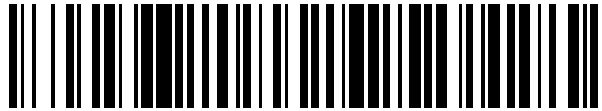


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 004**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0797 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2005 E 05851748 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 1814979**

54 Título: **Trasplante de células neurales humanas para el tratamiento de afecciones neurodegenerativas**

30 Prioridad:

17.11.2004 US 629220

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

01.06.2015

73 Titular/es:

**NEURALSTEM, INC. (100.0%)
20271 Goldenrod Lane, 2nd Floor
Germantown, Maryland 20876, US**

72 Inventor/es:

**MARSALA, MARTIN;
JOHE, KARL K.;
HAZEL, THOMAS G.;
KAKINOHAMA, OSAMU;
KOLIATSOS, VASSILIS;
YAN, JUN;
REIER, PAUL J. y
VELARDO, MARGARET J.**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 537 004 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 células neurales humanas para el tratamiento de afecciones neurodegenerativas

5 INTRODUCCIÓN

[0001] Los procedimientos descritos se refieren a procedimientos de preparación de células madre neurales para tratar trastornos mediante el trasplante de dichas células que son excepcionalmente beneficiosas para dichos procedimientos de tratamiento. En especial, los procedimientos descritos proporcionan procedimientos de preparación de células madre neurales para tratar afecciones neurodegenerativas con células madre neurales (CMN).

[0002] Los trastornos neurodegenerativos se caracterizan por condiciones que implican el deterioro de las neuronas como resultado de la enfermedad, afecciones hereditarias o lesiones, como una lesión traumática o isquémica de la médula espinal o del cerebro.

[0003] Los circuitos de la médula espinal que rigen la contracción de los músculos esqueléticos de las extremidades incluyen neuronas motoras excitadoras e interneuronas GABAérgicas (es decir, productores de GABA) y glicinérgica (es decir, productoras de glicina) inhibitoras. Una neurona motora es un nervio que se origina en el cuerno anterior de la sustancia gris de la médula espinal. El axón de la neurona motora emerge de un segmento de la médula espinal como una fibra motora eferente que inerva las fibras musculares. Los impulsos conducidos por la neurona motora estimulan la contracción de las fibras musculares. El GABA, o ácido gamma-amino butírico, es un metabolito natural del sistema nervioso de mamíferos que actúa como un neurotransmisor que inhibe o suprime la conducción nerviosa del potencial eléctrico. La pérdida de interneuronas GABAérgicas tiene como resultado la desregulación de la tonalidad inhibitoria de las contracciones musculares evocadas por neuronas motoras. Sin el control ejercido por las interneuronas inhibitoras sobre las neuronas excitadoras, se produce un sobredisparo de las neuronas excitadoras que lleva a una contracción espasmódica incontrolada o a rigidez incontrolada de los músculos de las extremidades. La pérdida de neuronas motoras da lugar a una paraplejía flácida en la que los sujetos no pueden contraer los músculos y, por tanto, no pueden moverse.

[0004] Un caso en que las interneuronas GABAérgicas estén dañadas en la médula espinal incluye una complicación asociada con un pinzamiento cruzado transitorio de la aorta torácica o toracoabdominal descendente. Dicho pinzamiento cruzado es un paso necesario en la cirugía vascular para reparar aneurismas de la aorta torácica o toracoabdominal. Durante el tiempo de pinzamiento cruzado, una parte de la médula espinal no recibe circulación sanguínea y puede sufrir isquemia. Dependiendo de la duración del intervalo isquémico, la disfunción neurodegenerativa posterior puede expresarse desde un punto de vista neurodegenerativo como paraparesia o paraplejía espasmódica o flácida completamente desarrollada.

[0005] Mientras que el mecanismo que lleva a la degeneración neuronal inducida por isquemia solo se entiende parcialmente y puede implicar una excesiva liberación/actividad de aminoácidos, prostaglandias y/o radicales libres de oxígeno excitadores, la población neuronal de la médula espinal afectada por la lesión isquémica transitoria están bien definida. Por ejemplo, el análisis histopatológico de la médula espinal obtenida de animales con paraplejía espasmódica completamente desarrollada muestra una pérdida selectiva de neuronas inhibitoras pequeñas; sin embargo, las neuronas motoras alfa persisten en segmentos espinales previamente isquémicos. Se ha descrito una patología neuronal medular similar en humanos con una lesión isquémica medular.

[0006] Por el contrario, en animales con paraplejía flácida, se observan cambios neurodegenerativos pan necróticos que afectan tanto a las interneuronas inhibitoras y excitadoras pequeñas como a las neuronas motoras ventrales. Durante el periodo de degeneración neuronal tras la isquemia medular, también se observa una activación dependiente de la lesión de la microglía local y cambios inflamatorios, como infiltración con macrófagos, al igual que en la isquemia cerebral focal o global. Dependiendo del grado de la lesión, los cambios inflamatorios típicamente son máximos entre los dos y los siete días tras la lesión isquémica y, a continuación, muestran una pérdida gradual de elementos inflamatorios durante dos a cuatro semanas de periodo postisquémico.

[0007] En las últimas dos o tres décadas se ha realizado un esfuerzo considerable para evaluar en modelos animales el potencial terapéutico del injerto medular de diversos materiales. Por tanto, se han administrado líneas celulares o tejido fetal de la médula espinal completamente aislado a las regiones lesionadas y también se ha usado terapia génica medular directa para mejora las disfunciones neurodegenerativas en varios modelos de lesión medular, incluyendo lesión traumática mecánica, médula espinal químicamente lesionada o animales genéticamente

manipulados con degeneración progresiva de neuronas motoras α (ratones o ratas transgénicas con ELA).

[0008] En general, los estudios demuestran una supervivencia a largo plazo y conservación de los fenotipos neuronales en injertos generados a partir de tejido fetal, pero no a partir de precursores neuronales expandidos *in vitro*. De hecho, solo se ha demostrado la diferenciación neuronal limitada y la maduración de los precursores neurales expandidos *in vitro* e injertados mecánica o químicamente en la médula espinal lesionada. Las células se diferencian preferiblemente en tipos celulares no neuronales. Mientras que el mecanismo de esta diferenciación neuronal preferente no se comprende por completo, se plantea la hipótesis de que probablemente está implicada una liberación local de citoquinas proinflamatorias (como TNF α o TGF β) en el sitio de la lesión previa.

[0009] La neurodegeneración representa un entorno biológico especialmente desafiante para la terapia celular y las señales de muerte celular presentes en la enfermedad neurodegenerativa establecida (Rothstein y col., 1992; Howland y col., 2002; Turner y col., 2005) pueden ser incompatibles con la supervivencia del injerto. Además, la médula espinal adulta se contempla como carente de células y/o señales que permitan la regeneración (Park y col., 2002) y la mayoría de los estudios de trasplante de CMN han mostrado una diferenciación escasa o restringida (Cao y col., 2002; Yan y col., 2003; Yan y col., 2004).

