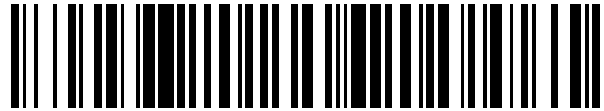


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 592**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2000 E 00935910 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 1183035**

54 Título: **Trasplante de médula ósea para el tratamiento de la apoplejía**

30 Prioridad:

14.05.1999 US 134344 P

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

17.03.2015

73 Titular/es:

**HENRY FORD HEALTH SYSTEM (100.0%)
1 FORD PLACE, 4B
DETROIT, MI 48202-3450, US**

72 Inventor/es:

**LI, YI y
CHOPP, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 531 592 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

Trasplante de médula ósea para el tratamiento de la apoplejía

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud es una conversión de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Nº 60/134.344, presentada el 14 de mayo de 1999, incorporada aquí como referencia.

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un tratamiento de la lesión neural y de enfermedades neurodegenerativas. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de células de la médula ósea para el tratamiento de la apoplejía.

TÉCNICA DE ANTECEDENTES

10 El trasplante intracerebral de células del donante a partir de tejido embrionario puede fomentar la neurogénesis (Synder et al. 1997). El injerto fetal intraestriatal se ha utilizado para reconstruir circuitos de los ganglios basales dañados y para mejorar los déficits de comportamiento en un modelo animal de isquemia (Goto et al. 1997). Células
15 fetales madre hematopoyéticas (HSCs - siglas en inglés) trasplantadas en el organismo adulto o HSCs de adultos trasplantadas en un embrión resulta en una quimera que refleja las células endógenas dentro del microentorno en el que se sembraron las células (Geiger et al. 1998). Células madre pluripotentes son albergadas en el SNC adulto y el cerebro adulto pueden formar nuevas neuronas (Gage 1998; Kempermann y Gage, 1998).

20 El concepto de trasplante de médula ósea ha sido estudiado por otros. Por ejemplo, en la referencia de Azzizi et al. los investigadores trasplantan células estromales de médula ósea humanas en los cerebros de ratas albinas. Sus observaciones primarias fueron que las células mesenquimales humanas pueden injertarse, migrar y sobrevivir de una manera similar a los astrocitos de rata. Además, en el manuscrito de Eglitis y Mwzey se muestra que las células de médula ósea, cuando se implantan en el cerebro de ratones adultos, pueden diferenciarse en microglia y
25 macroglia. Una vez más, esto ocurrió cuando se trasplantan en el cerebro de ratones normales. Estos dos documentos se utilizaron para apoyar la hipótesis de que algunos astrocitos surgen de una célula precursora que es un constituyente normal de la médula ósea. Sin embargo, no ha habido ningún estudio que demuestre que células de la médula ósea se diferencien en neuronas. Además, no ha habido ningún estudio que demuestre que esto ocurriría en un cerebro o médula espinal dañado y en la enfermedad neurodegenerativa. Además, no ha habido datos de que el tratamiento de la lesión neural (apoplejía, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal) y la enfermedad neurodegenerativa (de Parkinson) con células de médula ósea mejora el resultado funcional.

SUMARIO DE LA INVENCION

30 De acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de células estromales de médula ósea para el tratamiento de apoplejía trasplantando las células de modo intravascular mediante administración intracarótida o administración intravenosa. De manera adecuada, el uso es para activar células madre del sistema nervioso central para diferenciarse en neuronas en un cerebro dañado.

35 Médula ósea entera y componentes celulares de la médula ósea se han empleado (es decir, células madre mesenquimales, MSCs; células madre hematopoyéticas HSGs) para tratar la apoplejía (rata, ratón) y lesión cerebral traumática (rata). Componentes celulares de la médula ósea se cultivaron en un medio especial y en medio que contiene neurotrofinas (NGF, BDNF). Las células se inyectaron directamente en el cerebro, en la arteria carótida interna o en una vena femoral. Las medidas de resultados fueron: inmunohistoquímica de doble tinción para
40 identificar morfológicamente la transformación fenotípica de células de médula ósea y ensayos de comportamiento y funcionales para identificar déficits neurológicos. Los datos de los autores de la invención demuestran que el tratamiento de la apoplejía, lesión de la médula espinal o lesión cerebral traumática con médula ósea completa o componentes celulares reduce significativamente los déficits funcionales. Células de médula ósea también expresan fenotipos de las células del parénquima. Además, ratones tratados con MPTP de la neurotoxina para inducir
45 síntomas de la enfermedad de Parkinson fueron tratados con células de médula ósea administradas por vía intracerebral. Los síntomas de Parkinson se redujeron significativamente en ratones tratados con células de médula ósea. Estos datos demuestran que las células de médula ósea se pueden emplear para tratar la lesión neural y la enfermedad neurodegenerativa.

Importantes y nuevas contribuciones a este sector son: el cultivo de células de médula ósea en neurotrofinas, la administración intraparenquimatosa e intravascular de estas células (cultivadas con factor de crecimiento o no) para la terapia y el tratamiento de la apoplejía, trauma y enfermedad de Parkinson con médula ósea.

- 5 También se ha desarrollado un conjunto, compuesto de células madre neurales de la neuroesfera fetal, células madre mesenquimales de la médula ósea de adultos y líquido cefalorraquídeo de ratas Wistar adultas (denominado NMCesferas). Estas NMCesferas se han utilizado con éxito para tratar la apoplejía y trauma cerebral, y pueden emplearse para tratar la enfermedad neurodegenerativa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 10 Otras ventajas de la presente invención se apreciarán fácilmente al entender mejor la misma con referencia a la siguiente descripción detallada cuando se considera en unión con los dibujos que se acompañan, en donde:

Las FIGURAS 1A-B son diagramas de las tres regiones del cerebro de rata después de dos horas de MCAO con trasplante de médula ósea;

- 15 Las FIGURAS 2A-L son fotografías que muestran las células de médula ósea en la sección preparada H & E en la inmunorreactividad de proteínas representativas en el IBZ de una serie de secciones adyacentes de ratas muertas cuatro días después de trasplante de médula ósea (A-H); la FIGURA 2 I muestra la proteína nuclear específica neuronal, NeuN; la FIGURA 2 J muestra que el trasplante de médula ósea de las células adyacentes a las células ependimales que muestran reactividad para el marcador neuronal MAP-2; y K-L muestran que las células de la SVZ expresan marcadores de proteínas Neuro D y GFAP);

- 20 Las FIGURAS 3A-H son fotografías que muestran secciones preparadas de H & E de tejido cerebral después de MCA trasplantado con trasplante de células de médula ósea;

las FIGURAS 3I-J son fotografías que muestran la tinción TUNEL que muestra células de tipo apoptótico en el injerto de médula ósea a los cuatro días;

las FIGURAS 4A-C muestran datos del ensayo de eliminación de adhesivo, el ensayo motor del "rotarod" y la puntuación de la gravedad neurológica, respectivamente;

- 25 las FIGURAS 5A-B representan injertos que demuestran que los ratones tratados con MSC trasplantado exhiben una mejora significativa en la duración en el "rotarod" y muestran una función neurológica mejorada en comparación con los animales tratados con vehículo;

- 30 las FIGURAS 6A-B representan que ratas con trasplante intra-arterial de MSC mostraron una mejoría significativa en el ensayo de la eliminación de adhesivo y las puntuaciones de la gravedad neurológica modificadas a los 14 días en comparación con los controles;

las FIGURAS 7A-B representan datos funcionales procedentes de ratas a las que se administró MSC por vía intravenosa en comparación con ratas control-isquemia;

la FIGURA 8 representa los datos del "rotarod" de ratones sometidos a la neurotoxicidad MPTP;

- 35 las FIGURAS 9A-D representan los cambios morfológicos, es decir, desaparecieron neuronas pigmentadas más reducidas y sólo unas pocas de ellas se observaron en la sustancia negra a los 45 días después del trasplante de MSC en ratones MPTP-DP; células inmunorreactivas BrdU viables identificadas en la zona inyectada y migradas a distancias variables en el cuerpo estriado a los 45 días; la doble tinción demuestra que células BrdU reactivas dispersadas expresan inmunorreactividad TH dentro de los injertos;

la FIGURA 10 muestra los datos del ensayo BBB de animales sometidos a lesión de la médula espinal; y

- 40 la FIGURA 11 es una fotografía que representa la MSCneuroesfera compuesta nueve días después de la integración de neuroesferas en las células.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En general, la presente invención es útil en un método de tratamiento de la lesión neural y neurodegeneración utilizando trasplante de médula ósea. Se ha determinado que células de médula ósea se diferencian en neuronas y

5 otras células parenquimatosas. Células de médula ósea dentro de lesión cerebral y la médula espinal producen un conjunto de citoquinas y factores de crecimiento. Las células de médula ósea activan las células madre endógenas en el cerebro, las células ependimales, para que proliferen y se diferencien en células del parénquima, incluidas las neuronas. Nuevas neuronas están entonces presentes en el giro dentado y el bulbo olfativo y están adyacentes a los sitios de la lesión. Por lo tanto, la médula ósea activa las células madre del sistema nervioso central endógeno para diferenciarse en neuronas. Las células de médula ósea también producen factores (citoquinas y factores de crecimiento) que fomentan la reparación y la plasticidad del cerebro.

10 En esta memoria se describe también un método que emplea el cultivo específico de células de médula ósea, y los sitios específicos de inyección de médula ósea. Las células se trasplantan en el tejido penumbra, adyacente a una lesión, y no dentro de la lesión. El tejido adyacente a la lesión proporciona un entorno receptivo similar al de un cerebro de desarrollo, para la supervivencia y diferenciación de células de médula ósea. Se basa en esta actividad de que la médula ósea es capaz de ser útil en la lesión neural y la neurodegeneración en donde se ha producido un daño específico del cerebro o de la médula espinal. Además, células de la médula ósea son eficaces en el tratamiento de lesión neural y la degeneración cuando estas células se administran por vía intravascular, es decir, 15 intra-arterial o intravenosa. Por lo tanto, después de una lesión cerebral, cuando el tejido cerebral muere, en un esfuerzo por compensar el tejido perdido, la implantación de médula ósea y sus derivados proporciona una fuente suficiente de células y la activación de fomentar respuestas compensatorias del cerebro a un daño de este tipo.

