

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 996**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

C12N 5/079 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2006 E 06766101 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 1893747**

54 Título: **Células aisladas y poblaciones que comprenden a las mismas para el tratamiento de enfermedades del SNC**

30 Prioridad:

16.06.2005 US 690879 P

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

16.12.2014

73 Titular/es:

**RAMOT AT TEL AVIV UNIVERSITY LTD. (100.0%)
For all designated states Ramot at Tel Aviv
University Ltd.P.O. Box 39296
6139201 TEL AVIV, IL**

72 Inventor/es:

**OFFEN, DANIEL;
BAHAT-STROMZA, MERAV y
MELAMED, ELDAD**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 524 996 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células aisladas y poblaciones que comprenden a las mismas para el tratamiento de enfermedades del SNC

5 CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a las realizaciones tal como se caracterizan en las reivindicaciones. También se describen en el presente documento células y poblaciones de las mismas que se pueden usar para tratar enfermedades del SNC.

10 La enfermedad de Parkinson es un trastorno relacionado con la edad caracterizado por una pérdida progresiva de las neuronas productoras de dopamina en la sustancia negra del mesencéfalo, que a su vez conduce a la pérdida progresiva de funciones motoras que se manifiesta a través de síntomas tales como temblor, rigidez y ataxia.

15 Las estrategias actuales de tratamiento para la EP se centran en restaurar el empobrecimiento de dopamina, generalmente a través de la administración del precursor de dopamina L-DOPA (L-3-4-dihidroxifenilalanina). L-DOPA, (el precursor de la dopamina que penetra en la barrera hematoencefálica (BHE)), aumenta con éxito la síntesis y liberación de dopamina. Sin embargo, mientras la enfermedad progresa, existen menos neuronas dopaminérgicas disponibles para sintetizar dopamina a partir del precursor y la efectividad del tratamiento disminuye
20 mientras que aparece la discinesia inducida por L-DOPA. Otros tratamientos con agonistas de la dopamina, inhibidores de la monoaminooxidasa o inhibidores de COMT también demuestran una mejoría parcial pero no pueden prevenir la progresión de la enfermedad.

25 Se ha sugerido el trasplante de células como una opción de tratamiento alternativa para reparar y reemplazar las neuronas dopaminérgicas perdidas. Para que dicha terapia de reemplazo funcione, las células implantadas deben sobrevivir e integrarse, tanto funcionalmente como estructuralmente, dentro del tejido dañado.

30 Se ha sugerido recientemente uso de células madre como una fuente celular en la terapia de reemplazo celular para la enfermedad de Parkinson. Las células madre tienen la habilidad de existir *in vivo* en un estado indiferenciado y de auto-renovarse. No están restringidas a tipos celulares específicos del tejido de origen, y por lo tanto son capaces de diferenciarse en respuesta a señales ambientales locales de otros tejidos. Esta capacidad de auto-renovación y diferenciación tiene un gran potencial terapéutico para curar enfermedades.

35 En la enfermedad de Parkinson la estrategia de reemplazo de células madre se basa en la idea de que la restauración de la neurotransmisión de dopamina (DA) se efectúa por injertos celulares que se integran a lo largo del tiempo en el tejido restante y producen tejido funcional de larga duración. Existen dos métodos para tratar las células madre para los injertos en EP. En el primer método, antes del trasplante, las células se diferencian *in-vitro* a neuronas dopaminérgicas. Esto permite la estandarización y el control de calidad de las células relevantes. El segundo método comprende el trasplante de células madre no diferenciadas de las que se cree que se diferencian
40 *in-vivo* a neuronas dopaminérgicas después de la implantación en el cuerpo estriado o la sustancia negra.

45 En teoría, las neuronas DA para terapia celular podrían crearse a partir de células madre de cuatro fuentes distintas: neuronas dopaminérgicas fetales, células madre neuronales, células madre embrionarias y células madre de médula ósea.

La médula ósea contiene dos poblaciones principales de células madre: las células madre hematopoyéticas (CMH) y células madre mesenquimales (CMM) ocasionalmente citadas como células estromales de médula ósea.

50 Se mostró que las CEMO de rata después de la diferenciación expresan Tirosina-hidroxilasa (TH), colina acetiltransferasa y beta-III tubulina [Woodbury, D., *et al.*, J Neurosci Res. 69(6):908-17, 2002]. El potencial clínico terapéutico de las CEMO murinas en EP se demostró mediante inyección intraestriatal de CEMO de ratón en el modelo murino para EP de 1-metil-4-phenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP). Las células trasplantadas sobrevivieron y expresaron TH. Además se indicó una mejoría en el ensayo de la barra rotatoria 35 días después del trasplante [Li, Y., *et al.*, Neurosci Lett. 316(2):67-70, 2001].

55 La Solicitud de patente N° 2005026598 les enseña a los presentes inventores CMM que sintetizan dopamina humana que expresan marcadores neuronales y factores de transcripción que caracterizan a las neuronas DA del mesencéfalo después de la inducción de la diferenciación neuronal.

60 Como una alternativa a una estrategia de reemplazo celular, donde las células injertadas tienen que sobrevivir y poseen propiedades morfológicas, electrofisiológicas y funcionales dopaminérgicas, la terapia celular puede encaminarse a restaurar o restablecer la anatomía normal (conectividad) y fisiología (contactos sinápticos y funcionamiento apropiado) del cuerpo estriado.

65 Los factores Neurotróficos (NTF) son proteínas secretadas que regulan la supervivencia, el mantenimiento funcional y el desarrollo fenotípico de células neuronales. Las alteraciones en los niveles de los factores NTF están implicadas

en el desencadenamiento de la muerte celular programada en neuronas y por lo tanto contribuyen a la patogénesis de la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas.

Uno de los NTF más potentes para las neuronas dopaminérgicas se denomina factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales (GDNF). Se sabe que este promueve la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, promueve la extensión de neuritas, aumenta el tamaño del cuerpo celular y también eleva los niveles de TH. El GDNF pertenece a una familia de proteínas, relacionada con la superfamilia del TGF- β , que actualmente consiste en cuatro factores neurotróficos: GDNF, Neurturina (NTN), Persefina, y Artemina/Neublastina. Se sabe que estos factores sirven como reguladores de proliferación y diferenciación celular

Un análisis de las células neuronales progenitoras (ST14A) reveló que la sobreproducción del GDNF puede asociarse con una regulación positiva de los genes implicados en el brote axonal, extensión de neuritas, formación de espinas, transporte de vesículas y plasticidad sináptica [Pahnke J, *et al.*, *Exp Cell Res.* 297(2):484-94, 2004]. También se sugirió que la actividad neuroprotectora del GDNF está mediada por la activación de sistemas de enzimas antioxidantes tales como la actividad de la glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa [Chao CC, Lee EH. *Neuropharmacology*, 38(6):913-6, 1999].

Diversos tipos celulares producen GDNF incluyendo las células gliales (oligodendrocitos y astrocitos), líneas celulares de neuroblastoma y de glioblastoma. Se ha demostrado recientemente que las CEMO de rata cultivadas en DMEM complementado con suero bovino fetal al 20 %, en el pase 6 expresan GDNF y NFG [Garcia R, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 316(3):753-4, 2004].

La síntesis de GDNF se puede regular por factores de crecimiento, hormonas, citocinas y neurotransmisores. Por ejemplo, el factor de necrosis tumoral- α o la interleucina 1 inducen la liberación de GDNF de las células de glioblastoma. La forskolina o el AMPc causan un aumento de la liberación de GDNF tanto por las líneas celulares de neuroblastoma como por las líneas celulares de glioblastoma. Estas células comprenden receptores de neurotransmisores, que permiten que los neurotransmisores regulen la producción de factores de crecimiento en condiciones de estrés.

Se ha demostrado que la administración de GDNF directamente en el cerebro es efectiva en diversos modelos animales de EP. Además, se ha probado que la exposición de las células a GDNF antes del trasplante es beneficiosa. Por ejemplo, injertar 400.000 neuronas dopaminérgicas fetales antes del trasplante aumentó significativamente la conducta rotacional de ratas lesionadas [Mehta V, *et al.*, *J Neurosurg.* abril de 1999; 90(4):804-6].

Se han usado diversos métodos para ayudar a la administración de GDNF en el cerebro incluyendo bombas osmóticas, cápsulas y microesferas. Otro enfoque para suministrar GDNF *in vivo* es la terapia génica. Las células mesenquimales de médula ósea genéticamente modificadas para expresar GDNF, trasplantadas a ratones lesionados con MPTP, fueron capaces de proteger neuronas de la sustancia negra así como fibras del cuerpo estriado [Park, K., *Neurosci. Res.* 40: 315-323, 2001].

Varios estudios han mostrado que las células CMM después de la exposición a distintos factores *in vitro*, cambian su fenotipo y muestran marcadores neuronales y gliales [Kopen, G.C., *et al.*, *Proc Natl Acad EE.UU.* 96(19):10711-6, 1999; Sanchez-Ramos, *et al.* *Exp Neurol.* 164(2):247-56, 2000; Woodbury, D., *J Neurosci Res.* 61(4):364-70, 2000; Woodbury, D., *et al.*, *J Neurosci Res.* 69(6):908-17, 2002; Black, I.B., Woodbury, D. *Blood Cells Mol Dis.* 27(3):632-6, 2001; Kohyama, J., *et al.* *Differentiation.* 68(4-5):235-44, 2001; Levy, Y.S. *J Mol Neurosci.* 21(2):121-32, 2003].

Sin embargo, ninguno de estos estudios ha mostrado que las CMM humanas sean capaces de secretar niveles significativos de factores neurotróficos.

Por lo tanto existe una necesidad ampliamente reconocida de, y sería muy ventajoso tener, células trasplantables capaces de sintetizar factores neurotróficos tales como GDNF para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se refiere a las realizaciones tal como se caracterizan en las reivindicaciones. En el presente documento se describe una célula humana aislada que comprende al menos un fenotipo astrocítico y al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal, en la que el fenotipo de la célula madre mesenquimal no es un fenotipo astrocítico. Adicionalmente,

una célula humana aislada que comprende al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal y al menos un fenotipo astrocítico estructural, en la que el fenotipo de la célula madre mesenquimal no es un fenotipo astrocítico estructural; y

también se describe una célula humana aislada que comprende al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal y al menos un fenotipo astrocítico funcional, en la que el fenotipo de célula madre mesenquimal no es un fenotipo astrocítico funcional. Además,

5 también se hace referencia a una célula humana aislada que comprende al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal y que expresa al menos un factor neurotrófico, en la que la expresión es al menos 2 veces mayor que una expresión basal del factor neurotrófico en una célula madre mesenquimal. También se hace referencia a una población celular aislada que comprende células humanas en las que:

- 10 (i) al menos el N % de las células humanas comprenden al menos un fenotipo astrocítico;
(ii) al menos el M % de las células humanas comprenden al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal; el fenotipo de la célula madre mesenquimal no es un fenotipo astrocítico; y (iii) al menos una de las células humanas comprende tanto el al menos un fenotipo astrocítico como el al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal; donde cada uno de M y N se seleccionan independientemente entre 1 y 99.

15 Adicionalmente, una población celular aislada que comprende células humanas en las que:

- (i) al menos el N % de las células humanas expresan al menos un factor neurotrófico; en la que la expresión es al menos 2 veces mayor que una expresión basal del factor neurotrófico en una célula madre mesenquimal.
20 (ii) al menos el M % de las células humanas comprenden al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal; y
(iii) al menos una de las células humanas expresa tanto el al menos un factor neurotrófico como el al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal;

25 donde cada uno de M y N se seleccionan independientemente entre 1 y 99 como se describe en el presente documento.

Además, se hace referencia a una población celular aislada que comprende células humanas en las que:

- (i) al menos el N % de las células humanas comprenden al menos un fenotipo astrocítico estructural;
30 (ii) al menos el M % de las células humanas comprenden al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal; el fenotipo de la célula madre mesenquimal no es un fenotipo astrocítico estructural; y
(iii) al menos una de las células humanas comprende tanto el al menos un fenotipo astrocítico estructural como el al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal;

35 donde cada uno de M y N se seleccionan independientemente entre 1 y 99. También se describe una población celular aislada que comprende células humanas en la que:

- (i) al menos el N % de las células humanas comprenden al menos un fenotipo astrocítico funcional;
40 (ii) al menos el M % de las células humanas comprenden al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal; el fenotipo de la célula madre mesenquimal no es un fenotipo astrocítico funcional; y
(iii) al menos una de las células humanas comprende tanto el al menos un fenotipo astrocítico funcional como el al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal;

donde cada uno de M y N se seleccionan independientemente entre 1 y 99.

45 De acuerdo con la presente invención se proporciona un método para generar células similares a astrocitos tal como se define en las reivindicaciones, que comprende incubar las células madre mesenquimales en un medio de diferenciación que comprende factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y neuregulina 1- β 1 humana, generando de este modo células similares a astrocitos. También se describe un método para generar células similares a astrocitos, que comprende incubar células madre mesenquimales en un medio que comprende al menos
50 un agente de diferenciación, seleccionándose el al menos un agente de diferenciación del grupo que consiste en factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), neuregulina 1- β 1 humana, FGF2, EGF, N2, IBMX y AMPc, generando de este modo células similares a astrocitos.

55 Además, también se hace referencia a un método para tratar una enfermedad o trastorno del SNC que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de células similares a astrocitos, tratando de este modo la enfermedad o trastorno del SNC; y

60 un uso de células similares a astrocitos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno del SNC. También se incluye en el presente documento una descripción de una composición farmacéutica que comprende, como agente activo, cualquiera de las células o poblaciones celulares de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 y un transportador farmacéuticamente aceptable. Se describe además que las células que no están genéticamente manipuladas, que

65 el al menos un fenotipo astrocítico es un fenotipo estructural o un fenotipo funcional y que las células además comprenden un fenotipo astrocítico funcional.

La descripción además indica que el fenotipo astrocítico funcional no es el fenotipo de célula madre mesenquimal que las células además comprenden un fenotipo astrocítico estructural que el fenotipo astrocítico estructural no es el fenotipo de células madre mesenquimal y que el fenotipo astrocítico estructural es un tamaño celular, una forma celular, un tamaño de orgánulos y un número de orgánulos. También se especifica que el fenotipo astrocítico estructural es la expresión de al menos un marcador astrocítico y que el marcador astrocítico es un marcador de superficie o un marcador interno. Además, se describe que el fenotipo astrocítico funcional es la expresión de al menos un factor neurotrófico a un nivel al menos 2 veces mayor que una producción basal del factor neurotrófico en una célula madre mesenquimal y esto explica que el al menos un factor neurotrófico se selecciona del grupo que consiste en factor neurotrófico derivado de la glía (PDGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4/5, Neurturina (NTN), Persefina, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), artemina (ART), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor de crecimiento insulínico (IGF-1) y Neuroblastina.

Se destaca que el al menos un factor neurotrófico puede ser GDNF.

De acuerdo con características aún adicionales de la descripción, el marcador de astrocitos se selecciona del grupo que consiste en S 100 beta, proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), glutamina sintetasa, GLT-1 y GLAST.

Adicionalmente, se describe que la secreción del GDNF está regulada por IL-1 beta y/o cabergolina.

De acuerdo con características aún adicionales en las realizaciones descritas preferidas, una duración de la incubación es de aproximadamente 48 horas.

De acuerdo con características aún adicionales en las realizaciones descritas preferidas, una concentración del PDGF es de aproximadamente 5 ng/ml.

De acuerdo con características aún adicionales en las realizaciones descritas preferidas, una concentración de la neuregulina humana 1-β1 es de aproximadamente 50 ng/ml.

De acuerdo con las reivindicaciones, el medio de diferenciación además comprende L-glutamina, dibutilil AMP cíclico e isobutilmetilxantina IBMX.

De acuerdo con características aún adicionales en las realizaciones descritas preferidas, el método además comprende cultivar las células en un medio adicional antes de incubarlo predisponiendo de ese modo a las células a diferenciarse en células similares a astrocitos.

De acuerdo con características aún adicionales en las realizaciones descritas preferidas, el medio adicional comprende factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) y factor de crecimiento de fibroblastos básico humano (hbFGF).

De acuerdo con características aún adicionales en las realizaciones descritas preferidas, una concentración de hEGF es de aproximadamente 20 ng/ml.

De acuerdo con características aún adicionales en las realizaciones descritas preferidas, una concentración de hbFGF es de aproximadamente 20 ng/ml. Se ha descrito además que el medio adicional además comprende L-glutamina, insulina, progesterona, putrescina, selenio y transferrina y que una duración del cultivo es de aproximadamente 48 horas. La descripción además indica que las células madre mesenquimales se obtienen: (a) cultivando una población de células que comprende la células madre mesenquimales en un medio de proliferación capaz de mantener y/o expandir las células madre mesenquimales; y (b) seleccionando las células madre mesenquimales de las células resultantes de la etapa (a), y que la etapa (b) se efectúa recogiendo células que están adheridas a la superficie.

Además, se describe que el método comprende adicionalmente administrar al individuo, células madre capaces de sintetizar endógenamente al menos un neurotransmisor que

la enfermedad o el trastorno del SNC es una enfermedad o trastorno neurodegenerativo que la enfermedad o el trastorno del SNC se selecciona del grupo que consiste en un trastorno motor, un trastorno disociativo, un trastorno del estado anímico, un trastorno afectivo, un trastorno adictivo y un trastorno compulsivo y que

5 el trastorno neurodegenerativo se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, epilepsia, esclerosis lateral amiotrófica, ictus, encefalitis autoinmunitaria, neuropatía diabética, neuropatía glaucomatosa, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington. Además, se especifica que las células son células autólogas o células no autólogas.

10 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado tal como entiende comúnmente un experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen más adelante. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones, los controlará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 La invención y los aspectos adicionales descritos en el presente documento se describen en el presente documento, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se hace hincapié en que los particulares mostrados son solamente a modo de ejemplo y para fines de discusión ilustrativa de las realizaciones preferentes de la presente invención, y se presentan para proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se hace ningún intento de mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención, la descripción tomada junto con los dibujos hace evidente para los expertos en la materia cómo las diversas formas de la invención pueden realizarse en la práctica.