[0010] Uno de los principales problemas en las terapias celulares es la baja supervivencia celular (inferior al 5%) de las células injertadas. Todas las células injertadas hasta la fecha sufren una muerte celular significativa poco después de su inyección *in vivo*. Por tanto, para administrar una dosis de células eficaz, debe inyectarse la dosis final al menos 20 veces. Esto requiere, a su vez, una obtención de células a una escala mucho más mayor, lo que supone obstáculos administrativos y económicos adicionales. Además, no ha sido posible mantener la tasa de supervivencia de estas células *in vivo*. La imposibilidad de demostrar la administración reproducible de dosis efectivas de terapia celular impide la aprobación de su uso por parte del gobierno o de agencias reguladoras como la Food and Drug Administration.

[0011] Se presentan desafíos adicionales cuando se tratan enfermedades y afecciones neurodegenerativas que se diseminan sobre una zona extensa de un cuerpo, tejido u órgano, como el sistema nervioso completo en lugar de una única zona localizada. Por ejemplo, en la ELA, la neurodegeneración supone la muerte lenta de neuronas motoras a lo largo de toda la médula espinal, así como de las neuronas de la corteza motora. Igualmente, en la mayoría de las enfermedades lisosomales, la destrucción neuronal afecta a la mayoría de las regiones del cerebro y de la médula espinal. La enfermedad de Alzheimer afecta a la mayor parte del cerebro. Incluso en enfermedades neurodegenerativas más localizadas como el Parkinson y la enfermedad de Huntington, la zona afectada del núcleo estriado es bastante grande, mucho más grande que la zona injertada que puede conseguirse mediante cirugía. Por tanto, se prevé que las terapias celulares para enfermedades neurodegenerativas requieran procedimientos de trasplante más extensos.

[0012] Existe así una necesidad de procedimientos mejorados para tratar afecciones neurodegenerativas. También existe la necesidad de procedimientos de cultivo mejorados (véase Rappa y col., 2004, Neuroscience 124, 823-830) y trasplante de células madre neurales y progenitores neurales humanos que una vez injertados superen todas las limitaciones observadas previamente y proporcionen beneficios funcionales. Por tanto, este procedimiento de tratamiento de afecciones neurodegenerativas *in vivo* genera una diferenciación neuronal sólida, permite la supervivencia neuronal a largo plazo en diversas condiciones degenerativas y la maduración en subpoblaciones neuronales terapéuticamente relevantes en tejidos adultos que carecen de señales de desarrollo y proporciona un rango terapéutico más amplio que la propia localización de las células.

RESUMEN

[0013] En este documento se describen procedimientos para el tratamiento de afecciones neurodegenerativas. En especial, los procedimientos descritos incluyen el trasplante a un sujeto que necesita de estas CMN, progenitores neurales o precursores neurales expandidas *in vitro* de modo que las células puedan mejorar la afección neurodegenerativa. La presente invención proporciona procedimientos que incluyen la identificación, aislamiento, expansión y preparación de las células donantes para su uso como tratamiento de la afección neurodegenerativa. Las células donantes que se van a trasplantar pueden seleccionarse en correspondencia con los elementos o carencia de los mismos que contribuyan a la afección, sus síntomas y/o sus efectos.

[0014] Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para preparar una población de células madre neurales capaces de generar neuronas en la médula espinal del receptor que

comprende: a) expandir al menos una célula madre neural obtenida directamente del tejido de mamífero en un recipiente de cultivo previamente recubierto con de 0,1 µg/ml a 1 mg/ml de uno o más polímeros capaces de promover la adhesión de las células; b) concentrar la población expandida, donde los embriones, donde expandir las células madre neurales incluye cultivar las células madre neurales en ausencia de suero, donde expandir dicha célula madre neurales incluye exponer la célula madre neural a al menos un factor de crecimiento y donde la expansión celular excede las treinta duplicaciones de las células sin diferenciación.

[0015] En una realización la población expandida es capaz de generar neuronas productoras de GABA *in vivo*; o donde la población expandida es capaz de generar neuronas productoras de glicina *in vivo*; o donde al menos el 40% de la población expandida es capaz de generar neuronas en la médula espinal; o donde al menos el 30% de la población expandida es capaz de diferenciarse en neuronas *in vitro*; o donde el polímero se selecciona a partir del grupo compuesto por poli-D-lisina, poli-L/D-lisina, poli-L-lisina, poli-D-ornitina, poli-L-ornitina, fibronectina, lamina, colágeno y combinaciones de los mismos. En una realización preferida, el factor de crecimiento se selecciona a partir del grupo compuesto por bFGF, EGF, TGF-alfa, αFGF y combinaciones de los mismos.

[0016] En una realización, la célula madre neural se aísla a partir de una fuente seleccionada entre el grupo compuesto por un sistema nervioso central, un sistema nervioso periférico, médula ósea, sangre periférica, sangre de cordón umbilical y al menos un embrión. En una realización preferida el mamífero es un mamífero en desarrollo. En una realización todavía más preferida la edad de gestación del mamífero en desarrollo está entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 20 semanas.

[0017] Las células de los procedimientos descritos incluyen células que, tras el trasplante, generan un número de neuronas suficiente para integrarse dentro de la infraestructura neuronal para mejorar un estado patológico o afección. En este documento se describen procedimientos que incluyen el tratamiento de enfermedades o afecciones neurodegenerativas trasplantando progenitores neurales multipotentes o células madre neurales aislados del sistema nervioso central de un mamífero y que se han expandido *in vitro*. Por ejemplo, puede usarse el trasplante de las células madre neurales expandidas para mejorar la función ambulatoria en un sujeto que sufre de diversas formas de mielopatía con síntomas de espasticidad, rigidez, convulsiones, parálisis o cualquier otro tipo de hiperactividad muscular.

[0018] Un procedimiento de tratamiento puede incluir suministrar a una zona neural lesionada, mediante trasplante, un número adecuado de CMN que pueden diferenciarse en un número suficiente de neuronas productoras de GABA y/o de neuronas productoras de glicina para atenuar los circuitos neurales defectuosos, incluyendo circuitos neurales hiperactivos.

[0019] Entre los procedimientos descritos se incluye la recuperación de la función motora en una enfermedad de neuronas motoras. Puede proporcionarse un número adecuado o una cantidad terapéuticamente eficaz de CMN o de progenitores neurales que son capaces de diferenciarse en neuronas motoras a al menos una zona de neurodegeneración, como una médula espinal degenerativa, para recuperar la función motora. Las CMN ejercen su efecto terapéutico sustituyendo las uniones neuromusculares degeneradas.

[0020] De forma conjunta o alternativamente, las CMN ejercen su efecto terapéutico expresando y liberando moléculas tróficas que protegen a las neuronas del tejido degenerado de modo que sobrevivan un número mayor de ellas durante un periodo de tiempo más largo. Puede estimularse a las neuronas derivadas de CMN a que se proyecten dentro de las raíces ventrales e inerven el músculo donde las CMN participan en conexiones recíprocas extensivas con neuronas motoras del huésped en sujetos con enfermedad degenerativa de neuronas motoras. Por tanto, las CMN procedentes de médula espinal fetal humana pueden injertarse en la médula lumbar donde estas células pueden diferenciarse en neuronas que formen contactos sinápticos con neuronas del huésped y expresar y liberar factores de crecimiento de neuronas motoras.