20 La médula ósea se trasplanta en el cerebro isquémico de rata y ratón, cerebro de rata lesionado, médula espinal lesionada y en el cerebro de un ratón con Parkinson. El trasplante en el cerebro también se ha realizado con el co-trasplante de factores de crecimiento (BDNF, NAF). La médula ósea, en particular las MSCs, han sido cultivadas con el factor de crecimiento nervioso (NGF).

25 El trasplante se realizó en varios instantes (de cuatro horas a dos días después de la apoplejía, de uno a siete días después de trauma, siete días después de la lesión de la médula espinal y catorce días después del inicio de la enfermedad de Parkinson en el ratón) después de la apoplejía experimental, tanto en rata como en ratón. Los datos indican que el trasplante de médula ósea o de componentes en cerebro isquémico resulta en la diferenciación de las células de médula ósea en las células del parénquima del cerebro, incluyendo las neuronas. Además, células madre endógenas del cerebro se activan para proliferar y diferenciarse en células del parénquima. Estas células migran a diferentes regiones dentro del cerebro, incluyendo el hipocampo, bulbo olfatorio y la corteza. Hay también un resultado funcional mejorado en ratas tratadas con trasplante de médula ósea cultivado con o en combinación con factores de crecimiento. Este modelo es altamente predictivo de resultados positivos en mamíferos superiores, incluidos seres humanos. Un ensayo clínico para el tratamiento con MSC del paciente con apoplejía se presentará en la Institutional Review Board del Hospital Henry Ford para su revisión. 30

35 La discusión anterior proporciona una base fáctica para el uso de trasplante de médula ósea para el tratamiento de la lesión neuronal y la neurodegeneración. Los métodos utilizados con y la utilidad de la presente invención se pueden mostrar mediante los siguientes ejemplos no limitantes y las figuras que se acompañan.

40 Técnicas de biología molecular estándares conocidas en la técnica y no descritas específicamente se siguieron en general como en Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989), y en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989) y en Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley & Sons, Nueva York (1988), y en Watson et al., *Recombinant DNA*, Scientific American Books, Nueva York, y en Birren et al (comps.) *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Vols. 1-4* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998) y la metodología según se recoge en las patentes de Estados Unidos 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057 e incorporadas aquí como referencia. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo generalmente como en *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, San Diego, CA (1990). La PCR In-situ (en células) en combinación con Citometría de Flujo se puede utilizar para la detección de células que contienen secuencias específicas de ADN y de ARNm (Testoni et al, 1996, Blood 87: 3822). 45

Métodos estándares en inmunología conocidos en la técnica y no descritos específicamente se siguieron en general como en Stites et al. (comps.), *Basic and Clinical Immunology* (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) y Mishell y Shiigi (comps.), *Selected Methods in Cellular Immunology*, W.H. Freeman and Co., Nueva York (1980).

50 **EJEMPLOS**

TRATAMIENTO DE LA APOPLEJÍA (RATA) CON TRASPLANTE INTRACERBRAL DE MSC

Descripción del trasplante intracerebral MSCs derivadas de médula ósea después de isquemia cerebral en la rata: en este estudio se utilizaron ratas Wistar macho adultas (n = 28). Las ratas se sometieron a oclusión de la

arteria cerebral media durante dos horas utilizando el modelo de oclusión intraluminal. Los grupos experimentales incluyen: MCAo (siglas inglesas de oclusión de la arteria cerebral media) (Control) solo sin trasplante de MSC (n = 8). La inyección en la zona límite isquémica (IBZ – siglas en inglés) a las 24 horas después de MCAo del Grupo 2. Solución salina tamponada con fosfato (n = 4): Grupo 3. MSCs de médula ósea cultivadas sin NGF (n = 8); Grupo 4. MSCs cultivadas con NGF (n = 8). Se trasplantaron aproximadamente 4×10^4 células en un volumen total de fluido de 10 μ l. Las ratas recibieron injertos y fueron sacrificadas 14 días después de MCAo.

Medidas de resultados de comportamiento: Los datos del comportamiento de la batería de ensayos funcionales (ensayos del “rotarod”, eliminación de adhesivo y puntuación de la gravedad neurológica) demostraron que las funciones motoras y somatosensoriales se vieron perjudicadas por la lesión isquémica. No se detectaron diferencias significativas de los ensayos del “rotarod”, eliminación de adhesivo y NSS entre los grupos antes de la cirugía y antes del trasplante. Se detectó una recuperación significativa de la conducta somatosensorial ($p < 0,05$) y NSS ($p < 0,05$) en animales a los que se trasplantó MSCs en comparación con MCAo sola (Figuras 1a, c). Animales que recibieron MSCs cultivadas con NGF mostraron una recuperación significativa en ensayos del comportamiento motor ($p < 0,05$), somatosensorial ($p < 0,05$) y NSS ($p < 0,05$) a las 2 semanas post-trasplante con NGF, en comparación con el trasplante de MSCs solo. Las figuras 1 a, b, c muestran datos del ensayo de la eliminación de adhesivo, ensayo motor del “rotarod” y la puntuación de la gravedad neurológica (NSS – siglas en inglés), respectivamente. Estos datos demuestran claramente que el tratamiento de la apoplejía con trasplante intracraneal de MSCs proporciona un beneficio terapéutico significativo y que MSCs, cuando se cultivan en NGF, proporcionan un beneficio terapéutico superior a MSCs cultivadas sin NGF tal como se indica en los datos del ensayo motor (Figura 1b).

20 TRATAMIENTO DE LA APOPLEJÍA (RATÓN) CON TRASPLANTE INTRACEREBRAL DE MSC

Trasplante intraestriatal de MSCs en ratones después de apoplejía: MCAo embólica y trasplante. Ratones adultos experimentales (C57BL/6J, que pesan 27-35 g) se sometieron a una MCAo y se les trasplantaron MSCs (n = 5). Los ratones control fueron sometidos a MCAo sola (n = 8); la inyección de PBS en el cuerpo estriado isquémico (n = 5); y el trasplante de MSCs en el cuerpo estriado normal (n = 5). La MCAo se indujo utilizando un modelo embólico desarrollado en el laboratorio de la solicitante (Zhang et al., 1997). En síntesis, utilizando una mascarilla, los ratones fueron anestesiados con halotano al 3,5% y se mantuvo la anestesia con halotano al 1,0% en 70% de N_2O y 30% de O_2 . Se colocó en el origen de la MCA a través de un catéter PE-50 modificado un coágulo solo, rico en fibrina e intacto, homólogo de 24 horas de edad ($8 \text{ mm} \times 0,000625 \text{ mm}^2$, 0.18 :l). Los procesos de monitorización quirúrgicos y fisiológicos eran idénticos a los publicados previamente (Zhang et al., 1997). Cuatro días después de la MCAo (n = 18), los ratones fueron montados en un bastidor estereotáxico (Stoelting Co. Wood Dale, IL). Utilizando una técnica aséptica, se practicó una trepanación (1 mm) en el lado derecho del cráneo para exponer la dura madre que recubre la corteza derecha. MSCs semi-suspendidas (1×10^5 en 3 :l de PBS) se inyectaron lentamente a lo largo de un período de 10 minutos en el cuerpo estriado derecho (AP = 0 mm, ML = 2,0 mm y DV = 3,5 mm desde el bregma). Esta posición se aproxima a la zona límite isquémica en el cuerpo estriado. La aguja se mantuvo en el cuerpo estriado durante un intervalo adicional de 5 minutos para evitar el reflujo de los donantes. Los ratones fueron sacrificados a los 28 días después de la apoplejía.

Ensayo del Comportamiento: Cada uno de los ratones fue sometido a una serie de ensayos de comportamiento (ensayo motor de Rotarod, puntuación de gravedad neurológica) para evaluar diversos aspectos de la función neurológica por parte de un investigador quien desconocía los grupos experimentales. Las mediciones se realizaron antes de la apoplejía y a los 28 días después de la apoplejía.

Resultados: MSCs reactivas a BrdU sobrevivieron y migraron una distancia de aproximadamente 2,2 mm desde las zonas de injerto hacia las zonas isquémicas. Células reactivas BrdU expresadas de proteínas neuronales (~ 1% NeuN) y astrocíticas (-8% GFAP). La recuperación funcional de un ensayo “rotarod” ($p < 0,05$) y los ensayos de puntuación de la gravedad neurológica modificada (NSS, incluyendo los motores, sensoriales y reflejos, $p < 0,05$) mejoraron significativamente en los ratones que recibieron MSCs en comparación con MCAo sola (Figura 2). La Figura 2 muestra que ratones tratados con MSC trasplantada exhiben una mejora significativa en la duración en el “rotarod” (Figura 2) y muestran una función neurológica mejorada (Figura 2) en comparación con los animales tratados con vehículo. Los hallazgos sugieren que las MSCs intraestriatales trasplantadas sobreviven en el cerebro isquémico y mejoran la recuperación funcional de ratones adultos.

50 TRATAMIENTO DE LA APOPLEJÍA (RATÓN) CON ADMINISTRACIÓN INTRAVASCULAR DE MSC

Descripción de experimentos:

Los experimentos se realizaron en ratas adultas Wistar macho (n = 30) con un peso de 270-290 g. En todos los procesos quirúrgicos, la anestesia fue inducida en ratas con halotano al 3,5%, y se mantiene con halotano al 1,0% en 70% de N_2O y 30% de O_2 utilizando una mascarilla. La temperatura del recto se controló a 37°C con un sistema

de calentamiento de agua regulado de retroalimentación. Una MCAo transitoria se indujo utilizando un método de oclusión vascular intraluminal, según se describe arriba. Dos horas después de la MCAo, la reperusión se realizó mediante la retirada de la sutura hasta que la punta dejó al descubierto la arteria carótida interna.

