas y se utilizó la fórmula de Abercrombie para calcular el número total de células inmunopositivas.

Se evaluó la supervivencia de las NPC tras el trasplante utilizando el anticuerpo HuNu específico humano monoclonal, marcadores superficiales de células humanas que no reaccionan en cruzado con marcadores superficiales de células de roedores u otras proteínas de roedores. Para detectar la expresión del fenotipo neuronal, glial y oligodendrocítico en injertos celulares, se utilizó el análisis inmunohistoquímico, Neu-N y GFAP,

respectivamente. Estos marcadores superficiales celulares desvelaron también la migración de las NPC injertadas.

Generalmente, las NPC sobrevivieron bien en el cuerpo estriado con unas pocas neuronas positivas para la expresión de MAP2 a 1 mes después del trasplante. La supervivencia del injerto no difiere significativamente entre los dos niveles de dosis de las NPC. Las NPC redujeron la pérdida de células isquémicas en la penumbra del ictus. Los dos niveles de dosis mostraron casi la misma extensión de los efectos del neurorescate. En las Figuras 46-48 se presentan los datos de estos análisis.

H. EJEMPLOS DE MNC

Los ejemplos que se muestran a continuación se entiende que son ilustrativos y de ninguna manera limitantes, del alcance de la presente invención.

Procedimientos experimentales

Cultivo de MASC e inducción neuronal

Se aislaron las MASC a partir de ratas Wistar generalmente tal como se ha descrito anteriormente en S. Azizi y col. "Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts." Proc Natl Acad Sci U S A, 1998; 95: 3908-13. Las MASC se marcaron con proteína fluorescente verde (GFP) por infección retroviral utilizando el vector pBabe neo-GFP generalmente tal como se describe en M. Dezawa y col., "Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells." Eur J Neurosci. 2001; 14: 1771-6.

La inducción neuronal de MASC es generalmente tal como se describe en M. Dezawa y col., "Specific induction of neuronal cells from bone-marrow stromal cells and application for autologous transplantation J Clin Invest. 2004; 113: 1701-10. De forma breve, un vector (pCI neo-NICD) que contenía el dominio intracelular Notch (NICD) se transfectó en MASC utilizando Lipofectamin2000 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Se seleccionaron las células mediante G418 tras 11 días. Para la inducción de las MNC, las MASC transfectadas con NICD se subcultivaron una vez (confluencia del 60-70%) y se incubaron en medio alfa-MEM que contenía 10% de FBS, 5 µm de FSK (Calbiochem, La Jolla, California), 10 ng/ml de bFGF (Peprotech, London, Reino Unido) y 10 ng/ml de CNTF (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota). Cinco días después, las células se trasplantaron en el modelo de rata MCAO. Para caracterizar las MNC inducidas in vitro, se llevó a cabo la inmunocitoquímica. Se utilizaron un anticuerpo dirigido contra MAP-2ab (Sigma, St. Louis, Missouri), neurofilamento-M (NF-M) (Chemicon, Temecula, California) y beta-tubulina isotipo 3 (β-tubulina 3) (Sigma, St. Louis, Missouri) como marcadores neuronales, y un 90-95% de las MNC mostraron ser inmunopositivas para estos marcadores.

Modelo MCAO en rata:

Ratas Wistar macho que pesaban 200-250 g se mantuvieron a temperatura ambiente (24° C) con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h, y se proporcionó alimento y agua libremente. El procedimiento MCAO era una modificación de los métodos descritos en J. Koizumi y col., "Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in Which recirculation can be introduced in the ischemic area." Jpn J Stroke. 1986; 8: 1-8; y E. Longa y col., "Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats." Stroke. 1989; 20: 84-91. De forma breve, bajo anestesia profunda inducida por una mezcla de 1,0-1,5% de halotano, 10% de O₂ y aire, se llevó a cabo una incisión cervical en la línea media, y se identificó la bifurcación de la carótida izquierda. Una sonda preparada con una sutura de nylon 4-0 con una cabeza revestida con caucho de silicona de un diámetro de 0,3 mm se insertó en la arteria carótida externa ligada y se hizo avanzar en la arteria carótida interna hasta una posición 16-18 mm desde la bifurcación. Durante la cirugía, la temperatura rectal se mantuvo entre 37,5-38° C utilizando una manta calentadora retroalimentada (BWT-100, Bio Research Center Co. Ltd., Tokio, Japón). Se llevó a cabo el análisis del gas en sangre arterial 4 horas después de la oclusión mediante la extracción de la sonda 10 mm.

Trasplante

En el día 7 tras el procedimiento MCAO, se sometieron a anestesia las ratas con inyección intraperitoneal de 50 mg/kg de pentobarbital sódico y se colocaron en un marco estereotáxico. En un experimento preliminar, el área del infarto se produjo en el área lateral desde aproximadamente 3,5 mm lateral a la línea media. Para el trasplante en el parénquima cerebral no necrótico, la suspensión celular, compuesta por 8000-16000 células cultivadas es 3 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4), se inyectó estereotáxicamente en el prosencéfalo izquierdo desde las siguientes 3 localizaciones. +2mm, 0 mm y -2 mm anterior a bregma, y 2 mm lateral a la línea media y a una profundidad de 1,2 mm desde la superficie cortical en cada caso, los números totales de las células trasplantadas fueron de 24000-48000.

Se prepararon tres grupos de animales; el grupo del control, que recibió solo PBS (sin trasplante de células) (n=7) el grupo de las MASC, que experimentó el trasplante de MASC intactas no tratadas (n=10), y el grupo de las NMC,

donde se trasplantaron las MNC (n=10).

Ensayo conductual

5 Se evaluó la gravedad del daño neurológico utilizando los siguientes ensayos: Ensayo de la barra de equilibrio, Ensayo de colocación de las extremidades y Ensayo del laberinto de agua de Morris. El ensayo de la barra de equilibrio y el ensayo de colocación de las patas se llevaron a cabo el día 7 (justo antes del trasplante), 14, 21, 28 y 35 después de MCAO. El ensayo del laberinto de agua de Morris se llevó a cabo desde el día 36 al 40 tras el procedimiento de MCAO.

10

Ensayo de la barra de equilibrio

Se utilizó el ensayo de la barra de equilibrio para evaluar la función vestibulomotora gruesa, y se llevó a cabo generalmente tal como se ha descrito anteriormente en C. Dixon et al., "A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat." J Neurosurg. 1987; 67: 110-9. La puntuación se basó en los siguientes criterios: equilibrio con una postura estacionaria con las patas en la parte superior de la barra: una puntuación de 0; agarrando los lados de la barra y/o movimiento tembloroso. 1; una o más pata(s) resbalándose de la barra de equilibrio. 2: intentando equilibrarse en la barra, pero cayendo, 3; y cayendo de la barra de equilibrio sin intentar equilibrarse o aguantando

20

Ensayo de colocación de las extremidades

El ensayo de colocación de las extremidades examina la integración sensorimotora en las respuestas de colocación de las extremidades, los estímulos visuales, táctiles y propioceptivos, y se llevó a cabo generalmente tal como se ha descrito anteriormente en M. De Ryck y col. "Photochemical Stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats." Stroke, 1989; 20: 1383-1390. Se llevó a cabo también un ensayo de aducción propioceptivo, generalmente de nuevo de acuerdo con los procedimientos esbozados en el artículo de De Ryck y col. Para cada ensayo la puntuación se basó en los siguientes criterios: colocación inmediata y completa de la extremidad: una puntuación de 0; colocación incompleta y/o retrasada (> 2 segundos), incluyendo intercaladas agitando: 1; y sin agitación. 2. Visual, táctil delantera y táctil lateral, se proporcionaron estímulos propioceptivos al prosencéfalo derecho. Los estímulos táctiles delanteros y táctiles laterales y propioceptivos se administraron a la pata trasera derecha. Se llevaron a cabo los ensayos de aducción propioceptivos en las patas delanteras y las patas traseras. La puntuación total varía de 0-18.

35

Ensayo del laberinto de agua de Morris

El ensayo del laberinto de agua de Morris es un método útil para evaluar la función cognitiva. Se han notificado algunas modificaciones de este ensayo. Se utilizó una versión del ensayo notificada de forma general en A. Fukunaga y col., "Differentiation and angiogenesis of central nervous system stem cells implanted with mesenchyme into ischemic rat brain." Cell Transplant. 1999; 8: 435-41. Este ensayo se llevó a cabo desde el día 36 al día 40 tras la MCAO. Se preparó una piscina (diámetro 150 cm, profundidad 35 cm). Se localizó una plataforma de escape (diámetro 10 cm) 1 cm por debajo de la superficie del agua, que se volvió opaca y de color blanco lechoso: se designaron cuatro puntos de partida alrededor del borde de la piscina como N, E, S y O. La plataforma se mantuvo en la parte intermedia de un cuadrante, equidistante del centro y del borde de la piscina. Se liberó una rata en el agua desde cada punto de partida y se dejó que nadara hasta que alcanzó la plataforma, y se registró el tiempo que tardaba en alcanzar la plataforma (máximo de 120 segundos). Se adiestró a las ratas en la tarea utilizando dos conjuntos de cuatro ensayos en cada uno de 5 días consecutivos. Tras el primer conjunto en el quinto día, en vez del segundo conjunto, se llevó a cabo un ensayo de prueba espacial. Este ensayo es para estimar la retención de memoria a corto plazo. Se retiró la plataforma y se dejó a la rata nadar durante 60 segundos y, se midió el número de veces que el animal cruzó el área de ubicación de la plataforma. Se midió también el tiempo pasado en el cuadrante donde se ubicaba la plataforma.

50

Análisis histológico

En el día 41 se sacrificaron las ratas con la administración de una sobredosis de pentobarbital, y se perfundieron transcardinalmente con solución salina al 0,9% seguida por una solución de fijación de periodato-lisina-paraformaldehído tal como se describe de forma general en I. McLean y col., "Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy." J Histochem Cytochem. 1974; 22: 1077-83. El cerebro se cortó en bloques coronales de 2 mm de grosor utilizando Brain Matrix (BAS Inc. Warwickshire, Reino Unido). Se realizaron secciones de cryostat de 10 µm de grosor a partir de cada bloque. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para evaluar el área infartada. Las imágenes de las secciones se capturaron utilizando una lente de objetivo 1 X con un microscopio óptico y se trazaron las áreas de la lesión utilizando Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD). Se calculó el volumen del infarto de forma general tal como se describe en R. Swanson y col., "A semiautomated method for measuring brain infarct volume." J Cereb Blood Flow Metab. 1990; 10: 290-29, y se expresó como un porcentaje del volumen del hemisferio contralateral.

65

Para la inmunotinción, se incubaron las secciones con anticuerpos primarios dirigidos contra MAP-2 (1:100, Boehringer Mannheim, Alemania), β -tubulina 3 (1:400, Sigma, Missouri), NF-M (1:200, Boehringer Mannheim, Alemania), Tuj-1 (1:100, BAbCO, CA), o GFAP (1:400, Dako, CA) a 4°C durante la noche. ANTICUERPO DIRIGIDO CONTRA IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, Eugene, OR) (para MAP-2) o anticuerpo dirigido contra IgG de conejo (Molecular Probes, Eugene, OR) (para la β -tubulina 3, NF-M, Tuj-1 y GFAP) se utilizó como anticuerpo secundario. Se usó TOTO-3 para la tinción nuclear. Se inspeccionaron los especímenes utilizando el microscopio de barrido de láser confocal (CLMS) (Radiance 2000, Bio-Rad, Hertfordshire, Reino Unido).

En cada rata, se calculó el número total de células marcadas con GFP en el prosencéfalo completo. Se calculó también de la misma manera el número de células marcadas con GFP.

Análisis estadístico

Los datos de la evaluación conductual y los datos del volumen del infarto se analizaron utilizando medidas no repetidas de ANOVA. Cuando los resultados fueron significativos ($p < 0,05$), se utilizó el procedimiento post hoc de Student-Newman-Keuls a un nivel de significancia del 95%. Los valores se presentan como promedio $\pm$ desviación estándar, a no ser que se indique otra cosa.

Ejemplo 10: Ensayo conductual

Una semana después se llevó a cabo la MCAO, y justo antes del trasplante, algunos déficits neurológicos graves en el lado derecho, y la puntuación promedio de cada ensayo conductual no mostró diferencias significativas entre los tres grupos.

Ensayo de la barra de equilibrio

Entre el día 7 y el día 21, la puntuación promedio no fue estadísticamente diferente entre los tres grupos. En el día 28 y el 35, la puntuación promedio del grupo NMC mostró una mejora significativa, en comparación con el control (día 28, $p = 0,0041$, día 35 $p = 0,0001$) y los grupos de MASC ($p = 0,0471$, $0,0007$ respectivamente). Aunque el grupo de MASC mostró una ligera mejora en comparación con el del control, podrían no detectarse diferencias estadísticamente significativas en el día 28 y el 35 (Fig. 40)

Ensayo de colocación de extremidades

No hubo diferencias significativas entre la puntuación promedio de los tres grupos entre el día 7 y el día 21. En el día 28 y el 35, los grupos de NMC y MASC mostraron una significativa mejora, en comparación con el grupo del control (día 28: $p = 0,0022$ y $0,085$, día 35. $P = 0,0022$ y $0,0211$ respectivamente). Sin embargo, la puntuación promedio no mostró diferencias significativas entre los grupos de NMC y MASC durante el periodo completo (Fig. 41).

Ensayo del laberinto de agua de Morris

En la Fig. 42 se muestra el tiempo de latencia promedio registrado en cada conjunto de cuatro ensayos para localizar la plataforma de escape sumergida, para cada uno de los tres grupos. El grupo de NMC mostró el tiempo de latencia más corto en comparación con el del control y el grupo de MASC. El tiempo de latencia promedio para el segundo conjunto en el día 39 y el primer en el día 40 demostraron diferencias significativas entre los grupos de NMC y del control ($p = 0,00339$ y $0,0492$ respectivamente) (Fig. 42). Aunque el grupo de NMC mostró una tendencia a tardar un tiempo de latencia más corto en la plataforma de escape que el grupo de MASC, no existen diferencias estadísticamente significativas.

En el ensayo de prueba espacial, las ratas en el grupo de NMC mostraron una significativa mejora en comparación con el control ($p = 0,0419$) y el grupo de MASC ($p = 0,0453$) (Fig. 43).

Ejemplo 11: Estudio histológico

El área del infarto se localizó en la mitad lateral del hemisferio izquierdo incluyendo la corteza, el cuerpo estriado y el hipocampo, y se observó la formación quistes y cicatrices en la mayoría de cerebros lesionados. El hipocampo del lado de la lesión fue atrófico y mostró una disposición parcialmente irregular o pérdida de neuronas en comparación con el lado contralateral. Los volúmenes del infarto se midieron en todos los modelos de MCAO. El volumen del infarto promedio en los grupos de NMC, MASC y el control en el día 33 fueron de $50,7 \pm 10,9\%$, $51,0 \pm 10,2\%$ y $50,9 \pm 11,1\%$ respectivamente. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos.

Las MASC y las NMC trasplantadas, marcadas con GFP se localizaron principalmente en el límite del área entre el tejido intacto y el área del infarto que incluye la corteza ipsilateral, el cuerpo calloso, el cuerpo estriado y el hipocampo. Se observó infiltración de las células inflamatorias en el foco del infarto. No parece existir diferencia en el número de células inflamatorias que las infiltradas y no en el lugar del punto del infarto entre los grupos de MNC y MASC.

Un gran número de MNC marcadas con GFP fueron inmunopositivas para MAP-2 y mostraron desarrollo de neuritas en el cerebro del hospedador. Fueron también inmunopositivas para Tuj-1 y la β -tubulina 3. En el hipocampo ipsilateral, muchos cuerpos celulares y neuritas de las MNC marcadas con GFP mostraron también ser positivas para NF-M. Una gran fracción de MNC trasplantadas marcadas con GFP fueron positivas para MAP-2 ($84 \pm 8,1\%$), mientras que solo un pequeño número de células fueron positivas para GFAP ($1,0 \pm 0,2\%$).