[0021] Entre los procedimientos descritos se incluyen proporcionar células madre neurales o progenitores neurales que se integran con el tejido huésped y proporcionan uno o más factores de crecimiento a las neuronas huésped protegiéndolas así de influencias degenerativas presentes en el tejido. Los procedimientos incluyen introducir un número suficiente de CMN o progenitores neurales en una zona de la médula espinal de modo que las CMN secreten una cantidad eficaz de al menos un factor de crecimiento.

[0022] Los procedimientos descritos incluyen proporcionar un procedimiento para su uso en modelos animales en la evaluación preclínica de células madre para la sustitución celular en afecciones neurodegenerativas.

[0023] Los procedimientos descritos incluyen aumentar la eficacia de la diferenciación de las CMN trasplantadas en neuronas. El procedimiento puede incluir expandir CMN o progenitores neurales muy enriquecidos en su estado indiferenciado de modo que, tras el trasplante, un número suficiente equivalente al 20% de las células del injerto adopten un destino neuronal.

5

[0024] Los procedimientos descritos incluyen aumento del número de células diferenciadas sin aumentar el número de CMN o progenitores neurales que se van a trasplantar. El procedimiento puede incluir preparar la población donante expandida de modo que, una vez trasplantados, las CMN o los progenitores neurales continúen dividiéndose *in vivo* al menos diez veces y sin generar un tumor aumentando, de este modo, de forma eficaz el número total de células administradas.

10

[0025] Las células de los procedimientos descritos pueden aislarse u obtenerse a partir de tejidos fetales, neonatales, juveniles, adultos o postmortem de un mamífero. Las células de los procedimientos descritos pueden aislarse u obtenerse del sistema nervioso central, sangre o cualquier otra fuente adecuada de células madre que se diferencien en neuronas. Las células también pueden obtenerse a partir de células madre embrionarias. Por ejemplo, en una realización, las células incluyen células neuroepiteliales aisladas a partir de la médula espinal fetal en desarrollo. En determinadas circunstancias, las células madre neurales pueden ser progenitores neurales aislados a partir de subregiones específicas del sistema nervioso central.

15

[0026] Según los procedimientos descritos, las células madre neurales se expanden en cultivo. En una realización, las células madre neurales pueden ser CMN multipotentes capaces de expandirse en cultivo y generar tanto neuronas como glía tras la diferenciación.

20

[0027] Las células pueden estar indiferenciadas, prediferenciadas o completamente diferenciadas *in vitro* en el momento del trasplante. En una realización se induce a las células a diferenciarse en una estirpe neural. Las células de los procedimientos descritos pueden sufrir diferenciación neuronal *in situ* en presencia de citoquinas proinflamatorias y otros factores ambientales existentes en un tejido lesionado.

25

[0028] Usando los procedimientos descritos, pueden tratarse los circuitos neurales mediante trasplante o introduciendo las células en regiones apropiadas para mejorar la enfermedad, trastorno o afección. Generalmente, el trasplante se produce en el tejido nervioso o en tejidos no neuronales que mantienen la supervivencia de las células injertadas. Los injertos de CMN empleados en los procedimientos descritos sobreviven bien en un entorno neurodegenerativo donde las CMN pueden ejercer potentes efectos clínicos en forma de retraso de la aparición y progresión de afecciones o enfermedades neurodegenerativas.

30

35

[0029] En algunos casos, el trasplante puede realizarse en zonas remotas del cuerpo y las células pueden migrar a su objetivo deseado. Por consiguiente, los procedimientos descritos también pueden incluir un injerto parcial de CMN humanas. Según se usa en este documento, el término «injerto parcial» puede referirse al implante de CMN expandidas solo en una parte de una zona o en menos de una zona completa de neurodegeneración. Por ejemplo, realizando un injerto parcial de CMN humanas en los segmentos lumbares de la médula espinal. Al menos una parte de los efectos de las CMN sobre las neuronas motoras en degeneración incluye la administración de neurotrofinas y citoquinas tróficas a neuronas motoras huéspedes en degeneración mediante mecanismos celulares clásicos. Para este fin, se ha demostrado en un modelo animal transgénico de enfermedad de neuronas motores que las CMN sometidas a un injerto parcial en los segmentos lumbares de la médula espinal usando los procedimientos descritos sobreviven, sufren diferenciación neuronal completa, promueven la supervivencia de las neuronas motoras y funcionan en las zonas inmediatas del trasplante, así como en zonas remotas con respecto a la zona de trasplante.

40

45

[0030] Por consiguiente, los procedimientos descritos proporcionan un procedimiento para tratar la espasticidad, rigidez o afecciones de hiperactividad muscular. Los procedimientos incluyen aislar al menos una célula madre neural de un mamífero y expandir la célula madre neural *in vitro* hasta una población expandida. El procedimiento también incluye concentrar la población expandida e introducir una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha población expandida en al menos una zona de una médula espinal receptora. Al menos el 20% de la población expandida es capaz de generar neuronas en la médula espinal receptora.

50

55

[0031] Las afecciones que pueden tratarse como se describe en este documento pueden derivar de una lesión traumática de la médula espinal, lesión isquémica de la médula espinal, lesión traumática cerebral, ictus, esclerosis múltiple, parálisis cerebral, epilepsia, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, isquemia crónica, afecciones hereditarias o cualquier combinación de las mismas.