En los dibujos:

30 Las FIG 1A-B son imágenes de microscopía óptica de las CMM humanas diferenciadas y no diferenciadas al cabo de 5 días. Las CMM humanas diferenciadas muestran una morfología similar a la de los astrocitos así como la estructura típica similar a la de los astrocitos (microscopía óptica).

35 Las FIG 2A-D son imágenes de microscopía electrónica de barrido de CMM humanas diferenciadas (Figuras 2B-D) y no diferenciadas (Figura 2A) al cabo de 5 días. Las CCM humanas diferenciadas mostraron una morfología similar a la de los astrocitos.

Las FIG 3A-B son fotomicrografías que ilustran la expresión de marcadores de astrocitos en las CMM humanas diferenciadas. La inmunotinción se realizó en hCEMO humanas diferenciadas con anti- S100 β (Figura 3A), y anti-glutamina sintetasa (Figura 3B). Los núcleos de las células se tiñeron usando DAPI (azul).

40 Las FIG 4A-B son fotomicrografías y son gráficas de barras que ilustran la expresión de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) marcadora de astrocitos en las CMM humanas diferenciadas. La inmunotinción se realizó en hCEMO humanas con anti-GFAP y los núcleos de las células se tiñeron usando DAPI (azul) (Figura 4A). La Figura 4B es una gráfica de barras que ilustra el nivel de GFAP en extractos celulares de las CMM humanas diferenciadas tal como se analizó por PCR en tiempo real usando cebadores con las SEC ID NOS: 11 y 12.

45 La FIG.5 es una gráfica de barras que ilustra las cantidades de transcritos de los factores neurotróficos en CMM humanas diferenciadas en comparación con CMM humanas no diferenciadas. Los extractos celulares se sometieron a un ensayo de PCR en tiempo real para los transcritos de GDNF (SEC ID Nos: 3 y 4), NGF (SEC ID Nos 9 y10) y BDNF (SEC ID Nos: 5 y 6).

50 Las FIG 6A-B son fotomicrografías y gráficas de barras que ilustran la expresión de GDNF en CMM humanas diferenciadas. La inmunotinción se realizó en hCEMO humanas diferenciadas con anti-GDNF. Los núcleos de las células se tiñeron usando DAPI (azul) (Figura 6A). La Figura 6B ilustra que el número de células que se tiñeron positivamente con anti-GDNF fue de aproximadamente el 30 % (* P <0,05, n = 3, media de células contadas por n = 415,5 \pm 37,5). El número de células GDNF se evaluó mediante el examen de 15 campos de tres cultivos independientes. El número total de células en estas muestras se determinó contando los núcleos celulares teñidos con DAPI y los resultados se expresan como media \pm ETM de los porcentajes de células positivas.

55 FIG. 7 es una gráfica de barras que ilustra la cantidad de GDNF presente en la célula en la CMM humana diferenciada. La producción de GDNF se ensayó en extractos de células de las hCEMO diferenciadas por ELISA. Los resultados son la media \pm D.T. de tres experimentos independientes. Las diferencias donde p <0,05 (*) fueron significativas en comparación con los controles. Las células diferenciadas se incubaron con cabergolina (130 pg/ml) e IL-1 β (100 pg/ml) 24 horas después de la iniciación de la diferenciación durante 48 horas.

60 Las FIG 8A-D son gráficas de barras que ilustran la cantidad de GDNF, BDNF y NGF secretada por las CMM humanas diferenciadas. La Figura 8A ilustra el efecto de una incubación de 48 horas con cabergolina (130 pg/ml) e IL-1 β (100 pg/ml) sobre la secreción de GDNF. Los medios de cultivo se recogieron después de 72 horas de diferenciación y se analizaron usando ELISA. Los resultados son la media \pm D.T. de tres experimentos independientes. Las diferencias donde p <0,05 (*) fueron significativas cuando se compararon con los controles. Los medios de las células diferenciadas también se ensayaron para GDNF (Figura 8B) y NGF (Figura 8C).

(Donantes Nos 14-2, Nos 8-10 o Nos H1-2-7). Las barras azules representan la secreción después de la diferenciación y las barras rojas representan la secreción antes de la diferenciación. Figura 8D ilustra el efecto de una diferenciación de 48 horas sobre la secreción de BDNF en las CMM de tres donantes diferentes.

La FIG. 9 es una gráfica de barras que ilustra la expresión de los transportadores de glutamato GLAST y GLT-1 después de la diferenciación de las CMM. La expresión de estos transportadores de glutamato se evaluó mediante PCR en tiempo real realizada sobre ARN total extraído de las hCEMO que crecieron en medio aséptico y de las hCEMO diferenciadas en astrocitos. Los cebadores para GLAST tenían las SEC ID Nos: 7 y 8 y los cebadores para GLT-1 tenían las SEC ID Nos: 13 y 14. También se usaron las muestras para la amplificación por PCR del GAPDH permitiendo un análisis cuantitativo de los productos de PCR expresados en unidades arbitrarias (media \pm ETM de las medidas por triplicado realizadas en cultivos independientes). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido del ensayo de Newman-Keul para comparaciones múltiples. * ($p < 0,05$) indica diferencias significativas de las células mantenidas en el medio aséptico.

La FIG. 10 es una gráfica de barras que ilustra la actividad funcional de los transportadores de glutamato antes y después de la diferenciación de las hCEMO en astrocitos. La captación de [3 H]d-aspartato (20 nm) se midió en las hCEMO que crecieron en medio de diferenciación en comparación con las células que crecieron en medio aséptico. Los datos mostrados son la media \pm ETM de las medidas realizadas por triplicado en tres cultivos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido del ensayo de Newman-Keul para comparaciones múltiples ($p < 0,05$).

La FIG. 11 es una gráfica lineal que ilustra la mejoría en el comportamiento de ratas lesionadas con 6-OHDA trasplantadas con hCEMO diferenciadas en astrocitos. A las ratas se les trasplantaron 5×10^5 células inyectadas en el cuerpo estriado ipsilateral 6 semanas después de la lesión. El comportamiento de rotación inducido por la apomorfina (0,15 mg/kg, s.c.) se registró para un número medio de vueltas por 60 minutos. Las ratas trasplantadas presentaron una disminución marcada ($p < 0,05$) en las rotaciones 75 días después del trasplante.

La FIG. 12 es una gráfica de barras que ilustra la mejoría en el ensayo de la barra rotatoria de ratas lesionadas con 6-OHDA trasplantadas con hCEMO diferenciadas en astrocitos. El rendimiento de la barra rotatoria (segundos en la barra) se observó 95 días después del injerto en las mismas ratas. Las ratas trasplantadas presentaron una mejoría marcada ($p < 0,05$) (ensayos de comparación múltiples después de ANOVA de Friedman, $P < 0,05$).

La FIG. 13 es una gráfica de barras que ilustra la mejoría en la función motora delicada de ratas lesionadas con 6-OHDA trasplantadas con hCEMO diferenciadas en astrocitos. Se realizó un ensayo de ingesta de semillas de girasol 100 días después del trasplante. Las ratas trasplantadas con los astrocitos abrieron e ingirieron las semillas durante un período de 5 minutos mucho más rápido en comparación con las ratas tratadas con solución salina. Los resultados son la media \pm ETM de dos ensayos realizados en dos días siguientes.

Las FIG 14A-E son imágenes de microscopía confocal de células de ratas lesionadas con 6-OHDA trasplantadas con hCEMO diferenciadas en astrocitos. A los 110 días después del trasplante se sacrificaron los animales y se realizaron los estudios histológicos. La Figura 14A ilustra la tinción con DAPI. La Figura 14B ilustra la tinción con antígeno nuclear humano. La Figura 14C ilustra la tinción con GFAP. La Figura 14D es una mezcla de las tres tinciones. La inmunotinción y el estudio de microscopía confocal revelaron que hasta el 25 % de las células que fueron positivas para el antígeno humano también fueron positivas para GFAP.

La FIG. 15 es una gráfica lineal que ilustra que las CEMO diferenciadas en astrocitos trasplantadas en el gastrocnemio de ratones con ELA retrasaron la aparición de la enfermedad y mejoraron su rendimiento motor en la barra rotatoria ($n = 8$, $p < 0,05$).

La FIG. 16 es una gráfica lineal que ilustra que las CEMO diferenciadas en astrocitos trasplantadas en el gastrocnemio de ratones con ELA retrasaron la disminución de peso corporal.

Las FIG. 17A-C son imágenes de microscopía confocal en células de ratones con ELA trasplantados con hCEMO diferenciadas en astrocitos que ilustran que las CEMO diferenciadas en astrocitos trasplantadas en el gastrocnemio de ratones con ELA sobrevivieron 110 días después del trasplante.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La presente invención se refiere a las realizaciones tal como se caracterizan por las reivindicaciones.

Los principios y el funcionamiento de la presente invención pueden comprenderse mejor con referencia a los dibujos y a las descripciones que se adjuntan.

Los factores neurotróficos (NTF) son proteínas secretadas que regulan la supervivencia, el mantenimiento funcional y desarrollo fenotípico de células neuronales. Las alteraciones en los niveles de los NTF están implicadas en el desencadenamiento de la muerte celular programada en neuronas y por lo tanto contribuyen a la patogénesis de la enfermedad de Parkinson y de otras enfermedades neurodegenerativas.

Uno de los NTF más potentes para las neuronas dopaminérgicas se denomina factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales (GDNF). Se sabe que este promueve la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, promueve la extensión de neuritas, aumenta el tamaño del cuerpo celular y también eleva los niveles de TH.

Sin embargo, el uso de factores neurotróficos en general, y del GDNF en particular, está prohibido ya que estos no atraviesan la barrera hematoencefálica y no se distribuyen apropiadamente después de inyección sistémica. Por lo tanto, se deben desarrollar otras estrategias para aprovechar sus propiedades terapéuticas.

Al mismo tiempo que la presente invención se reduce a la realización práctica, los presentes inventores han encontrado que en condiciones de cultivo específicas, las células madre mesenquimales (CMM) se pueden diferenciar en células que tienen un fenotipo astrocítico capaz de secretar factores neurotróficos. Se demostró que este resultado era independiente tanto del donante como de los países. Por consiguiente, los presentes inventores demostraron que dichas CMM diferenciadas se pueden usar para tratar a pacientes con enfermedades neurodegenerativas después del trasplante.

Los presentes inventores mostraron que las CMM diferenciadas de acuerdo con un novedoso protocolo de dos etapas, representan una forma similar a la de los astrocitos (Figuras 1A-B y 2A-D) junto con la presencia de marcadores de astrocitos (Figuras 3A-B y 4A-B). Se ha demostrado que estas células similares a astrocitos expresan (Figura 5) y secretan (Figuras 8A-D) niveles significativos de GDNF, BDNF y NGF. Además la producción de NTF estaba regulada positivamente por cabergolina, un agonista del receptor D2 e IL-1 (Figura 7 y Figura 8A). Además, las células similares a astrocitos poseían maquinaria de eliminación de glutamato (Figura 10).

Después del trasplante en el cuerpo estriado de las ratas lesionadas con 6-OHDA (un modelo de rata del Parkinson) y en los músculos de la pata de ratones transgénicos con ELA, las células sobrevivieron y mejoraron los déficits conductuales examinados por un ensayo de barra giratoria, y la apomorfina indujo un comportamiento rotacional (Figuras 11-17A-C).

Por lo tanto, de acuerdo a un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para generar células similares a astrocitos, que comprende incubar las células madre mesenquimales en un medio de diferenciación que comprende factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y neurregulina 1- β 1 humana, generando de este modo células similares a astrocitos.

Tal como se usa en el presente documento la frase "células similares a astrocitos" se refiere a células que comprenden al menos un fenotipo astrocítico que las permite mediar *in vivo* una actividad astrocítica, es decir, el soporte de neuronas.

Dichos fenotipos se describen adicionalmente de aquí en adelante.

La expresión "célula madre mesenquimal" o el término "CMM" se usan indistintamente para las células adultas que no están diferenciadas terminalmente, que se pueden dividir para producir células que bien son células madre, o que, se diferencian de modo irreversible para dar lugar a células de un linaje de células mesenquimales. Las células madre mesenquimales de la presente invención pueden ser una fuente sinérgica o alogénica, aunque se prefiere lo primero.

Se prefiere en este aspecto de la presente invención que las células madre mesenquimales no estén manipuladas genéticamente (es decir, transformadas con una construcción de expresión) para generar las células y las poblaciones celulares descritas en el presente documento.

Se apreciará que las células se puedan derivar de cualquier célula madre, aunque preferentemente no de células ME.

Las células madre mesenquimales pueden aislarse de diversos tejidos que incluyen pero no se limitan a médula ósea, sangre periférica, sangre, placenta y tejido adiposo. Un método para aislar células madre mesenquimales humanas de sangre periférica se ha descrito por Kassis et al [Bone Marrow Transplant. Mayo de 2006; 37(10):967-76]. Un método para aislar células madre mesenquimales de tejido placentario se ha descrito por Zhang et al [Chinese Medical Journal, 2004, 117 (6):882-887]. Los métodos para aislar y cultivar células madre mesenquimales de tejido adiposo, placentario y cordón umbilical se han descrito por Kern et al [Stem Cells, 2006; 24:1294-1301].

De acuerdo con este aspecto de la presente invención, las células madre mesenquimales son preferentemente humanas.

La médula ósea puede aislarse de la cresta ilíaca de un individuo por aspiración. Las células mononucleares de MO (CMNMO) de baja densidad se pueden separar por un gradiente de densidad FICOL-PAGUE. Para obtener células madre mesenquimales, se puede cultivar una población celular que comprenda las células madre mesenquimales (por ejemplo, CMNMO) en un medio de proliferación capaz que mantener y/o expandir las células. Las poblaciones se pueden sembrar en placas en superficies plásticas de poliestireno (por ejemplo en un matraz) y las células madre mesenquimales pueden aislarse eliminando las células no adherentes. Como alternativa la célula madre mesenquimal puede aislarse mediante FACS usando marcadores de células madre mesenquimales (ver Tabla 1, de aquí en adelante).

Preferentemente las MSC se purifican al menos el 50 %, más preferentemente se purifican al menos el 75 % y aún más preferentemente se purifican al menos el 90 %.

5 Después del aislamiento las células típicamente se expanden cultivando en un medio de proliferación capaz de mantener y/o expandir las células aisladas *ex vivo* tal como se describe en el Ejemplo 1 de aquí en adelante. El medio de proliferación puede ser DMEM, alfa-MEM o DMEM/F12. Preferentemente, el medio de proliferación es DMEM. Preferentemente, el medio de proliferación además comprende SPN, L-glutamina y un suero (tal como suero fetal de ternera o suero de caballo) tal como se describe en el Ejemplo 1 de la sección siguiente de Ejemplos.

10 La diferenciación a células similares a astrocitos se puede efectuar incubando las CMM en medios de diferenciación tales como aquellos que se describen en la Patente de EE.UU. N° 6.528.245 y por Sanchez-Ramos *et al.* (2000); Woodbury *et al.* (2000); Woodbury *et al.* (J. Neurosci. Res. 96:908-917, 2001); Black y Woodbury (Blood Cells Mol. Dis. 27:632-635, 2001); Deng *et al.* (2001); Kohyama *et al.* (2001); Reyes y Verfatile (Ann. N. Y. Acad. Sci. 938:231-235, 2001) y Jiang *et al.* (Nature 418:47-49, 2002);

15 Las CEMO se incuban preferentemente en "medio adicional" durante al menos 24 horas, preferentemente 48 horas, antes de su incubación en un "medio de diferenciación". La incubación en "medio de diferenciación" se prolonga durante al menos 24 horas, preferentemente al menos 48 horas.

20 El medio de diferenciación (incluyendo el medio de diferenciación adicional) puede ser DMEM o DMEM/F12, preferentemente DMEM. Un "medio adicional" adecuado puede ser cualquier medio de crecimiento capaz de predisponer a las células para la diferenciación similar a la de los astrocitos, tal como un medio de crecimiento complementado con factor de crecimiento epidérmico hEGF (por ejemplo 20 ng/ml) y/o factor de crecimiento básico de fibroblastos (por ejemplo 20 ng/ml). Preferentemente, el medio adicional también comprende complemento N2

25 (insulina, progesterona, putrescina, selenio y transferrina).

El medio de diferenciación de la presente invención preferentemente comprende factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo 5 ng/ml) y neurregulina 1-β1 humana (por ejemplo 50 ng/ml). El "medio de diferenciación" preferentemente incluye agentes de diferenciación tales como IL-1β y/o dbAMPc.

30 Preferentemente el medio de diferenciación además comprende SPN, L-glutamina, un complemento (tal como N2 o B27), antibiótico (por ejemplo IBMX) y un suero (tal como suero de ternera fetal, suero bovino fetal o suero de caballo).

35 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, las células madre mesenquimales se incuban en un medio tal como se define por las reivindicaciones para generar las células similares a astrocitos. Los ejemplos de agentes de diferenciación adicionales incluyen, pero no se limitan a complemento N2, IBMX y AMPc,

40 Los medios de diferenciación (incluyendo el medio de diferenciación adicional) también puede comprender otros agentes tales como factores neurotróficos (por ejemplo BDNF, CNTF, GDNF, NTN, NT3 o LIF), hormonas, factores de crecimiento (por ejemplo, GGF2, TGF-β3, TGF-α, FGF-8 y bFGF), vitaminas, hormonas por ejemplo, insulina, progesterona y otros factores tales como erizo sónico (*sonic hedgehog*), proteínas morfogénicas óseas, forskolina, ácido retinoico, ácido ascórbico, putrescina, selenio y transferrina.