En contraste, la gran mayoría de MASC en el cerebro hospedador fueron negativas para ambos marcadores neuronal (MAP-2, Tuj1, β -tubulina 3 y NF-M) y glial (GFAP). Los porcentajes de células positivas para MAP-2 y GFAP entre las células marcadas con GFP fueron de $1,4 \pm 0,2\%$ y $4,8 \pm 1,0\%$, respectivamente. No podía encontrarse la formación de neuritas en las MASC positivas para MAP-2.

El número promedio de MNC y MASC en el prosencéfalo del hospedador fueron de 13250 ± 1126 y 5850 ± 997 . Aproximadamente, se detectaron un 30-45% de MNC trasplantadas y, por otra parte, se detectaron un 10-20% de MASC trasplantadas un mes después del trasplante. La relación de supervivencia de las MNC en el cerebro isquémico fue sustancialmente mayor que las MASC. En el hipocampo, el número promedio de las MNC fue de 790 ± 160 , y un 89% de las mismas fueron positivas para MAP-2. El número promedio de MASC, en contraste, fue de 470 ± 66 y un 0,6% fueron positivas para MAP-2, mostrando que la mayoría de las MASC trasplantadas fueron negativas para ambos marcadores, neuronal y glial.

En todos los grupos, no se observó formación de tumor en el parénquima del cerebro hasta 41 días después de MCAO.

Bibliografía:

Aihara N, Mizukawa K, Koie K, Mabe H, Nishino H. Striatum grafts in infarct striatopallidum increase GABA release, recognize GABA_A receptor and improve water maze learning in the rat. *Brain Res.* 1994;33:483-488.

Altumbabic M, Peeling J, Del Bigio MR. Intracerebral hemorrhage in the rat: effects of hematoma aspiration. *Stroke.* 1998;29:1917-22.

Azizi, S. A. , Stokes, D. , Augelli, B. J. , DiGirolamo, C. , Prockop, D. J. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998;95:3908-13.

Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke.* 1986;17:472-6.

Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci.* 2000; 3:537-44.

Borlongan CV, Cahill DW, Sanberg PR. Locomotor and passive avoidance deficits following occlusion of the middle cerebral artery. *Physiol Behav.* 1995, 58:909-17.

Borlongan CV, Fujisaki T, Watanabe S. Chronic cyclosporine-A injection in rats with damaged blood-brain barrier does not impair retention of passive avoidance. *Neurosci Res.* 1998, 32:195-200.

Borlongan CV, Hida H, Nishino H. Early assessment of motor dysfunctions aids in successful occlusion of the middle cerebral artery. *Neuroreport.* 1998; 9:3615-21.

Borlongan CV, Tajima Y, Trojanowski JQ, Lee VM, Sanberg PR Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinoma-derived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats. *Exp Neurol.* 1998; 149:310-21.

Borlongan CV, Yamamoto M, Takei N, Kumazaki M, Ungsuparkorn C, Hida H, Sanberg PR, Nishino H. Glial cell survival is enhanced during melatonin-induced neuroprotection against cerebral ischemia. *FASEB J.* 2000;14: 1307-17

Brundin P, Widner H, Nilsson OG, Strecker RE, Bjorklund A. Intracerebral xenografts of dopamine neurons: the role of immunosuppression and the blood-brain barrier. *Exp Brain Res.* 1989;75:195-207.

Butcher SP, Henshall DC, Teramura Y, Iwasaki K, Sharkey J. Neuroprotective actions of FK506 in experimental stroke: in vivo evidence against an antiexcitotoxic mechanism. *J Neurosci.* 1997;17:6939-46.

Butovas S, Lukkarinen J, Virtanen T, Jolkkonen J, Sivenius J. Differential effect of the α 2-adrenoceptor antagonist, atipamezole, in limb-placing task and skilled forepaw use following experimental stroke. *Restor Neurol Neurosci.* 2001;18:143-51.

- Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, Chopp M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci.* 2000;189:49-57.
- 5 Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, Sanchez-Ramos J, Chopp M. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke.* 2001 Nov;32(11) :2682-8
- Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 2001;32:1005-11.
- 10 Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol.* 2002;1:92-100.
- Chu, K, Manho Kim, Kyung-Il Park, Sang-Wuk Jeong, Hee-Kwon Park, Keun-Hwa Jung, Soon-Tae Lee, Lami Kang, Kyungmi Lee, Dong-Kyu Park, Seung U. Kim y Jae-Kyu Roh . Human neural stem cells improve sensorimotor deficits in the adult rat brain with experimental focal ischemia. *Brain Research,* 2004 1016:145-153
- 15 Cicchetti F, Fodor W, Deacon TW, van Home C, Rollins S, Burton W, Costantini LC, Isacson O. Immune parameters relevant to neural xenograft survival in the primate brain. *Xenotransplantation* 2003;10:41-9
- Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci.* 2001;14:1771-6.
- 20 Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, Tajima N, Yamada H, Sawada H, Ishikawa H, Mimura T, Kitada M, Suzuki Y, Ide C. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest.* 2004;113:1701-10.
- 25 De Ryck M, Van Reempts J, Borgers M, Wauquier A, Janssen PAJ. Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats, *Stroke,* 1989;20:1383-1390.
- 30 Ding Y, Li J, Luan X, Ding YH, Lai Q, Rafols JA, Phillis JW, Clark JC, Diaz FG. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin. *Neuroscience.* 2004;124(3) :583-91.
- Dixon CE, Lyeth BG, Povlishock JT, Findling RL, Hamm RJ, Marmarou A, Young HF, Hayes RL. A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurosurg.* 1987;67:110-9.
- 35 Fahr A. Cyclosporin clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 1993 Jun;24(6) :472-95.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998;279:1528-30.
- 40 Fukuda S, del Zoppo, GJ. Models of focal cerebral ischemia in the nonhuman primate. *ILAR J.* 2003;44(2) : 96-104.
- Fukunaga A, Uchida K, Hara K, Kuroshima Y, Kawase T. Differentiation and angiogenesis of central nervous system stem cells implanted with mesenchyme into ischemic rat brain. *Cell Transplant.* 1999;8:435-41.
- 45 Furuichi, Y. Masashi Maeda, Akira Moriguchi, Taiji Sawamoto, Akio Kawamura, Nobuya Matsuoka, Seitaro Mutoh, y Takehiko Yanagihara. Tacrolimus, a Potential Neuroprotective Agent, Ameliorates Ischemic Brain Damage and Neurologic Deficits After Focal Cerebral Ischemia in Nonhuman Primates. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 23:1183-1194, 2003
- 50 Gharbawie OA, Gonzalez CL, Whishaw IQ. Skilled reaching impairments from the lateral frontal cortex component of middle cerebral artery stroke: a qualitative and quantitative comparison to focal motor cortex lesions in rats. *Behav Brain Res.* 2005;156:125-37.
- 55 Gonzalez CL, Kolb B. A comparison of different models of stroke on behaviour and brain morphology. *Eur J Neurosci.* 2000;18:1950-62.
- Goto S, Yamada K, Yoshikawa M, Okamura A, Ushio Y. GABA receptor agonist promotes reformation of the striatonigral pathway by transplant derived from fetal striatal promordia in the lesioned striatum. *Exp Neurol.* 1997;147:503-509.
- 60 Grabowski M, Johansson BB, Brundin P. Survival of fetal neocortical grafts implanted in brain infarcts of adult rats: the influence of postlesion time and age of donor tissue. *Exp Neurol.* 1994;127:126-36.
- 65 Green R, Odergren T, Ashwood T. Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents? *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:402-8.

- Hartings JA, Williams AJ, Tortella FC. Occurrence of nonconvulsive seizures, periodic epileptiform discharges, and intermittent rhythmic delta activity in rat focal ischemia. *Exp Neurol*. 2003;179:139-49.
- 5 Huang, J MD; J. Mocco, MD; Tanvir F. Choudhri, MD; Alexander Poisik, MD;Sulli J. Popilskis, DVM; Ronald Emerson, MD; Robert L. DelaPaz, MD; Alexander G. Khandji, MD;David J. Pinsky, MD; E. Sander Connolly, Jr, MD. A Modified Transorbital Baboon Model of Reperfused StrokeStroke. 2000;31:3054-63.
- 10 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blanckstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*.2002;418:41-49.
- Kaminska, B, Gaweda-Walerych, K, Zawadzka, M. Molecular mechanisms of neuroprotective action of immunosuppressants-facts and hypotheses. *J Cell Mol Med*. 2004;8:45-58.
- 15 Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G, Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke*. 1986;8:1-8.
- 20 Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa A. Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation*. 2001;68:235-44.
- Kondziolka D, Wechsler L, Achim C. Neural transplantation for stroke. *J Clin Neurosci*. 2002;9:225-30. Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, Meltzer C, Thulborn KR, Gebel J, Jannetta P, DeCesare S, Elder EM, McGrogan M, Reitman MA, Bynum L. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology*. 2000;55:565-9.
- 25 Lemaire M, Pardridge WM, Chaudhuri G. Influence of blood components on the tissue uptake indices of cyclosporin in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;24:740-3.
- 30 Li Y, Chopp M, Chen J, Wang L, Gautam S C, Xu Y X, y Zhang Z. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000; 20:1311-19.
- 35 Lindner MD, Gribkoff VK, Donlan NA, Jones TA. Long-lasting functional disabilities in middle-aged rats with small cerebral infarcts. *J Neurosci*. 2003; 23:10913-22.
- Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med*. 2004;10 Suppl:S42-50.
- 40 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20:84-91.
- 45 Mack, WJ, Ricardo J. Komotar, J Mocco, Alexander L. Coon, Daniel J. Hoh, Ryan G. King, Andrew F. Ducruet, Evan R. Ransom, Marcello Oppermann, Robert DeLaPaz y E. Sander Connolly Jr. Serial magnetic resonance imaging in experimental primate stroke: Validation of IMR for preclinical cerebroprotective trials. *Neurological Research*, 2003; 25:846-852.
- 50 Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999;103:697-705.
- 55 Markgraf CG, Green EJ, Watson B, McCabe PM, Schneiderman N, Dietrich WD, Ginsberg MD. Recovery of sensorimotor function after distal middle cerebral artery photothrombotic occlusion in rats. *Stroke*. 1994; 25:153-9.
- Marshall JW, Ridley RM. Assessment of cognitive and motor deficits in a marmoset model of stroke. *ILAR J*. 2003;44:153-60.
- 60 Matsumoto S, Isshiki A, Watanabe Y, Wieloch T. Restricted clinical efficacy of cyclosporin A on rat transient middle cerebral artery occlusion. *Life Sci*. 2002;72:591-600.
- McLean I W, Nakane P K. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem*. 1974;22:1077-83.
- 65 Modo, M, R. Paul Stroemer, PhD; Ellen Tang, BSc; Sara Patel, PhD; Helen Hodges, PhD. Effects of Implantation Site of Stem Cell Grafts on Behavioral Recovery From Stroke Damage. *Stroke*. 2002; 33:2270-2278.

- Modo, M, R.P. Stroemer, E. Tang, T. Veizovic, P. Sowniski, H. Hodges. Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *Journal of Neuroscience Methods* 2000; 194:99-109.
- 5 Morris R G M. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv.* 1981;12:239-260.
Nikkhah G, Rosenthal C, Hedrich HJ, Samii M. Differences in acquisition and full performance in skilled forelimb use as measured by the 'staircase ensayo' in five rat strains. *Behav Brain Res.* 1998;92:85-95
- 10 Nishino H y Borlongan CV. Restoration of function by neural transplantation in the ischemic brain. *Prog Brain Res.* 2000;127:461-76.
- Nudo RJ, Larson D, Plautz EJ, Friel KM, Barbay S, Frost SB. A squirrel monkey model of poststroke motor recovery. *ILAR J.* 2003;44:161-74.
- 15 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001;410:701-5.
- Pakzaban P, Isacson O. Neural xenotransplantation: reconstruction of neuronal circuitry across species barriers. *Neuroscience.* 1994;62:989-1001.
- 20 Pedersen EB, Zimmer J, Finsen B. Triple immunosuppression protects murine intracerebral, hippocampal xenografts in adult rat hosts: effects on cellular infiltration, major histocompatibility complex antigen induction and blood-brain barrier leakage. *Neuroscience.* 1997;78:685-701.
- 25 Plautz, EJ, Barbay, S, Frost, SB, Friel, KM, Dancause, N, Zoubina, EV, Stowe, AM, Quaney, BM y RJ Nudo. Post-infarct cortical plasticity and behavioral recovery using concurrent cortical stimulation and rehabilitative training: A feasibility study in primates. *Neurological Research*, 2003, 25:801-810
- 30 Roitberg, B. Transplantation for stroke. *Neurol Res.* 2004;26:256-64.
- Roitberg, B., Khan, N., Tuccar, E., Kompoliti, K., Chu, Y, Alperin, N., Kordower, JH, y ME Emborg. Chronic ischemic stroke model in cynomolgous monkeys: Behavioral, neuroimaging and anatomical study. *Neurological Research*, 2003, 25:68-78.
- 35 Roof RL, Schielke GP, Ren X, Hall ED. A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. *Stroke.* 2001; 32:2648-57.
- Sanchez-Ramos, JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res.* 2002;69:880-893.
- 40 Sorensen JC, Grabowski M, Zimmer J, Johansson BB. Fetal neocortical tissue blocks implanted in brain infarcts of adult rats interconnect with the host brain. *Exp Neurol.* 1996;138:227-35.
- 45 Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR). Recommendations for Standards Regarding Preclinical Neuroprotective and Restorative Drug Development. *Stroke.* 1999;30:2752-2758.
- Sullivan PG, Rabchevsky AG, Hicks RR, Gibson TR, Fletcher-Turner A, Scheff SW. Dose-response curve and optimal dosing regimen of cyclosporin A after traumatic brain injury in rats. *Neuroscience.* 2000;101:289-9
- 50 Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharo FR. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1990;10:290-293
- Szentirmai O, Carter BS. Neurosurgery. Genetic and cellular therapies for cerebral infarction. 2004;55:283-6.
Takamatsu, H, Hideo Tsukada, Akihiro Noda, Takeharu Kakiuchi, Shingo Nishiyama, Shintaro Nishimura, y Kazuo Umemura. FK506 Attenuates Early Ischemic Neuronal Death in a Monkey Model of Stroke. *J Nucl Med* 2001; 42:1833-1840
- 55 Toda H, Takahashi J, Iwakami N, Kimura T, Hoki S, Mozumi-Kitamura K, Ono S, Hashimoto N. Grafting neural stem cells improved the impaired spatial recognition in ischemic rats. *Neurosci Lett.* 2001 Dec 4;316(1) :9-12
- 60 Umezawa A, Maruyama T, Segawa K, Shaddock R K, Waheed A, Hata J. Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis in vivo. *J Cell Physiol.* 1992;151:197-205.
- 65 Vachon P, Beaudry F, Marier JF, Ste-Marie L, Montgomery J. Cyclosporin A in blood and brain tissue following intra-carotid injections in normal and stroke-induced rats. *Brain Res.* 2002;943:1-8.

Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J. y Black, I.B. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61: 364-370.

5 Zhang K y Terrence J. Sejnowski. A universal scaling law between gray matter and white matter of cerebral cortex. *PNAS*, 2000, 10: 5621-5626

Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, Chopp M. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2001;105(1) :33-41.

10 Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*. 2002; 174:11-20.