- 5 [0032] En una realización, la célula madre neural se aísla a partir de una fuente seleccionada entre el grupo compuesto por un sistema nervioso central, un sistema nervioso periférico, médula ósea, sangre periférica, sangre de cordón umbilical y al menos un embrión no humano.
- [0033] En una realización, el mamífero es un mamífero en desarrollo.
- [0034] En una realización, la edad de gestación del mamífero en desarrollo está entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 20 semanas.
- 10 [0035] Según la presente invención, la expansión de la célula madre neural incluye el cultivo de dicha célula madre neural en ausencia de suero.
- [0036] Según la presente invención, la expansión de la célula madre neural incluye la exposición de dicha célula madre neural a al menos un factor de crecimiento.
- 15 [0037] En una realización, el factor de crecimiento se selecciona a partir del grupo compuesto por bFGF, EGF, TGF-alfa, aFGF y combinaciones de los mismos.
- 20 [0038] En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida es capaz de generar al menos 1000 neuronas productoras de GABA *in vivo*.
- [0039] En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida es capaz de generar al menos 1000 neuronas productoras de glicina *in vivo*.
- 25 [0040] En una realización, al menos el 40% de la población expandida es capaz de generar neuronas en la médula espinal.
- [0041] Como se describe en este documento, la introducción de una cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida puede incluir inyectar al menos una parte de la cantidad terapéuticamente eficaz en varias zonas de la médula espinal receptora.
- 30 [0042] En una realización, al menos el 30% de la población expandida es capaz de diferenciarse en neuronas *in vitro*.
- 35 [0043] En este documento se describe una célula madre neural. Una célula madre neural según se describe en este documento puede ser capaz de tratar la espasticidad, rigidez o afecciones de hiperactividad muscular. La célula madre neural se aísla a partir de un mamífero y se expande *in vitro hasta una población expandida*. La población expandida que incluye la célula madre se concentra y se introduce una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha población expandida en al menos una zona de una médula espinal receptora. Al menos el 20% de la población expandida es capaz de generar neuronas en la médula espinal receptora.
- 40 [0044] Se describe un procedimiento de tratamiento del dolor crónico. El procedimiento puede incluir aislar al menos una célula madre neural de un mamífero y expandir la célula madre neural *in vitro* hasta una población expandida. El procedimiento también puede incluir concentrar la población expandida e introducir una cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida en al menos una zona de una médula espinal receptora. Al menos el 20% de la población expandida es capaz de generar neuronas en la médula espinal receptora.
- 45 [0045] El dolor crónico puede derivar de una lesión traumática de la médula espinal, lesión isquémica de la médula espinal, lesión traumática cerebral, ictus, esclerosis múltiple, parálisis cerebral, epilepsia, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, isquemia crónica, afecciones hereditarias o cualquier combinación de las mismas.
- 50 [0046] En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida es capaz de generar al menos 1000 neuronas productoras de GABA.
- 55 [0047] En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida es capaz de generar al menos 1000 neuronas productoras de glicina.

[0048] En una realización, al menos el 40% de la población expandida es capaz de generar neuronas en la médula espinal.

[0049] Como se describe en este documento, la introducción de una cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida incluye la inyección de al menos una parte de la cantidad terapéuticamente eficaz en varias zonas de la médula espinal receptora.

[0050] Las zonas pueden incluir el cuerno dorsal.

10 **[0051]** Las zonas pueden incluir el espacio intratecal.

[0052] También se describe una célula madre neural. La célula madre neural es capaz de tratar el dolor crónico. La célula madre neural se aísla a partir de un mamífero y se expande *in vitro* hasta una población expandida. La población expandida que incluye la célula madre se concentra y se introduce una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha población expandida en al menos una zona de una médula espinal receptora. Al menos el 20% de la población expandida es capaz de generar neuronas en la médula espinal receptora.

[0053] También se describe un procedimiento de tratamiento de la degeneración de neuronas motoras. Los procedimientos incluyen aislar al menos una célula madre neural de un mamífero y expandir la célula madre neural *in vitro* hasta una población expandida. El procedimiento también incluye concentrar la población expandida e introducir una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha población expandida en al menos una zona de una médula espinal receptora. Al menos el 20% de la población expandida es capaz de generar neuronas en la médula espinal receptora.

25 **[0054]** La degeneración de neuronas motoras puede derivar de una lesión traumática de la médula espinal, lesión isquémica de la médula espinal, lesión traumática cerebral, ictus, esclerosis múltiple, parálisis cerebral, epilepsia, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, isquemia crónica, afecciones hereditarias o cualquier combinación de las mismas.

30 **[0055]** Como se describe en este documento, dicho procedimiento puede incluir aislar la célula madre neural de una zona rica en al menos un subtipo neuronal, donde el subtipo neuronal produce un factor de crecimiento eficaz para mejorar la deficiencia motora.

[0056] La población expandida puede incluir una cantidad de células madre neurales capaces de diferenciarse en neuronas suficientes para secretar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un factor de crecimiento.

[0057] El procedimiento puede incluir aislar la célula madre neural de una zona rica en neuronas motoras.

40 **[0058]** También se describe una célula madre neural capaz de tratar la siringomielia. La célula madre neural se aísla a partir de un mamífero y se expande *in vitro* hasta una población expandida. La población expandida que incluye la célula madre se concentra y se introduce una cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida en al menos una zona de una médula espinal receptora. Al menos el 20% de la población expandida es capaz de generar neuronas en la médula espinal receptora.

45 **[0059]** Se describe también un procedimiento de tratamiento de la siringomielia. Los procedimientos incluyen aislar al menos una célula madre neural de un mamífero y expandir dicha célula madre neural *in vitro* hasta una población expandida. El procedimiento también incluye concentrar la población expandida e introducir una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha población expandida de al menos una siringe de una médula espinal receptora. Al menos el 20% de la población expandida es capaz de generar neuronas en la siringe de la médula espinal receptora.

[0060] La siringomielia puede derivar de una lesión traumática de la médula espinal, lesión isquémica de la médula espinal, lesión traumática cerebral, ictus, esclerosis múltiple, parálisis cerebral, epilepsia, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, isquemia crónica, afecciones hereditarias o cualquier combinación de las mismas.

[0061] Dicho procedimiento puede incluir aislar la célula madre neural de una zona rica en al menos un subtipo neuronal, donde el subtipo neuronal produce un factor de crecimiento eficaz para mejorar la siringomielia.

- [0062]** Dicho procedimiento puede incluir aislar la célula madre neural de una zona rica en neuronas motoras.
- [0063]** La población expandida puede incluir una cantidad de células madre neurales capaces de diferenciarse en neuronas suficientes para secretar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un factor de crecimiento.
- [0064]** La cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida puede ser capaz de generar al menos 1000 neuronas.
- [0065]** Al menos 100 000 células madre neurales de la población expandida pueden introducirse en la jeringa de la médula espinal receptora.
- [0066]** También se describe una célula madre neural capaz de tratar la siringomielia. La célula madre neural se aísla a partir de un mamífero y se expande *in vitro hasta una población expandida*. La población expandida que incluye la célula madre se concentra y se introduce una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha población expandida en una jeringa de una médula espinal receptora. Al menos el 20% de la población expandida es capaz de generar neuronas en la jeringa de la médula espinal receptora.
- [0067]** La presente invención proporciona un procedimiento de expansión *in vitro* de al menos una célula madre neural a una población expandida de células madre neurales. Cada expansión de células madre neurales excede las treinta duplicaciones de las células sin diferenciación. El procedimiento incluye disociar las células madre neurales del tejido del sistema nervioso central y proporcionar al menos una proteína extracelular a un recipiente de cultivo. La proteína extracelular incluye al menos aproximadamente 10 µg/ml de poli-D-lisina y aproximadamente 1 mg/ml de fibronectina. El procedimiento también incluye cultivar los células madre neurales disociados en el recipiente de cultivo en ausencia de suero y añadir al recipiente de cultivo al menos un factor de crecimiento. El factor de crecimiento se selecciona a partir del grupo compuesto por bFGF, EGF, TGF-alfa, aFGF y combinaciones de los mismos. El procedimiento además incluye pasar las células cultivadas antes de la confluencia.
- [0068]** En una realización, los células madre neurales expandidos son capaces de diferenciarse a neuronas.
- [0069]** En una realización, la expansión de la célula madre neural incluye añadir fibronectina al medio de cultivo como factor soluble.
- [0070]** En una realización, la disociación de las células y el pase de las células incluyen disociación enzimática.
- [0071]** En una realización, la disociación enzimática incluye tratar las células con tripsina.
- [0072]** Una cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida puede introducirse en al menos una zona de un sistema nervioso receptor para tratar una enfermedad neurodegenerativa.
- [0073]** Por tanto, es una ventaja de los procedimientos descritos sobre las técnicas farmacológicas existentes que proporcionan un procedimiento para facilitar la capacidad de las CMN trasplantadas para secretar moléculas tróficas que puedan administrarse a neuronas motoras en degeneración en condiciones de biodisponibilidad óptimas.
- [0074]** Aún otra ventaja de la presente invención es proporcionar un procedimiento de cultivo y expansión de CMN para facilitar el injerto exitoso de las CMN en la médula lumbar.
- [0075]** Una ventaja adicional de la invención descrita incluye proporcionar un procedimiento para conseguir una proporción de diferenciación neuronal más elevada de una población de CMN.
- [0076]** Otra ventaja del procedimiento descrito incluye conseguir efectos clínicos a partir de un injerto parcial de CMN.
- [0077]** Características y ventajas adicionales de los procedimientos descritos se describen, y serán aparentes, en la siguiente descripción detallada de la invención y en las figuras.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**[0078]**