45 Los medios de diferenciación ejemplares se describen en el Ejemplo 1 de aquí en adelante.

Las poblaciones celulares obtenidas de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento son típicamente no homogéneas.

50 Por lo tanto, una población aislada de células humanas puede ser una población, en la que:

- (i) al menos el N % de las células comprenden al menos un fenotipo astrocítico;
- (ii) al menos el M % de las células comprenden al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal; el fenotipo de célula madre mesenquimal no es un fenotipo astrocítico; y (iii) al menos una de las células humanas comprende tanto el al menos un fenotipo astrocítico como el al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal; donde cada uno de M y N se seleccionan independientemente entre 1 y 99.

60 El término "aislada" tal como se usa en el presente documento se refiere a una población de células que se ha extraído de su localización *in vivo* (por ejemplo, médula ósea, tejido neural). Preferentemente la población celular aislada carece sustancialmente de otras sustancias (por ejemplo, otras células) que están presentes en su localización *in vivo*.

65 Tal como se usa en el presente documento, la frase "fenotipo astrocítico" se refiere a un parámetro estructural y/o funcional típico (por ejemplo único) para un astrocito que se puede usar para distinguir entre las CMM diferenciadas de la presente invención y las CMM no diferenciadas. El fenotipo astrocítico puede comprender una sola o diversas características que se pueden usar para distinguir entre las CMM diferenciadas y las CMM no diferenciadas.

Se apreciará que los parámetros funcionales pueden solaparse con los parámetros estructurales, por ejemplo, la presencia de vesículas secretoras.

5 Preferentemente el fenotipo astrocítico funcional comprende la capacidad de expresar un factor neurotrófico a un nivel al menos 2 veces mayor que una expresión basal del factor neurotrófico en un célula madre mesenquimal humana no diferenciada.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "expresar" se refiere a la síntesis y/o secreción del factor neurotrófico anteriormente mencionado. Dado que el factor neurotrófico provoca sus efectos fuera de la célula, preferentemente la secreción del factor neurotrófico aumenta en las células de las poblaciones. Preferentemente, la secreción aumenta al menos 2 veces en comparación con la cantidad de factor neurotrófico que se secreta en células madre mesenquimales humanas no diferenciadas y aún más preferentemente 5 veces.

15 Tal como se usa en el presente documento, la frase "factor neurotrófico" se refiere a un factor celular que actúa en el sistema nervioso cerebral que comprende el crecimiento, la diferenciación, el mantenimiento funcional y/o los efectos de supervivencia en las neuronas. Los ejemplos de factores neurotróficos incluyen, pero no se limitan a, factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), Nos de referencia de GenBank. L19063, L15306; factor de crecimiento nervioso (NGF), N° de referencia de GenBank. CAA37703; factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), N° de referencia de GenBank. CAA62632; neurotrofina-3 (NT-3), N° de referencia de GenBank. M37763; neurotrofina-4/5, Neurturina (NTN), N° de referencia de GenBank. NP_004549; Neurotrofina-4, N° de referencia de GenBank. M86528; Persefina, N° de referencia de GenBank. AAC39640; factor neurotrófico derivado del cerebro, (BDNF), N° de referencia de GenBank. CAA42761; artemina (ART), N° de referencia de GenBank. AAD13110; factor neurotrófico ciliar (CNTF), N° de referencia de GenBank. NP_000605; factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1), N° de referencia de GenBank. NP_000609; y Neuroblastina N° de referencia de GenBank. AAD21075.

25 Un ejemplo adicional de un fenotipo astrocítico funcional es la potenciación de la expresión y/o secreción de un factor neurotrófico después de la adición de IL-1beta y cabergolina.

30 Los astrocitos juegan un papel importante en el mantenimiento de la baja concentración de glutamato extracelular por eliminación de glutamato por medio de transportadores de glutamato de alta afinidad. Por lo tanto, otro fenotipo astrocítico funcional de las células de las poblaciones puede ser un aumento de la actividad de los transportadores de glutamato. La actividad de dichos transportadores de glutamato puede analizarse midiendo aspartato marcado (por ejemplo, captación de [³H]-d-aspartato del medio de cultivo de las células.

35 Tal como se menciona anteriormente en el presente documento un porcentaje de las células de las poblaciones celulares puede comprender adicionalmente o como alternativa un fenotipo astrocítico estructural.

40 Los ejemplos de fenotipos astrocíticos estructurales incluyen un tamaño celular, una forma celular, un tamaño de los orgánulos y un número de orgánulos. Por lo tanto, los fenotipos astrocíticos estructurales incluyen un núcleo redondeado, un cuerpo con " forma de estrella" y numerosos procesos largos que terminan como placas de pies vasculares en vasos sanguíneos pequeños del SNC (Véanse las Figuras 1A-B y 2A-D). Pueden encontrarse ejemplos adicionales de fenotipos astrocíticos estructurales en los siguientes documentos: Reynolds y Weiss, Science (1992) 255:1707-1710; Reynolds, Tetzlaff, y Weiss, J. Neurosci (1992) 12:4565-4574; y Kandel, *et al.*, Principles of Neuroscience, tercera edición. (1991), Appleton & Lange, Norwalk, Conn. Estos fenotipos estructurales se pueden analizar usando técnicas de microscopía (por ejemplo, microscopía electrónica de barrido). Se pueden usar anticuerpos o tinciones para destacar las características distintivas para ayudar en el análisis.

Un fenotipo astrocítico estructural puede comprender también la expresión de un marcador de astrocitos.

50 Tal como se usa en el presente documento la frase "marcador de astrocitos" se refiere a un polipéptido que se expresa bien selectivamente o no selectivamente en un astrocito. El marcador de astrocitos se puede expresar en la superficie celular o internamente. Los ejemplos de marcadores de astrocitos incluyen S 100 beta, proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), glutamina sintetasa, GLAST y GLT1.

55 Tal como se menciona anteriormente en el presente documento, un porcentaje de células de las poblaciones celulares comprende al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal que no está presente en células astrocíticas típicas. Dichos fenotipos de células madre son típicamente estructurales. Por ejemplo, las células pueden mostrar una morfología similar a la de las células madre mesenquimales (una morfología similar a un huso). Como alternativa o adicionalmente las células pueden expresar un marcador (por ejemplo, un marcador de superficie) típico para células madre mesenquimales pero atípico para células astrocíticas nativas. Los ejemplos de marcadores de superficie de células madre mesenquimales incluyen, pero no se limitan a, CD105+, CD29+, CD44+, CD90+, CD34-, CD45-, CD19-, CD5-, CD20-, CD11B- y FMC7-. Otros marcadores de células madre mesenquimales incluyen, pero no se limitan a, tirosina hidroxilasa, nestina y H-NF.

65 Las poblaciones celulares también incluyen células que muestran un fenotipo tanto astrocítico como un fenotipo de célula madre mesenquimal. El fenotipo de la célula madre mesenquimal preferentemente no es un fenotipo

astrocítico. Por lo tanto, tal como se ilustra en la Tabla 3, se mostró que las células de las poblaciones celulares expresan marcadores de células madre mesenquimales, tirosina hidroxilasa, CD90 y H-NF, tres marcadores de los que no se conoce expresión en astrocitos.

5 Preferentemente, cuando las células comprenden los fenotipos tanto astrocíticos como los de células madre mesenquimales descritos anteriormente en el presente documento, su fenotipo astrocítico es exclusivo para los astrocitos. Las células pueden comprender un solo fenotipo astrocítico exclusivo para los astrocitos (por ejemplo, morfología con forma de estrella) o una combinación de fenotipos no exclusivos de los astrocitos que en combinación representan un fenotipo exclusivo para los astrocitos.

10 Preferentemente, el fenotipo astrocítico de cualquiera de las células de las poblaciones es tan cercano como es posible al de los astrocitos nativos. Por lo tanto, tal como se ilustra en los ejemplos de la sección siguiente, las células diferenciadas de acuerdo con el método de la presente invención representan una forma similar a la de los astrocitos (Figuras 1A-B y 2A-D), están acompañadas por la presencia de marcadores de astrocitos (Figuras 3A-B y 4A-B); expresan (Figura 5) y secretan (Figuras 8A-D) niveles significativos de GDNF, BDNF y NGF; comprenden la producción de NTF que adicionalmente está regulada positivamente por la cabergolina, un agonista del receptor D2 e IL-1 (Figura 7 y Figura 8A); y poseen maquinaria de aclaramiento de glutamato (Figura 10).

20 El porcentaje de células que comprende un fenotipo astrocítico se puede elevar o disminuir de acuerdo con las necesidades previstas. Por lo tanto, por ejemplo, las poblaciones celulares se pueden enriquecer para células con un fenotipo astrocítico particular (por ejemplo la expresión de GDNF). Esto se puede efectuar por FACS usando un anticuerpo específico para un marcador celular de astrocitos. Más adelante se describen ejemplos de dichos marcadores de astrocitos. Si el marcador celular es un marcador interno, preferentemente el análisis por FACS comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos que pueden penetrar fácilmente en una célula y pueden eliminarse fácilmente de la célula por lavado después de la detección. El proceso de FACS se puede repetir varias veces usando el mismo o distintos marcadores dependiendo del grado de enriquecimiento y del fenotipo celular requerido así como del producto final.

25 Como alternativa, las poblaciones pueden enriquecerse para células que comprendan un fenotipo tanto astrocítico como un fenotipo de célula madre mesenquimal de modo que se genere una población homogénea de células.

30 Por lo tanto, en el presente documento también se describe una célula humana aislada que comprende al menos un fenotipo astrocítico y al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal, en la que el fenotipo de la célula madre mesenquimal no es un fenotipo astrocítico.

35 Una vez diferenciadas y opcionalmente aisladas, las células se pueden someterse a ensayo (en cultivo) con respecto a su fenotipo astrocítico (por ejemplo, capacidad para secretar un factor neurotrófico funcional). Los cultivos pueden analizarse comparativamente para un fenotipo astrocítico, usando métodos analíticos bioquímicos tales como inmunoensayos, transferencias de Western y PCR a tiempo real tal como se describe en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos siguiente, o por bioensayos de actividad enzimática.

40 De acuerdo con el fenotipo astrocítico, las células y las poblaciones celulares se pueden usar para tratar una enfermedad o trastorno particular. Las poblaciones celulares pueden usarse directamente después de la diferenciación o pueden enriquecerse para un fenotipo astrocítico particular tal como se describe anteriormente en el presente documento. Tal como se resume en la Tabla 1 de aquí en adelante, se mostró que ciertos factores neurotróficos o conjuntos de factores neurotróficos son particularmente beneficiosos para tratar una enfermedad en particular. Por ejemplo, células que secretan NGF, BDNF, FGF y GDNF podrían ser particularmente adecuadas para tratar el Parkinson.

Tabla 1

<i>Enfermedad</i>	<i>Fenotipo Astrocítico</i>	<i>REF</i>
Parkinson	NGF, BDNF, FGF, GDNF	Walker DG, <i>et al.</i> Brain Res 1998; 794: 181-7. Lorigados L, <i>et al.</i> Rev Neurol 1998; 26: 744-8. Mogi M, <i>et al.</i> Neurosci Lett 1994; 180: 147-50. Howells DW, <i>et al.</i> Exp Neurol 2000;166: 127-35. Beck KD, <i>et al.</i> Nature 1995; 373: 339-41. Tomac A, <i>et al.</i> Nature 1995; 373: 355-9. Gash DM, <i>et al.</i> Nature 1996; 380: 252-5. Choi-Lundberg DL., Science 1997; 275: 838-41. Bozzi Y, Borrelli E. Eur J Neurosci 1999; 11: 1275-84. Chauhan NB, et al Soc Neurosci Abstr 1998; 24: 1465. Chauhan NB, et al Neurology 1999; 52:A212-213.

<i>Enfermedad</i>	<i>Fenotipo Astrocítico</i>	<i>REF</i>
Epilepsia	BDNF, NGF, NT-3, transportador de glutamato	G.W. Mathem, Mol. Chem. Neuropathol. 30 1-2 (1997), páginas 53-76 Lucia Tapia-Arancibia <i>et al.</i> Frontiers in Neuroendocrinology Julio 2004;25(2):77-107 RYUTA KOYAMA y YUJI IKEGAYA; NEUROSCIENCE UPDATE Agosto 2005:11(4):282-7. Gerald Seifert, <i>et al.</i> , Nature Reviews Neuroscience 7, 194-206 (Marzo 2006).
ELA	NT3, IGF1, BDNF, transportador de glutamato	Luis H. <i>Et al.</i> , Brain Research Reviews diciembre 2004;47(1-3):263-74. Bradley WG. Ann Neurol 1995; 38: 971. Haase G, <i>et al.</i> Nat Med 1997; 3:429-36. Arakawa Y, J Neurosci 1990; 10: 3507-15.
neuropatía	NGF	G. Sobue, M. <i>et al.</i> Neurochem. Res. 236 (1998), páginas 821-829.
Adicción a drogas o alcohol	GDNF	Ron D, Janak PH. Rev Neurosci. 2005;16(4):277-85.
Daño cerebral	Habilidad de las células para responder a IL-1	Nancy Rothwell; Brain, Behavior, and Immunity. Junio 2003;17(3):152-7.
Alzheimer	NGF, BDNF	Crutcher KA, <i>et al.</i> J Neurosci 1993; 6: 2540-50. Scott SA, <i>et al.</i> Nerve growth factor in Alzheimer's disease: increased levels throughout the brain coupled with declines in nucleus basalis. J Neurosci 1995; 15: 6213-21. Peng S, <i>et al.</i> J Neuropathol Exp Neurol 2004; 63: 641-9. Murer MG, <i>et al.</i> Neuroscience 1999; 88: 1015-32.
Huntington	BDNF, NT-3, o NT-4/5	Martinez-Serrano A, Bjorklund A. Trends Neurosci 1997; 20: 530-8. Perez-Navarro E, <i>et al.</i> J Neurochem 2000; 75: 2190-9. Perez-Navarro E, <i>et al.</i> Neuroscience 1999; 91: 1257-64.
Esquizofrenia	NGF, NT-3, BDNF	Gal Shoval, Abraham Weizmana; Eur Neuropsychopharmacol. Mayo 2005;15(3):319-29. Levi-Montalcini, R., 1987. Biosci. Rep. 7, 681- 699. Hattori, M., Nanko, S., 1995. Biochem. Biophys. Res. Commun. 209,513-518. Virgos, C., 2001, Schizophr. Res. 49, 65-71.
Nervio óptico	CNTF	Paul A. Sieving, <i>et al.</i> , Proc Natl Acad Sci U S A. Marzo 2006 7;103(10):3896-901.
Ictus	FGF, BDNF	Wu D; Neuro Rx. Enero 2005;2(1):120-8.

5 Se ha propuesto que las células astrocíticas pueden reducir el estrés oxidativo en neuronas metabolizando la dopamina, así como expresando monoaminoxidasa B y catecol-O-metil-transferasa. Adicionalmente, se ha propuesto que las células astrocíticas pueden ser capaces de prevenir la neurotoxicidad generada por NO mediante un mecanismo dependiente de glutatión (Chen *et al.* 2004, Curr Drug Targets. Noviembre 2005;6(7):821-33). Por consiguiente, las células de la presente invención que comprenden una función de expulsión y/o que expresan enzimas metabolizantes de dopamina pueden ser también adecuadas para tratar el Parkinson.

10 Debido a la eliminación insuficiente o a la disminución de los transportadores de glutamato, se ha sugerido la exotoxicidad del glutamato como un factor causante de la ELA [Bendotti 2001, *et al.*, J Neurochem, 79(4):737-746, 2001]. Por lo tanto las células de la presente invención que muestran una actividad transportadora de glutamato elevada pueden ser también adecuadas para tratar la ELA.

15 Por lo tanto, también se describe un método para tratar una enfermedad o trastorno del SNC. Tal como se usa en el presente documento, la frase "enfermedad del SNC" se refiere a cualquier trastorno, enfermedad o afección del sistema nervioso central que puede tratarse con las células descritas anteriormente en el presente documento.

20 Por consiguiente, estas células pueden usarse para preparar un medicamento (indistintamente citado como composición farmacéutica), por lo que dicho medicamento se formula para tratar una enfermedad o trastorno del SNC.

Los ejemplos representativos de enfermedades o trastornos del SNC que pueden beneficiarse del tratamiento con las células descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, un trastorno del dolor, un trastorno

motor, un trastorno disociativo, un trastorno del estado anímico, un trastorno afectivo, una enfermedad o trastorno neurodegenerativo y un trastorno compulsivo.

5 Los ejemplos más específicos de dichas afecciones incluyen, pero no se limitan a, Parkinson, ELA, esclerosis múltiple, enfermedad de Huntington, encefalitis autoinmunitaria, neuropatía diabética, neuropatía glaucomatosa, degeneración macular, temblores de acción y discinesia tardía, pánico, ansiedad, depresión, alcoholismo, insomnio, conducta maníaca, Alzheimer y epilepsia.

10 En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento las células se pueden obtener a partir de cualquier donante humano autólogo o no autólogo (es decir, alogénico o xenogénico). Por ejemplo, las células pueden aislarse de un cadáver o de un sujeto donante

15 Las células pueden administrarse al individuo tratado usando una variedad de estrategias de trasplante, cuya naturaleza depende del sitio del implante.

Los términos o frases "trasplante", "reemplazo celular" o "injerto" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a la introducción de las células en el tejido diana. Las células pueden proceder del receptor o de un donante alogénico o xenogénico.

20 Las células se pueden injertar en el sistema nervioso central o en las cavidades ventriculares o por vía subdural en la superficie de un cerebro hospedador. Las condiciones para el éxito del trasplante incluyen: (i) la viabilidad del implante; (ii) retención del injerto en el sitio de trasplante; y (iii) cantidad mínima de reacción patológica en el sitio de trasplante. Se han descrito métodos para trasplantar diversos tejidos nerviosos, por ejemplo, tejido cerebral embrionario, en cerebros hospedadores en: "Neural grafting in the mammalian CNS", Bjorklund y Stenevi, edición (1985); Freed *et al.*, 2001; Olanow *et al.*, 2003); Estos procedimientos incluyen el trasplante intraparenquimal, es decir, dentro del cerebro hospedador (en comparación con el trasplante fuera del cerebro o extraparenquimal) realizados por inyección o deposición de tejido dentro del cerebro hospedador de modo que se opone al parénquima cerebral en el momento del trasplante.