REIVINDICACIONES

1. Células precursoras neuronales para su uso en el tratamiento de una lesión del sistema nervioso central, donde las células precursoras neuronales se obtienen por transdiferenciación de citoblastos adherentes de médula en células precursoras neuronales transfectando los citoblastos adherentes de médula con un vector que contiene las secuencias que codifican el dominio intracelular Notch, y donde la lesión del sistema nervioso central está producida por ictus isquémico o ictus hemorrágico.
2. Células precursoras neuronales de acuerdo con la reivindicación 1 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde las células precursoras neuronales comprenden células precursoras neuronales humanas.
3. Células precursoras neuronales de acuerdo con la reivindicación 1 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde las células precursoras neuronales son alogénicas con respecto a un paciente.
4. Una unidad formadora de injerto para su uso en el tratamiento de una lesión del sistema nervioso central que comprende:
 - células precursoras neuronales de acuerdo con la reivindicación 1; y
 - un vehículo farmacéuticamente aceptabledonde la lesión del sistema nervioso central está producida por ictus isquémico o ictus hemorrágico.
5. La unidad formadora de injerto de acuerdo con la reivindicación 4 para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un disolvente, un medio de dispersión, un agente antibacteriano, o un agente antifúngico.
6. La unidad formadora de injerto de acuerdo con la reivindicación 4 para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde el injerto comprende células precursoras neuronales en una cantidad que varía entre 10.000 y 100 millones de células precursoras neuronales.
7. La unidad formadora de injerto de acuerdo con la reivindicación 4 para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde las células precursoras neuronales comprenden una marca.
8. la unidad formadora de injerto de acuerdo con la reivindicación 4 para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde las células precursoras neuronales comprenden células precursoras neuronales humanas.
9. Células neuronales derivadas de citoblastos adherentes de médula (MNC) para su uso en el tratamiento de una lesión del sistema nervioso central que está producida por un ictus isquémico o un ictus hemorrágico; donde las MNC se obtienen
 - (i) proporcionando citoblastos adherentes de médula;
 - (i) transdiferenciando los citoblastos adherentes de médula en células precursoras neuronales transfectando los citoblastos adherentes de médula con un vector que contiene las secuencias que codifican el dominio intracelular Notch; y
 - (iii) induciendo las células precursoras neuronales para formar células neuronales cultivando las células en presencia de 5 μ M de forskolina (FSK), 10 ng/ml de factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), y 10 ng/ml de factor neurotrófico ciliar (CNTF).
10. Las células neuronales derivadas de citoblastos adherentes de médula de acuerdo con la reivindicación 9 para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, donde las células neuronales derivadas de citoblastos adherentes de médula comprenden células neuronales derivadas de citoblastos adherentes de médula.
11. Las células neuronales derivadas de citoblastos adherentes de médula de acuerdo con la reivindicación 9 para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, donde las células neuronales derivadas de citoblastos adherentes de médula son alogénicas con respecto a un paciente.
12. Una unidad formadora de injerto para su uso en el tratamiento de una lesión del sistema nervioso central que comprende:
 - las células neuronales derivadas de citoblastos adherentes de médula de acuerdo con la reivindicación 9; y
 - un vehículo farmacéuticamente aceptable,donde la lesión del sistema nervioso central está producida por ictus isquémico o ictus hemorrágico.
13. La unidad formadora de injerto de acuerdo con la reivindicación 12 para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un disolvente, un medio de dispersión, un agente

antibacteriano, o un agente antifúngico.

- 5 14. La unidad formadora de injerto de acuerdo con la reivindicación 12 para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde las células neuronales derivadas de citoblastos adherentes de médula en una cantidad que varía entre 10.000 y 100 millones de células neuronales derivadas de citoblastos adherentes de médula.
15. La unidad formadora de injerto de acuerdo con la reivindicación 12 para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde las células neuronales derivadas de citoblasto adherente de médula comprenden una marca.
- 10 16. La unidad formadora de injerto de acuerdo con la reivindicación 12 para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde las células neuronales derivadas de citoblastos adherentes de médula comprenden células neuronales derivadas de citoblastos adherentes de médula.