5 (a- **Administración intracarótida de MSCs**) El trasplante de intracarótida de las MSC se llevó a cabo a las 24 horas después de la MCAo (n = 23). Un catéter PE-50 modificado se hizo avanzar desde el mismo sitio de esta arteria carótida externa hasta el lumen de la arteria carótida interna hasta que se detuvo a 2 mm proximales del origen de la MCA (Figura 1). Aproximadamente 2×10^6 MSCs en 200 μ l de PBS (n = 6) o fluido Control (200 μ l de PBS, n = 8) fueron inyectadas a lo largo de un período de 10 minutos en cada una de las ratas experimentales. En ningún animal se utilizaron inmunosupresores. Todas las ratas fueron sacrificadas a los 14 días después de la MCAo.

10 (b- **Administración intravenosa de MSCs**) Para la administración intravenosa de MSCs, se canuló una vena femoral y se inyectaron $1,5 \times 10^6$ MSCs o 3×10^6 MSCs.

15 **Ensayos de comportamiento e inmunohistoquímica:** Cada una de las ratas fue sometida a una serie de ensayos de comportamiento (NSS y ensayo de eliminación de adhesivo) para evaluar la función neurológica antes de la MCAo, y a los 1, 4, 7 y 14 días después de la MCAo. Se emplearon técnicas de inmunohistoquímica sencilla y doble para identificar proteínas específicas para las células de MSCs reactivas con BrdU.

20 **Resultados:** Para la administración intra-arterial, células reactivas con BrdU (~21% de 2×10^6 MSCs trasplantadas) distribuidos por todo el territorio de la MCA hacia los 14 días después de la isquemia. Algunas células reactivas con BrdU expresaron proteínas características de los astrocitos (proteína ácida glial fibrilar, GFAP) y neuronas (proteína asociada a microtúbulos-2, MAP-2). Las ratas con el trasplante de MSC intra-arterial exhibían una mejoría significativa en el ensayo de eliminación de adhesivo ($p < 0,05$) (Figura 3) y las puntuaciones de gravedad neurológica modificada ($p < 0,05$) (Figura 3) a los 14 días, en comparación con los controles. Los datos para la administración intravenosa de MSCs eran muy similares, debido a que estaba presente una mejoría funcional significativa con las ratas tratadas con MSCs en comparación con las ratas tratadas con placebo. La Figura 4 muestra los datos funcionales de ratas a las que se administró MSC por vía intravenosa en comparación con ratas de control de la isquemia. Una mejora significativa se observa en la velocidad a la que las ratas retiraban las etiquetas adhesivas de sus patas a los siete y 14 días después de la apoplejía, en comparación con los animales control (Figura 4). La función neurológica global de ratas tratadas con MSCs administrados por vía intra-arterial mejoró significativamente en comparación con las ratas de control de la isquemia a los 14 días después de la apoplejía. Los hallazgos sugieren que MSCs inyectadas por vía intra-arterial están localizadas y dirigidas al territorio de la MCA y estas células fomentan una mejora funcional después de la isquemia cerebral. Además, la administración intravenosa de MSCs también proporciona una mejora significativa en el resultado funcional. Por lo tanto, los autores de la invención han demostrado que la administración vascular es una vía factible y eficaz de administración de MSCs terapéuticamente beneficiosas.

TRATAMIENTO DE LESIÓN CEREBRAL TRAUMÁTICA (RATA) CON TRASPLANTE INTRACERBRAL DE MSC

35 **Descripción:** Los experimentos se realizaron en 66 ratas Wistar macho que pesaban 250-350 gramos. Se utilizó un dispositivo de impacto cortical controlado para inducir la lesión (Dixon E et al A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in rat. **J. Neuroscience Methods** 39: 253-262,1991). La lesión fue inducida por el impacto de la corteza izquierda con un pistón neumático que contiene un diámetro de 6 mm que se mueve a una velocidad de 4 mm/s y produce una compresión de 2,5 mm. MSCs marcadas con BrdU se recogieron de animales donantes y se implantaron en el hemisferio ipsilateral, como en los experimentos de apoplejía. MSCs fueron trasplantadas en el cerebro 24 horas después de la lesión. Las ratas que recibieron MSCs fueron sacrificadas a los 4 días (n = 4), 1 semana (n = 15), 2 semanas (n = 4) y 4 semanas (n = 4) después del trasplante. Los animales control se dividieron en 3 grupos: 1) ratas sometidas a lesiones sin trasplante y sacrificadas a los 8 días (n = 4) y 29 días (n = 4) después de la lesión; 2) animales a los que se inyectó PBS un día después de la lesión y fueron sacrificados a los 4 días (n = 4), 7 días (n = 4), 14 días (n = 4) y 28 días después de la inyección de PBS; 3) ratas control simuladas con craneotomía pero ninguna lesión o trasplante fueron sacrificadas a los 8 días (n = 4) y 29 días (n = 4) después de una craneotomía.

50 **Medidas de resultados (comportamiento, histología):** Se empleó un ensayo "rotarod" acelerante para medir la función motora. Las mediciones se realizaron a los 2, 5, 15 y 29 días después de la lesión. Después del sacrificio, las secciones de cerebro se tiñeron con hematoxilina y eosina y se realizó un inmunohistoquímica doble marcada para identificar el tipo de células MSC.

Resultados: El examen histológico reveló que después del trasplante las MSCs sobreviven, proliferan y migran hacia el lugar de la lesión. MSCs marcadas con BrdU expresaban marcadores para astrocitos y neuronas. Las ratas a las que se trasplantaron MSCs exhibían una mejora significativa en la función motora en comparación con

animales control. Los datos de los autores de la invención indican que el trasplante intracerebral de MSC mejora significativamente la función neurológica después de una lesión cerebral traumática. En un conjunto complementario de experimentos, también trataron con MSCs a ratas sometidas a lesión cerebral traumática; sin embargo, en este experimento las MSCs fueron suministradas al cerebro por medio de administración intra-arterial (arteria intracarótida). Los datos eran similares al trasplante intracraneal. Las MSCs migraban fácilmente a la región lesionada del cerebro y estas células expresaban marcadores de proteínas de las células del cerebro (astrocitos, neuronas). Por lo tanto, los estudios de los autores de la invención indican que la lesión cerebral traumática puede ser tratada con MSC administrada por vía intracerebral o por medio de una ruta vascular.

TRATAMIENTO DE PARKINSON (RATÓN) CON TRASPLANTE INTRACRANEAL DE MSCs

10 Descripción del método MPTP y resultados

En este estudio se emplearon ratones C57BL/6 adultos macho, de 8-12 semanas de edad, con un peso de 20-35 g. Con el fin de obtener lesiones graves y de larga duración, los ratones fueron tratados con inyecciones intraperitoneales de hidrocloreuro de MPTP (30 mg/kg, Sigma) en solución salina una vez al día durante siete días consecutivos (210 mg/kg dosis total). A los ratones se les trasplantaron, por vía estereotáxica, MSCs marcadas con BrdU ($3 \times 10^5/3 \mu\text{l}$) directamente en el cuerpo estriado derecho.

Ensayos de comportamiento

Ratones sometidos a cada una de las inyecciones de MPTP presentaban y mantenían anomalías de comportamiento (aquinesia, inestabilidad postural, temblor y rigidez) durante varias horas, tal como se reseña en la bibliografía [Heikkila et. al. I., 1989].

Una evaluación sin fármacos de Parkinson mediante el ensayo "rotarod" fue descrito por Rozas et al. [1997,1998]. Ratones MPTP-PD con o sin trasplante de MSC fueron sometidos a ensayo en un "rotarod" a una velocidad creciente (16 rev./minuto y 20 rev./minuto) después de las últimas inyecciones de MPTP (cinco ensayos al día para obtener valores estables) sin inyección de fármacos adicional mejorada alguna. Un ensayo se terminó cuando los ratones se caían del "rotarod". Se observó una mejora significativa en la función motora ($p < 0,05$) a los 35 días después de la inyección de MPTP en ratones con enfermedad de Parkinson tratados con trasplante de MSC en comparación con ratones control a los que se inyectó MPTP solo. La Figura 5 muestra datos del "rotarod" de ratones sometidos a neurotoxicidad con MPTP. Se realizaron dos experimentos; los ratones se colocaron en el "rotarod" que giraba a 16 rpm o a 20 rpm. Los datos demuestran que ratones tratados con MSCs mostraban un incremento significativo de duración en el "rotarod" a las dos velocidades angulares en comparación con ratones MPTP a los que se administró PBS por vía intracerebral. Los ratones tratados con MSCs cultivadas con NGF parecían tener un beneficio incremental en comparación con el tratamiento con MSC, aunque las diferencias no eran significativas.

Cambios morfológicos:

Se identificaron células inmunorreactivas con BrdU viables en la zona de inyección y migraron a distancias variables en el cuerpo estriado del huésped (Figura 1b) a los 35 días. La tinción doble muestra que células reactivas con BrdU dispersadas (Figura 1c) expresan inmunoreactividad de tirosina hidroxilosa (un marcador de la dopamina) (Figura 1d) dentro de los injertos.

Conclusiones: Estos datos demuestran que el trasplante intracerebral de MSCs reduce los síntomas de la enfermedad de Parkinson en el ratón.

TRATAMIENTO DE LESIONES DE LA MÉDULA ESPINAL (RATA) CON TRASPLANTE INTRALESIONAL DE MSCs

Descripción de la lesión de médula espinal

Lesión de médula espinal. Se indujo una lesión por impacto utilizando la caída de peso (10 g desde una altura de 25 mm, modelo de 'impacto NYU') para producir una lesión en la médula espinal de gravedad moderada. Ratas Wistar macho adultas (300 ± 5 g) fueron anestesiadas con pentobarbital (50 mg/kg, vía intraperitoneal), y se realizó una laminectomía en el nivel T9.