30 El trasplante intraparenquimal se puede efectuar usando dos estrategias: (i) inyección de células en el parénquima del cerebro hospedador o (ii) preparación de una cavidad por medios quirúrgicos para exponer el parénquima del cerebro hospedador y depositar después el injerto en la cavidad. Ambos métodos proporcionan la deposición parenquimal entre el injerto y el tejido del cerebro hospedador en el momento del injerto, y ambos facilitan la integración anatómica entre el injerto y el tejido del cerebro hospedador. Esto es importante si se requiere que el injerto se convierta en una parte integral del cerebro hospedador y sobreviva durante la vida del hospedador.

40 Como alternativa, el injerto puede colocarse en un ventrículo, por ejemplo, en un ventrículo cerebral o por vía subdural, es decir, en la superficie del cerebro hospedador donde se separa del parénquima del cerebro hospedador por la intervención en la piamadre o aracnoides y piamadre. El injerto en el ventrículo se puede llevar a cabo por inyección de las células donantes o haciendo crecer las células en un sustrato, tal como colágeno al 3 %, para formar un tapón de tejido sólido que pueda implantarse después en el ventrículo para prevenir el desplazamiento del injerto. Para el injerto subdural, las células se pueden injertar alrededor de la superficie del cerebro después de hacer una abertura en la duramadre. Pueden hacerse inyecciones en regiones seleccionadas del cerebro hospedador taladrando un orificio y perforando la duramadre para permitir que se inserte la aguja de una microjeringa. La microjeringa se monta preferentemente en un marco estereotáxico y se seleccionan coordenadas estereotáxicas tridimensionales para colocar la aguja en la localización deseada del cerebro o la médula espinal. Las células también se pueden introducir en el putamen, núcleo basal, corteza hipocámpal, cuerpo estriado, sustancia negra o regiones caudales del cerebro, así como en la médula espinal.

50 Las células también pueden trasplantarse a una región sana del tejido. En algunos casos la localización exacta del área de tejido dañado puede ser desconocida y las células pueden trasplantarse involuntariamente a una región sana. En otros casos, puede preferirse administrar las células a una región sana, evitando de ese modo que se produzca mayor daño en esa región. En cualquier caso, después del trasplante, las células migran preferentemente al área dañada.

55 Para trasplantar, la suspensión celular se prepara en la jeringuilla y se administra a receptores de trasplantes anestesiados. Se pueden hacer múltiples inyecciones usando este procedimiento.

60 El procedimiento de suspensión celular permite por lo tanto el injerto de las células en cualquier sitio predeterminado del cerebro o de la médula espinal, es relativamente no traumático, permite el injerto múltiple simultáneo en varios sitios distintos o en el mismo sitio usando la misma suspensión celular, y permite mezclas de células de distintas regiones anatómicas. Los injertos múltiples pueden consistir en una mezcla de tipos celulares, y/o en una mezcla de transgenes insertados en las células. Preferentemente se introducen de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^8 células por injerto.

65

- Para el trasplante en las cavidades, que pueden ser preferibles para el injerto de médula espinal, se elimina el tejido de regiones próximas a la superficie externa del sistema nervioso central (SNC) para formar una cavidad de trasplante, por ejemplo, tal como describen Stenevi *et al.* (Brain Res. 114:1-20., 1976), eliminando el hueso suprayacente al cerebro y deteniendo el sangrado con un material tal como una espuma en gel. Se puede usar succión para crear la cavidad. Después, el injerto se coloca en la cavidad. Se puede colocar más de un trasplante en la misma cavidad usando inyección de células o implantes de tejido sólido. Preferentemente, el sitio del implante lo estipula el trastorno del SNC que se esté tratando y el fenotipo astrocítico comprendido en la célula (por ejemplo, el factor neurotrófico particular que las células están secretando). Por ejemplo, las células que secretan GDNF se implantan preferentemente en la sustancia negra de un paciente con Parkinson.
- 5 Dado que las células no autólogas probablemente inducen una reacción inmunitaria cuando se administran al organismo, se han desarrollado diversas estrategias para reducir la probabilidad de rechazo de células no autólogas. Estas incluyen bien suprimir el sistema inmunitario del receptor o encapsular las células no autólogas en membranas inmunoaislantes, semipermeables, antes del trasplante.
- 10 Las técnicas de encapsulación generalmente se clasifican como microencapsulación, que implica vehículos esféricos pequeños y macroencapsulación, que implica láminas planas y membranas de fibra hueca más grandes (Uludag, H. *et al.* Technology of mammalian cell encapsulation. Adv Drug Deliv Rev. 2000; 42: 29-64).
- 15 En la técnica se conocen métodos para preparar microcápsulas e incluyen, por ejemplo, aquellos divulgados por Lu MZ, *et al.*, Cell encapsulation with alginate and alpha-phenoxycinnamylidene-acetylated poly(allylamine). Biotechnol Bioeng. 2000, 70: 479-83, Chang TM y Prakash S. Procedures for microencapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms. Mol Biotechnol. 2001, 17: 249-60, y Lu MZ, *et al.*, A novel cell encapsulation method using photosensitive poly(allylamine alpha-cyanocinnamylideneacetate). J Microencapsul. 2000, 17: 245-51.
- 20 Por ejemplo, las microcápsulas se preparan formando complejos de colágeno modificado con un armazón terpolimérico de 2-hidroxietil metilacrilato (HEMA), ácido metacrílico (MAA) y metil metacrilato (MMA), dando como resultado una cápsula 2-5 μm de espesor. Dichas microcápsulas pueden encapsularse además con armazones terpoliméricos adicionales de terpolímeros 2-5 μm para impartir una superficie lisa cargada negativamente y de minimizar la absorción de proteínas plasmáticas (Chia, S.M. *et al.* Multi-layered microcapsules for cell encapsulation Biomaterials. 2002 23: 849-56).
- 25 Otras microcápsulas están basadas en alginato, un polisacárido marino (Sambanis, A. Encapsulated islets in diabetes treatment. Diabetes Technol. Ther. 2003, 5: 665-8) o sus derivados. Por ejemplo, las microcápsulas se pueden preparar por la formación de complejos polielectrolíticos entre los polianiones de alginato de sodio y sulfato de celulosa de sodio con el polication clorhidrato de poli(metilén-co-guanidina) en la presencia de cloruro de calcio.
- 30 Se apreciará que la encapsulación de las células mejora cuando se usan cápsulas más pequeñas. Por lo tanto, el control de calidad, la estabilidad mecánica, las propiedades de difusión, y las actividades *in vitro* de las células encapsuladas mejoraron cuando se redujo el tamaño de la cápsula de 1 mm a 400 μm (Canaple L. *et al.*, Improving cell encapsulation through size control. J Biomater Sci Polym edición 2002;13:783-96). Además, se descubrió que las biocápsulas nanoporosas con tamaño de poro bien controlado, tan pequeño como 7 nm, adaptadas a químicas de superficie y a microarquitecturas precisas, aislaron inmunológicamente de manera satisfactoria los microambientes para las células (Williams D. Small is beautiful: microparticle and nanoparticle technology in medical devices. Med Device Technol. 1999, 10: 6-9; Desai, T.A. Microfabrication technology for pancreatic cell encapsulation. Expert Opin Biol Ther. 2002, 2: 633-46).
- 35 Los ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, ciclosporina A, cloroquina hidroxiclороquina, sulfasalacina (sulfasalazopirina), sales de oro, D-penicilamina, leflunomida, azatioprina, anakirina, infliximab (REMICADE.sup.R), etanercept, bloqueantes del TNF alfa, un agente biológico que se dirige a una citocina inflamatoria, y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los ejemplos de fármacos AINE incluyen, pero no se limitan a, ácido acetil salicílico, salicilato de cloruro de magnesio, diflunisal, salicilato de magnesio, salsalato, salicilato de sodio, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolac, meclofenamato, naproxeno, nabumetona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tolmentina, acetaminofeno, ibuprofeno, inhibidores de la Cox-2 y tramadol.
- 40 En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, las células se pueden administrar bien como tal o, preferentemente, como una parte de una composición farmacéutica que además comprende un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 45 Tal como se usa en el presente documento una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los conjugados químicos descritos en el presente documento, con otros componentes químicos tales como transportadores y excipientes farmacéuticamente adecuados. La finalidad de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un sujeto.
- 50 De aquí en adelante, la expresión "transportador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un transportador o a un diluyente que no causa irritación significativa a un sujeto y que no anula la actividad biológica ni las propiedades del
- 55
- 60
- 65

compuesto administrado. Los ejemplos, sin limitaciones, de transportadores son propilenglicol, solución salina, emulsiones y mezclas de disolventes orgánicos con agua.

5 En el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte que se añade a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidones, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y poli etilenglicoles.

10 Preferentemente, el transportador farmacéutico es una solución acuosa salina. Pueden encontrarse técnicas para la formulación y administración en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

15 Las rutas de administración adecuadas incluyen la administración directa en el tejido u órgano de interés. Por lo tanto, las células se pueden administrar, por ejemplo, directamente en el cerebro, tal como se describe anteriormente, o directamente en el músculo, tal como se describe en el ejemplo 3, más adelante en el presente documento.

20 Para cualquier preparación, la cantidad o dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos *in vitro* y de cultivos celulares. Preferentemente, se formula una dosis en un modelo animal hasta alcanzar una concentración o título deseado. Dicha información se puede usar para determinar con más precisión las dosis útiles en seres humanos.

25 La toxicidad y eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en el presente documento se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o en animales de experimentación. Por ejemplo, pueden usarse los ratones lesionados con 6-OHDA como modelos animales de enfermedad de Parkinson. Además, se puede usar un ensayo con girasoles para ensayar la mejoría en las funciones motoras delicadas, desafiando a los animales a abrir semillas de girasol durante un periodo de tiempo particular.

30 Como modelo de la enfermedad de Huntington se pueden usar ratones transgénicos que comprenden números de repeticiones GAC aumentados que tienen inclusiones intranucleares de huntingtina y ubiquitina en las neuronas del cuerpo estriado y en la corteza cerebral pero no en el tronco cerebral, tálamo, o médula espinal, que coinciden bastante con los sitios de pérdida neuronal en la enfermedad.

35 Los ratones transgénicos se pueden usar como un modelo de la enfermedad de la ELA que comprende mutaciones de SOD-1.

40 La ruta septohipocampal, se secciona unilateralmente cortando la fimbria, imitando el déficit colinérgico de la pérdida de la ruta septohipocampal en la enfermedad de Alzheimer. Por consiguiente los modelos animales que comprenden esta lesión se pueden usar para ensayar las células para tratar el Alzheimer.

Después de la administración de las células se puede analizar la supervivencia y el comportamiento rotacional (por ejemplo, en una barra rotatoria) de los animales (tal como en los Ejemplos 2 y 3).

45 Los datos obtenidos a partir de estos ensayos *in vitro* y de cultivos celulares y en estudios animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. El médico tratante puede seleccionar la formulación, vía de administración y dosificación exacta en vista de la afección del paciente, (véase, por ejemplo, Fingl, *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Capítulo 1, página 1). Por ejemplo, la mejoría de las funciones motoras de un paciente con Parkinson puede controlarse sintomáticamente indicando respuestas positivas al tratamiento.

50 Para la inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer, o un tampón salino fisiológico.

55 La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente a niveles del ingrediente activo que son suficientes para regular eficazmente la síntesis del neurotransmisor por las células implantadas. Las dosificaciones necesarias para conseguir el efecto deseado dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Los ensayos de detección se pueden usar para determinar concentraciones plasmáticas.

60 Dependiendo de la gravedad y de la respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser de una sola administración o de una pluralidad de administraciones, con una duración del ciclo de tratamiento de varios días a varias semanas o hasta que se consiga la disminución de la patología.

La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del individuo que se esté tratando, de la gravedad de la dolencia, del modo de administración, del criterio del médico que la prescribe, etc. La dosificación y el tiempo de administración responderán a un control cuidadoso y continuo del cambio de la afección individual.

- 5 Por ejemplo, a un paciente con tratamiento de Parkinson se le administrará una cantidad de células que sea suficiente para aliviar los síntomas de la enfermedad, basándose en las indicaciones de los controles.

10 Las células de la presente invención pueden coadministrarse con agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, tales como gangliósidos, antibióticos, neurotransmisores, neurohormonas, toxinas, moléculas promotoras de neuritas; y antimetabolitos y precursores de moléculas neurotransmisoras, tales como la L-DOPA. Adicionalmente, las células de la presente invención pueden coadministrarse con otras células capaces de sintetizar un neurotransmisor. Dichas células se describen en la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20050265983 para los presentes inventores.

15 Después del trasplante, las células de la presente invención sobreviven preferentemente en el área de la enfermedad durante un periodo de tiempo (por ejemplo al menos 6 meses), de tal manera que se observa un efecto terapéutico. Tal como se describe en el Ejemplo 2, se demostró que las células de la presente invención eran viables en el hemisferio cerebral de ratones lesionados con 6-OHDA 16 semanas después del trasplante y viables en el modelo de ratón transgénico para ELA 110 días después del trasplante.

20 Tal como se usa en el presente documento el término "aproximadamente" se refiere a \pm el 10 %.

25 Los objetos, ventajas, y nuevas características adicionales de la presente invención serán obvios para un experto habitual en la materia tras el examen de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención, tal como se ha explicado anteriormente en el presente documento y tal como se reivindica más adelante en la sección de reivindicaciones, encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

30 Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención.

35 Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., edición (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (ediciones) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como las expuestas en las Patentes de EE.UU. Nos 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057. "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J. E., edición (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera edición; "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III Coligan J. E., edición (1994); Stites *et al.* (ediciones), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (ediciones), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen de forma extensa en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nos 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521. "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., edición (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., edición. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., edición. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., edición (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos en este respecto se conocen bien en la técnica y se proporcionan por comodidad para el lector.

EJEMPLO 1

60 *Caracterización de CEMO diferenciadas en astrocitos*

MATERIALES Y MÉTODOS

65 *Aislamiento y cultivo de CEMO humanas:* Se recogieron aspiraciones de médula ósea (10-30 ml) de la cresta ilíaca posterior de donantes humanos adultos sanos con consentimiento informado. Las células mononucleares de MO (CMNMO) de baja densidad se separaron por gradiente de densidad FICOL-PAGUE (1.077 g/ml) y se lavaron con

HBSS. A continuación, las células se sembraron en matraces plásticos de poliestireno en medio de cultivo. El medio de cultivo consistió en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal de ternera (FCS) al 15 %, L-glutamina 2 mM, estreptomycin 100 µg/ml, penicilina 100 U/ml, nistatina (SPN) 12,5 unidades/ml. Las células no adherentes se eliminaron con medio de reemplazo. Después de la confluencia, las capas adherentes se sometieron a digestión con tripsina, se resembraron, crecieron hasta la confluencia y se efectuaron de 2 a 6 pases antes de realizar los experimentos. El medio de cultivo se cambió dos veces a la semana y las células se mantuvieron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %.

Diferenciación de astrocitos: Para inducir la diferenciación de los astrocitos, se cultivaron 1X10⁶ células en placas de 10 mm. El medio de las células se reemplazó por el de pre-diferenciación durante 48 horas (DMEM complementado con SPN, L-glutamina 2 mM, factor de crecimiento epidérmico humano hEGF 20 ng/ml (R& D, Systems, Minneapolis, MN), factor de crecimiento básico de fibroblastos humano (hbFGF) y complemento N2 (insulina 5 µg/ml, progesterona 20 nM, putrescina 100 µM, selenio 30 nM, transferrina 100 µg/ml). Después de 48 horas, el medio de pre-diferenciación se cambió por medio de diferenciación, (DMEM complementado con SPN, L-glutamina 2 mM, dibutilil AMP cíclico, dbAMPc, 1 mM, isobutilmetilxantina IBMX 0,5 mM (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EE.UU.), factor de crecimiento derivado de plaquetas humano PDGF 5 ng/ml (peprotech), y neurregulina 1-β1 humana NRG1-β1-GGF-2 50 ng/ml). En algunos experimentos se añadieron IL-1β (100 pg/ml) o Cabergolina (130pg/ml) al medio 24 horas después de la iniciación de la diferenciación.

Inmunohistoquímica: Para el análisis inmunoquímico, las células se cultivaron en cubreobjetos de vidrio redondos de 12 mm recubiertos con poli-L-lisina. Al final del experimento se eliminó el medio, se fijaron las células con paraformaldehído al 4 % (v/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente y después se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,25 % (v/v) en PBS 0,1 M durante 20 minutos. La unión inespecífica se bloqueó incubando las células en una solución de PBS 0,1 M que contenía suero normal de cabra (NGS) al 5 % y albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (Sigma) durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, las células se incubaron en una solución de PBS 0,1 M que contenía Triton X-100 al 0,25 % (v/v) NGS al 5 % y BSA al 1 % con anticuerpos primarios, es decir, anti-proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) de conejo 1:100 (DAKO), anti-GDNF de conejo 1:100 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, EE.UU.). anti- h-Nuc nuclear humano de ratón 1:30, anti-glutamina sintetasa de conejo 1:200 (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EE.UU.), anti S100β de ratón 1:200 (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EE.UU.). Anticuerpos secundarios; para la tinción de GDNF se añadió anticuerpo anti-conejo de cabra biotinilado (1:200) durante 1 hora y posteriormente anticuerpo IgG anti-conejo de cabra conjugado con estreptavidina-Alexa-488 1:200 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.) Para otras tinciones, los anticuerpos IgG anti-conejo conjugado con Alexa-488 1:200 y conjugado con Rodamina-Rx 1:200 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) se diluyeron en una solución de PBS 0,1 M que contenía Triton X-100 al 0,25% (v/v), NGS al 5 % y BSA al 1 % y se aplicaron durante una hora a temperatura ambiente. Se tiñeron los núcleos durante 5 minutos con la tinción nuclear DAPI 1:200 (Sigma, Aldrich). Después de tres aclarados con PBS, se montaron las preparaciones en antidecolorante (Sigma, Israel) y se examinaron usando un microscopio de fluorescencia acoplado a una cámara CCD (T.I.L.L. photonics, Martinsried, Alemania). Las longitudes de onda de excitación (488, 405 y 568 nm para Alexa 488, DAPI y Alexa 568, respectivamente) se generaron usando una lámpara de Xenón acoplada a un monocromador (T.I.L.L. photonics, Martinsried, Alemania). Se adquirieron las imágenes digitales usando filtros apropiados y se combinaron usando el programa informático TILLVISION.