5 Figura 1. Expansión de células madre neurales humanas. Se aisló una línea progenitora medular humana (conocida como CMN) de tejido de la médula espinal fetal post mortem de 7 a 8 semanas de edad y se pasó de forma seriada durante aproximadamente 130 días de periodo neto de cultivo. En cada pase, el número de células recuperadas en la recogida se dividió por el número inicial de células en la siembra en placa para obtener el número de veces de aumento en el número de células. El número de veces de aumento acumulado (eje Y izquierdo) se obtuvo
10 multiplicando el número de veces de aumento en cada pase. El tiempo de duplicación (eje Y derecho) de las células en cada pase se calculó dividiendo el número de veces de aumento del número de células por el periodo de cada cultivo (eje X). Este proceso se repitió tres veces (expansión seriada 1, 2 y 3).

Figura 2. Morfología de las células madre medulares humanas expandidas. (A) Vista con contraste de fases de un
15 cultivo en expansión fijado y sin teñir, objetivo 20x, (B) Tinción con anticuerpo anti-nestina.

Figura 3. Caracterización de los cultivos diferenciados obtenidos a partir de células madres medulares humanas. Las células expandidas de los pases 15-16 se diferenciaron durante aproximadamente 14 días de cultivo, se fijaron y tiñeron con diversos anticuerpos específicos de neuronas. (A) Tau y MAP2; (B) tubulina beta de tipo 3; (C) GABA;
20 (D) Acetilcolina transferasa.

Figura 4. Expansión de células madre de mesencéfalo humanas. Se aisló una línea progenitora de mesencéfalo humana (conocida como CMN) a partir de tejido de mesencéfalo fetal postmortem de 7-8 semanas y se pasó de forma seriada durante aproximadamente 170 días de periodo neto de cultivo. En cada pase, el número de células recuperadas en la recogida se dividió por el número inicial de células en la siembra para obtener el número de veces de aumento en el número de células. El número de veces de aumento acumulado (eje Y) se obtuvo multiplicando el
25 número de veces de aumento en cada pase.

Figura 5. Actividad de captación de dopamina de las células madre de mesencéfalo humano expandidas. La actividad transportadora de dopamina (ATD) en células vivas se determinó a partir de una línea de células madre de mesencéfalo humano y una de sus sublíneas clonales, que se diferenciaron durante 22 o 44 días en el momento del ensayo. Las células se incubaron con dopamina marcada radiactivamente en presencia (+) o ausencia (-) del inhibidor de ATD nomifensina (10 μ M). Las células se lavaron para eliminar la dopamina no incorporada y se lisaron en una mezcla de líquido de centelleo. A continuación, se determinó la radioactividad celular total (dpm) usando un
35 contador de centelleo.

Figura 6. Efecto de los factores exógenos sobre la inducción de diferenciación neuronal y diferenciación dopaminérgica de líneas celulares madre de mesencéfalo humanas. Las células madre neurales crioconservadas de dos líneas de células madre de mesencéfalo humanas (527RMB y 796RMB) se descongelaron y sembraron en placas a una densidad de 40 000 células por pocillo en portaobjetos de cuatro cámaras en presencia de bFGF y se dejó que proliferaran durante 6 días. Posteriormente, se retiró el bFGF y se permitió la diferenciación durante 8 días más. Las células se dividieron en cuatro grupos en función del tiempo y duración de la exposición a medio acondicionado con células de Sertoli (SCCM, diluido 1:1 en N2). Un grupo se expuso a SCCM durante la proliferación y diferenciación (condición 1); un segundo grupo se expuso solo durante la proliferación (condición 2);
40 un tercero se expuso solo durante la diferenciación (condición 3) y un cuarto no se expuso a SCCM (Control, Cont.). Los medios se cambiaron cada dos días, y se añadió un mitógeno diariamente durante la fase proliferativa. Se mantuvieron cuatro pocillos por condición para poder realizar un marcaje con múltiples marcadores. Tras la diferenciación, las células se fijaron usando paraformaldehído al 4% y se realizó una inmunotinción usando anticuerpos frente a MAP2ab (Fig. 6A) y tirosina hidroxilasa (Fig. 6B), así como GFAP y GalC. Las células
45 inmunoteñidas se contaron usando un objetivo 40x y se contaron al menos tres campos para cada pocillo. Se detectaron pocas o ninguna célula GFAP+ o GalC+ tras el análisis de células mantenidas en cualquier condición, por lo que estos antígenos se excluyeron del análisis.

Figura 7. Reducción de la espasticidad/rigidez y de las deficiencias motoras en ratas mediante trasplante de células madre neurales humanas. Se obtuvieron ratas espásticas mediante lesión isquémica de la médula espinal lumbar.
55 En un grupo (círculos negros), las ratas (n = 9) se trasplantaron con células madre medulares humanas expandidas en cultivo (pase 16), mientras que el otro grupo, el grupo control (círculos blancos, n = 7) recibieron solo los medios sin las células. El agente inmunosupresor FK506 se administró a 1 mg/kg al día a ambos grupos durante todo el estudio (8 semanas). La coordinación motora de animales individuales se evaluó mediante la puntuación BBB una

vez a la semana.

Figura 8. Reducción de la espasticidad/rigidez y de las deficiencias motoras en ratas mediante trasplante de células madre medulares humanas. Se obtuvieron ratas espásticas mediante lesión isquémica de la médula espinal lumbar.