Trasplante y ensayos de comportamiento MSCs $2,5 \times 10^5/4 \mu\text{l}$ se inyectaron en el epicentro de la lesión a los 7 días después de SPI. Las puntuaciones de valoración del aparato locomotor de Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) fueron obtenidas antes y después del trasplante Basso et al., 1995]. La Figura 7 muestra los datos del ensayo BBB

de animales sometidos a lesión de la médula espinal y tratados con trasplante de MSC o simplemente dado el mismo volumen de vehículo. Todas las ratas tenían una puntuación de 21 (puntuación normal) antes de la lesión de la médula espinal y una puntuación de 0 a 6 horas después de la contusión. En las ratas sometidas a una contusión con inyección de PBS, las puntuaciones mejoraron de 6,7 (1 semana) a 11,5 (5 semanas). El grupo control tuvo una mejoría temprana en la función neurológica, que se estabiliza hacia la tercera semana. Las ratas sometidas a contusión con trasplante de MSC tenían una puntuación significativamente mejorada de 7,0 (1 semana) y 15,3 (5 semanas). El grupo tratado con MSC exhibía una recuperación estable que no se había estabilizado hacia la quinta semana, que era el punto final del experimento. Las ratas tratadas con MSC tuvieron una mejoría significativa en las puntuaciones BBB con el valor p, 0,01 para el global y cada uno de los tiempos individuales para el efecto del tratamiento. En términos funcionales, las ratas contusas en el grupo tratado con MSC podían caminar con pasos plantares que soportan el peso consistentes con coordinación de las extremidades anteriores y las extremidades posteriores. En contraposición, las ratas contusionadas en el grupo de control PBS exhibían déficits obvios en la función motora.

Análisis histológico

Células derivadas de MSCs, identificadas por una inmunoreactividad con BrdU, sobrevivieron y se distribuyeron por todo el tejido dañado (T9, Figura 1a) de 1 semana hasta 4 semanas después de trasplante de MSC. Células reactivas con BrdU migraron 5 mm tanto caudal como rostral del epicentro de células trasplantadas (Figura 1b). La Figura 2a muestra que el anticuerpo contra Rip no reaccionaba con oligodendrocitos dañados en ratas contusionadas con inyección de PBS no tratada. Por el contrario, después de la lesión de la médula espinal y el trasplante de MSC (Figura 2b), una intensa inmunoreactividad Rip claramente demarcaba fibras mielinadas de diámetro pequeño y grande. La doble inmunotinción (Figuras 2c-d) demuestra que células reactivas con BrdU dispersadas expresan el marcador neuronal, NeuN.

Conclusiones: El tratamiento de lesión medular de moderada a grave con MSCs trasplantadas en el sitio de la lesión proporciona una mejora significativa de la función motora. Las MSCs expresan marcadores de proteínas de neuronas y oligodendrocitos, lo que indica que estas células, cuando se disponen dentro de la médula espinal, adquieren características de las células del parénquima.

NEUROESFERA (NMC-ESFERA)- UN NUEVO MATERIAL COMPUESTO PARA EL TRATAMIENTO DE LESIONES Y ENFERMEDADES DEL SNC

Descripción del experimento con neuroesferas

Los autores de la invención han empleado agregados, compuestos de **células madre neurales** de la neuroesfera fetal, **células madre mesenquimales** de la médula ósea de adultos y **fluido cefalorraquídeo** de ratas Wistar adultas (denominados NMCesferas). Células del cerebro fetales se pre-marcaron con 1,1'-dioctadecil-6,6'-di(4-sulfofenil)-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (DiI) y células mesenquimales de la médula ósea de ratas adultas se pre-marcaron con perclorato de 3,3'-dioctadeciloxocarbocianina (DiO) y/o bromodesoxiuridina (BrdU). Utilizando microscopía confocal de escaneo láser (tridimensional) y el análisis inmunohistoquímico en parafina y secciones congeladas, los autores de la invención identificaron que:

1. **Interacción célula-célula:** Dentro de la NMCesfera, células derivadas de células madre mesenquimales de la médula forman rápidamente un almacén (1 día) y una red (9 días, Figura 8) conforme avanzaba el tiempo, in vitro. La Figura 8 muestra la MSC neuroesfera compuesta nueve días después de la integración de células-neuroesfera. La MSC, identificada mediante DiO y BrdU forman una red tipo axonal-dendrítica (amarillo-verde).

2. **Interacción célula-célula:** Dentro del NMCesfera, células derivadas de células madre neurales tienen una vida útil más larga que dentro de la neuroesfera sola. Las NMCesferas expresan proteínas, p. ej., nestina que se encuentra normalmente en células neurales inmaduras; proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que es un marcador específico para astrocitos diferenciados; proteína básica de mielina (MBP), que es un marcador de oligodendrocitos; y β -tubulina clase III específica de neuronas (TuJ1) que es un marcador de neuronas inmaduras y proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2) que es un marcador de los cuerpos celulares neuronales y dendritas.

3. **Micro-entorno de NMCesfera:** El tamaño y la estructura de las NMCesferas están influenciados por el micro-entorno del medio, es decir, crecen mejor en el IMDM con factor de células madre que con DMEM estándar.

4. **Secreción de NMCesferas:** La adición del sobrenadante procedente de la NMCesfera cultivada en el medio DMEM e IMDM para neuroesferas y MSCs, respectivamente, estimuló el crecimiento tanto de neuroesferas como de MSCs. La conexión célula-célula obvia y la proliferación fue inducida con este sobrenadante. Esto sugiere que las

NMCesferas secretan sustancias de soporte para las células madre. Estas sustancias pueden utilizarse para potenciar la neurogénesis.

5. **Fluido cefalorraquídeo (CSF)** proporciona un micro-entorno óptimo para formar NMCesferas que es superior al medio convencional.

5 **TRATAMIENTO DE LA APOPLEJÍA Y TRAUMA DEL CEREBRO CON NMCesfera**

Protocolo para el trasplante de MSC y neuroesfera en ratas después de MCAo y TBI.

MCAo

MSCs pre-marcadas con BrdU y neuroesferas se mezclaron y se cultivaron en matraces durante 7 días. A las 24 horas después de la MCAo, las ratas fueron anestesiadas con halotano y la NMCesfera compuesta se inyectó en el cerebro (n = 4). Los animales fueron montados en un aparato estereotáxico (Modelo 51603, Stoelting Co., Wood Dale, IL). Veinte esferas (diámetro inferior a 0,2 mm) en 5 ml de PBS se inyectaron verticalmente mediante una jeringa Hamilton en el cuerpo estriado derecho en las coordenadas LM = 2,5 mm, VD = 4,5 mm y AP = 0 a la bregma, y en la corteza derecha en LM = 2,5 mm, VD = 2 mm y AP = 0 mm. Esta posición se aproxima a la zona límite isquémica. Tres microlitros de esferas se inyectaron inicialmente en el cuerpo estriado y 2 ml en la corteza a lo largo de un período de 10 minutos en cada punto. La aguja se mantuvo en la corteza durante un intervalo adicional de 5 minutos para evitar el reflujo de médula ósea desde las zonas inyectadas a la superficie del cerebro. Después de la inyección, cera de hueso (W810, Ethicon) se colocó en el cráneo para evitar la fuga de la disolución. Las ratas fueron sacrificadas a los 14 días después de la MCAo.

Lesión Traumática del Cerebro (TBI)

MSCs pre-marcadas con BrdU y neuroesferas se mezclaron y se cultivaron en matraces durante 7 días. 4 días más tarde, ratas con TBI (n = 4) fueron anestesiadas con clorohidrato y se colocaron en el bastidor estereotáxico, y después se expuso la zona lesionada previa. Una pipeta con una punta de vidrio (0,5 mm de diámetro) que contienen 15 NMCesferas mixtas preparadas (diámetro de 0,25 mm) en 20 μ l de PBS se fijó sobre el bastidor estereotáxico. La punta de la aguja se insertó en el sitio central de la zona lesionada, 2,5 mm alejada de la superficie del cerebro. Las esferas se inyectaron en el cerebro a lo largo de 5 minutos, y después se mantuvieron durante un intervalo de 5 minutos para evitar el reflujo. En ambos conjuntos de experimentos (apoplejía y TBI) las medidas de resultados funcionales se midieron utilizando los ensayos de "rotarod" y de eliminación de adhesivo.

Resultados: Un beneficio funcional tanto en la apoplejía como en TBI era evidente en ratas tratadas con NMCesferas. Estos datos indican que las NMCesferas se pueden emplear para el tratamiento de la apoplejía y la lesión cerebral. Este material compuesto es un nuevo material con un potencial para el tratamiento de lesiones del SNC y la neurodegeneración.

DESCRIPCIÓN DEL NUEVO MEDIO (CON Y SIN FACTORES DE CRECIMIENTO) EMPLEADO PARA EL CULTIVO DE MSCS PARA EL TRATAMIENTO DE LESIONES NEURALES Y LA NEURODEGENERACIÓN

Células de médula ósea primariaS se obtuvieron a las 48 horas después de tratar a ratas Wistar adultas con 5-fluorouracilo (5-FU, 150 mg/kg) y se cultivaron en el Medio de Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM) suplementado con suero de bovino fetal (FBS) al 10% y factor de células madre (100 ng/ml). MSCs adherentes se resuspendieron en IMDM reciente con factor de crecimiento nervioso (NGF, 200 ng/ml), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, 100 ng/ml) y factor de crecimiento epidérmico (EGF, 20 ng/ml) hasta un mes. MSCs control se cultivaron en el IMDM sin factores de crecimiento neurales. Se utilizaron anticuerpos contra núcleos neuronales (NeuN), proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2) y la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) para la identificación inmunocitoquímica de células cultivadas.