Análisis de GDNF y BDNF: Al final del procedimiento de diferenciación anteriormente descrito, se recopiló el sobrenadante de la placa y se recogieron y se contaron las células. La cantidad de GDNF o BDNF en los lisados celulares y en los sobrenadantes de los cultivos se cuantificó usando un sistema de inmunoensayo para GDNF o BDNF (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La absorbancia a 450 nm se registró en el lector de microplacas (BioRad Modelo 550) y se usaron los valores para producir la curva patrón del GDNF o de BDNF. La curva patrón del GDNF fue lineal entre 15,6 y 1,000 pg/ml. Los resultados del ELISA se calcularon de acuerdo con 10⁶ células por placa.

Evaluación del recuento celular: Para determinar el número de células positivas que expresaban un antígeno particular, se recogieron datos del examen cuidadoso de 15 campos de tres cultivos independientes por muestra. El número total de CMM de estas muestras se determinó contando los núcleos celulares teñidos con DAPI y los resultados se expresaron como porcentajes de células positivas bien para GDNF, glutamina sintetasa, o S 100β.

Preparación de ARNm: Se aisló el ARN total tal y como describen Chomczynski y Sacchi (Anal Biochem 162:156-159, 1987); La células se desestabilizaron con 200 µl de solución D (tiocianato de guanidinio 4 M, citrato de sodio 25 mM, sarcosilo al 0,5 %, 2-mercaptoetanol 0,1 M). Posteriormente, se añadieron 0,1 volúmenes de acetato de sodio 2 M (pH 4), 1 volumen de fenol (saturado) y 0,2 volúmenes de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1). Se dejó reposar las muestras a 4 °C durante 30 minutos, y después se centrifugaron a 10.000Xg durante 20 minutos a 4 °C. La fase acuosa superior se mezcló con 2 volúmenes de etanol y se dejó que el ARN precipitara durante toda la noche a -20 °C. Los sedimentos de ARN finales se lavaron con etanol al 75 %, y se secaron al aire. Los sedimentos se disolvieron en agua tratada con DEPC. La cantidad de ARN se determinó espectrofotométricamente usando el espectrofotómetro ND-1000 (Nano-drop). La calidad del ARN se verificó midiendo la relación DO260/DO280. El ARN se conservó a -80 °C hasta su uso.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa a tiempo real:

La PCR cuantitativa a tiempo real de los genes deseados se realizó en un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (Applied biosystems) usando la mezcla maestra Sybr green para PCR (Applied biosystems) y los siguientes cebadores: GAPDH sentido- 5'-CGACAGTCAGCCGCATCTT-3' (SEC ID N°: 1), GAPDH antisentido 5'-CCAATACGACCAAATCCGTTG -3' (SEC ID N°: 2); GDNF sentido 5'-TCAAATATGCCAGAGGATTATCCTG-3' (SEC ID N°: 3), GDNF antisentido 5'-GCCATTTGTTTATCTGGTGACCTT-3' (SEC ID N°: 4), BDNF sentido 5'-AGCTCCGGGTTGGTATACTGG-3' (SEC ID N°: 5), BDNF antisentido 5'-CCTGGTGGAACTTCTTTGCG-3' (SEC ID N°: 6), GLAST sentido 5'-AGAATGAGCTACC GGAAGTCA-3' (SEC ID N°: 7), GLAST antisentido 5'-CTAGC GCCG CCATTCCT-3' (SEC ID N°: 8); NGF sentido 5'-CATGCTGGACCCAAGCTCA-3' (SEC ID N°: 9); NGF antisentido 5'-GACATTACGCTAT GCACCTCAGTG-3' (SEC ID N°: 10); GFAP sentido TAGAGGGCGA GGAGAACCG -3' (SEC ID N°: 11); GFAP antisentido 5'-GTGGCCTTCTGACACA-GACTTG -3' (SEC ID N°: 12); GLT-1 sentido 5'-TTGGCTCAGAGGA ACCCAAG-3' (SEC ID N°: 13), GLT-1 antisentido 5'-CAGGATGACAC CAAA CACCGT-3' (SEC ID N°: 14); S100 beta sentido 5'-GGGTGAGACAAGGAAGAGGATG-3' (SEC ID N°: 15), S100 beta antisentido 5'-GCTTGTGCTT GTCTCCCTCC-3' (SEC ID N°: 16); Glutamina sintetasa sentido 5'-CGAAGGCCTGCAGAGACC-3' (SEC ID N°: 17), Glutamina sintetasa antisentido 5'-AGGGTATACTCCT-GCTCCATGC-3' (SEC ID N°: 18). El gen GAPDH sirvió como un gen "constitutivo" de referencia válida para los perfiles de transcripción.

Para la cuantificación, se realizó PCR cuantitativa a tiempo real (cPCR) por duplicado. La amplificación por cPCR se realizó para cada muestra en pocillos distintos de la misma placa de reacción de PCR, que también contenía una curva patrón para cada gen amplificado y controles sin molde (CSM). Los parámetros experimentales óptimos (temperatura de hibridación, tiempo de elongación, y concentración de los cebadores se determinaron para cada par de cebadores. Para cada gen, la verificación de un solo pico en el análisis de la curva de fusión evaluó la especificidad del producto de la PCR.

La PCR se realizó en un volumen total de 20 µl que contenía 1 µl del ADNc anteriormente descrito, 1 µl de cada uno de los cebadores 3' y 5' (concentración final de 500 nmol/l cada una), 10 µl de mezcla absoluta TM QPCR SYBR® Green ROX y 8 µl de agua DEPC.

El protocolo de amplificación fue de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos seguido de 60 °C durante 1 min cada uno. Los cálculos cuantitativos el gen de interés frente a GAPDH se realizaron usando el método de la ddCT, tal como se indica en el boletín del usuario del sistema de detección de secuencias N°2 ABI prism 7700 (actualizado 10/2001).

Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR): La RT-PCR se llevó a cabo en 0,5 microgramos de muestras de ARN usando 10 U de la enzima de RT-superscript II (Gibco-BRL, MD, EE.UU) en una mezcla que contenía oligo-dT12-18 1,3 µM (Sigma, EE.UU.). Tampón 1x proporcionado por el fabricante, DTT 10 mM, dNTP 20 µM, e inhibidor de RNasa (RNA-guard, amersham farmacia biotech, G.B.). La transcripción inversa se realizó a 42 °C durante 2 horas. La PCR de los genes deseados se realizó con cebadores específicos en una mezcla que contenía 2 µl de tampón 1X de RT (Takara, Japón), dNTP 200 µM, 1 µM de cada cebador y 5 U unidades de Taq polimerasa (Takara, Japón) seguido de 25-30 ciclos en el Termociclador: 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y extensión del ADN a 72 °C durante 45 segundos. En esas condiciones experimentales, se observó la linealidad de amplificación.

La RT-PCR se realizó en hCEMO no diferenciadas y en hCEMO diferenciadas de acuerdo con el método de la presente invención. La expresión de los genes se comparó entre los dos tipos celulares y respecto a la expresión en astrocitos (a partir de la información obtenida de la bibliografía). Las secuencias de los cebadores se detallan en la siguiente Tabla 2

Tabla 2

GEN	CEBADOR 5'	CEBADOR 3'	NCBI
CD90	ctagtggaccagagccttcg SEC ID N°: 19	gccctcacacttgaccagt SEC ID N°: 20	NM6288
CD34	aaggagcagggagcatcac SEC ID N°: 21	tgcattgtgcagactccttc SEC ID N°: 22	NM1773
CD133	gatgcagaactgacaacg SEC ID N°: 23	acacagtaagcccaggtagt SEC ID N°: 24	NM006017
Nestina	ccagaaactcaagcaccac SEC ID N°: 25	tttccactccagccatcc SEC ID N°: 26	X65964
H-NF	aaagcaccaaggactcact SEC ID N°: 27	ttctcagacttctccaccac SEC ID N°: 28	NM021076

GEN	CEBADOR 5'	CEBADOR 3'	NCBI
TH	gaggggaaggccgtgctaaa SEC ID N°: 29	gaggcgcacgaagtactcca SEC ID N°: 30	NM000360
NGFR	ctacggctactaccaggatg SEC ID N°: 31	ctggctatgaggctctgttc SEC ID N°: 32	NM002507
GDNF	tcaaatatgccagaggattatcctg SEC ID N°: 33	gccattgtttatctggtgacctt SEC ID N°: 34	NM199231.1
NGF	catgctggaccaagctca SEC ID N°: 35	gacattacgctatgcacctcagt SEC ID N°: 36	NM002506.2
IGF1	tcagctcgctctgtccgtg SEC ID N°: 37	ttgctgtcttcaaatgtacttctt SEC ID N°: 38	NM000618
BDNF	agctccgggttggtatactgg SEC ID N°: 39	cctggtggaacttcttggcg SEC ID N°: 40	NM1707323
CNTF	cctgactgctcttacggaatcctat SEC ID N°: 41	cccattccgagagtccag SEC ID N°: 42	NM000614.2
GFAP	tagagggcgaggagaaccg SEC ID N°: 43	gtggcctctgacacagacttg SEC ID N°: 44	NM003054
S100b	gggtgagacaaggaagaggatg SEC ID N°: 45	gcttggtctgtctccctcc SEC ID N°: 46	NM006272.1
Neurotrofina NT3	gacttcagagaacaataaactcgtgg SEC ID N°: 47	tgccaattcatgttcttccg SEC ID N°: 48	NM002527.3
GLAST	agaatgagctaccggaagtca SEC ID N°: 49	ctagcgcgccattctt SEC ID N°: 50	Nm004172.3
GLUL	cgaaggcctgcagagacc SEC ID N°: 51	agggtatactctgtccatg SEC ID N°: 52	NM02065.4
GLT1	ttggctcagaggaaccaag SEC ID N°: 53	caggatgacaccaaacaccgt SEC ID N°: 54	D85884
GAPDH	cgacagtcagccgcatctt SEC ID N°: 55	ccaatacgaccaaataccgttg SEC ID N°: 56	NM002046

5 *Microscopía electrónica de barrido:* Las células se fijaron con glutaraldehído al 2,5 % en tampón fosfato (pH 7,2), se lavaron en el mismo tampón y se fijaron -posteriormente con OsO₄ al 2 %. La tercera etapa de fijación se realizó usando una solución de ácido tánico y clorhidrato de guanidina. Las células triplemente fijadas se deshidrataron en soluciones con grados crecientes de alcohol. Después se cambió el alcohol por Freon-112 usando soluciones con grados crecientes de Freon. Se secaron las células al aire, se recubrieron de oro y se examinaron usando un microscopio electrónico de barrido Jeol 840.

10 *Captación de glutamato:* La caracterización funcional de los transportadores de glutamato se realizó en células tripsinizadas diferenciadas. La velocidad de transporte se estimó midiendo la captación de [³H]-d-aspartato (20 nM) después de una incubación de seis minutos a 37 °C en un tampón que contenía Na⁺. La actividad específica de los transportadores de glutamato se expresó como la velocidad de captación por la cantidad de proteína en mg.

15 RESULTADOS

20 Las hCEMO diferenciadas de acuerdo con el método de la presente invención adquirieron una morfología similar a la de los satélites que se asemejaba a la de los astrocitos mientras que las células control que crecieron solo en medio asérico, presentaban una morfología plana similar a la de los fibroblastos característica de las hCEMO (Figuras 1A-B). También se analizaron las células diferenciadas usando un microscopio electrónico de barrido que confirmó su morfología exclusiva de astrocitos satélite (Figuras 2A-D).

25 El fenotipo astrocítico de las células se verificó adicionalmente usando análisis de inmunofluorescencia con marcadores típicos de astrocitos. Tal como se ilustra en las Figuras 3A-B, el cambio morfológico vino acompañado con la inmunotinción positiva para S100 beta, (una subunidad de los canales de Ca⁺ de astrocitos) y glutamina sintetasa (GS), (una enzima exclusiva de astrocitos que cataboliza el glutamato). Además, las eran células positivas para la tinción con proteína fibrilar de la glía (GFAP) (Figura 4A).

La cuantificación de los datos de la tinción inmunocitoquímica reveló que el porcentaje de las células positivas para la S100 beta, GFAP y GS está en el intervalo del 20-30 %.

5 Para confirmar adicionalmente la expresión de marcadores astrocíticos, se realizó el análisis por PCR a tiempo real. Tal como se demuestra en la Figura 4B, el transcrito de GFAP se reguló positivamente 10-20 veces. Se mostraron valores similares en los transcritos de S 100 beta y GS.

10 Dado que los astrocitos son conocidos por su secreción de factores neurotróficos (NTF), se analizaron los niveles de ARNm de NTF tales como GDNF, NGF y BDNF. El análisis por PCR a tiempo real reveló que las hCEMO diferenciadas a astrocitos expresaron altas cantidades de transcritos de NTF en comparación con la ausencia o los pocos de estos transcritos en las CMM que crecieron en medio asérico (Figura 5). La inmunotinción con anti-GDNF reveló que el 30 % de las células cultivadas se tiñeron positivamente con el anticuerpo (Figuras 6A-B).

15 Se usó un ensayo ELISA con anticuerpos específicos para cuantificar la producción y secreción de los NTF. La medición de la producción de GDNF se ensayó en el extracto celular (Figura 7) y en el medio de cultivo Figura 8A. A pesar de que se detectó un nivel basal de producción de GDNF en las CMM cultivadas y en la línea celular de neuroblastoma (SH-SY5Y tratada con rasageleina), GDNF solamente se detectó en el medio de cultivo de las CMM diferenciadas.

20 Además, se detectó una marcada potenciación de la producción y secreción de GDNF después de la adición de IL-1 beta y cabergolina, factores que se sabe que regulan el GDNF. Este fenómeno confirma la idea de que las células diferenciadas responden como astrocitos. Los niveles de GDNF y NGF secretados se compararon en varios donantes y se puede ver que los niveles de secreción varían entre 69-140 pg/10⁶ células para GDNF (Figura 8B) y 356-875 pg/10⁶ células para NGF (Figura 8C).

25 Los astrocitos juegan un papel importante en el mantenimiento de la baja concentración de glutamato extracelular por eliminación del glutamato por medio de transportadores de glutamato de alta afinidad y catabolizándolo por la glutamina sintetasa. Por lo tanto, se analizaron las células diferenciadas, usando análisis de RT-PCR para la expresión de transportadores de glutamato y glutamina sintetasa. Se encontró un nivel alto de expresión del transcrito de GLT-1/EAAT-2 en hCEMO diferenciadas a astrocitos (Figura 9). La actividad del transportador de glutamato fue evidente por la captación de ³H-glutamato del medio de cultivo de las células diferenciadas pero no de las CMM (p<0,005) (Figura 10).

35 Se realizó un análisis por RT-PCR más detallado para determinar que marcadores de células mesenquimales y que marcadores de células astrocíticas se expresaron en las células de la presente invención. La expresión de los genes en los dos tipos celulares también se comparó con la expresión de los genes en los astrocitos (información obtenida de la bibliografía). Los resultados se resumen en la Tabla 3 siguiente.

Tabla 3

GEN	hCMM	DIF	Astrocitos
CD90	+	+	-
CD34	-	-	-
CD133	-	-	-
Nestina	++	+	+/+++/-
H-NF	+	+	-
TH	+	+	-
NGFR	+	+	+++
GDNF	+	++	+++
NGF	+	+++	+++
IGF1	+	++	+++
BDNF	+	++	+++
CNTF	ND	ND	+++
GFAP	+	+++	+++
S100b	+	++	+++

Neurotrofina NT3	+	+	+++
GLAST	+	++	+++
GLUL	+	++	+++
GLT1	+	++	+++
GAPDH	+	+	+

Por lo tanto, se puede ver que las células diferenciadas muestran un fenotipo específico que es distinto tanto de las células madre mesenquimales como de los astrocitos. Por ejemplo, las células expresan CD90, tirosina hidroxilasa y H-NF diferenciándose de los astrocitos. Además, las células de la presente invención expresan niveles altos de factores neurotróficos y marcadores de astrocitos, diferenciándose de las células madre mesenquimales.

EJEMPLO 2

El trasplante intraestratial de hCEMO diferenciadas a células similares a astrocitos mejoran las funciones motoras de ratas lesionadas

Para explorar el posible potencial terapéutico de las células de la presente invención, las HCEMO diferenciadas de acuerdo con el método de la presente invención se trasplantaron en un modelo de rata establecido de enfermedad de Parkinson.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales Se usaron ratas macho Sprague-Dawley (Harlan, Israel) que pesaban 220-280 g para el experimento de la lesión con 6-OHDA. Todos los animales se dispusieron en condiciones convencionales; temperaturas constantes (22 ± 1 °C), humedad (relativa, 30 %), 12 h de luz: ciclo de oscuridad 12-h y acceso libre al alimento y al agua. Los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo supervisión del Comité de Cuidados Animales del Rabin Medical Center en la Universidad de Tel Aviv, Tel Aviv, ISRAEL.