5 En un grupo (círculos negros y cuadrados negros), las ratas (n = 13) se trasplantaron con células madre medulares humanas expandidas en cultivo (pase 16), mientras que el otro grupo, el grupo control (triángulos rellenos, n = 6) recibió solo los medios sin las células. El agente inmunosupresor FK506 se administró a 3 mg/kg al día a ambos grupos durante todo el estudio (12 semanas). La coordinación motora de animales individuales se evaluó mediante la puntuación BBB una vez a la semana.

10

Figura 9. Efectos del tratamiento con CMN humanas sobre la gravedad de la enfermedad de neuronas motoras en ratas G93A SOD1 mostrados con el análisis de progresión (A-B), así como el criterio de valoración (C-E) de las medidas clínicas y patológicas en casos con injertos de células vivas (L, rojo) y células muertas (control, C) (azul).

15 **[0079]** A-B. El panel A es una gráfica de Kaplan-Meier en la que se muestra una separación significativa entre los animales experimentales y controles en el transcurso de la observación (P = 0,0003). En el panel B se muestra una separación en las dos medidas principales de la debilidad muscular (puntuaciones BBB y de plano inclinado) entre los dos grupos (P = 0,00168 y 0,00125, respectivamente).

20 **[0080]** C-E. Análisis del criterio de valoración de supervivencia (C), tiempo hasta la aparición de la enfermedad (D) y número de neuronas motoras (E) en ratas experimentales y control. En el panel C se muestra una diferencia significativa de 11 días en la esperanza de vida entre los dos grupos (P = 0,0005). En el panel D se muestra una diferencia significativa de 7 días en el tiempo hasta la aparición de la enfermedad entre los dos grupos (P = 0,0001). En el panel E se muestra una diferencia de 3212 células en la protuberancia lumbar entre los grupos con CMN vivas y muertas (P = 0,01). La inserción en la base de (E) muestra la diferencia en la supervivencia de neuronas motoras entre una rata experimental (arriba) y control (abajo) representativas a los 128 días de edad; las flechas indican el grupo de neuronas motoras lateral. Tamaño de las barras: 150 µm.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

30

[0081] Los procedimientos descritos están relacionados con el tratamiento de afecciones neurodegenerativas. En especial, los procedimientos descritos incluyen procedimientos de preparación de células madre neurales para el trasplante a un sujeto que las necesita. La preparación de las células para su trasplante puede incluir expandir *in vitro* una población específica de células hasta un nivel suficiente para su uso comercial como tratamiento para afecciones neurodegenerativas. Un procedimiento de tratamiento de una zona neural degenerada o lesionada puede incluir suministrar a la zona un número eficaz de células madre neurales suficiente para mejorar la afección neurodegenerativa.

35

[0082] Según se usa en este documento, una afección neurodegenerativa puede incluir cualquier enfermedad o trastorno, síntomas, causas o efectos del mismo que implique el daño o deterioro de las neuronas. Entre las afecciones neurodegenerativas pueden incluirse, pero sin limitaciones, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia telangiectasia, enfermedad de Canavan, síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Machado-Joseph, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Niemann-Pick, esclerosis primaria lateral, enfermedad de Refsum, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Schilder, enfermedad de Steele-Richardson-Olszewsky, tabes dorsal o cualquier otra afección asociada con neuronas dañadas. Pueden incluirse otras afecciones neurodegenerativas o pueden estar causadas por lesión traumática de la médula espinal, lesión isquémica de la médula espinal, ictus, lesión cerebral traumática y afecciones hereditarias.

50

[0083] Los procedimientos descritos incluyen el uso de CMN para mejorar una afección neurodegenerativa. Según se usa en este documento, el término «CMN» también puede referirse a progenitores neurales o neuronales, o a precursores neuroepiteliales. Las CMN pueden definirse funcionalmente según su capacidad para diferenciarse en cada uno de los tres principales tipos celulares del SNC: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

55

[0084] En una realización, las CMN son multipotentes de modo que cada célula tiene la capacidad de diferenciarse en una neurona, un astrocito o un oligodendrocito. En una realización, las CMN son bipotentes de modo que cada célula tiene la capacidad para diferenciarse en dos de los tres tipos de células del SNC. En una realización, las CMN incluyen al menos células bipotentes que generan tanto neuronas como astrocitos *in vitro* e

incluyen al menos células unipotentes que generan neuronas *in vivo*.

- [0085]** Las condiciones de crecimiento pueden influir en la dirección de diferenciación de las células hacia un tipo u otro de células, lo que indica que las células no están comprometidas con una única estirpe. En condiciones de cultivo que favorecen la diferenciación neuronal, las células, especialmente del SNC humano, son en gran parte bipotentes para neuronas y astrocitos y su diferenciación en oligodendrocitos es mínima. Por tanto, los cultivos de células diferenciadas de los procedimientos descritos pueden dar lugar a neuronas y astrocitos. En una realización, la proporción de neuronas con respecto a astrocitos puede aproximarse a una proporción 50:50.
- 10 **[0086]** Los procedimientos descritos incluyen obtener CMN que residen en regiones del SNC de un mamífero como en el neuroepitelio. Entre otras regiones del SNC a partir de las cuales pueden aislarse CMN se incluyen las zonas ventricular y subventricular del SNC y otras regiones del SNC que incluyen tanto precursores mitóticos como neuronas postmitóticas. En una realización, los procedimientos descritos pueden emplear CMN que residen en regiones del SNC de un mamífero en desarrollo.
- 15 **[0087]** En una realización, los CMN se obtienen a partir de una zona que es naturalmente neurogénica para una población deseada de neuronas. La población deseada de células puede incluir las células de un fenotipo neuronal específico que pueda sustituir o suplementar dicho fenotipo perdido o inactivo en una afección neurológica.
- 20 **[0088]** Pueden obtenerse diversos subtipos neuronales diferentes, incluyendo aquellos utilizados para el tratamiento de enfermedades o afecciones neurodegenerativas específicas aislando CMN a partir de diferentes zonas o regiones del SNC y a lo largo de diferentes edades de gestación durante el desarrollo fetal. Se usan CMN aisladas de diferentes zonas o regiones del SNC y a lo largo de diferentes edades de gestación para obtener una capacidad de expansión y diferenciación neuronal óptima. Una de las características destacadas del SNC de mamífero es la diversidad de subtipos neuronales. Una población única de CMN, por ejemplo, puede generar espontáneamente solo unos pocos subtipos neuronales diferenciados en cultivo. Además, las células de una edad de gestación fetal en particular pueden establecer la relevancia fisiológica de las células en cultivo.
- 25 **[0089]** Las células que se trasplantan a los sujetos como se describe en este documento pueden derivar de la parte equivalente del feto humano de la zona neural lesionada. Las CMN pueden aislarse de las regiones del SNC fetal humano a edades de gestación de entre aproximadamente 6,5 a aproximadamente 20 semanas. Las células de una médula espinal fetal pueden aislarse a una edad de gestación de aproximadamente 7 a aproximadamente 9 semanas. Debe apreciarse que la proporción de la población de células madre neurales aislables puede variar con la edad del donante. La capacidad de expansión de las poblaciones celulares también puede variar con la edad del donante. Esta especificidad regional y temporal de las CMN indica que estas CMN se comportan como progenitores de diferenciación de destino restringido y no como células blanco ni como una única población de células.
- 30 **[0090]** La proporción de la población *in vitro* que incluye neuronas productoras de GABA es generalmente constante a aproximadamente el 5-10%.
- 35 **[0091]** Las CMN del mesencéfalo ventral, por ejemplo, son diferentes de las CMN obtenidas de la médula espinal en el mismo estadio de gestación. En particular, las CMN del mesencéfalo ventral dan lugar exclusivamente a neuronas dopaminérgicas que expresan tirosina hidroxilasa, donde los CMN de la médula espinal generan exclusivamente neuronales colinérgicas productoras de acetilcolina. Sin embargo, ambos tipos de células generan simultáneamente las neuronas productoras de glutamato y GABA más ubicuas. Las CMN pueden obtenerse a partir del mesencéfalo ventral para tratar afecciones mejoradas o atenuadas, al menos en parte, mediante la implantación de neuronas dopaminérgicas que expresan tirosina hidroxilasa. Los procedimientos descritos además incluyen la obtención de CMN de la médula espinal para tratar afecciones neurodegenerativas mejoradas o atenuadas, al menos en parte, mediante la implantación de neuronas colinérgicas productoras de acetilcolina.
- 40 **[0092]** Por tanto, el tratamiento de trastornos del movimiento como la enfermedad de Parkinson, que se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas, puede incluir el uso de CMN derivadas de una zona como el mesencéfalo ventral en el que es importante la neurogénesis de neuronas dopaminérgicas. Además, las CMN pueden obtenerse a una edad de gestación del desarrollo fetal humano durante el cual es importante la neurogénesis de neuronas dopaminérgicas. Las CMN pueden obtenerse a partir del mesencéfalo ventral derivado a una edad de gestación de aproximadamente 7 a aproximadamente 9 semanas para tratar las enfermedades del movimiento.
- 45 **[0093]** El tratamiento de enfermedades de neuronas motoras como la esclerosis lateral amiotrófica o la