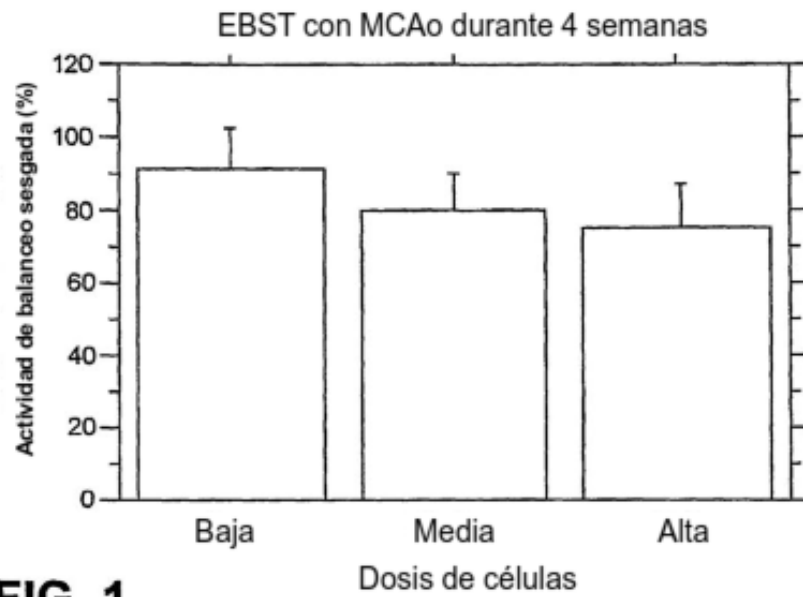


FIG. 1

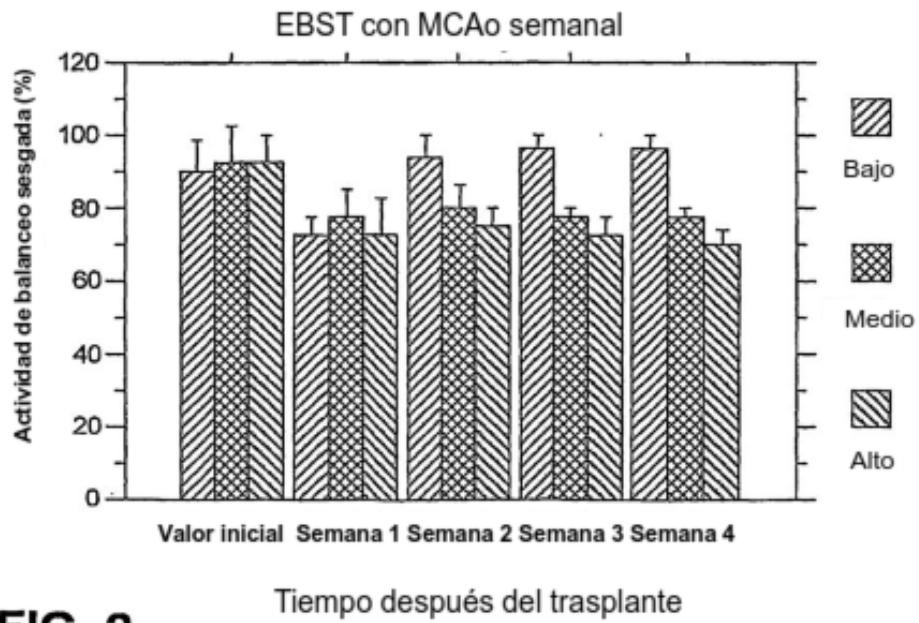


FIG. 2

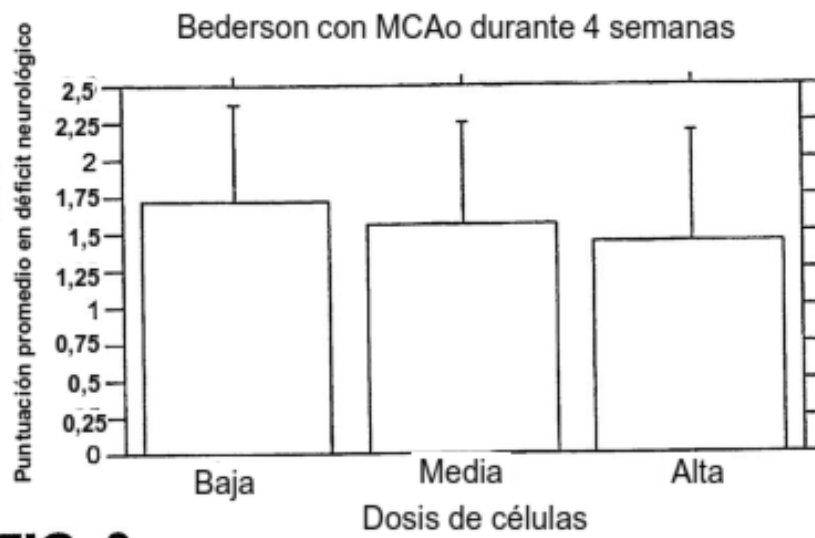


FIG. 3

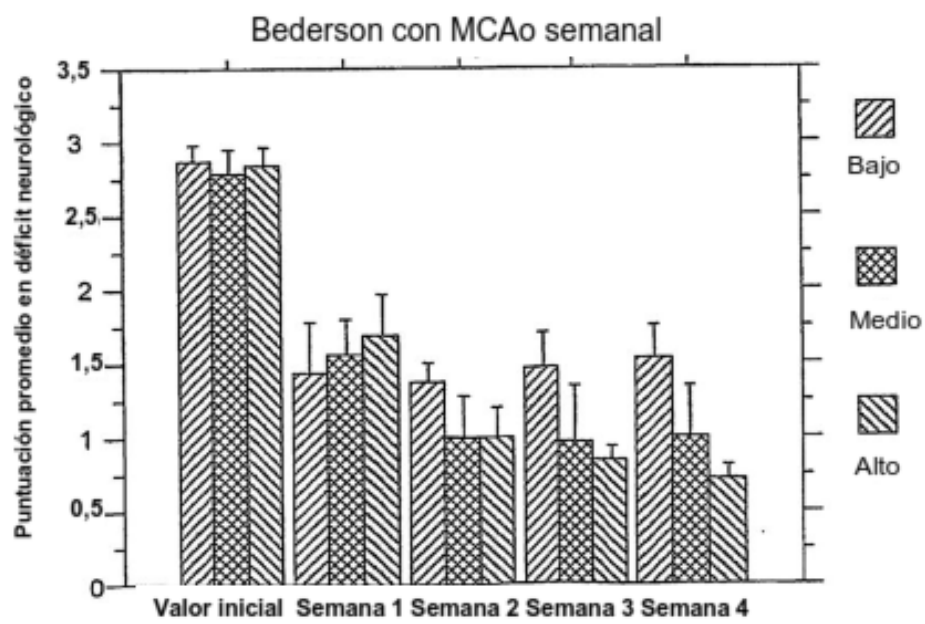


FIG. 4

Tiempo después del trasplante

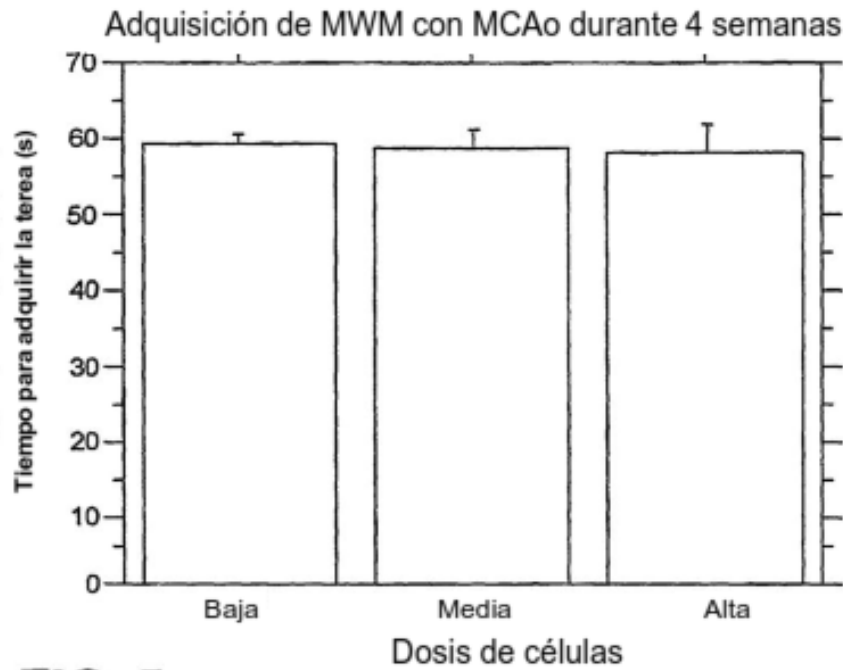


FIG. 5

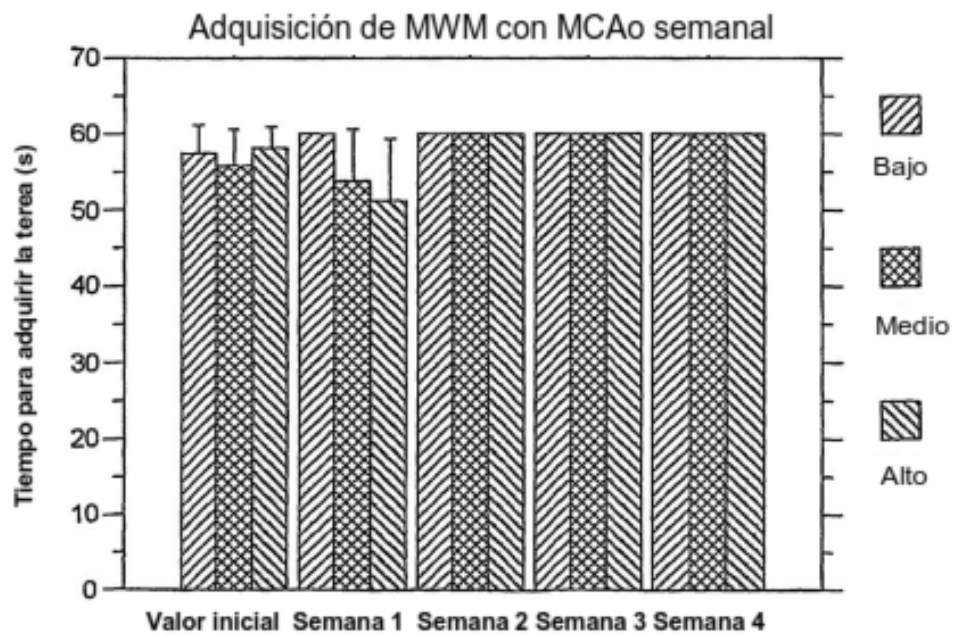


FIG. 6 ~ Tiempo después del trasplante

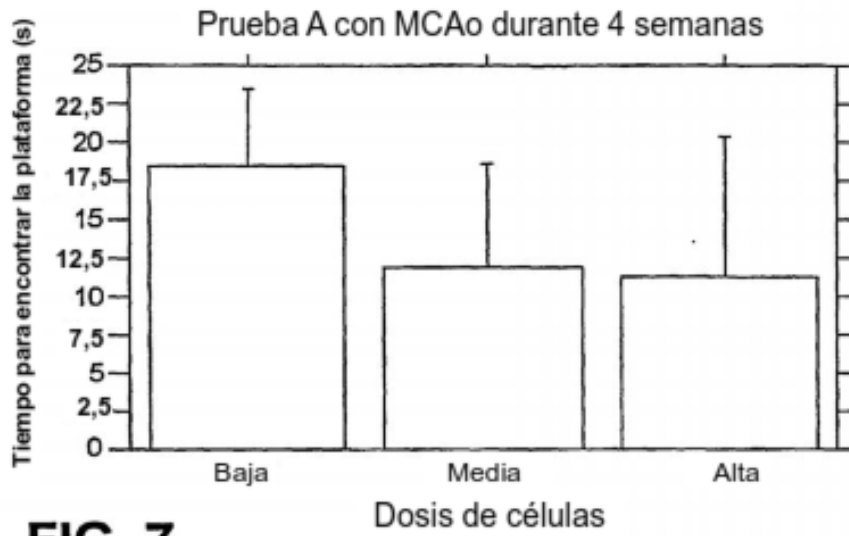


FIG. 7

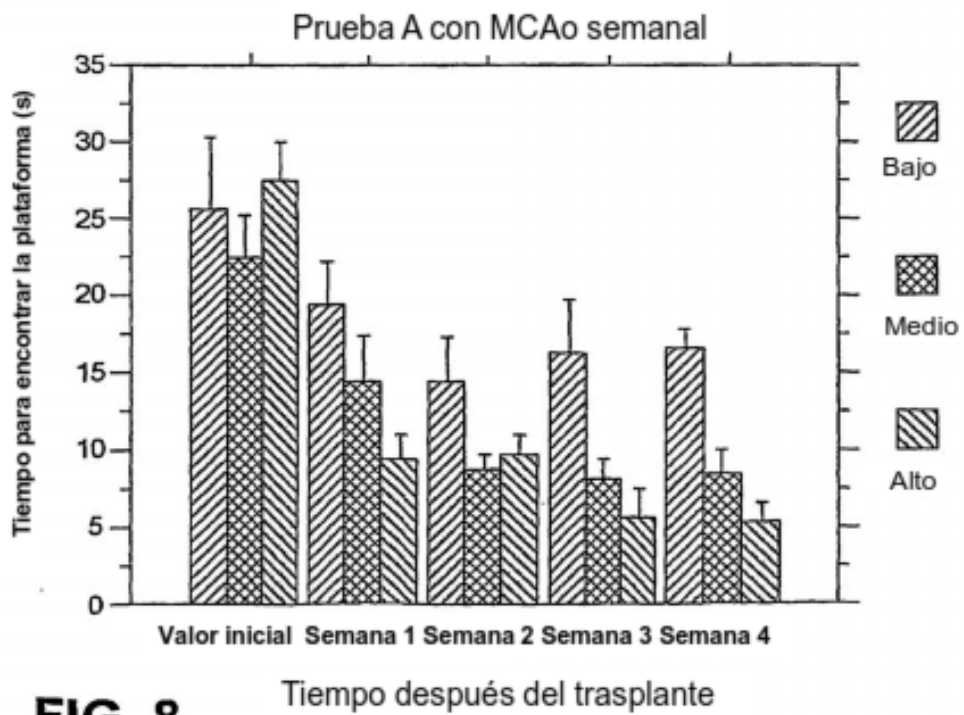


FIG. 8

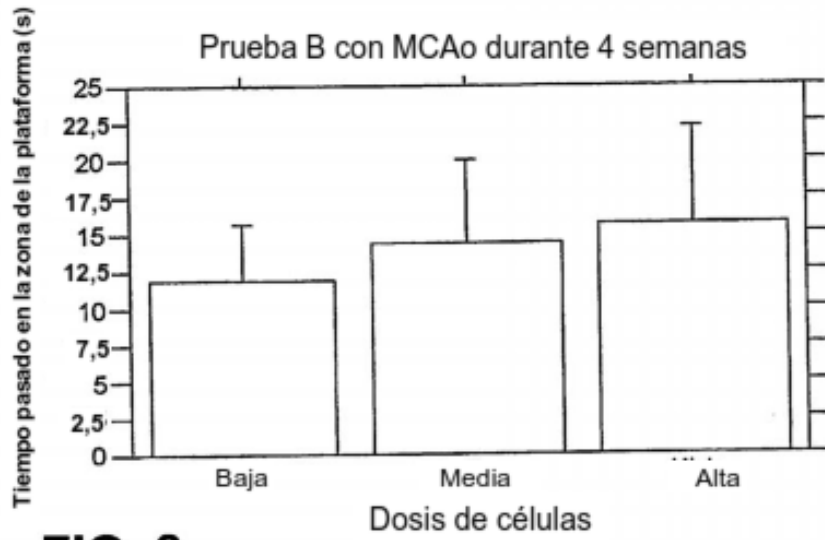


FIG. 9

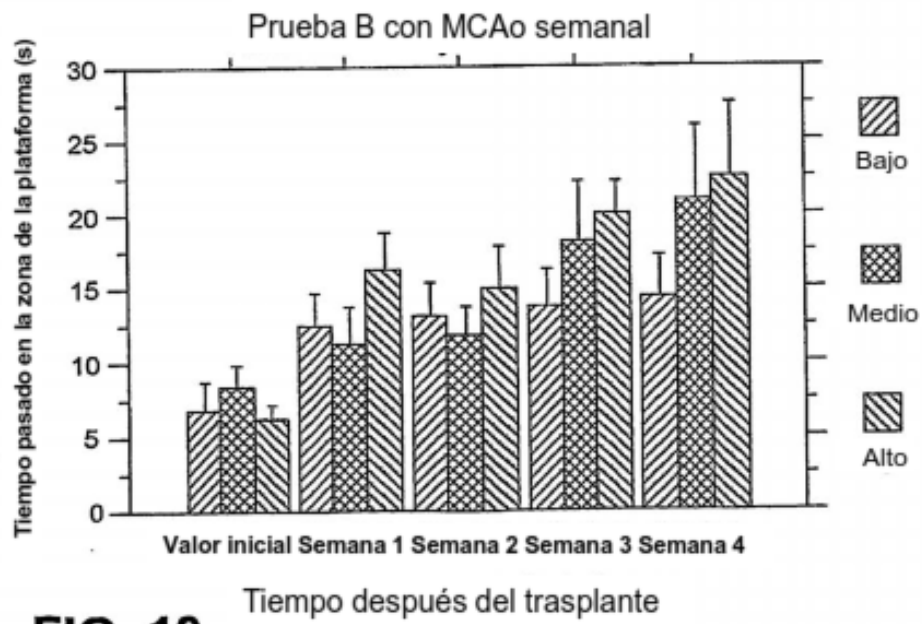