Lesiones con 6-OHDA: Se anestesiaron las ratas con hidrato de cloral, 350 mg/kg i.p., y se sujetaron en un marco estereotáxico (Stoelting, EE.UU.). A los animales se les inyectó unilateralmente bromhidrato de 6-OHDA (12 µg/6 µl disueltos en una solución salina de ascorbato) usando una jeringa Hamilton de 10 µl con una aguja de calibre 26, en el cuerpo estriado izquierdo en los dos sitios (6 µl por cada sitio a dos profundidades). Las coordenadas de las inyecciones fueron las siguientes: (1) AP: +0,5, mm del bregma, L: -2.5, mm del lateral al medio, V: -6.5 mm de la superficie ventral a la dural, y (2) AP: -0,5 mm, L: -3,7 mm, V: -6.0 mm, en base al atlas estereotáxico (Paxinos & Watson, 1986). A la finalización de la inyección, se dejó la cánula en su lugar durante otros 3 minutos antes de retirarla a 1 mm/min para impedir la formación de vacío.

Medición del comportamiento rotacional: Se ensayó el comportamiento de rotación de las ratas lesionadas 14 días después de la inyección intracerebral de 6-OHDA. Se controló la asimetría motora en un aparato medidor de rotación automatizado durante 1 hora después de la inyección subcutánea del agonista de DA, la apomorfina (Sigma, 0,15 mg/kg, disuelta en solución salina normal). La apomorfina induce un comportamiento de rotación contralateral al lado de la lesión original porque los receptores de DA del cuerpo estriado se vuelven hipersensibles como resultado de la lesión con 6-OHDA. Se consideró que las ratas con una velocidad de rotación de cinco vueltas por minuto eran un modelo de EP establecido y se usaron para los experimentos de injerto. Este ensayo se usa ampliamente como un índice fiable de empobrecimiento de dopamina en el cuerpo estriado.

Trasplante: Seis semanas después de la lesión con 6-OHDA, las ratas del modelo de EP se dividieron en dos grupos, un grupo control y un grupo experimental. A las ratas del grupo control (n=7) se les inyectó solución salina al 0,9 %. A las ratas del grupo experimental (n=6) se les injertaron células productoras de GDNF. Las células hCEMO similares a astrocitos se recogieron antes del trasplante y se resuspendieron a 5×10^5 células vitales/5µl en solución salina. Las células se inyectaron estereotáxicamente en el cuerpo estriado izquierdo en un sitio a las dos profundidades (2, µl por cada una) a través de una aguja de calibre 26 de una jeringa Hamilton de 10 µl. Las coordenadas usadas para la inyección fueron las siguientes: (1) AP: +1,0 mm, L: +3,0 mm, V: -5,0 mm, y (2) AP: +1,0 mm, L: +3,0 mm, V: -4,1 mm, con el dentado helicoidal ajustado al nivel de la línea interaural. Después de la operación, los animales se sometieron a ensayos de rotación cada dos semanas tal como se describe anteriormente. En el caso del trasplante de CMM humanas, se inmunosuprimió a los animales mediante inyección subcutánea diaria de Sandimmune (10 mg/kg/día; Novartis).

Barra Rotatoria: Tres meses después del trasplante, se ensayó el rendimiento en una tarea de barra rotatoria. La tarea consistió en tres pruebas consecutivas en las que las ratas se colocaron en la barra y se las retó (hasta 16 RPM) a que evitaran caerse de la barra en aceleración. Cada prueba continuó hasta un máximo de 2 minutos. El intervalo entre las pruebas fue de 30 segundos. Los resultados se obtuvieron a partir de dos ensayos semanales.

Ensayo con girasol: El propósito de este ensayo era retar a los animales a abrir semillas de girasol durante un tiempo máximo de 5 minutos. Para realizar el ensayo a los animales se les denegó el acceso a la comida y se les suministraron solamente 45 mg/kg/día tres días antes de empezar los controles. Se entrenó a los animales durante 3 días y al cuarto y quinto día, se tomaron mediciones. Se colocaron los animales en jaulas vacías y se les suministraron semillas durante 5 minutos. Se midió el número de semillas abiertas e ingeridas [Gonzalez C., Kolb B. A comparison of different models of stroke on behavior and brain morphology. *E. J. Neuroscience* 18 (1950-1962), 2003].

Inmunohistoquímica: 16 semanas después del trasplante se sometió a inmunotinción tanto al grupo control como al de tratamiento. Se anestesió profundamente a las ratas con hidrato de cloral (350 mg/kg i.p) y se les perfundieron por vía transcardiaca 65 ml de solución salina fría, seguido de 250 ml de paraformaldehído al 4 % frío en PBS 0,1 mol/l (pH 7,4). Se extirparon los cerebros, se colocaron en PFA/PBS al 4 % durante 48 horas, seguido de crioprotección en sacarosa al 20 %/PBS durante 48 horas, y después se congelaron isopentano sobre hielo seco. Se cortaron secciones coronales en serie del cerebro a 20 µm de espesor en un criostato microtomo. Las secciones se lavaron 3 veces en PBS, y posteriormente se bloquearon en suero de caballo normal al 5 % (Biological Industries) en PBS durante 1 hora. Posteriormente, se incubaron las secciones durante 24 horas en la misma solución que contenía anticuerpos primarios contra núcleos humanos (1:30; monoclonal de ratón; Chemicon International, Temecula, CA, EE.UU.), contra GDNF (1:200; policlonal de conejo, Santa Cruz) y contra GFAP (1:100, de conejo DAKO). Después se lavaron las secciones tres veces en PBS y se expusieron a los anticuerpos secundarios: IgG de cabra anti-ratón (1:500; Jackson Immuno Research Laboratories Inc., West Grove, PA, EE.UU) acoplado con rodamina; e IgG de cabra anti-conejo conjugado con Alexa-488 (1:500 Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.) aplicados durante 1 hora a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron durante 5 minutos con la tinción nuclear DAPI 1:200 (Sigma). Finalmente, las secciones se aclararon en PBS 0,1 M y los cubreobjetos se montaron con glicerol al 95 %. Los experimentos de inmunotinción se llevaron a cabo bien omitiendo: (i) anticuerpo primario, (ii) anticuerpo secundario, y (iii) tanto anticuerpo primario como secundario.

RESULTADOS

Se inyectó 6-hidroxidopamina en el cuerpo estriado de los cerebros de rata para inducir daño moderado de las neuronas dopaminérgicas en el cuerpo estriado. El grado de la lesión se midió tres semanas después por inyección de apomorfina que condujo a las rotaciones ipsilaterales. Se injertaron células similares a astrocitos (5×10^5) en el cuerpo estriado ipsilateral de ratas que se preseleccionaron basándose en su rendimiento rotacional. El comportamiento rotacional inducido por el fármaco se midió en las ratas trasplantadas así como en las ratas inyectadas con solución salina a los 60, 75 y 105 días después del trasplante. Durante el experimento, a ambos grupos se les inyectó ciclosporina diariamente para impedir el rechazo del injerto. Tal como se ilustra en la Figura 11, las rotaciones inducidas con apomorfina disminuyeron de una media de 160 rotaciones por hora al inicio a 60 por hora a los 75 días en las ratas trasplantadas (n=8), y 50 rotaciones por hora 105 días después del trasplante (reducción del 68 % y 75 % $p < 0,05$). El grupo control (n=8) rotó 155 veces por hora al inicio y 140 después de 105 días (sin reducción significativa).

95 días después del trasplante, se realizó un ensayo de barra rotatoria no farmacológico para proporcionar una medida de los déficits motores. Los animales trasplantados con células similares a astrocitos fueron capaces de caminar durante un periodo de tiempo más largo en la barra en aceleración que los controles (Figura 12).

El ensayo de la ingesta de semillas de girasol también se aplicó a los animales. 100 días después del trasplante se evaluó la capacidad de los animales para abrir las semillas de girasol en un tiempo limitado (véase métodos). Los animales trasplantados abrieron 44 semillas en 5 minutos en comparación con los controles que abrieron 44 en el mismo tiempo ($p < 0,05$) (Figura 13).

110 días después del trasplante los animales se sacrificaron y se realizaron estudios histológicos para identificar y caracterizar las células trasplantadas. Se usaron anticuerpos anti-antígeno nuclear humano y anti-GFAP para identificar las células trasplantadas diferenciadas (Figuras 14A-E). Los estudios de inmunotinción y de microscopía confocal revelaron que hasta el 25 % de las células que fueron positivas para el antígeno humano también fueron positivas para GFAP. Estos resultados indican que las células similares a astrocitos son capaces de restaurar el déficit en dopamina del cuerpo estriado y probablemente son beneficiosas en otra enfermedad neurodegenerativa.

EJEMPLO 3

El trasplante intramuscular de hCEMO diferenciadas a células similares a astrocitos mejora las funciones motoras de un modelo de ratón transgénico de ELA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo animal: La colonia de ratones transgénicos TgN (SOD1-G93A)1Gur (Gurney 1994) se obtuvo en el laboratorio Jackson (EE.UU.). Los ratones se cruzaron con los CSJLF1 y la descendencia se genotipificó a un mes

de vida mediante análisis por PCR, usando los siguientes cebadores de la PCR: cebador aguas arriba de hSOD1 (SEC ID N°: 19) 5'CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT3'; cebador aguas abajo de hSOD1 (SEC ID N°: 20) 5'GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC3'; cebador aguas arriba de IL2 (SEC ID N°: 21) 5'CATCAGCCCTAATCCATCTGA3'; cebador aguas abajo de IL2 (SEC ID N°: 22) 5'CGCGACTAACAAATCAAAGTGA3'. La temperatura de hibridación fue de 53 °C, los productos de la PCR fueron de 236 pb (hSOD1), 324 pb (IL2). Los ratones a usar en este estudio estaban sanos hasta los 3 meses de vida y se paralizaban completamente entre los 4 y 5 meses de vida. La Universidad de Tel-Aviv aprobó y supervisó los experimentos con animales.

10 *Trasplante de células y comportamiento:* El día 40, se trasplantaron $0,5 \times 10^6$ células astrocíticas humanas diferenciadas (preparadas tal como se describe en el Ejemplo 1) en el interior del músculo gastrocnémico en dos patas. Se evaluó el rendimiento motor cada dos semanas con un aparato de barra rotatoria con rotaciones aceleradas.

15 *Evaluación histopatológica:* Se sacrificaron los ratones el día 110 y las patas se pusieron en paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4, 4 °C. Se prepararon bloques de parafina y se realizó la tinción inmunológica con anticuerpos anti-antígenos humanos.

20 *Análisis estadístico:* Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA con ensayo de Dunnett retrospectivo cuando estaban implicados más de dos grupos. Si los datos no se distribuían normalmente, se usaba un ensayo no paramétrico (ensayo de U de Mann-Whitney) para la comparación de los resultados. Los datos se expresaron como media \pm e.t.m.

RESULTADOS

25 Las células diferenciadas en astrocitos ($0,5 \times 10^6$) se trasplantaron el día 40, en los ratones hmSOD (n=8) por vía intramuscular (pata). Al grupo paralelo se le inyectó solución salina. Además se usaron ratones de tipo silvestre (n=8) y ratones mhSOD Tg (n=8) como controles positivos y negativos.

30 La evaluación del comportamiento se realizó en una barra rotatoria (ver M&M) desde el día 40 y hasta la muerte (día 120-140) cada dos semanas. Tal como se ve en la Figura 15, la reducción en el rendimiento motor (es decir, los síntomas de ELA) se retrasó significativamente en los ratones a los que se les trasplantaron las células.

35 Se midió el peso de los animales y se comparó entre el grupo trasplantado y los controles y se analizaron estadísticamente. El grupo control mostró una reducción de peso significativamente mayor ($p < 0,05$) que el grupo trasplantado (Figura 16).

40 Un estudio histológico que se realizó el día 110 con anticuerpos anti-antígeno nuclear humano indicó que las células injertadas sobrevivieron (Figura 17A-C).

45 Se aprecia que ciertas características de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones distintas, también pueden proporcionarse en combinación con una sola realización. Por otro lado, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, pueden proporcionarse también por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

50 A pesar de que la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que numerosas alternativas, modificaciones y variaciones serán obvias para los expertos en la materia. Además, la cita o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no se considerará como una admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ramot At Tel Aviv University Ltd. Offen, Daniel Bahat-Stromza, Merav Melamed, Eldad

55 <120> CÉLULAS AISLADAS Y POBLACIONES QUE COMPRENDEN A LAS MISMAS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DEL SNC.

<130> 31988

60 <160> 56

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

65 <211> 19

<212> ADN

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

5 <400> 7
 agaatgagct accggaagt ca 22

<210> 8
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

15 <400> 8
 ctagcggcgc cattcct 17

<210> 9
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

25 <400> 9
 catgctggac ccaagctca 19

<210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

35 <400> 10
 gacattacgc tatgcacctc agtg 24

<210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

45 <400> 11
 tagagggcga ggagaaccg 19

<210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

55 <400> 12
 gtggccttct gacacagact tg 22

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

65

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 5 <400> 13
 ttggctcaga ggaaccaag 20
 <210> 14
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 15 <400> 14
 caggatgaca ccaaacaccg t 21
 <210> 15
 <211> 22
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 25 <400> 15
 gggtagaca aggaagagga tg 22
 <210> 16
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 35 <400> 16
 gcttgctt gtctccctcc 20
 <210> 17
 <211> 18
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 17
 50 cgaaggcctg cagagacc 18
 <210> 18
 <211> 22
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 60 <400> 18
 aggtatact cctgctccat gc 22
 <210> 19
 <211> 20
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 5 <400> 19
 gccctcacac ttgaccagtt 20
 <210> 20
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 15 <400> 20
 ctagtggacc agagccttcg 20
 <210> 21
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 25 <400> 21
 tgcatgtgca gactccttc 20
 <210> 22
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 35 <400> 22
 aaggagcagg gagcatac 18
 <210> 23
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 45 <400> 23
 acacagtaag cccaggtagt 20
 <210> 24
 <211> 19
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 55 <400> 24
 gatgcagaac tgacaacg 19
 <210> 25
 <211> 19
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 5 <400> 25
 tttccactc cagccatcc 19
 <210> 26
 <211> 19
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 15 <400> 26
 ccagaaactc aagcaccac 19
 <210> 27
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 25 <400> 27
 ttctcagact tctccaccac 20
 <210> 28
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 28
 40 aaagcaccaa ggactcact 19
 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 29
 50 gaggcgcacg aagtactcca 20
 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 60 <400> 30
 gaggggaagg ccgtgctaaa 20
 <210> 31
 <211> 20
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

5 <400> 31
 ctggctatga ggtctgttc 20

<210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

15 <400> 32
 ctacggctac taccaggatg 20

<210> 33
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

25 <400> 33
 gccattgtt tatctggtga cctt 24

<210> 34
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

35 <400> 34
 tcaaatatgc cagaggatta tcctg 25

<210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

45 <400> 35
 gacattacgc tatgcacctc agtg 24

<210> 36
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

55 <400> 36
 catgctggac ccaagctca 19

<210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

65

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 5 <400> 37
 ttgcgttctt caaatgtact tcct 24
 <210> 38
 <211> 19
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 15 <400> 38
 tcagctcgct ctgtccggtg 19
 <210> 39
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 25 <400> 39
 cctggtggaa cttcttgcg 20
 <210> 40
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 35 <400> 40
 agctccgggt tggatactg g 21
 40 <210> 41
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 41
 50 cccatccgca gaggccag 18
 <210> 42
 <211> 25
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 60 <400> 42
 cctgactgct cttacggaat cctat 25
 <210> 43
 <211> 22
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 5 <400> 43
 gtggccttct gacacagact tg 22
 <210> 44
 <211> 19
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 15 <400> 44
 tagagggcga ggagaaccg 19
 <210> 45
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 25 <400> 45
 gcttgtgctt gtctccctcc 20
 <210> 46
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 35 <400> 46
 gggtgagaca aggaagagga tg 22
 <210> 47
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 47
 50 tgccaattca tgttctccg 20
 <210> 48
 <211> 26
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 60 <400> 48
 gactcagag aacaataaac tcgtgg 26
 <210> 49
 <211> 17
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 5 <400> 49
 ctagcggcgc cattcct 17
 <210> 50
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 15 <400> 50
 agaatgagct accggaagt ca 22
 <210> 51
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 25 <400> 51
 aggtatact cctgctccat g 21
 <210> 52
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 35 <400> 52
 cgaaggcctg cagagacc 18
 <210> 53
 <211> 21
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 45 <400> 53
 caggatgaca ccaaaccg t 21
 <210> 54
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 60 <400> 54
 ttggctcaga ggaaccaag 20
 <210> 55
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

5 <400> 55
ccaatacgac caaatccggt g 21

<210> 56
<211> 19
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

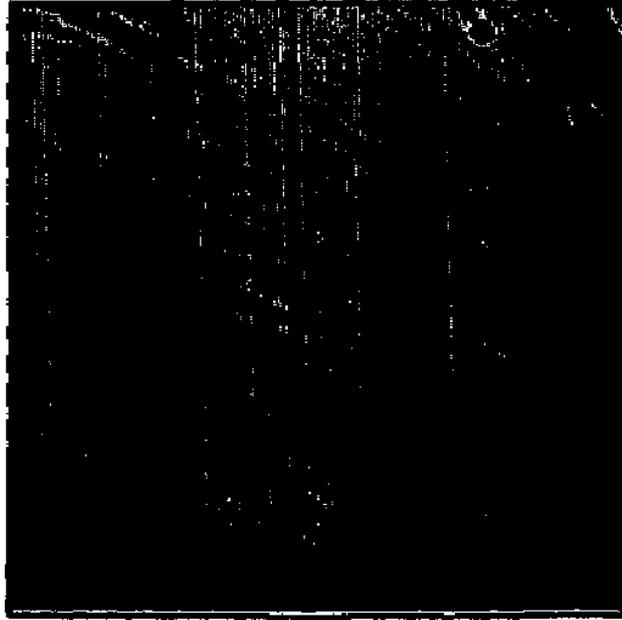
15 <400> 56
cgacagtcag ccgcatctt 19

20

REIVINDICACIONES

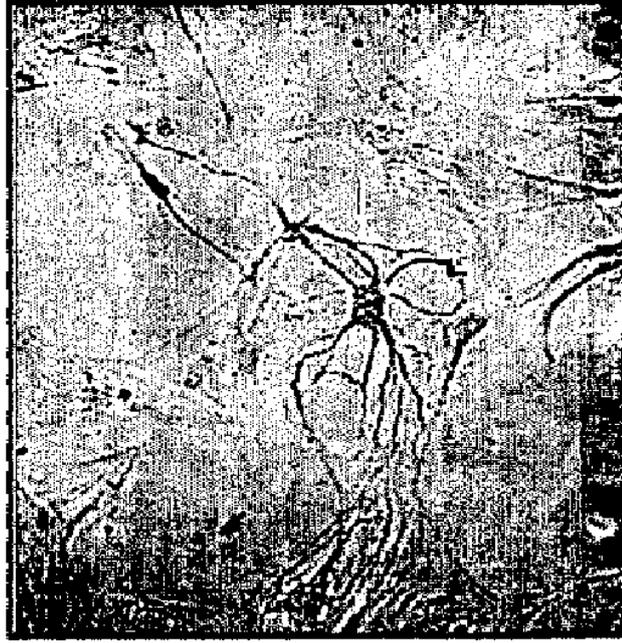
1. Un método para generar células similares a astrocitos, que comprende:
 - 5 (a) incubar células madre mesenquimales en un medio que comprende un factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) y un factor de crecimiento básico de fibroblastos humano (hbFGF) para generar células predispuestas a generar células similares a astrocitos ; y
 - 10 (b) incubar dichas células predispuestas en un medio de diferenciación que comprende un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y una neurregulina 1-β1 humana, generando de este modo células similares a astrocitos.
2. El método de la reivindicación 1, en el que una duración de dicha incubación en la etapa (b) es de aproximadamente 48 horas.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que una concentración de dicho PDGF es de aproximadamente 5 ng/ml.
4. El método de la reivindicación 1, en el que una concentración de dicha neurregulina 1-β1 humana es de aproximadamente 50 ng/ml.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, en el que dicho medio de diferenciación comprende adicionalmente L-glutamina, dibutiril AMPcíclico e isobutilmetilxantina IBMX.
6. El método de la reivindicación 1, en el que una concentración de hEGF es de aproximadamente 20 ng/ml.
- 25 7. El método de la reivindicación 1, en el que una concentración de hFGF es de aproximadamente 20 ng/ml.