Los datos indican que células derivadas de células madre adultas de la médula ósea y células progenitoras pueden crecer en grandes cantidades en cultivo y pueden expresar proteínas características de neuronas y astrocitos. Factores de crecimiento neurotróficos potencian la expresión neural de células derivadas de células de médula ósea in vitro. La tinción inmunocitoquímica demuestra que MSCs control sin factores de crecimiento neurotróficos expresan los NeuN neuronales (~ 1%, Figura 1a) y GFAP astrocítica (~ 3%, Figura 1b). Sin embargo, MSCs tratadas con factores de crecimiento neurotróficos (p. e., NGF) expresan NeuN neuronal (~ 3%, Figura 1c) y GFAP astrocítica (~ 30%, Figura 1d).

Bromodesoxiuridina (BrdU, 3 Fg/ml), que se incorpora en células en división, e identifica ADN recién formado, se añadió al medio 72 horas antes del trasplante. Utilizando inmunoperoxidasa con 3,3'-diaminobenzidina (DAB, parda)

y contraindicación mediante hematoxilina, células de médula ósea se identifican por el anticuerpo contra BrdU. El número de MSCs marcadas con BrdU es ~ 90% in vitro.

DISCUSIÓN

5 Los datos demuestran que células de la médula ósea adultas cultivadas, particularmente células estromales de la médula (MSC) sobreviven y se diferencian en células de tipo parenquimal en los cerebros de roedores adultos después de isquemia, traumatismo cerebral y de la médula espinal, y la enfermedad de Parkinson, y que la médula ósea fomenta la proliferación prominente, la diferenciación y la migración de VZ/SVA NSCs.

10 Células de la médula ósea pluripotentes se convierten en glia en el cerebro de rata normal (Azizi et al., 1998), y facilitan la proliferación celular y la diferenciación específica para las células después de una MCAo. El experimento de trasplante de médula ósea requiere un medio sensible para vigilar la suerte de las células de médula ósea. La ayuda vino de las células de médula ósea que portan trazadores y marcadores tales como BrdU, CD34, nestina, PCNA. Células madre hematopoyéticas pluripotentes y células madre mesenquimales de la médula ósea de adultos expuestos al nuevo micro-entorno isquémico después de MCAo se activan para proliferar y diferenciarse en fenotipos de células neuronales (MAP-2, NeuN) y gliales (GFAP). Factores de la médula ósea o estroma humorales también han de ser una fuente de factores de diferenciación y proporciona el micro-entorno quimiotáctico para potenciar la proliferación, migración y diferenciación de las células madre neurales a partir de VZ/SVZ (siglas inglesas de zona ventricular/zona subventricular).

20 La VZ/SVZ del cerebro anterior de mamíferos es una región de matrices germinales que se desarrolla tarde en la gestación, se agranda y luego disminuye de tamaño, pero persiste en una forma vestigial a largo de la vida (Gage 1998). En el cerebro adulto normal, la ausencia de la producción neuronal del cerebro anterior refleja no una falta de células madre neurales apropiadas, sino más bien una inhibición tónica y/o una falta de soporte trófico y migratorio post-mitótico. A pesar de que las señales que activan las células madre en reposo del SNC dentro de la VZ/SVZ normal para entrar en el ciclo celular aún no se han resuelto, los datos demuestran que un SNC lesionado es un entorno diferente de un SNC intacto y marcadamente altera el fenotipo diferenciado terminal de las células madre neurales. De manera interesante, es de destacar que la VZ/SVZ en el cerebro anterior de adultos no es una zona amenazada de isquemia pasiva, que se encuentra lejos de las zonas isquémicas (FIGURAS 3F-H), sino que es un tejido activo que proporciona células para reconstruir el cerebro. Células de la VZ/SVZ proliferan y se diferencian en fenotipos neuronales y gliales después de una MCAo. La supervivencia de neuronas que surgen de NSCs adultas es dictada tanto por la disponibilidad de una vía permisiva para la migración como el entorno en el que se produce la migración. Nuevas neuronas parten de la VZ/SVZ para entrar en el parénquima cerebral a través de fibras guía radiales, que emanan de los cuerpos celulares en el epéndimo ventricular en la rata adulta (FIGURAS 2K-L), y proporcionan una vía permisiva para la migración tal como se encuentra durante el desarrollo (Rakic 1972). La mitosis dentro del injerto y la VZ/SVZ demuestran que el cerebro lesionado isquémico junto con las células trasplantadas revierte a una etapa temprana de desarrollo para fomentar la reparación. Los datos son consistentes con la observación de que el cerebro adulto puede formar nuevas neuronas (Gage 1998).

40 En resumen, los datos indican que el trasplante de médula ósea intracerebral e intravascular después de la lesión neural por apoplejía y la enfermedad de Parkinson mejora significativamente la recuperación funcional. El trasplante también potencia la proliferación y diferenciación de células madre de médula ósea exógenas y NSCs endógenas. Aspiraciones y biopsias de médula ósea se han empleado en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades clínicas. El trasplante de médula ósea proporciona una nueva vía para inducir plasticidad del cerebro y la médula espinal lesionados y proporciona una estrategia terapéutica para el tratamiento de la lesión neuronal y la neurodegeneración.

Además, se identifica una nueva sustancia, un material compuesto de MSCs y neuroesferas, que cuando se trasplanta al cerebro después de apoplejía o trauma, mejora la recuperación funcional.

45 A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones por autor y año. Las citas completas de las publicaciones se listan más adelante.

La invención ha sido descrita de una manera ilustrativa, y ha de entenderse que la terminología que se ha utilizado pretende estar en la naturaleza de las palabras de descripción más que de limitación.

50 Obviamente, son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención a la vista de las enseñanzas anteriores. Por lo tanto, debe entenderse que dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención puede ponerse en práctica de otra manera distinta a la descrita específicamente.

REFERENCIAS

- Burke and Olson, "Preparation of Clone Libraries in Yeast Artificial-Chromosome Vectors" en Methods in Enzymology, Vol. 194, "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", comps. C. Guthrie y G. Fink, Academic Press, Inc., Cap. 17, págs. 251-270 (1991).
- Capecchi, "Altering the genome by homologous recombination" *Science* 244:1288-1292 (1989).
- 5 Davies et al., "Targeted alterations in yeast artificial chromosomes for inter-species gene transfer", Nucleic Acids Research, Vol. 20, N° 11, págs. 2693-2698 (1992).
- Dickinson et al., "High frequency gene targeting using insertional vectors", Human Molecular Genetics, Vol. 2, N° 8, págs. 1299-1302 (1993).
- 10 Duff and Lincoln, "Insertion of a pathogenic mutation into a yeast artificial chromosome containing the human APP gene and expression in ES cells", Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders, 1995.
- Huxley et al., "The human HPRT gene on a yeast artificial chromosome is functional when transferred to mouse cells by cell fusion", Genomics, 9:742-750 (1991).
- Jakobovits et al., "Germ-line transmission and expression of a human-derived yeast artificial chromosome", Nature, Vol. 362, págs. 255-261 (1993).
- 15 Lamb et al., "Introduction and expression of the 400 kilobase precursor amyloid protein gene in transgenic mice", Nature Genetics, Vol. 5, págs. 22-29 (1993).
- Pearson and Choi, *Expression of the human b-amyloid precursor protein gene from a yeast artificial chromosome in transgenic mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993. **90**:10578-82.
- 20 Rothstein, "Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast" en Methods in Enzymology, Vol. 194, "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", comps. C. Guthrie y G. Fink, Academic Press, Inc., Cap. 19, págs. 281-301 (1991).
- Schedl et al., "A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number-dependent expression in transgenic mice", Nature, Vol. 362, págs. 258-261 (1993).
- 25 Strauss et al., "Germ line transmission of a yeast artificial chromosome spanning the murine $\alpha_1(I)$ collagen locus", Science, Vol. 259, pp. 1904-1907 (1993).
- Gilboa, E, Eglitis, MA, Kantoff, PW, Anderson, WF: Transfer and expression of cloned genes using retroviral vectors. *BioTechniques* 4(6):504-512, 1986.
- Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC: Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*, *Bio/Technology* 11:905-910, 1993.
- 30 Culver, 1998. Site-Directed recombination for repair of mutations in the human ADA gene. (Abstract) Antisense DNA & RNA based therapeutics, febrero, 1998, Coronado, CA.
- Huston et al, 1991 "Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins" in *Methods in Enzymology* (JJ Langone, comp.; Academic Press, Nueva York, NY) 203:46-88.
- 35 Johnson and Bird, 1991 "Construction of single-chain Fvb derivatives of monoclonal antibodies and their production in *Escherichia coli*" en *Methods in Enzymology* (JJ Langone, comp.; Academic Press, Nueva York, NY) 203:88-99.
- Mernaugh and Memaugh, 1995 "An overview of phage-displayed recombinant antibodies" en *Molecular Methods in Plant Pathology* (RP Singh y US Singh, comps.; CRC Press Inc., Boca Raton, FL) págs. 359-365.
- Snyder EY, Park KI, Flax J, Liu S, Rosario C, Yandava BD, Aurora Y. Potential of neural "stem-like" cells for gene therapy and repair of the degenerating central nervous system, *Adv Neurol*;72:121-132, (1997).
- 40 Goto et al., *Exp. Neurol.* 147:503-509, (1997).

Geiger H, Sick S, Bonifer C, Müller AM. Globin gene expression is reprogrammed in chimeras generated by injecting adult hematopoietic stem cells into mouse blastocysts. *Cell.*; 93:1055-1065 (1998).

Gage FH, "Stem cells of the central nervous system" *Curr. Opin. Neurobiol.* 8:671-676, (1998).

5 Kempermann G, Gage FH, "Closer to neurogenesis in adult humans", *Nat. Med.* 4:555-557, (1998).

REIVINDICACIONES

1. Uso de células estromales de la médula ósea en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de apoplejía mediante el trasplante de las células intravascularmente mediante administración intracarótida o administración intravenosa.
- 5
2. Uso de células estromales de la médula ósea de acuerdo con la reivindicación 1 para activar células madre del sistema nervioso central endógenas para diferenciarse en neuronas en un cerebro lesionado.