paraplejía flácida, resultado de la pérdida de neuronas motoras ventrales, puede incluir el uso de CMN derivadas de una zona como la médula espinal en la que la neurogénesis de neuronas motoras ventrales es importante y puede obtenerse a una edad de gestación del desarrollo fetal humano durante el cual es importante la neurogénesis de las neuronas motoras ventrales. Las CMN pueden aislarse a partir de la médula espinal a una edad de gestación de 5 aproximadamente 7 a aproximadamente 9 semanas para tratar enfermedades de neuronas motoras.

[0094] Debería apreciarse, sin embargo, que en algunos casos, los límites de dicha especificidad regional son bastante amplios a fines prácticos. Por tanto, las CMN de diversas zonas de la médula espinal como los segmentos cervical, torácico, lumbar y sacro pueden usarse de forma indistinta para implantar y tratar localizaciones distintas al origen correspondiente de las CMN. Por ejemplo, las CMN derivadas de la médula espinal cervical pueden usarse para tratar la espasticidad y/o la rigidez trasplantando las células en los segmentos lumbares de un paciente.

[0095] Las CMN también pueden aislarse de tejidos postnatales y adultos. Las CMN derivadas de tejidos postnatales y adultos son cuantitativamente equivalentes con respecto a su capacidad para diferenciarse en neuronas y glía, así como en sus características de crecimiento y diferenciación. Sin embargo, la eficiencia del aislamiento *in vitro* de CMN a partir de diversos SNC postnatales y adultos puede ser mucho más baja que en el aislamiento de CMN a partir de tejidos fetales que albergan una población de CMN más abundantes. No obstante, como con las CMN derivadas de fetos, los procedimientos descritos permiten que al menos el 30% de las CMN derivadas de fuentes neonatales y adultas se diferencien en neuronas *in vitro*. Por tanto, los tejidos postnatales y adultos pueden usarse como se describe anteriormente en el caso de CMN derivadas de fetos, aunque se prefiere el uso de tejidos fetales.

[0096] Pueden obtenerse diversos subtipos neuronales a partir de la manipulación de células madre embrionarias expandidas en cultivo. Por tanto, los subtipos neuronales específicos, en función de los procedimientos descritos, pueden aislarse y purificarse a partir de otras células irrelevantes o no deseadas para mejorar el resultado, si es necesario, y pueden usarse para el tratamiento de las mismas afecciones neurodegenerativas.

[0097] Las CMN en los procedimientos descritos pueden derivar de una zona y trasplantarse a otra zona dentro del mismo sujeto como un autoinjerto. Además, las CMN en los procedimientos descritos pueden derivar de un donante genéticamente idéntico y trasplantarse como un isoinjerto. Todavía más, las CMN en los procedimientos descritos pueden derivar de un miembro genéticamente no idéntico de la misma especie y trasplantarse como un aloinjerto. Alternativamente, las CMN pueden derivar de un origen no humano y trasplantarse como un xenoinjerto. Con el desarrollo de inmunodepresores potentes, pueden realizarse aloinjertos y xenoinjertos de precursores neurales no humanos, como precursores neurales de origen porcino, en sujetos humanos.

[0098] Un tejido de muestra puede disociarse por cualquier procedimiento convencional. En una realización, el tejido se disocia mediante triturado mecánico suave usando una pipeta y un tampón salino sin cationes divalentes para formar una suspensión de células disociadas. Es deseable una disociación suficiente para obtener células suficientemente individualizadas para evitar una densidad celular local excesiva.

[0099] Para una aplicación comercial exitosa de las CMN, es deseable mantener cultivos sólidos y reproducibles que tienen capacidades de expansión y diferenciación estables a través de muchos pasos sucesivos. Como se describe anteriormente, los procedimientos de cultivo pueden optimizarse para conseguir la expansión estable a largo plazo de una línea celular individual de CMN a partir de diferentes zonas y edades de desarrollo del SNC mientras que se mantienen sus propiedades progenitoras diferentes.

[0100] Para este fin, se ha encontrado sorprendentemente que promover la adhesión de CMN (CMN) a un sustrato contribuye a acelerar la tasa mitótica de CMN o células progenitoras proporcionando, de este modo, una mejora significativa de un cultivo más sólido de CMN o células progenitoras. En particular, además de evitar una densidad celular local excesiva y mantener las concentraciones de mitógeno, se ha encontrado que las concentraciones de proteínas de la matriz extracelular afectan a la capacidad mitótica y de diferenciación de las CMN. Las proteínas de la matriz extracelular pueden incluir poli-D-lisina, poli-L-lisina, poli-D-ornitina, poli-L-ornitina, fibronectina y combinaciones de las mismas. Entre otras proteínas de la matriz extracelular pueden incluirse diversos isotipos, fragmentos, formas recombinantes o miméticos sintéticos de fibronectina, laminina, colágeno y sus combinaciones. Alternativamente, o además, debe apreciarse que los procedimientos descritos pueden incluir cualquier otra sustancia adecuada que es capaz de promover la adhesión celular efectiva de modo que cada célula individual se adhiera al sustrato de cultivo durante todo el cultivo sin que sea citotóxica o retrase la división celular.