FIG. 1A



CMM

FIG. 1B



CMM después de la diferenciación

FIG. 2B



FIG. 2D



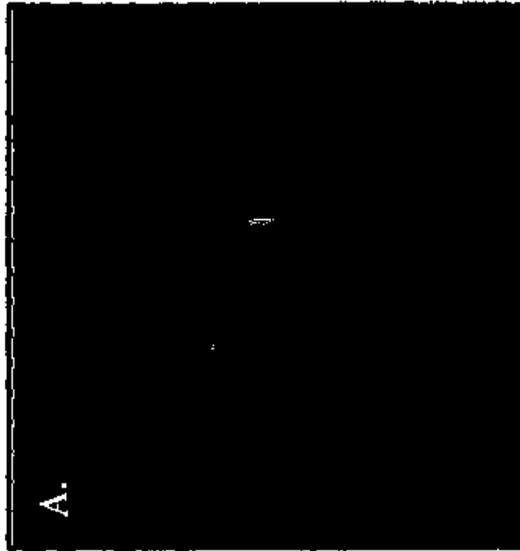
FIG. 2A



FIG. 2C

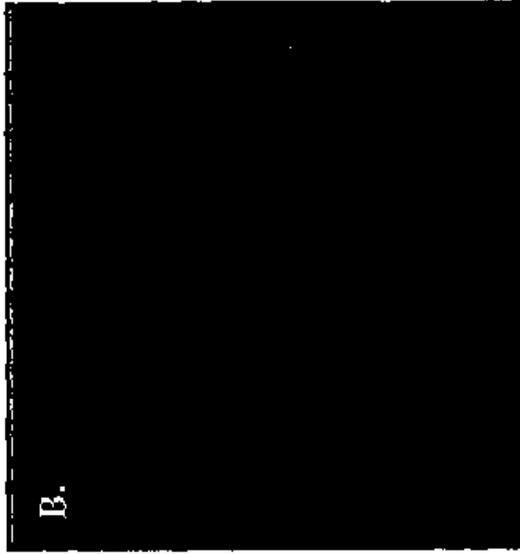


FIG. 3A



Anti S100- β

FIG. 3B



**Anti Glutamina
sintetasa**

FIG. 4A

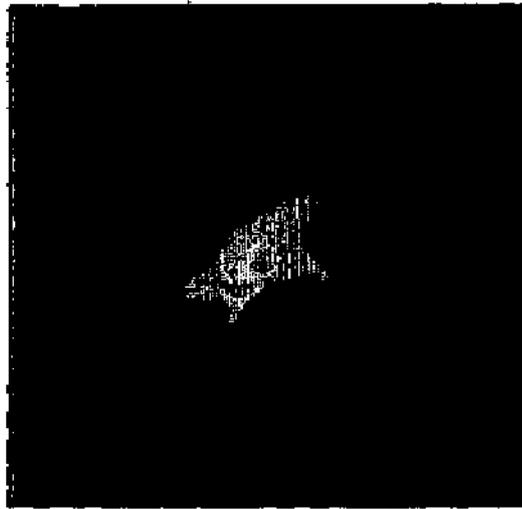


FIG. 4B

PCR a tiempo real

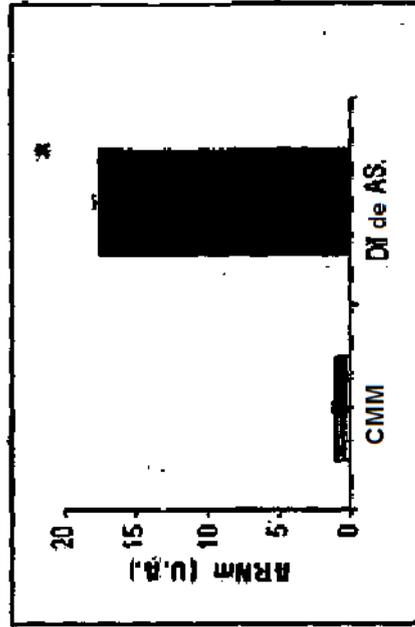


FIG. 5

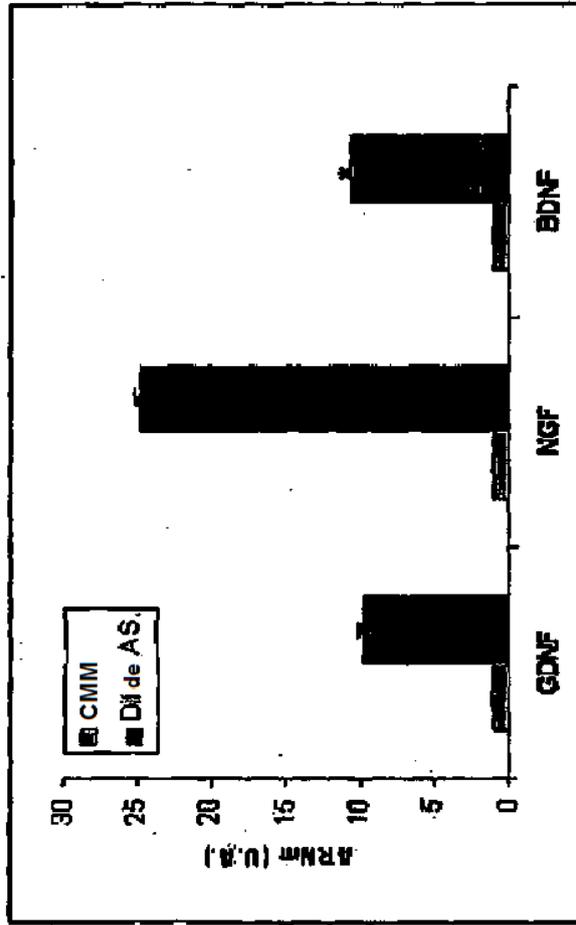


FIG. 6A

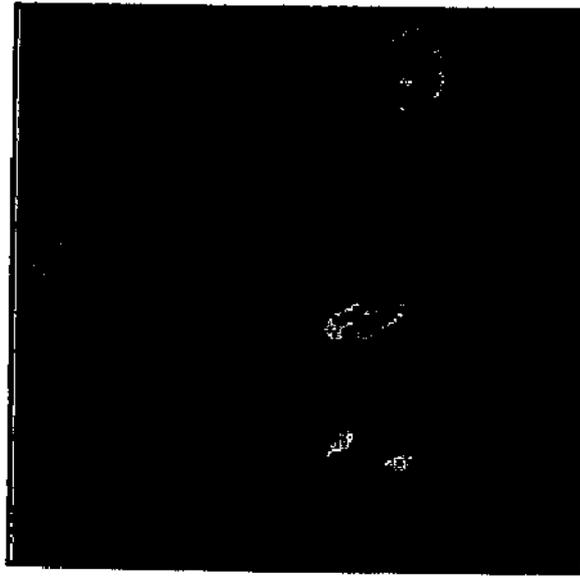


FIG. 6B

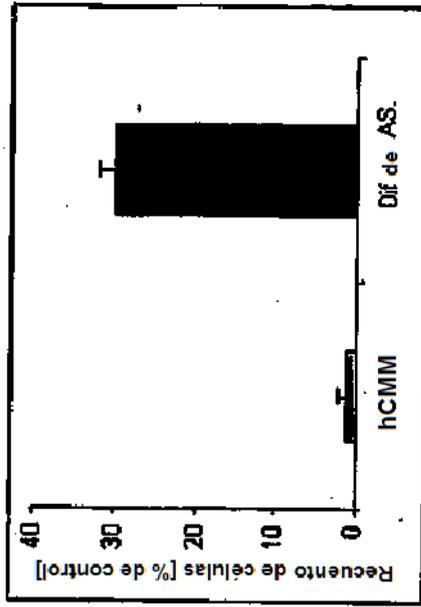
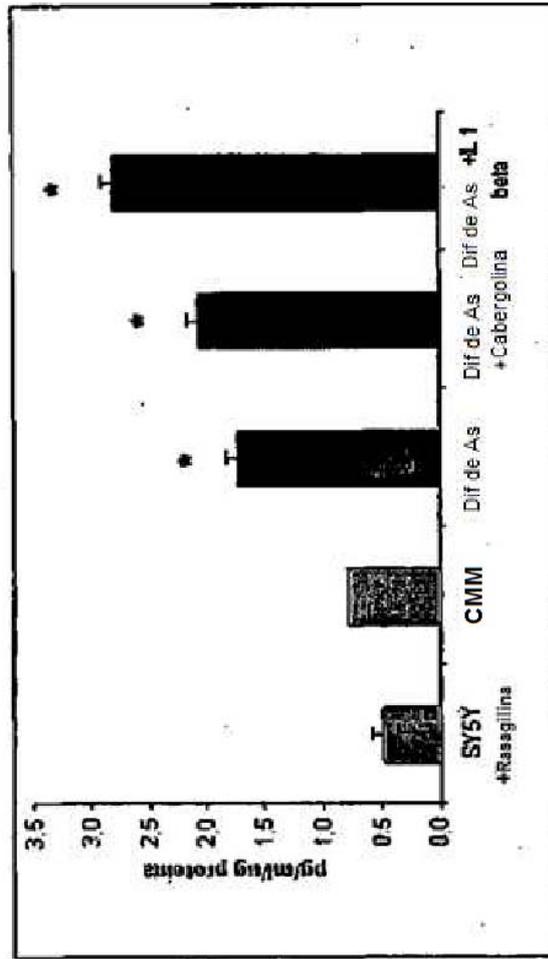