FIG. 10

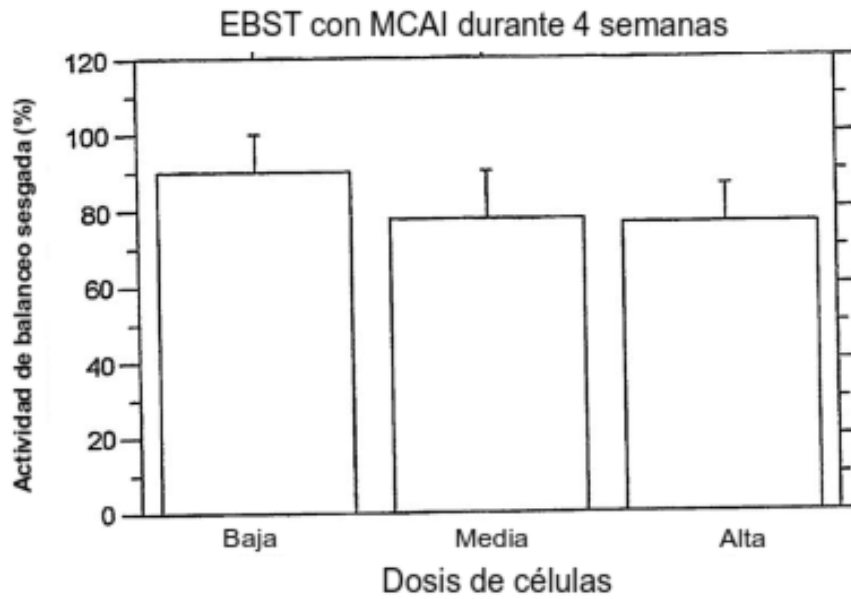


FIG. 11

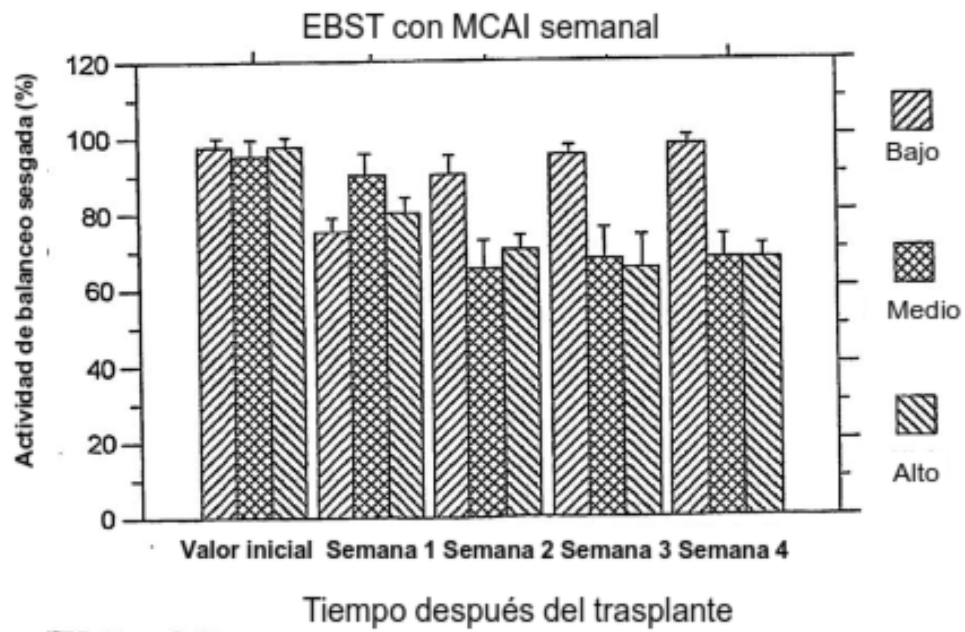


FIG. 12

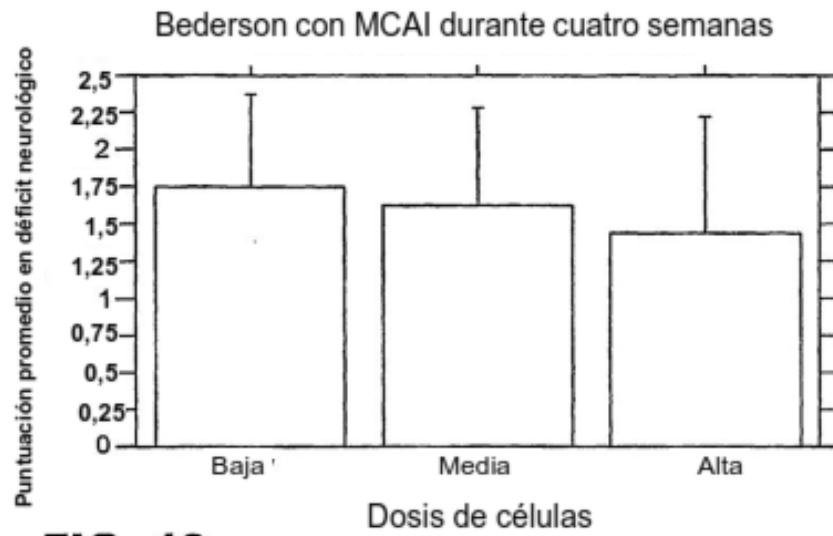


FIG. 13

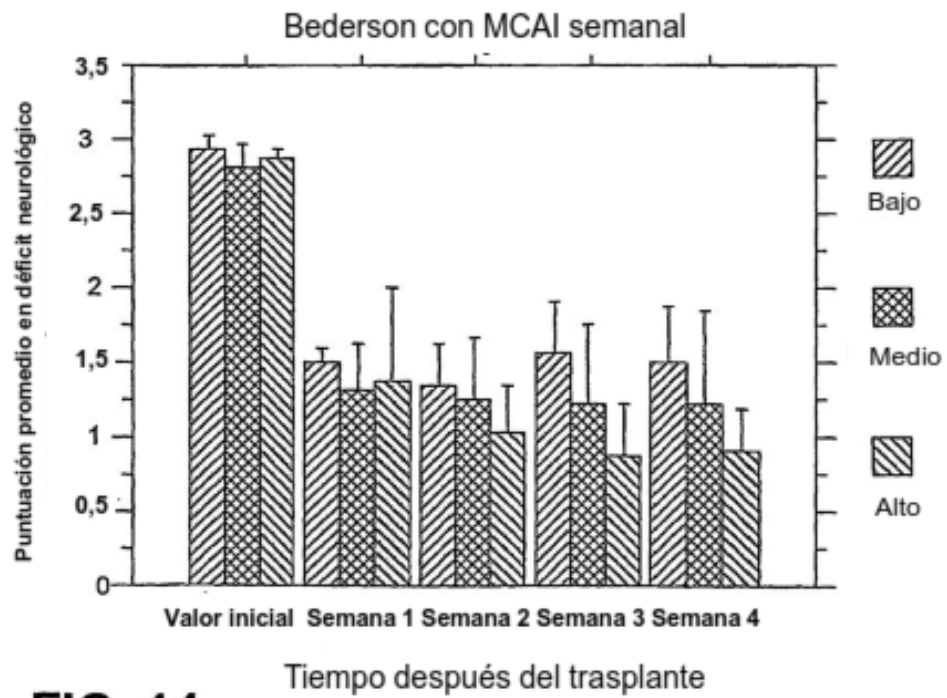


FIG. 14

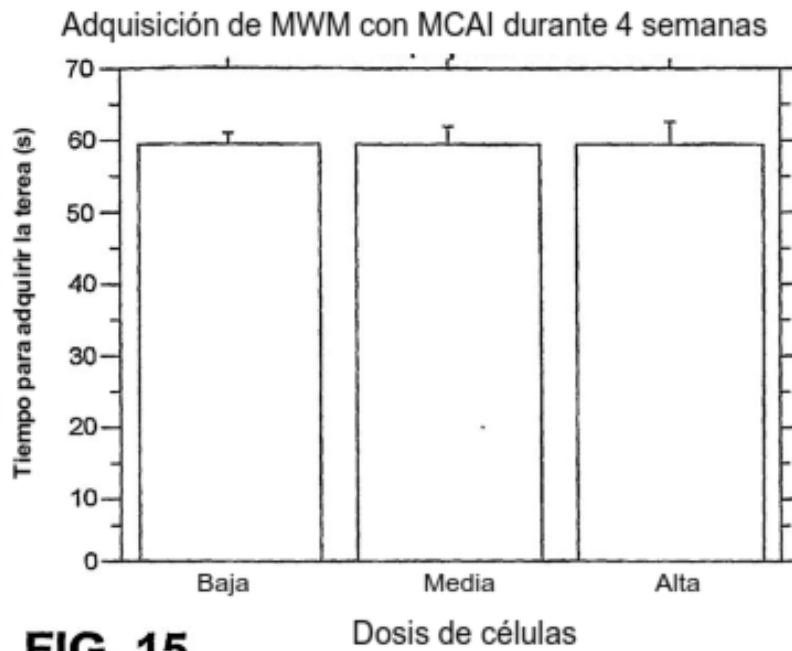


FIG. 15

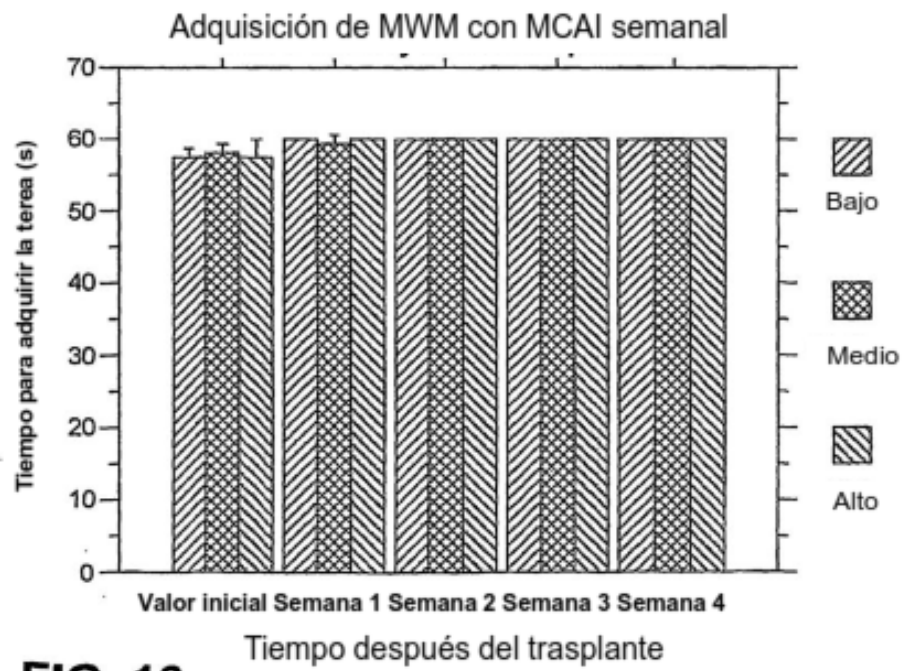


FIG. 16

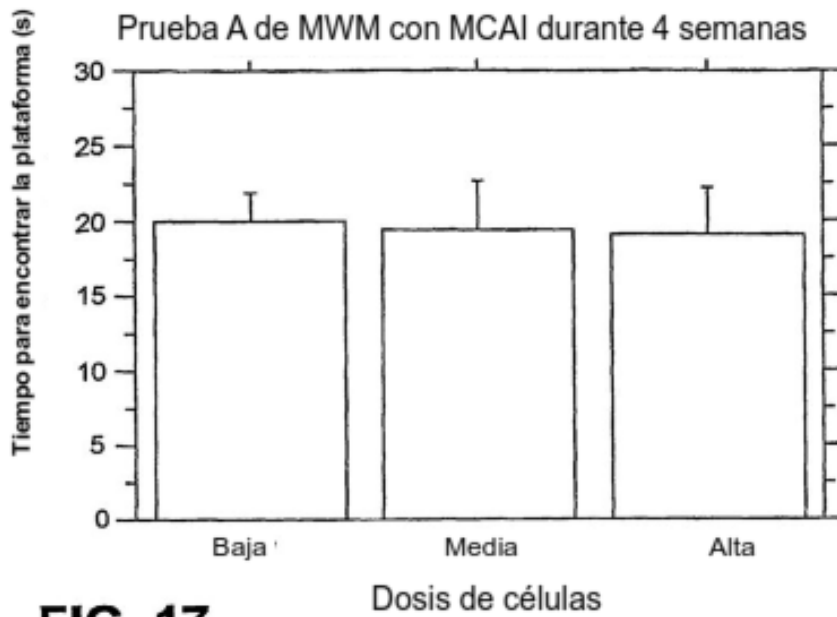


FIG. 17

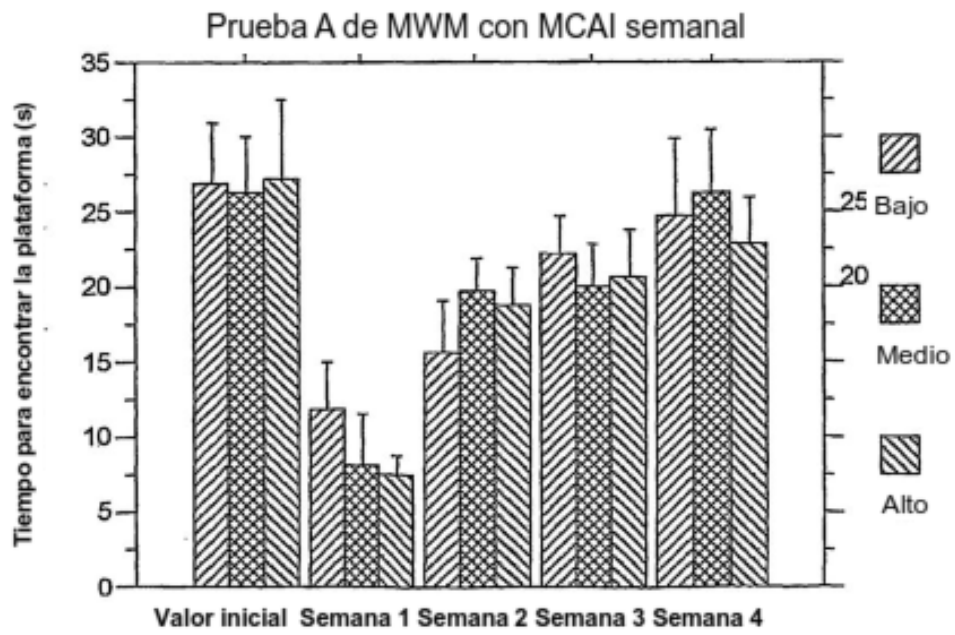


FIG. 18

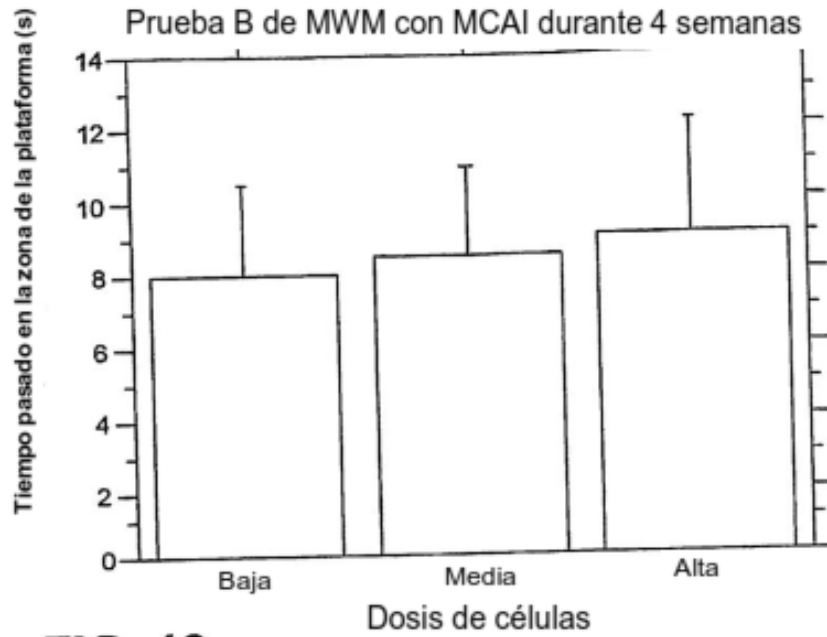


FIG. 19

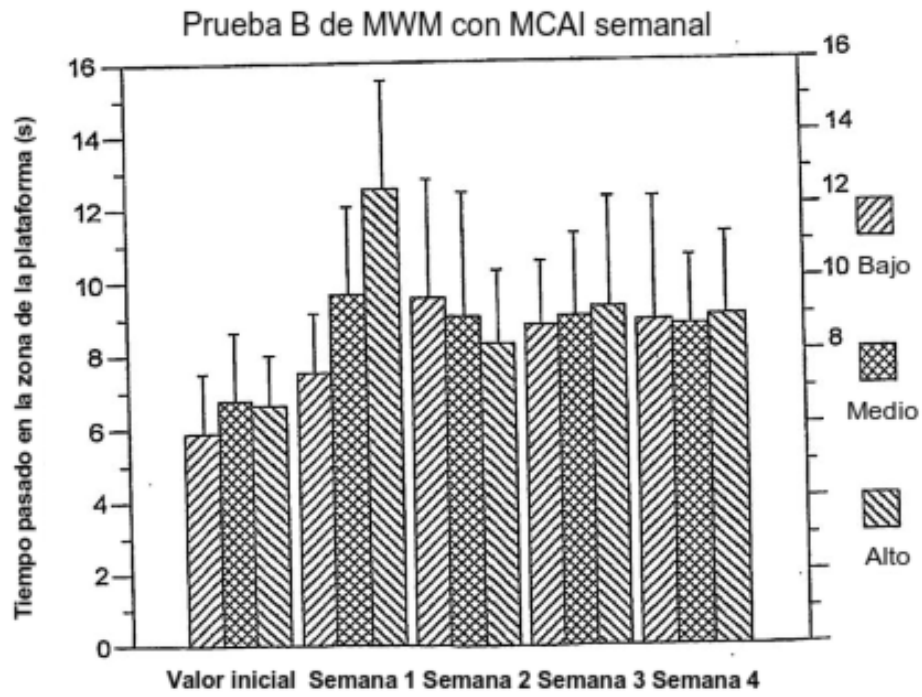