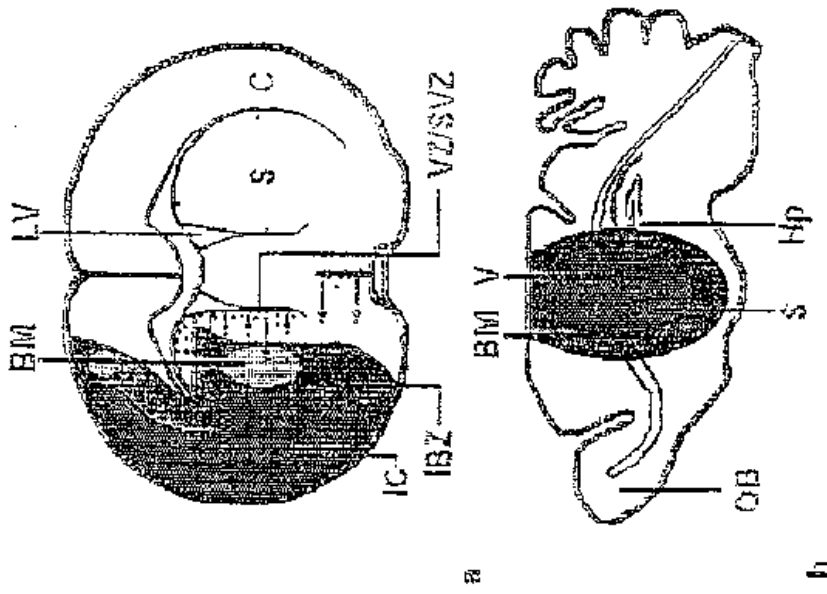
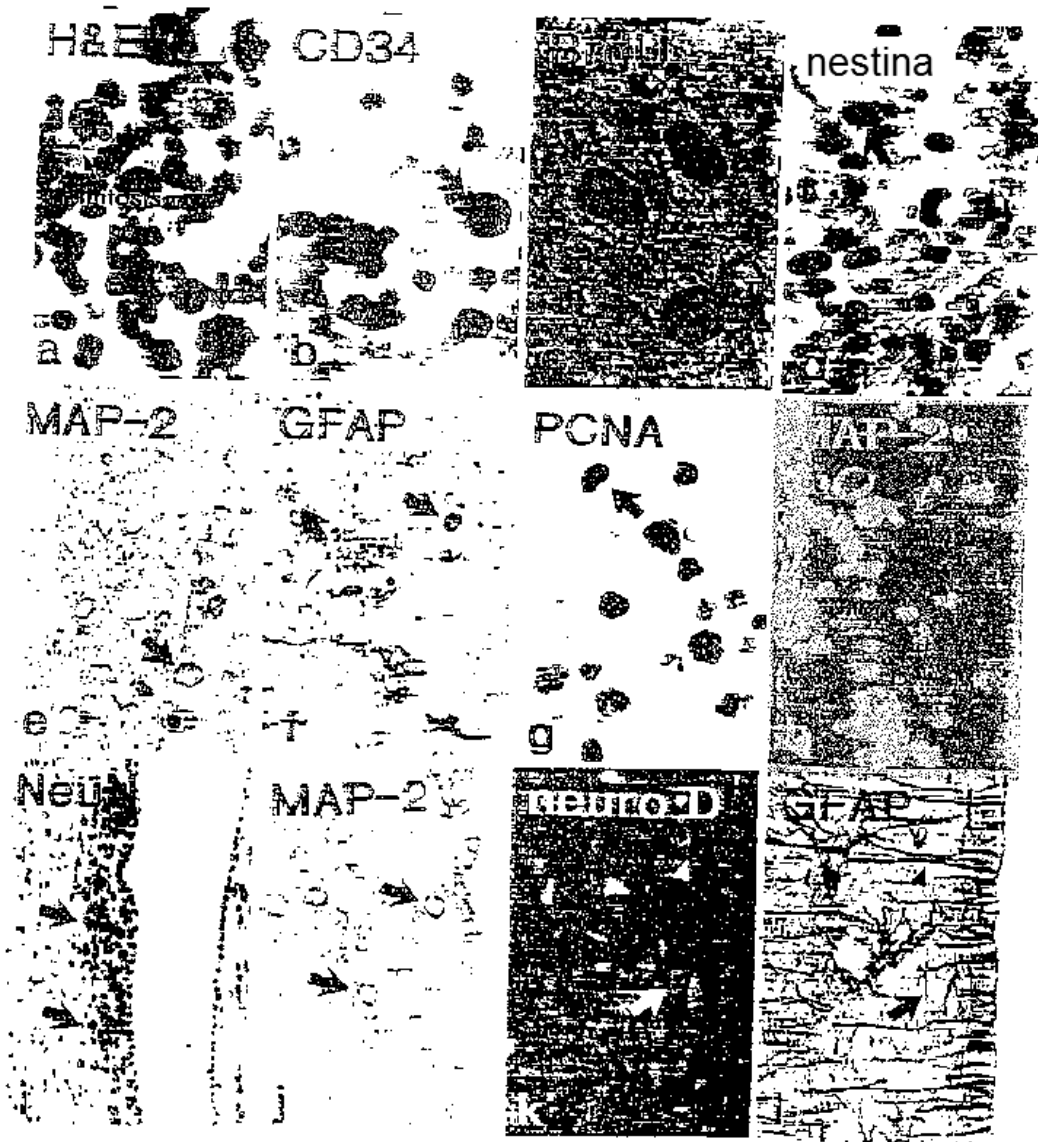