FIG. 7



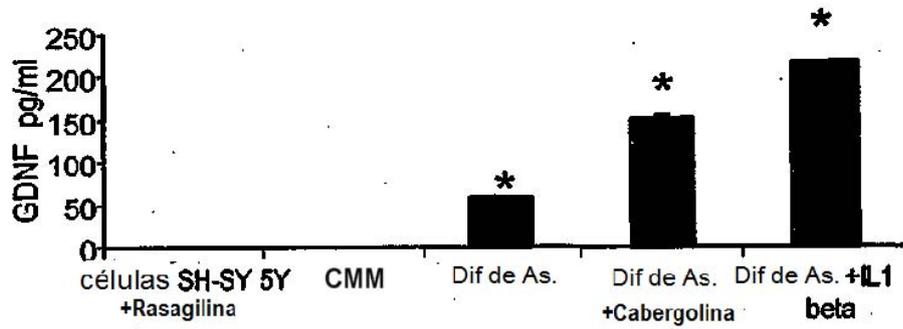


Fig. 8a

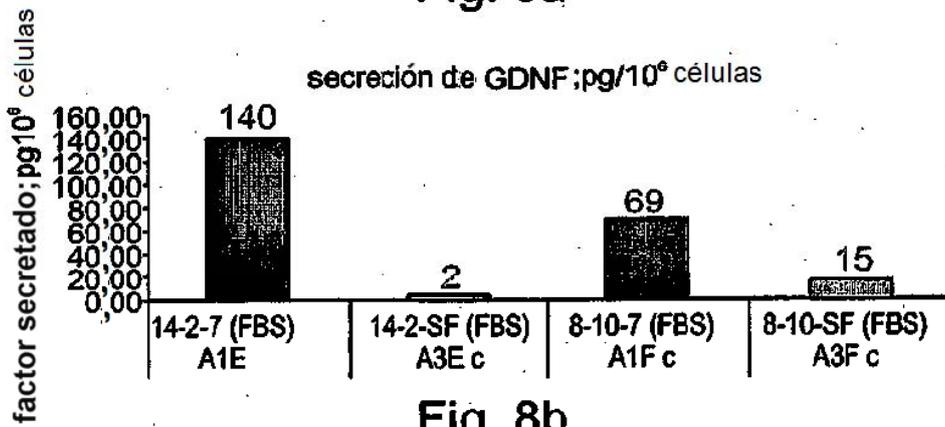


Fig. 8b

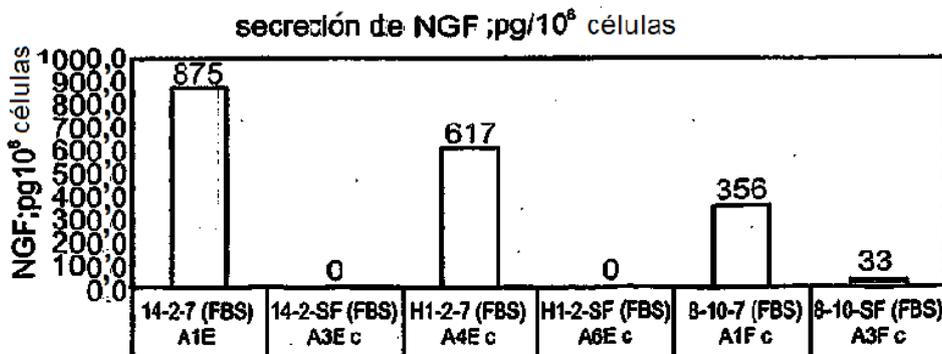


Fig. 8c

FIG. 8D

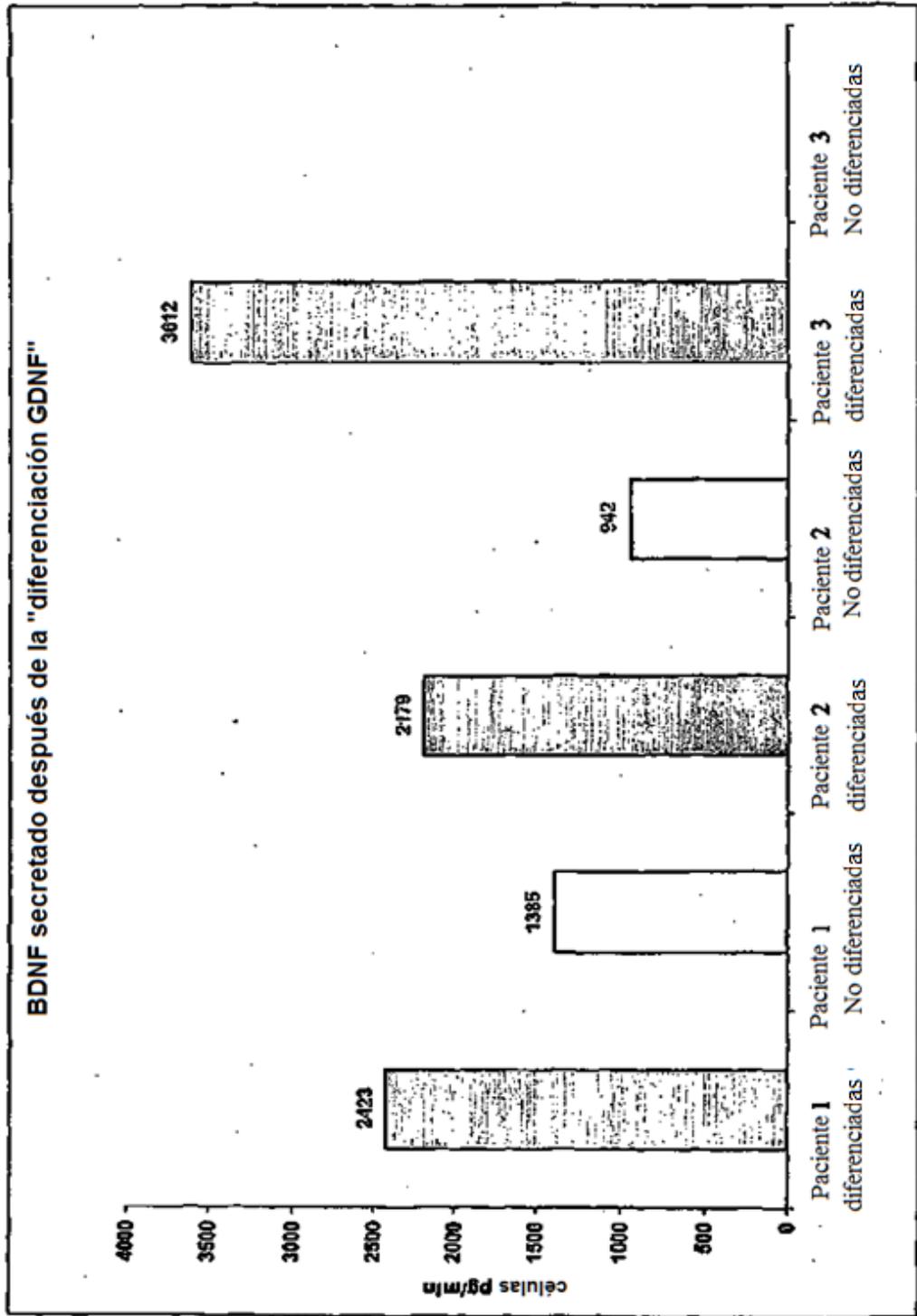


FIG.9

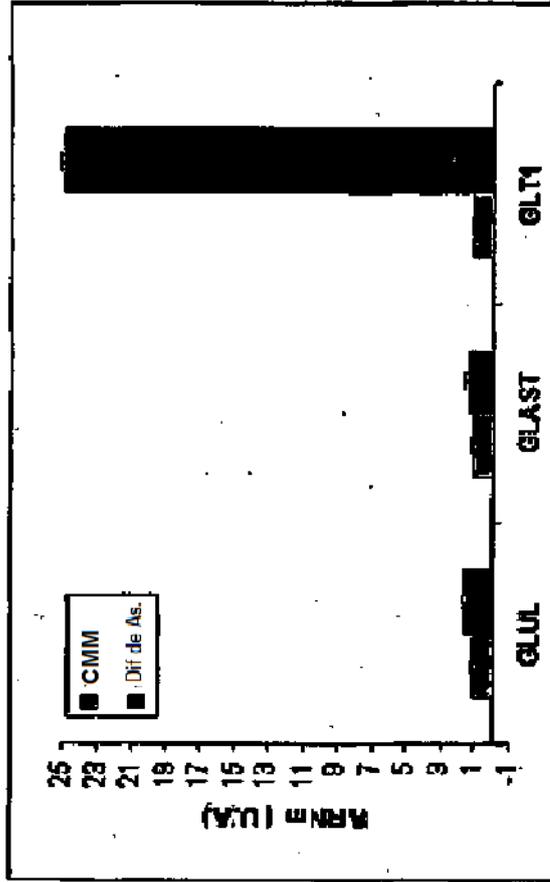


FIG. 10

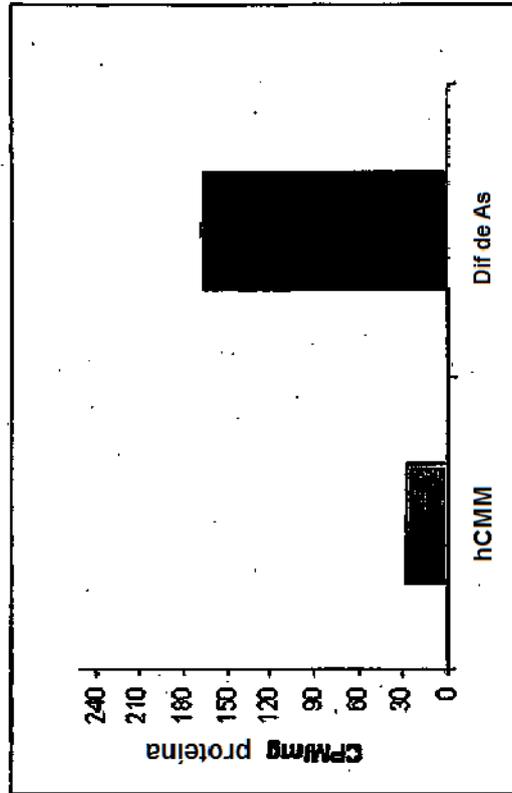


FIG. 11

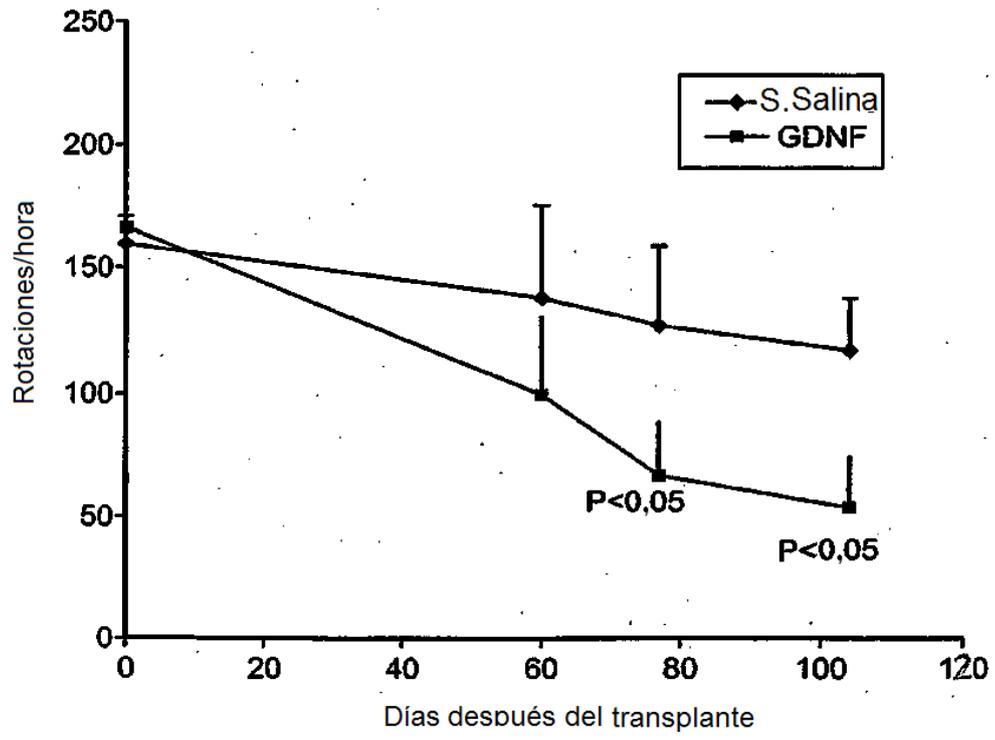


FIG. 12

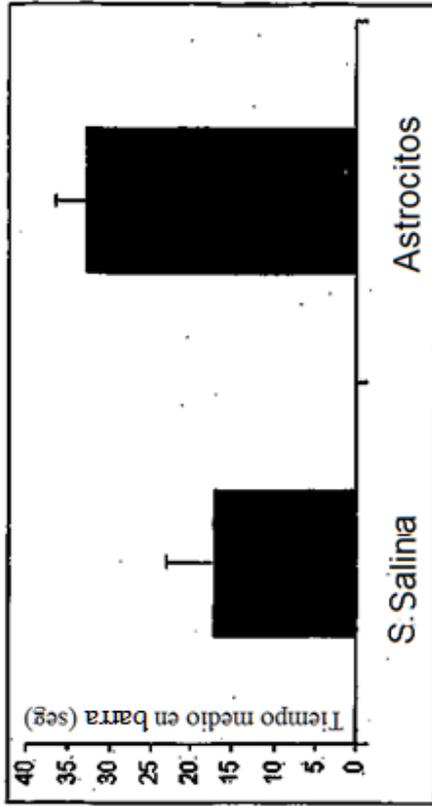
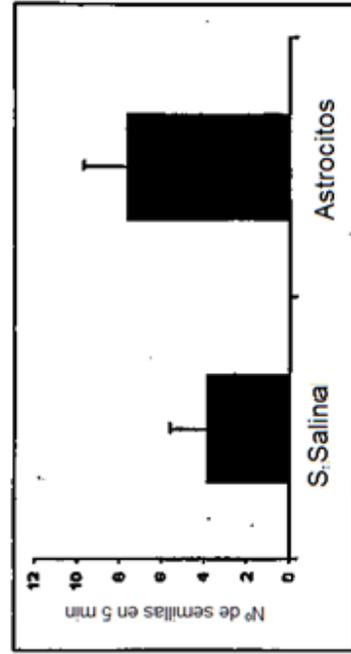


FIG. 13



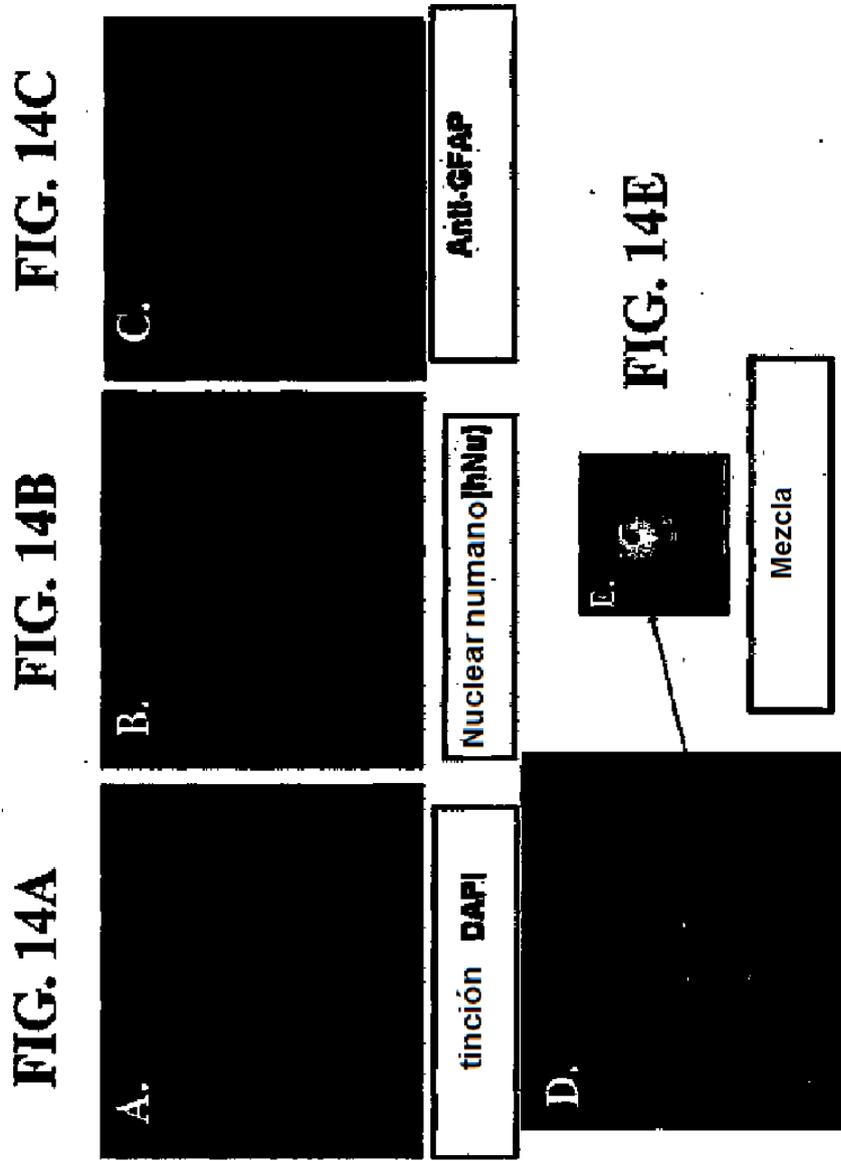


FIG. 15

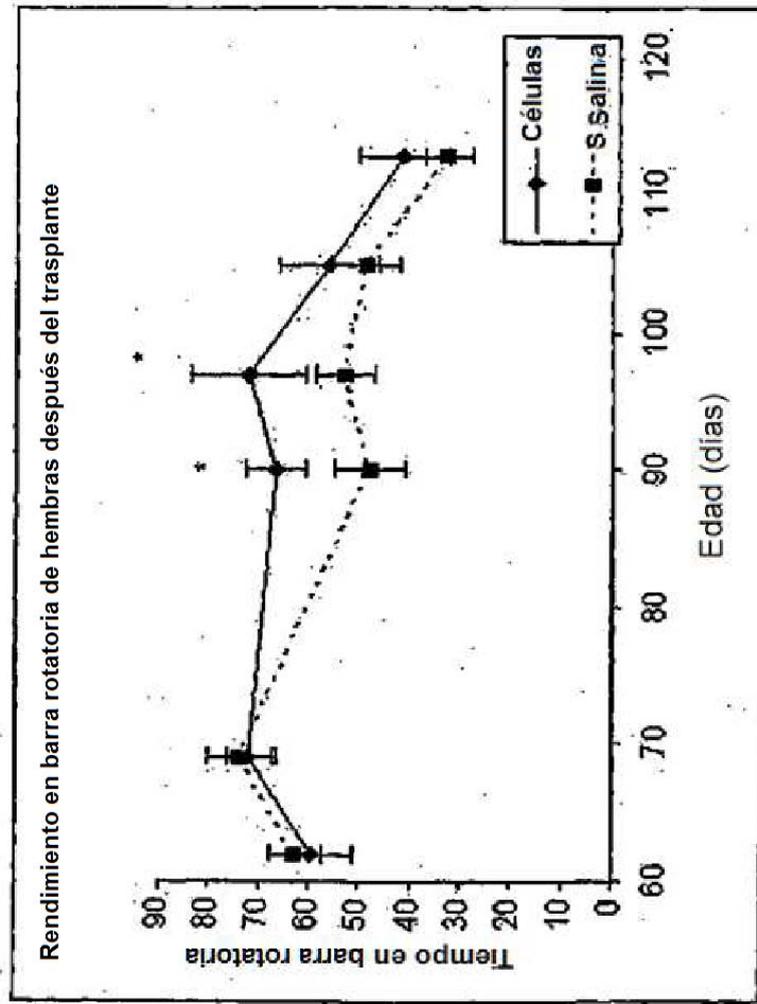


FIG. 16

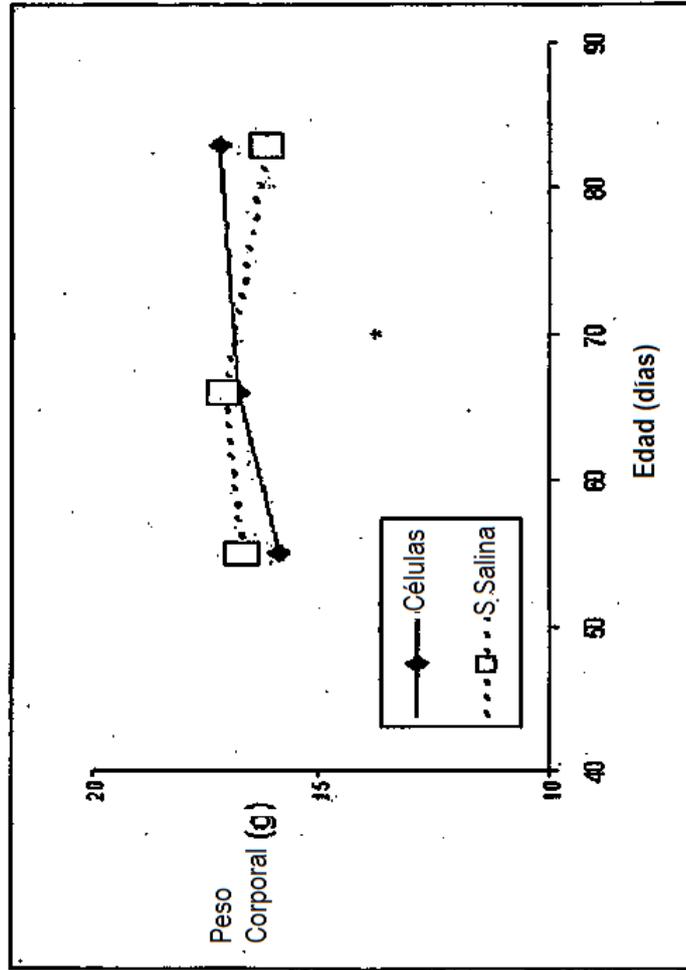


FIG. 17A **FIG. 17B**

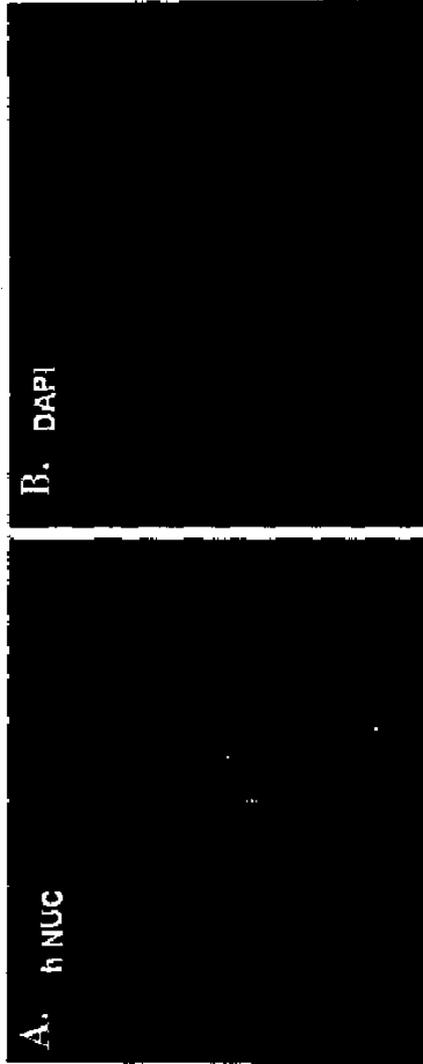


FIG. 17C