FIG. 20

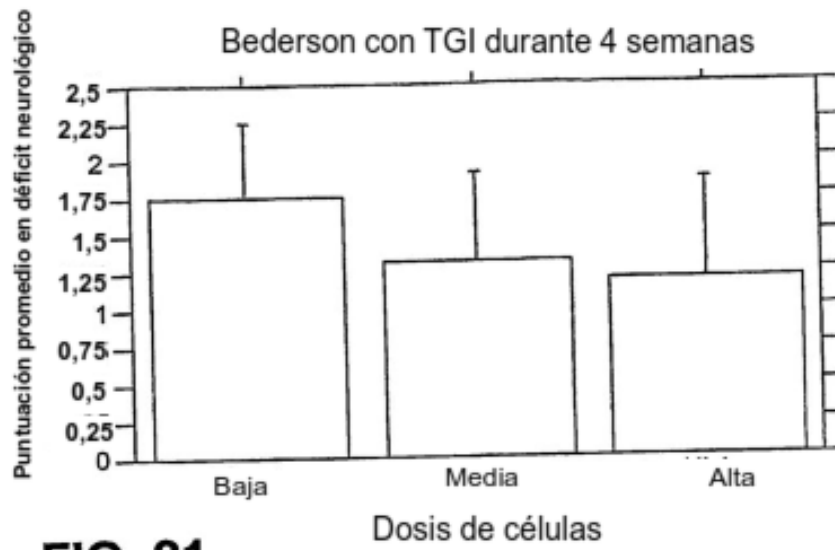


FIG. 21

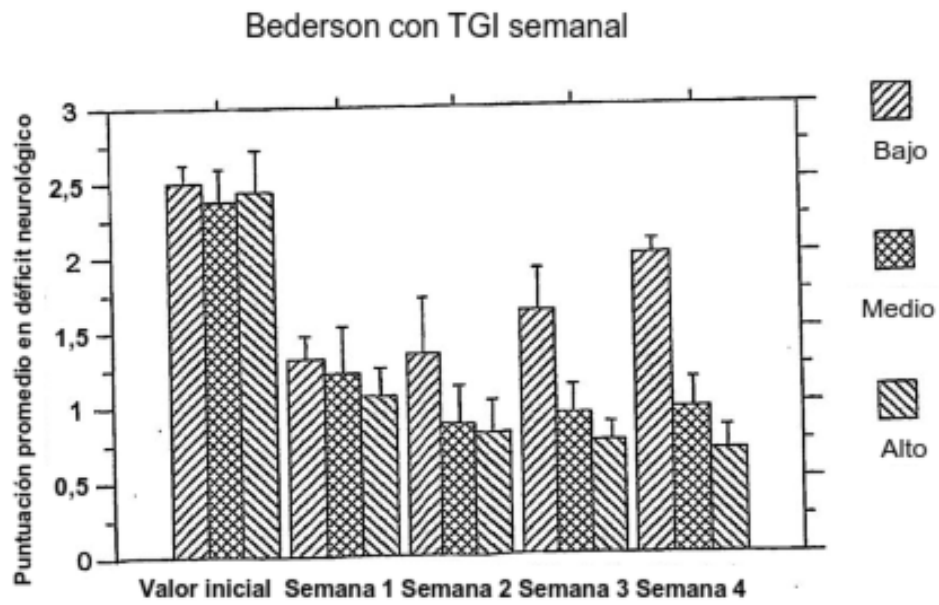


FIG. 22 Tiempo después del trasplante

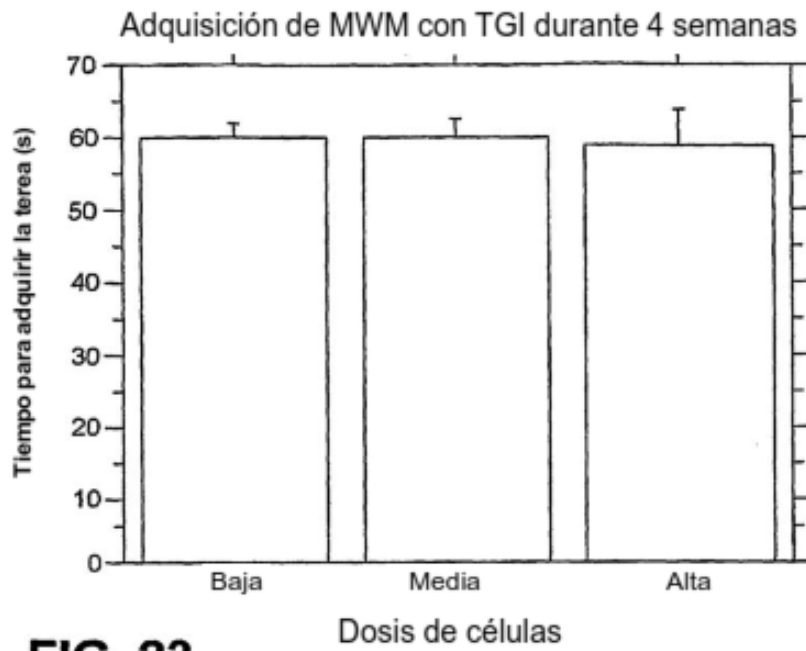


FIG. 23

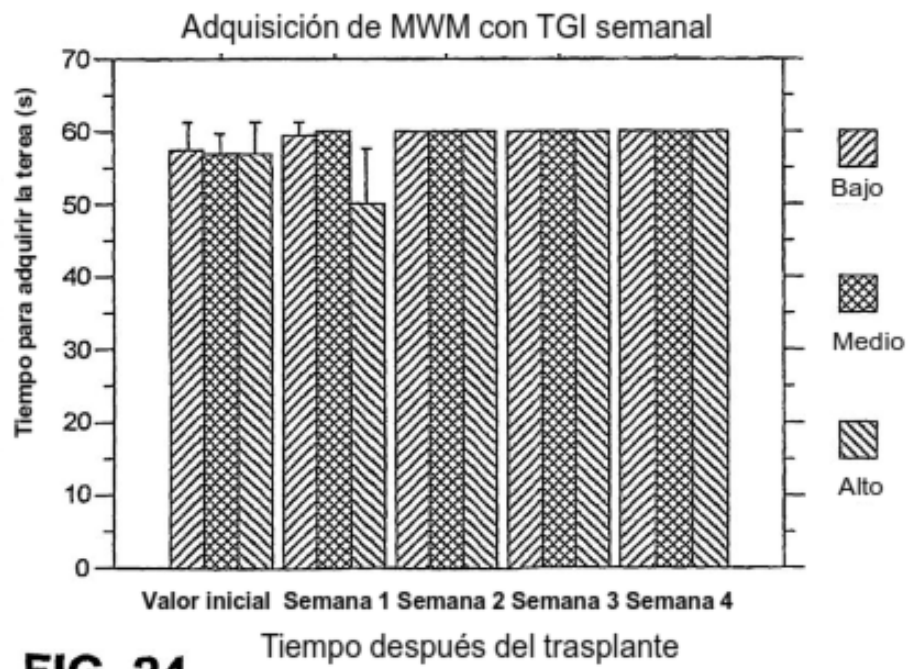


FIG. 24

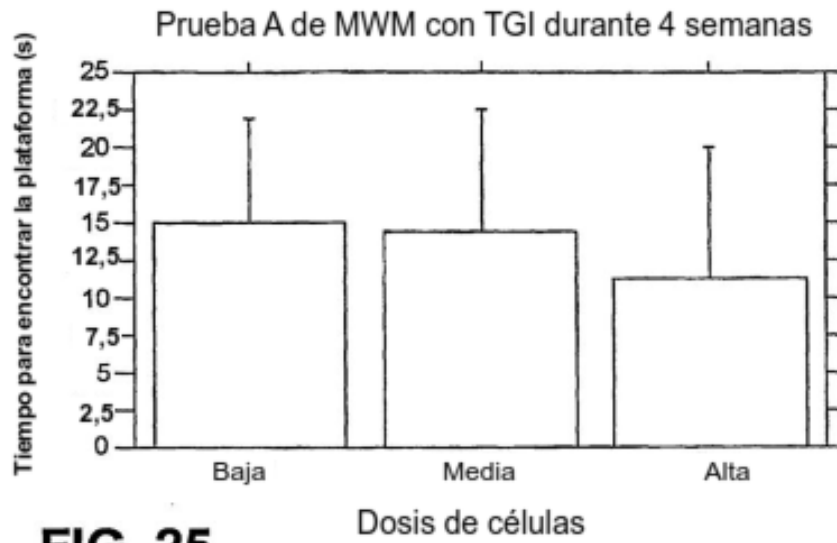


FIG. 25

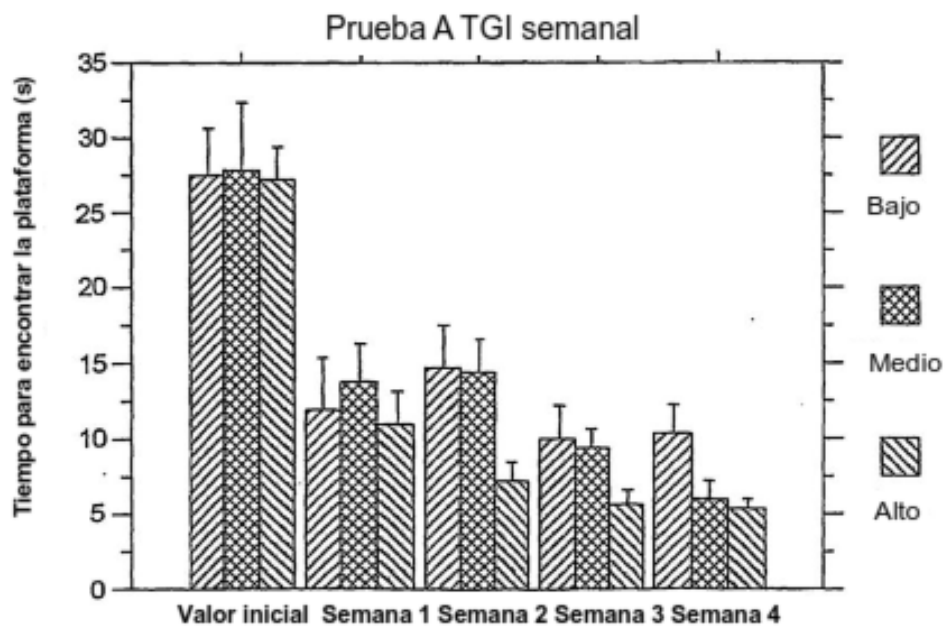


FIG. 26

Tiempo después del trasplante

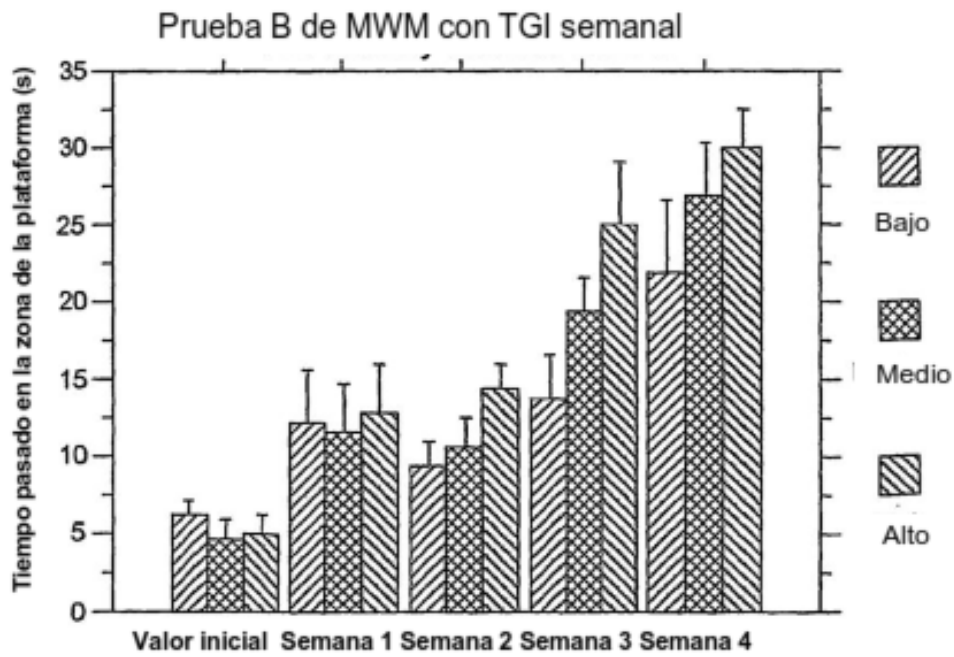
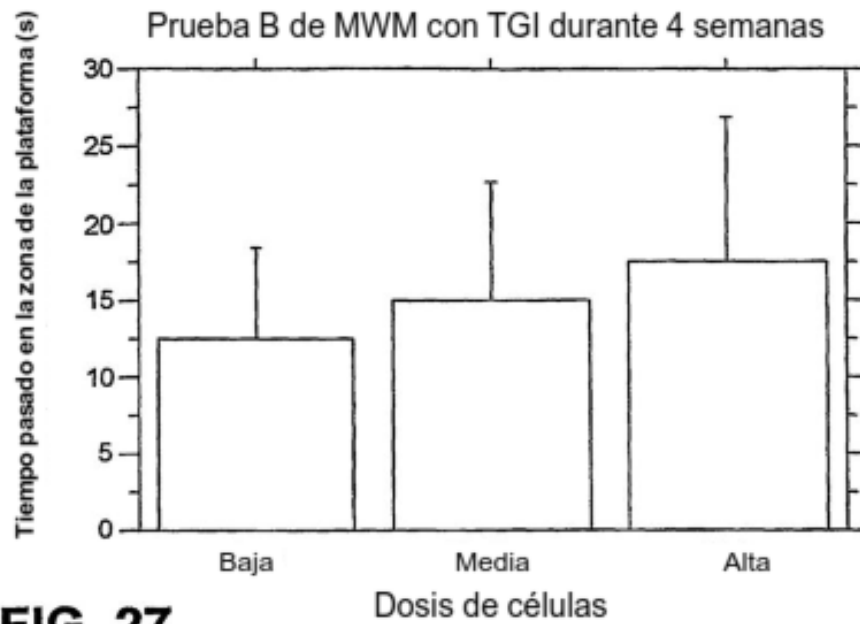
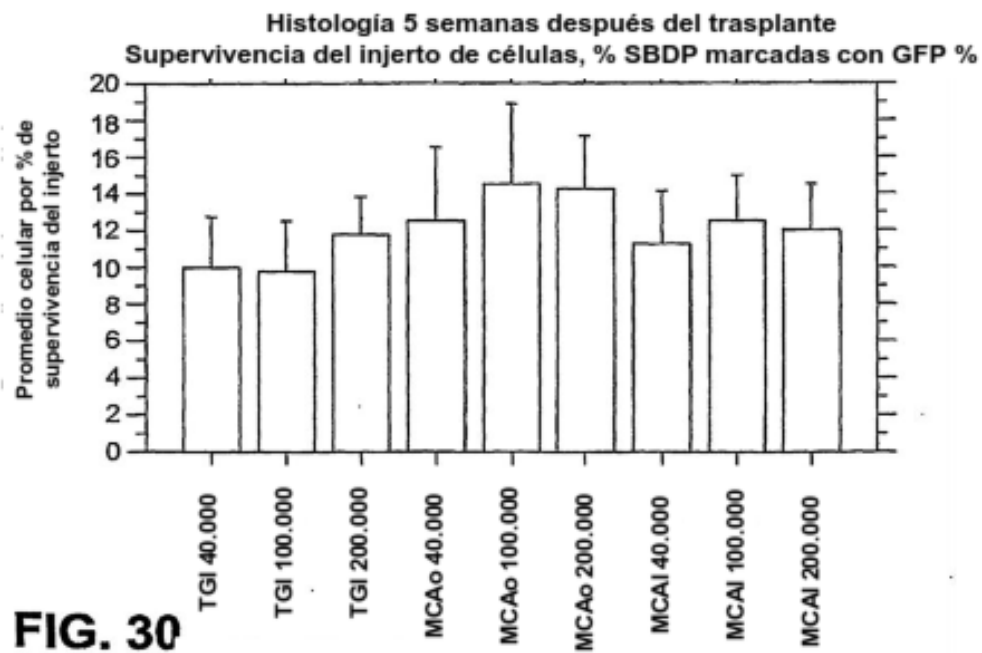
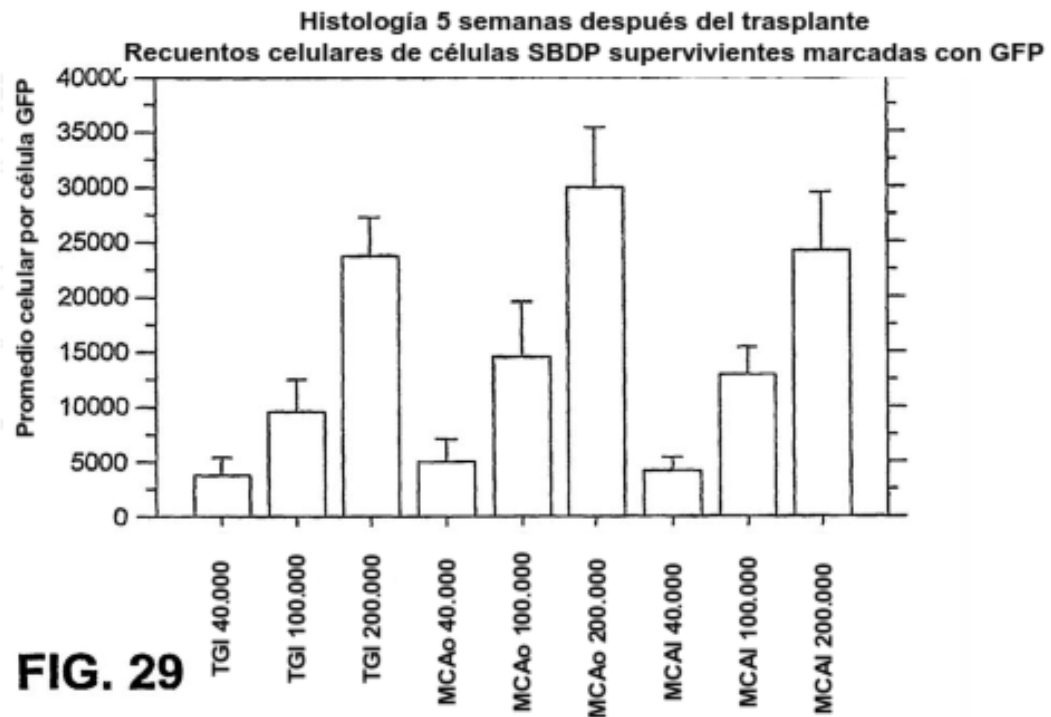