Figura 1



FIGS. 2A-L



FIGS. 3A-J

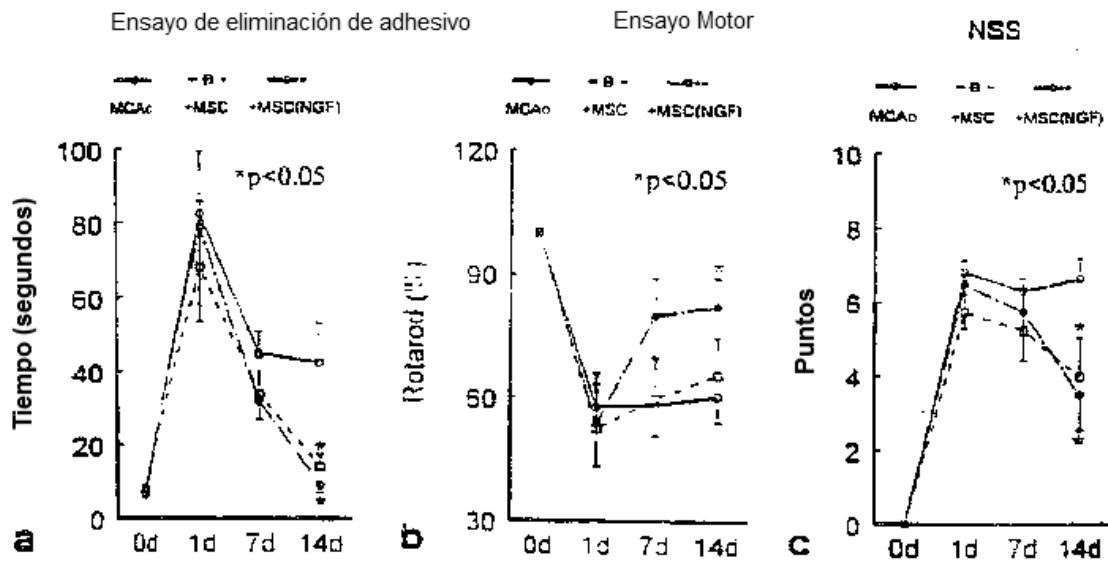


FIG. 4 A-C

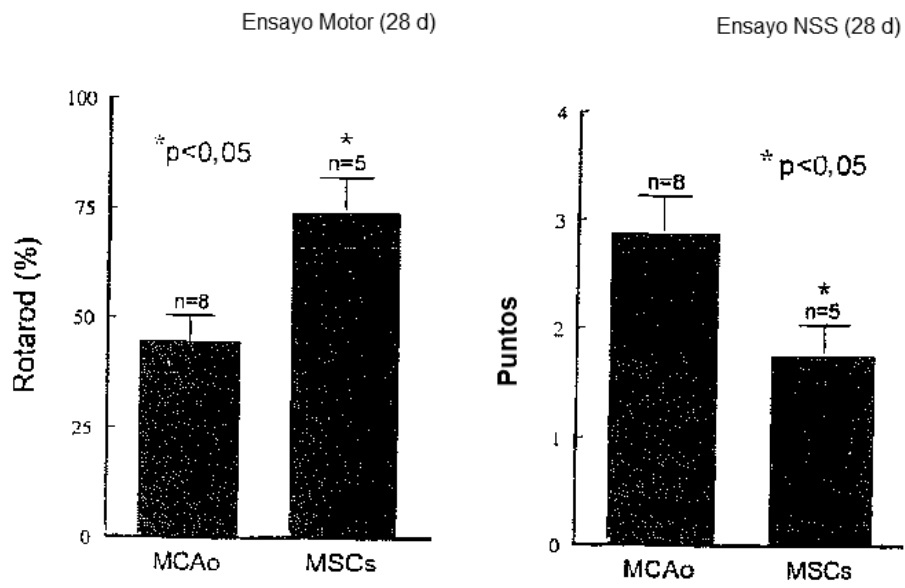


FIG. 5A-B

Inyección Intra-arterial a Ratas

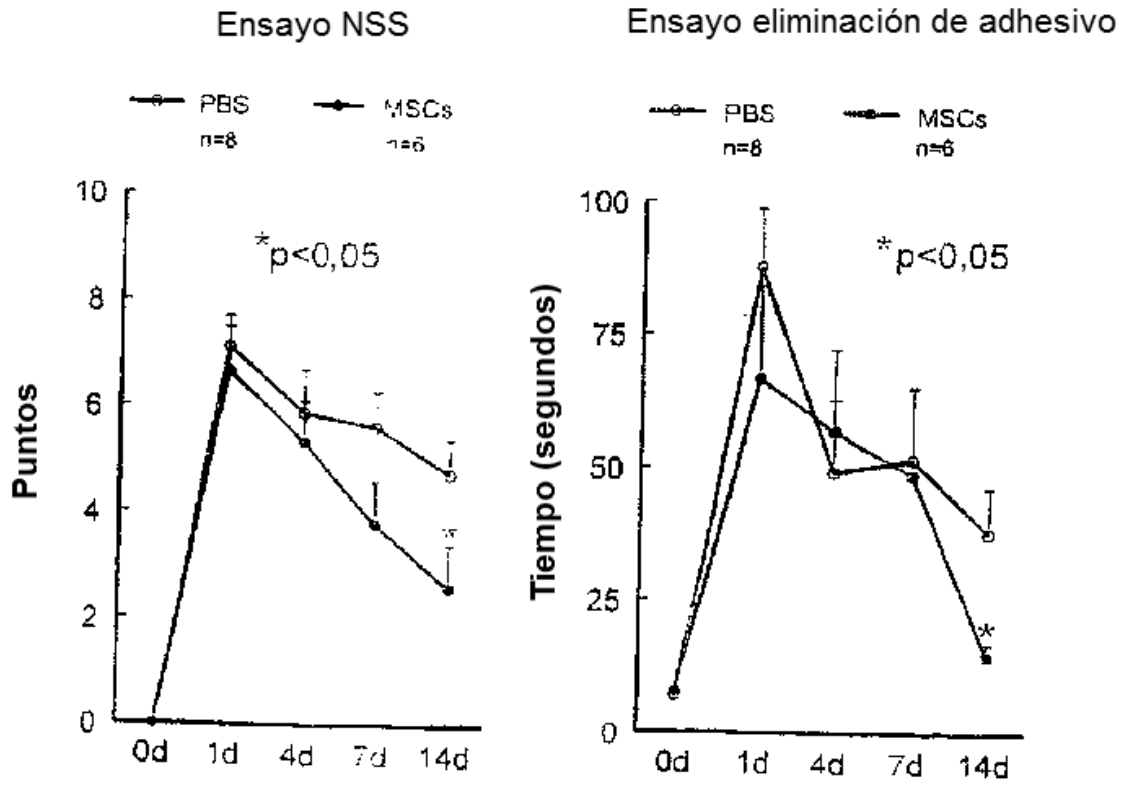
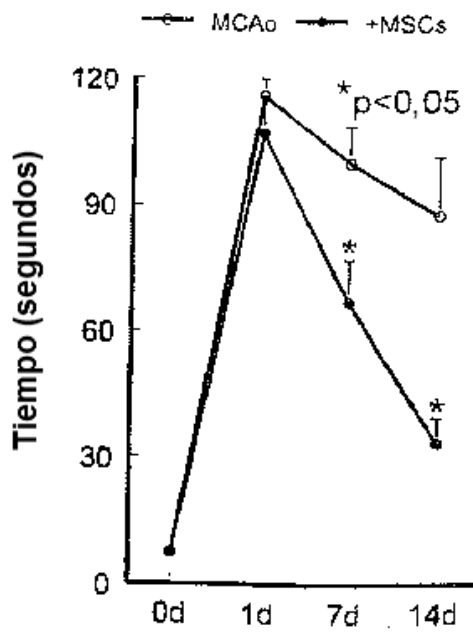


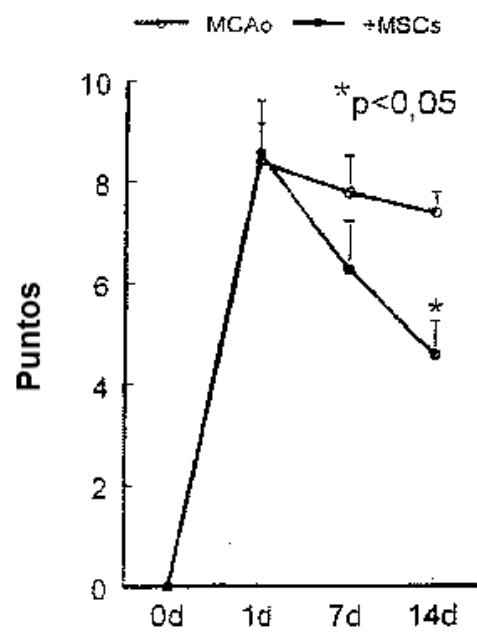
FIG. 6A-B

FIG. 7A-B

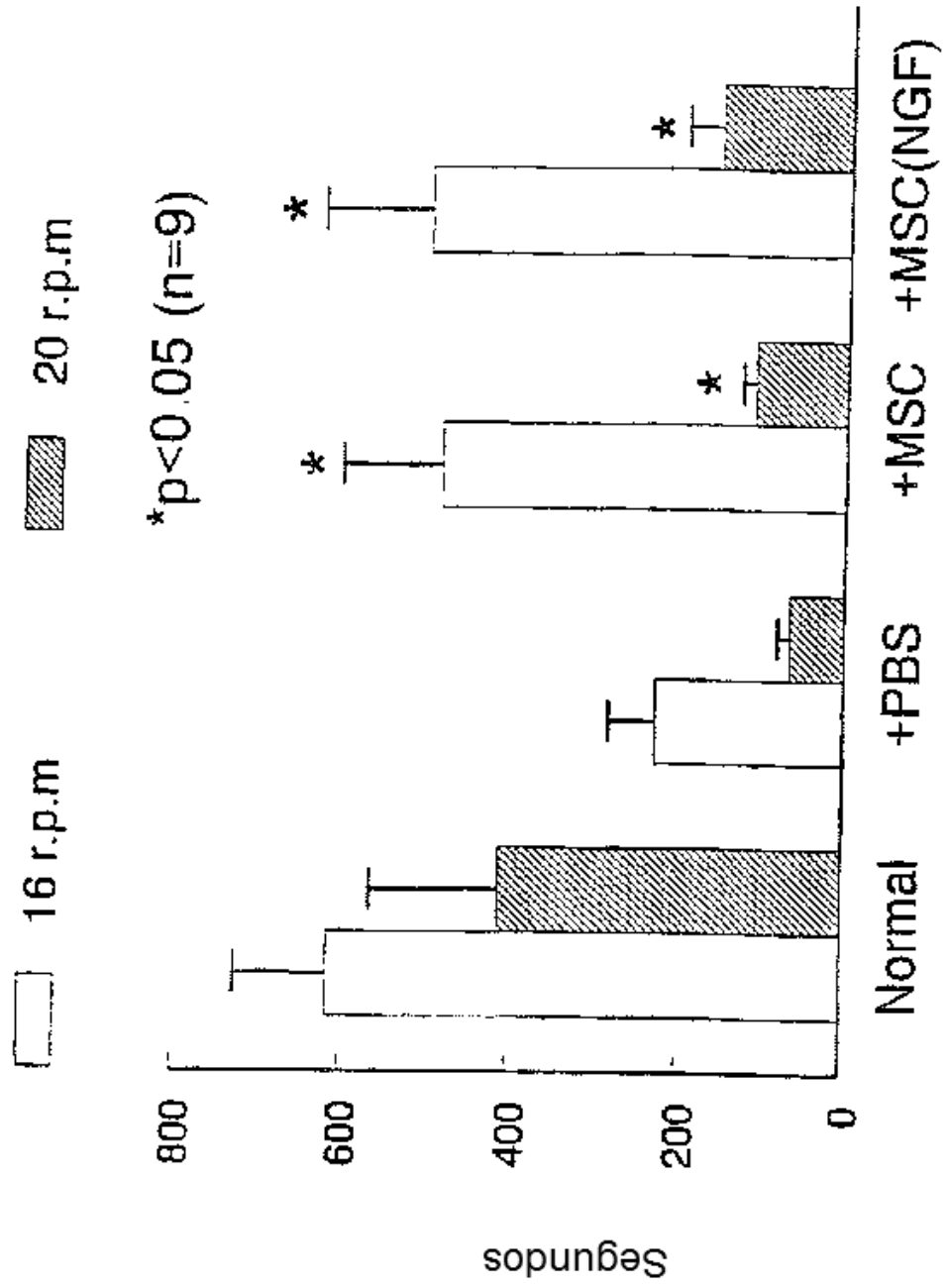
Ensayo eliminación de adhesivo
(rata-intravenoso)



Ensayo NSS
(rata-intravenoso)



Ensayo Rotarod-MPTP Ratonos



77 16, 8

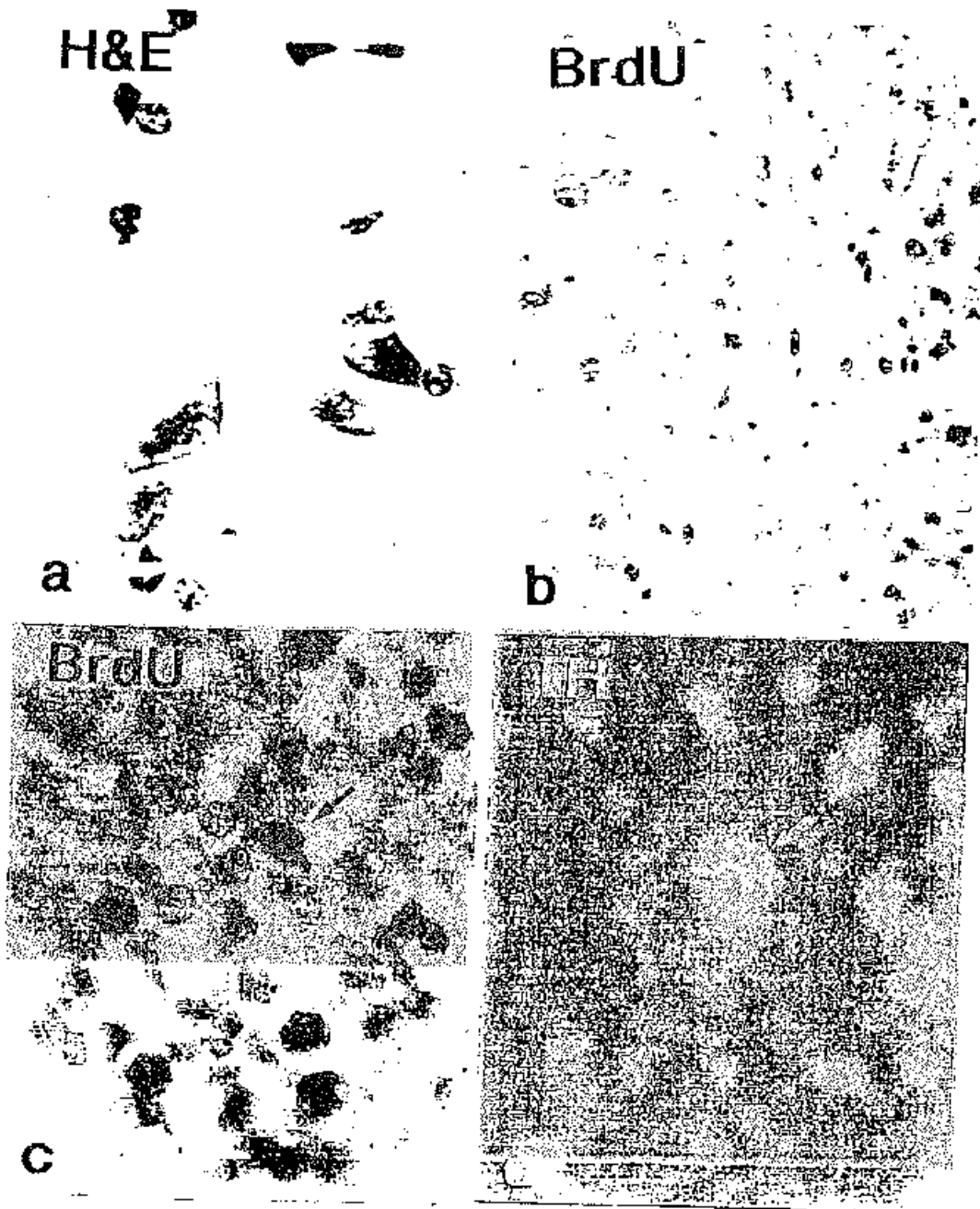


FIG. 9 A-D

Ensayo BBB

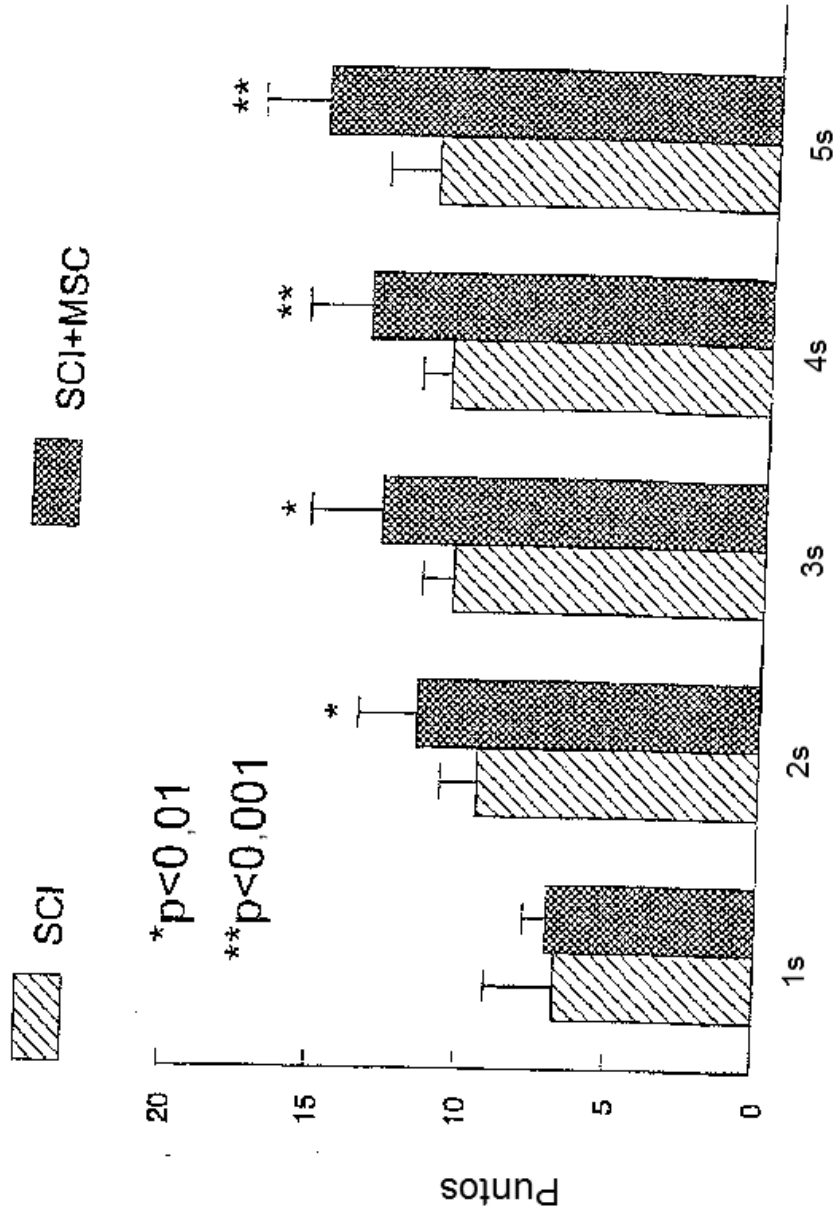


FIG. 10

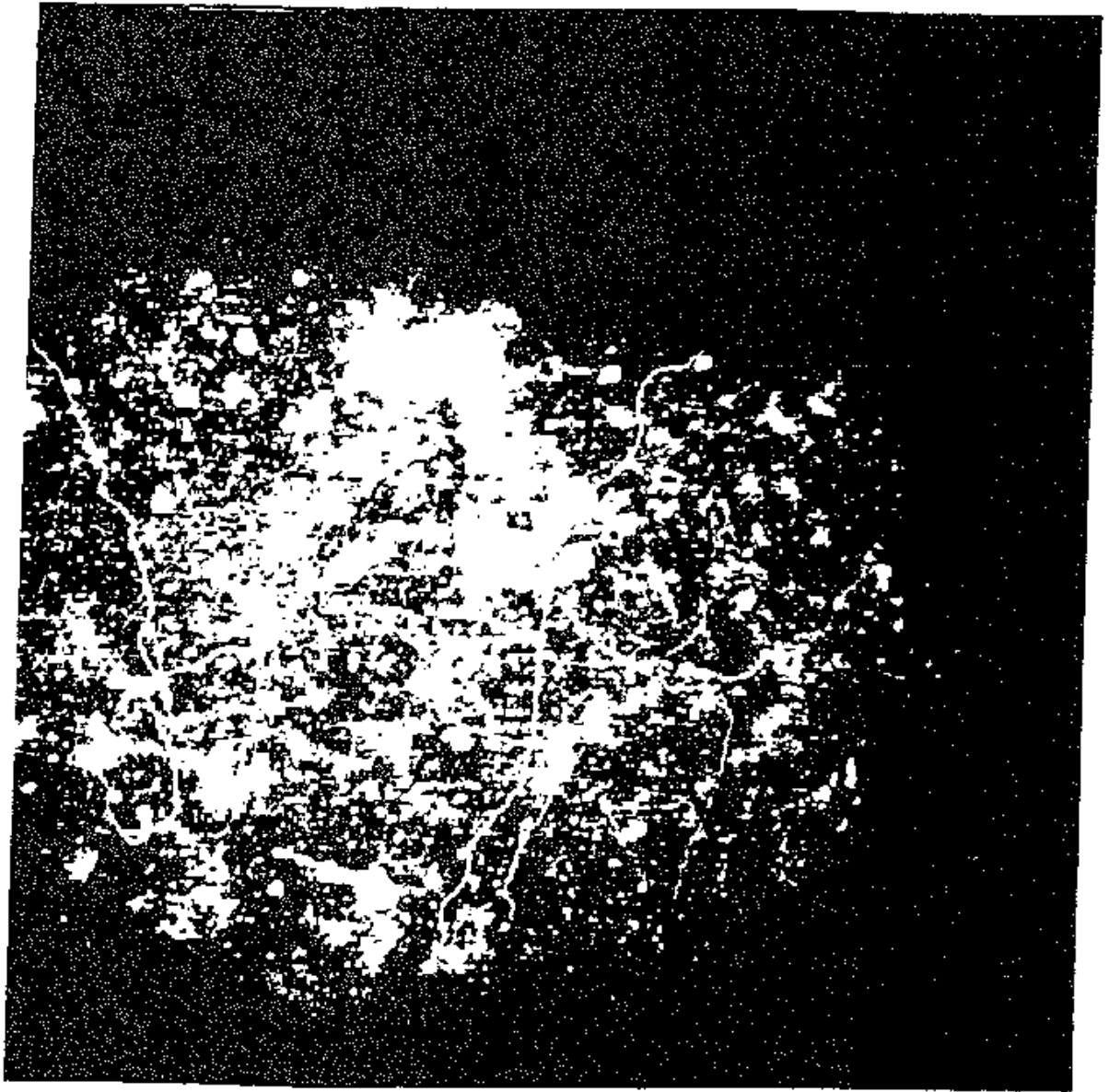


FIG. 11