FIG. 28



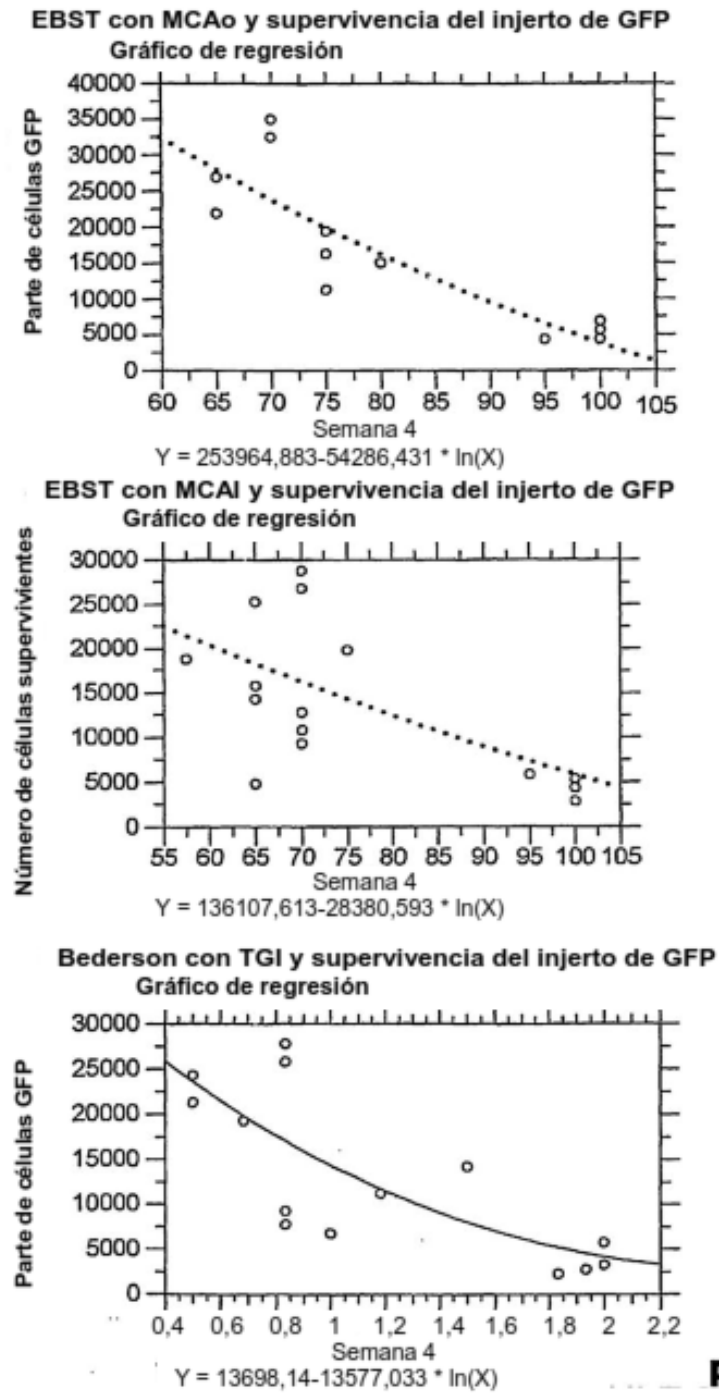


FIG. 31

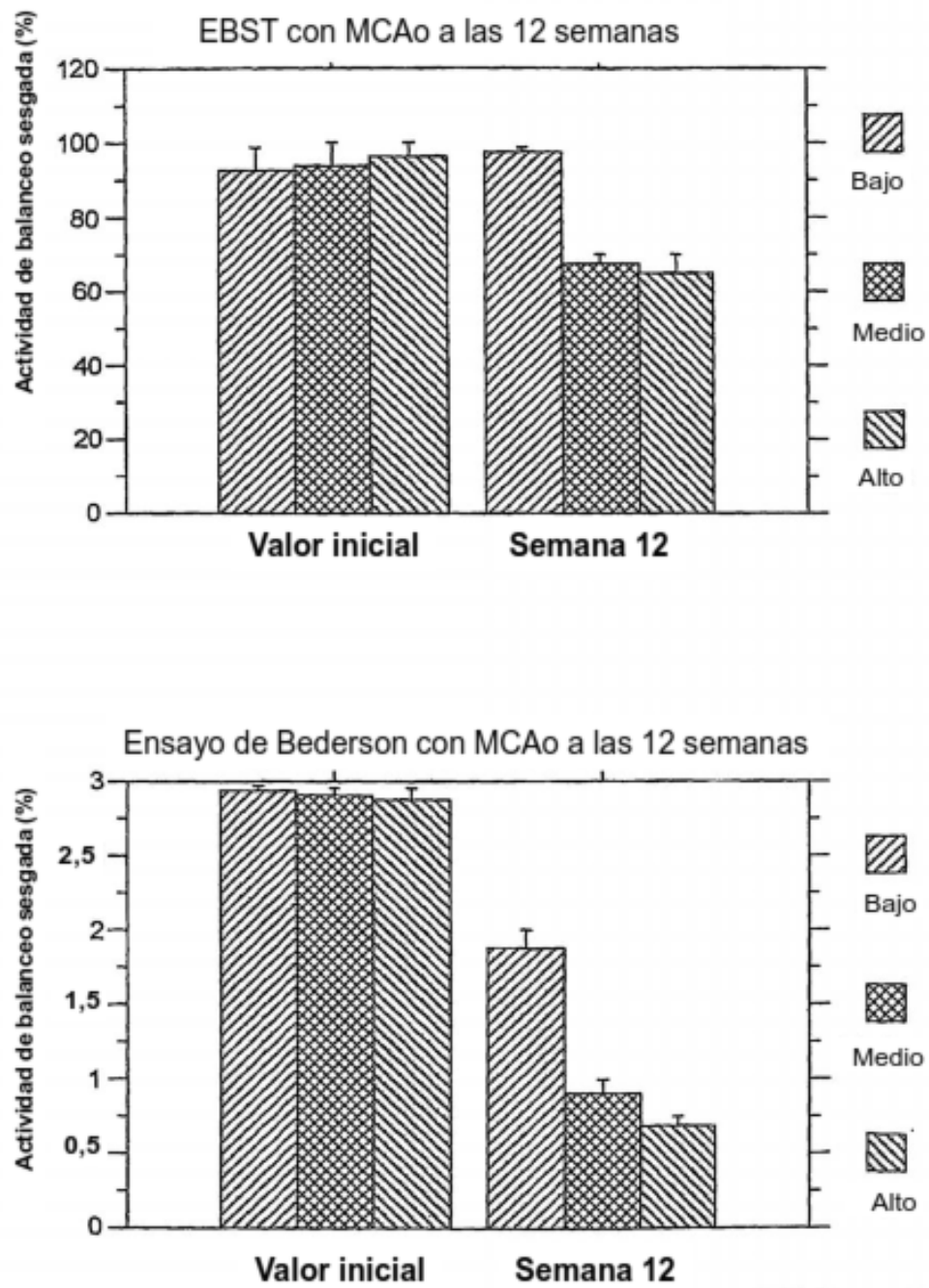


FIG. 32

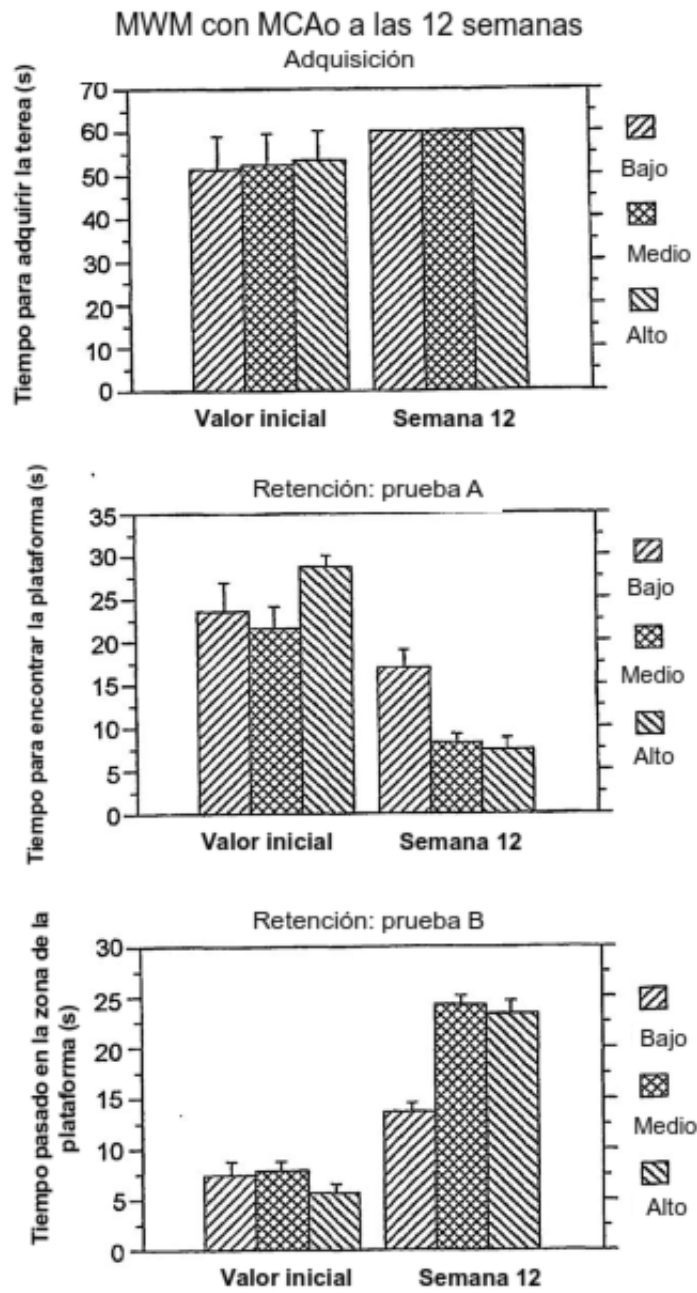


FIG. 33

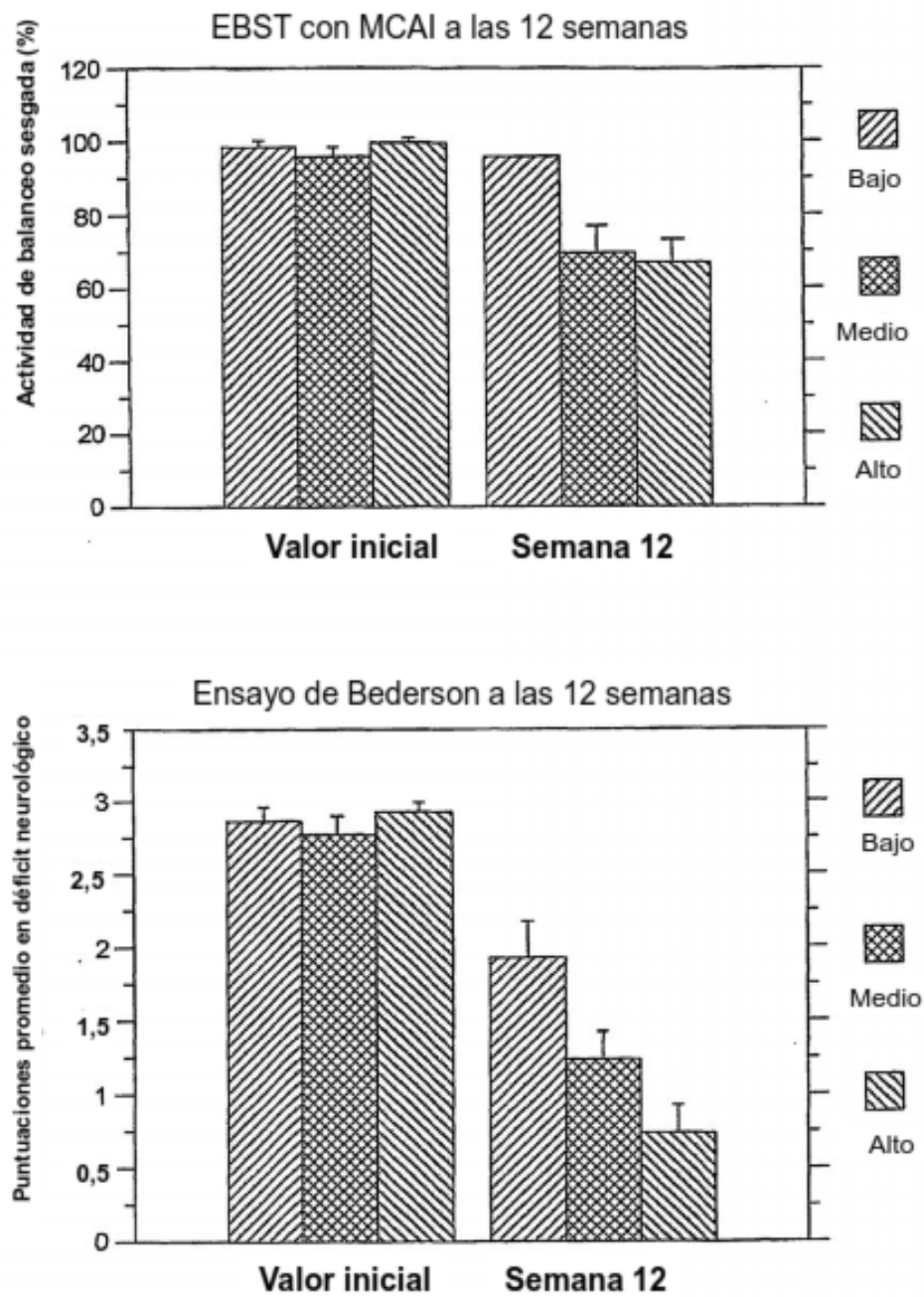


FIG. 34

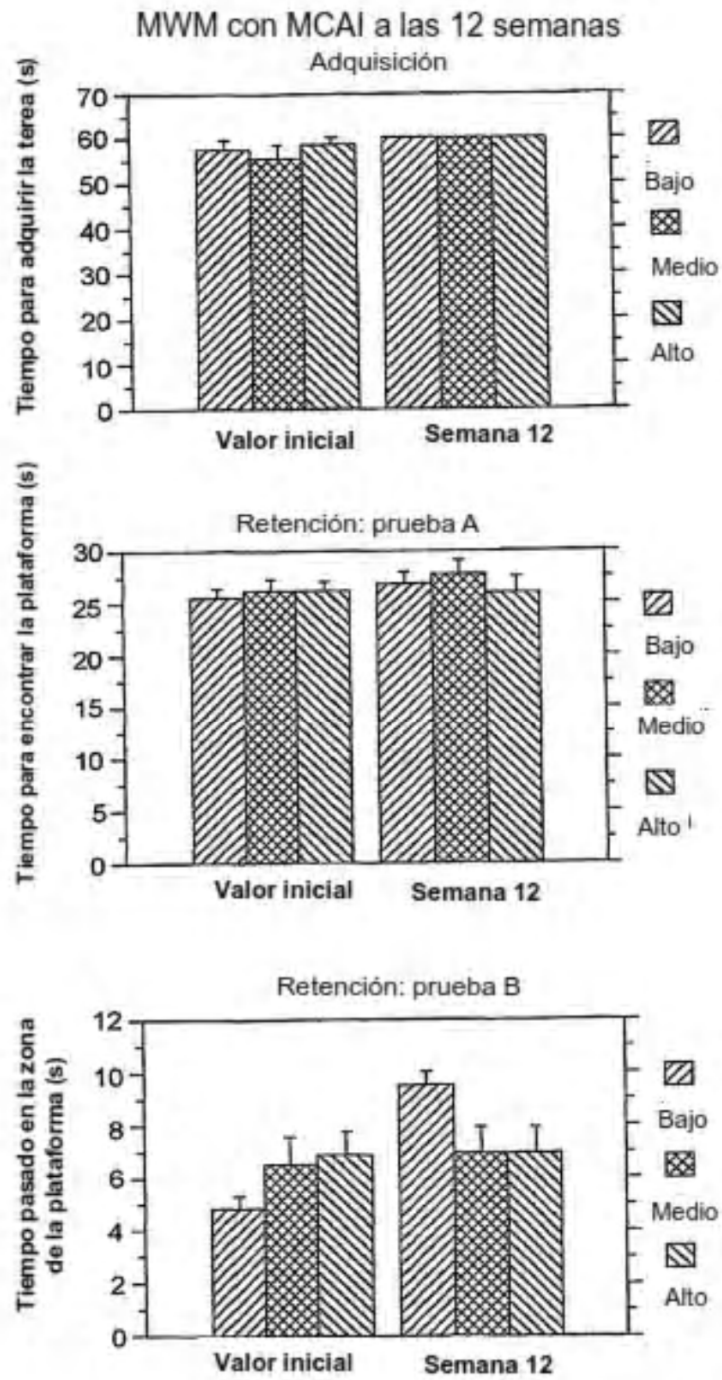


FIG.35

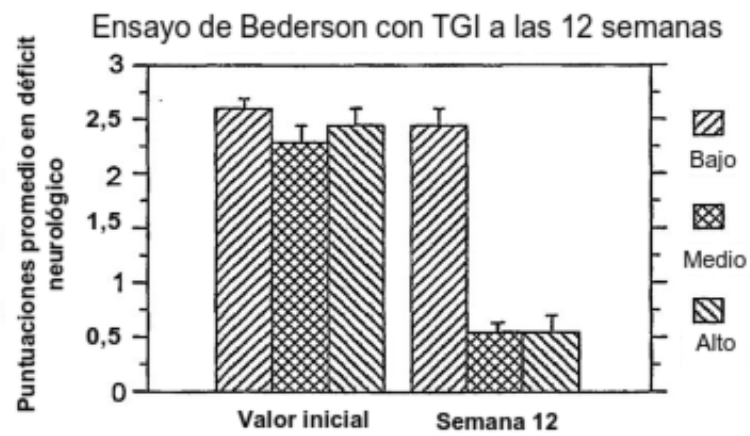


FIG. 36

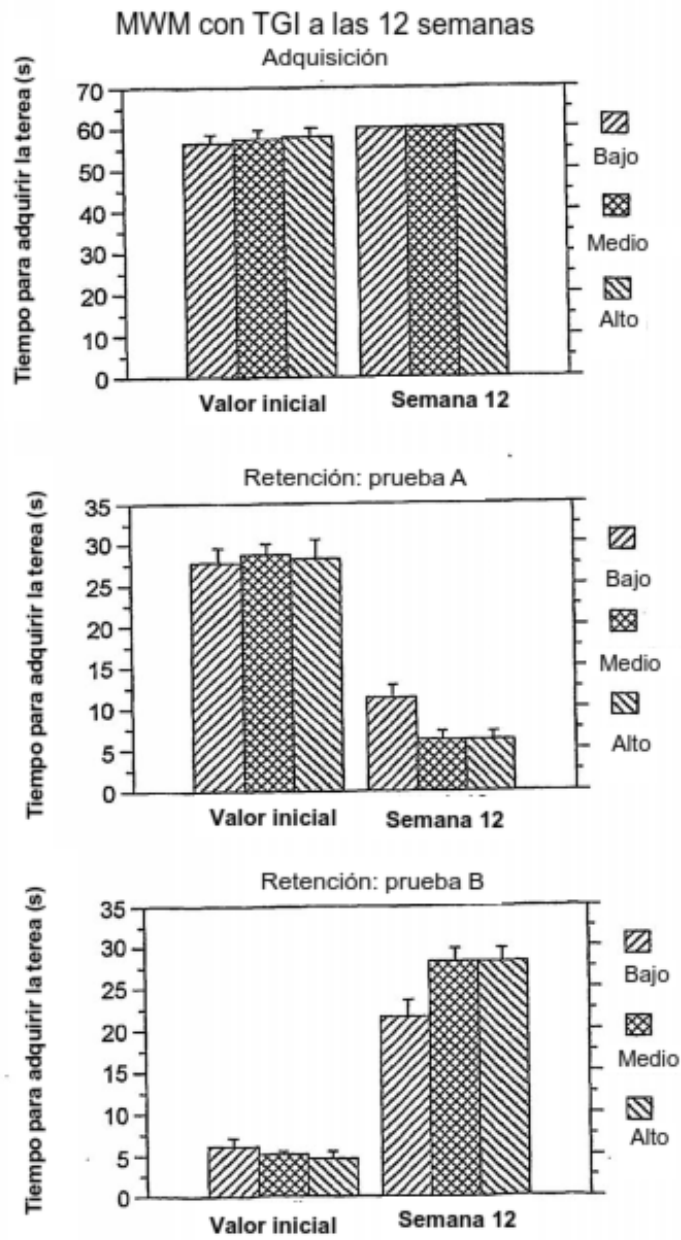
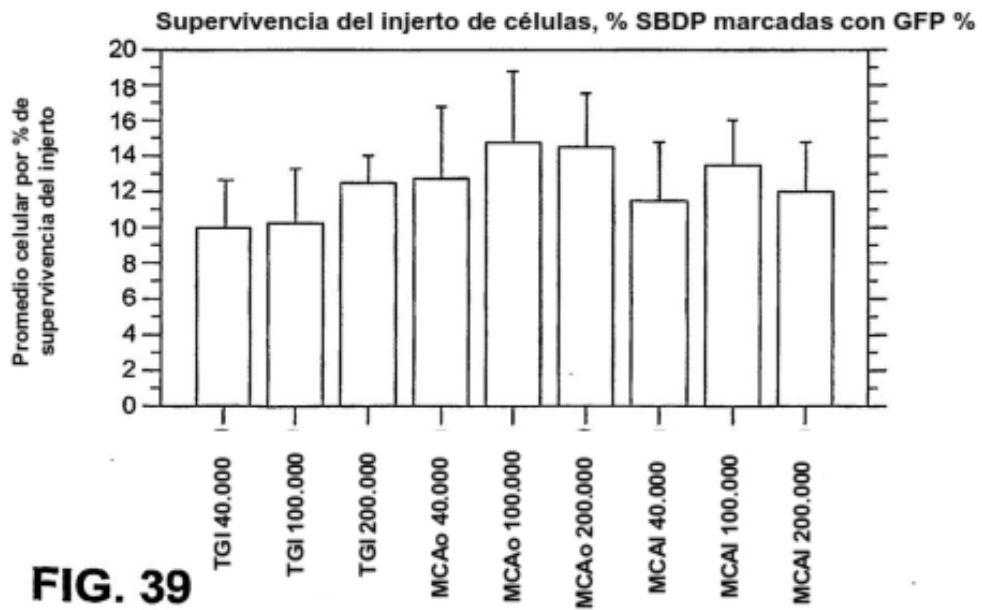
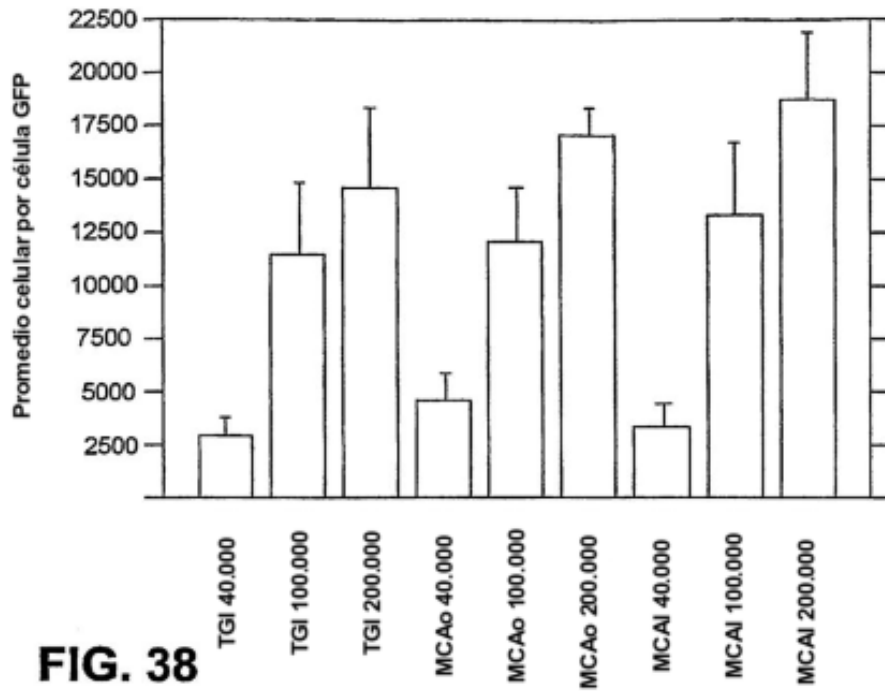


FIG. 37



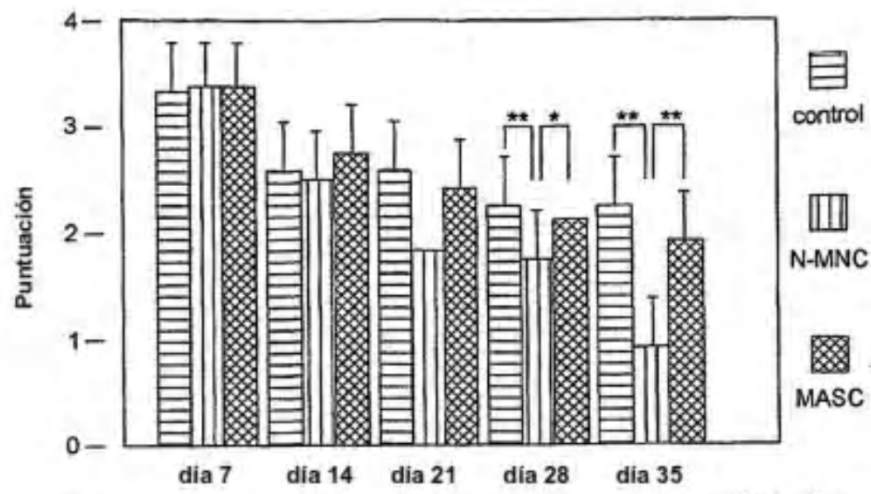


FIG.40

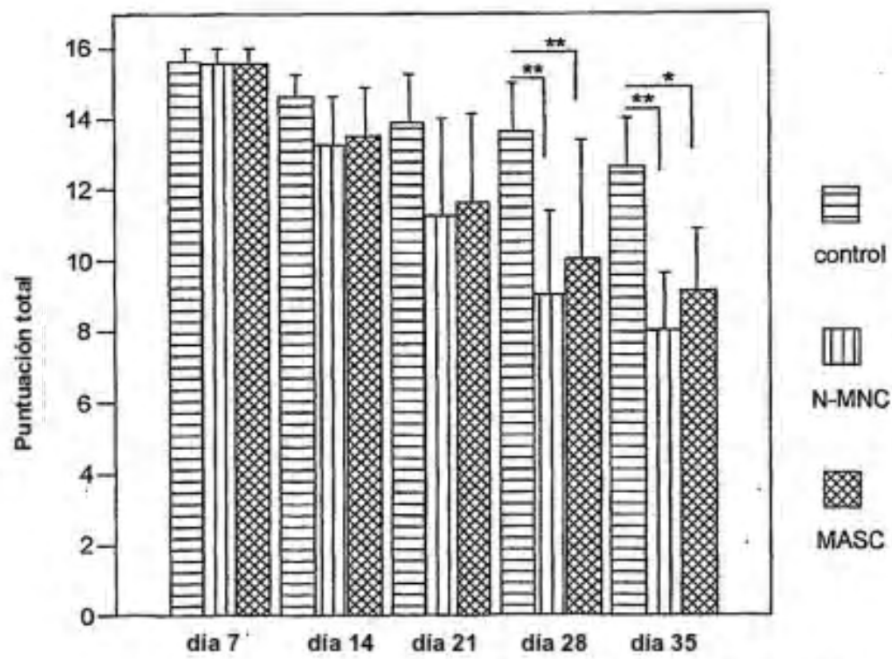


FIG. 41

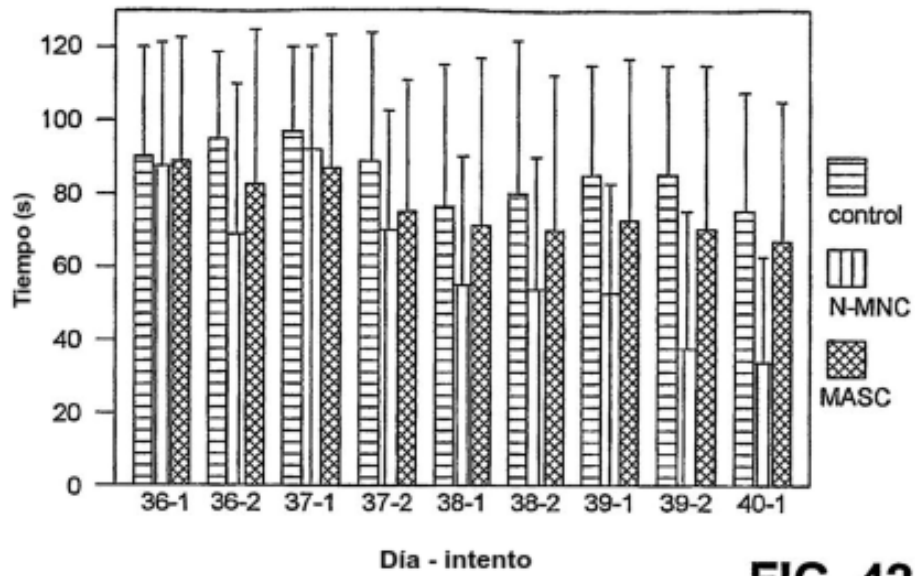


FIG. 42

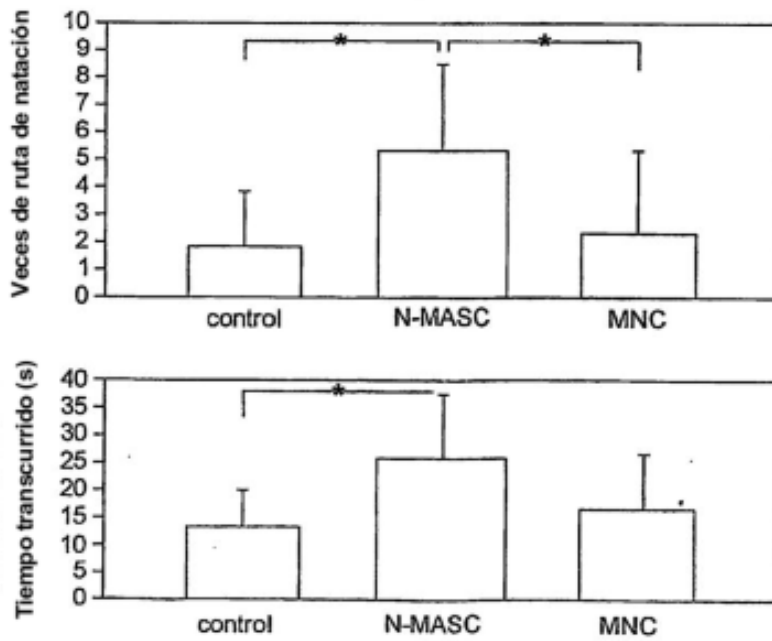
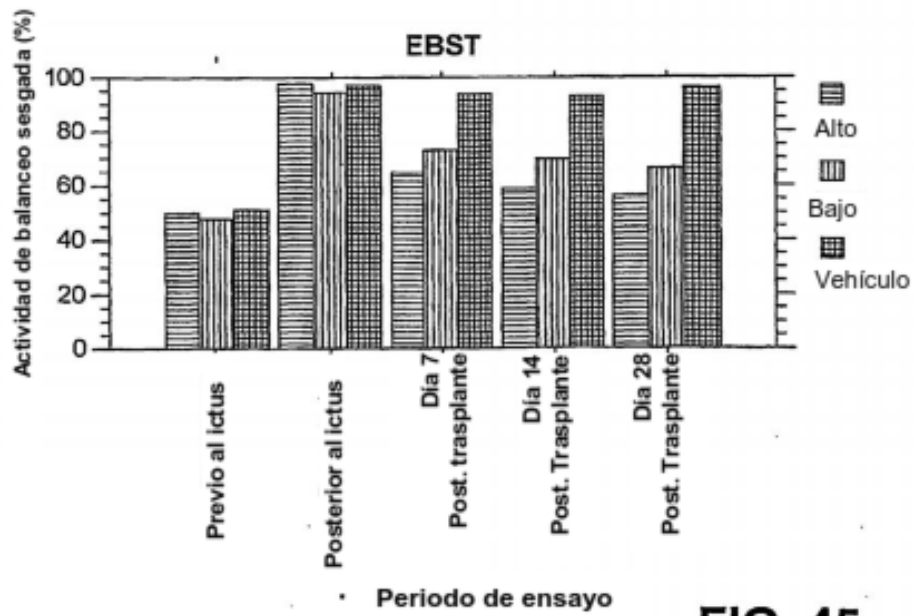
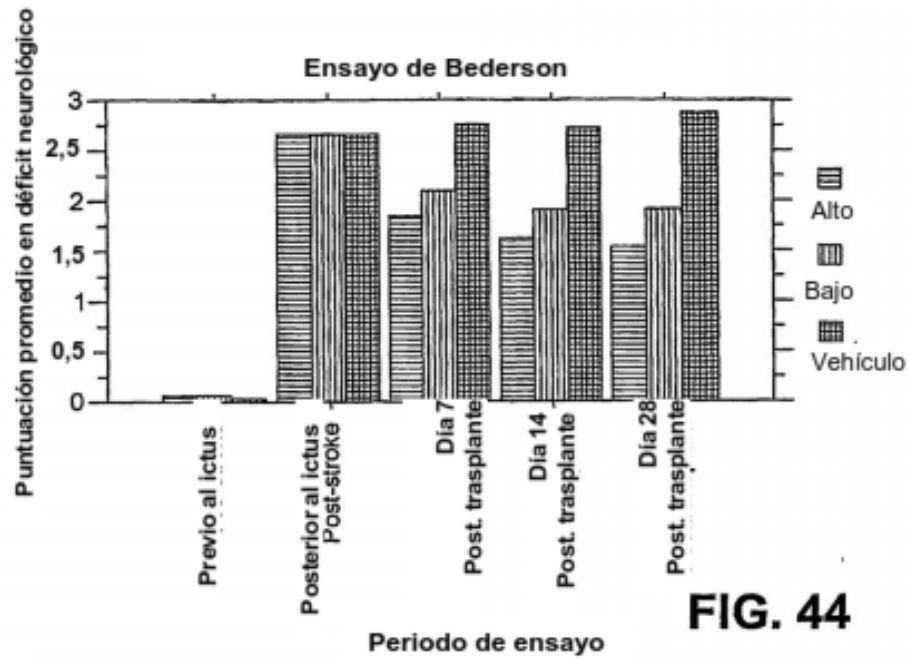


FIG. 43



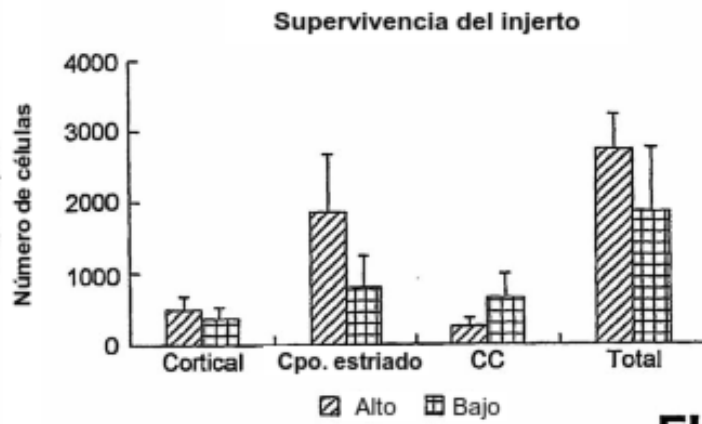


FIG. 46

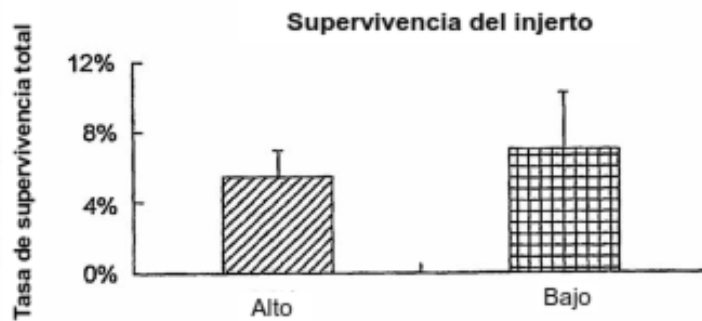


FIG. 47

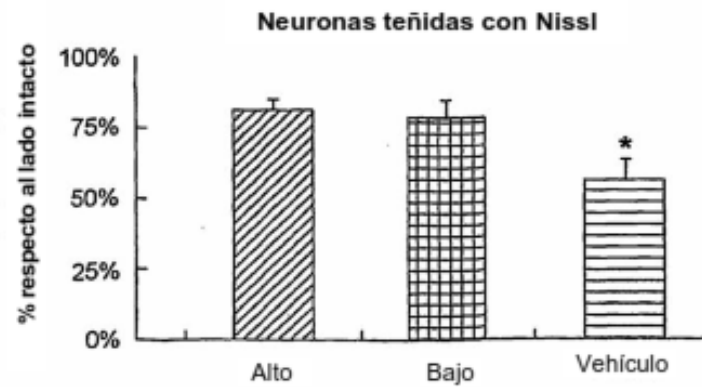


FIG. 48