[0101] Aunque las proteínas de la matriz extracelular pueden ser eficaces a la hora de promover la adhesión

- celular, diferentes polímeros de aminoácidos, como poli-L/D-ornitina o poli-L/D-lisina, pueden ser tóxicos para las células a determinadas concentraciones para cada línea celular individual. La duración de la incubación también puede afectar a la cantidad final del polímero depositado en la superficie de la placa afectando a la viabilidad de las células. En el caso de las CMN empleadas en los procedimientos descritos, las concentraciones de polímero pueden
- 5 estar dentro de un intervalo de entre aproximadamente 0,1 µg/ml y aproximadamente 1 mg/ml. En una realización, se disuelven 100 µg/ml de poli-D-lisina en tampón HEPES 0,01 M o agua a pH neutro, y se aplican en un recipiente de cultivo. El recipiente de cultivo se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, el recipiente de cultivo se lava abundantemente con agua y se seca antes de su uso.
- 10 **[0102]** Los procedimientos descritos también pueden incluir un doble recubrimiento de los recipientes de cultivo con una proteína de la matriz extracelular. En una realización, el recipiente de cultivo se trata con fibronectina o un derivado de fibronectina tras la aplicación de poli-L/D-ornitina o poli-L/D-lisina descrita anteriormente. En una realización, se usa la proteína fibronectina preparada a partir de plasma humano. Sin embargo, debe apreciarse que puede usarse cualquier otra forma o fuente adecuada de proteína fibronectina como fibronectina porcina o bovina,
- 15 fibronectina recombinante, fragmentos de proteínas fibronectina, péptidos sintéticos y otros miméticos químicos de fibronectina. En una realización, pueden aplicarse entre aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 1 mg/ml de fibronectina.
- [0103]** En una realización que incluye la expansión de CMN de médula espinal humana, el recipiente de cultivo se trata con 100 µg/ml de poli-D-lisina durante un periodo suficiente que permita que la proteína extracelular se una y cubra el recipiente de cultivo. Este periodo de tiempo puede ser de aproximadamente cinco minutos a aproximadamente tres horas. El recipiente de cultivo puede lavarse posteriormente con agua. Tras secar al aire el recipiente de cultivo, el recipiente puede tratarse con aproximadamente 25 mg/ml de fibronectina durante aproximadamente de cinco minutos a varias horas a temperatura ambiente o aproximadamente 1 mg/ml de
- 25 fibronectina durante aproximadamente de 1 hora a varios días a 37°C. Posteriormente, la fibronectina puede retirarse y el recipiente de cultivo puede lavarse al menos una vez o conservarse en PBS hasta su uso.
- [0104]** La fibronectina puede añadirse dentro del medio de cultivo como un factor soluble suministrado directamente a las células. Las CMN pueden expandirse añadiendo 1 µg/ml de fibronectina dentro del medio de cultivo además del tratamiento de los recipientes de cultivo con fibronectina. El suministro de la proteína de unión al medio de cultivo como un factor soluble en el momento de sembrar las células en placas es especialmente ventajoso para el cultivo a gran escala comercial de CMN debido a la semivida relativamente corta de los recipientes recubiertos de fibronectina. Este procedimiento también es útil para producir una línea de células madre neurales que requiera condiciones sustancialmente exactas y reproducibilidad como las requeridas en los protocolos de
- 35 cGMP y para producir la línea de células madre neurales para uso terapéutico.
- [0105]** En una realización, las CMN aisladas se añaden al recipiente de cultivo a una densidad de aproximadamente 1000 a aproximadamente 20 000 células por centímetro cuadrado. Esta densidad contribuye a la dispersión y adhesión uniformes de las células individuales en el recipiente de cultivo, evitando concentraciones
- 40 localizadas de células, para enriquecer el cultivo en CMN.
- [0106]** Según la presente invención las CMN se expanden en ausencia de suero. En una realización, las CMN se cultivan en un medio definido sin suero para evitar la exposición de las CMN a concentraciones de suero suficientes para desestabilizar la capacidad mitótica y de diferenciación de las CMN. Además, la exposición de las
- 45 CMN a determinados factores de crecimiento como factor inhibidor de la leucemia (LIF) o el factor neurotrófico ciliar (CNTF) también puede desestabilizar a las CMN y debería evitarse.
- [0107]** Pueden añadirse mitógenos al cultivo en cualquier estadio del proceso de cultivo para potenciar el crecimiento de las CMN. Los mitógenos pueden incluir factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGFA) y combinaciones de los mismos.
- 50
- [0108]** Las CMN de los procedimientos descritos pueden crecer y expandirse en al menos dos formas de cultivo diferentes. Una forma de cultivo incluye una forma agregada, normalmente denominada aglomerada, y una forma agregada denominada cultivo en suspensión. Otra forma de cultivo incluye una forma dispersa no agregada denominada cultivo adherente.
- 55
- [0109]** En un cultivo adherente disperso de las CMN de los procedimientos descritos, las células forman una monocapa en la que las células inicialmente entran en contacto con el sustrato de cultivo directamente. Finalmente,

tras un periodo de incubación, las células pueden formar agregados de forma esporádica, donde se forma al menos una capa adicional de células sobre la capa inferior, incluso las células en la capa inferior se adhieren individualmente al sustrato. Estos agregados se producen especialmente cuando el cultivo se inocula a alta densidad celular o se permite que alcance una alta densidad celular que, en una realización, se minimiza para obtener una expansión óptima de CMN o células progenitoras, o para el mantenimiento óptimo de la capacidad multipotente de las CMN. En el cultivo adherente disperso de una realización de los procedimientos descritos, se deja que las CMN humanas se dividan en menos de aproximadamente cuatro días por división celular.

[0110] Otra característica diferenciadora del cultivo adherente disperso es que las CMN de los procedimientos descritos se dividen para generar células hijas, reteniendo cada una su capacidad multipotencial. En una realización, el cultivo adherente disperso de CMN de los procedimientos descritos incluye una capacidad de expansión de al menos 20 duplicaciones celulares en ausencia de diferenciación sustancial. La mayoría de las CMN pueden expandirse por encima de al menos 50 duplicaciones celulares antes de perder su capacidad neurogénica. En una realización, las CMN expandidas en el cultivo adherente disperso de los procedimientos descritos muestran mayor diferenciación neuronal, dando lugar en una realización a al menos aproximadamente el 30% de diferenciación neuronal. En muchos casos, al menos el 50% de las CMN se diferencian en neuronas. Aunque la forma de adherencia dispersa de cultivo es la forma de cultivo más preferida, los procedimientos de cultivo diferentes pueden permitir el aislamiento de poblaciones celulares distintas de forma innata con diferentes potenciales de diferenciación *in vitro* o *in vivo*.

[0111] El presente procedimiento también permite el aislamiento clonal de CMN de diversas fuentes sin modificación genética o inclusión de células nodrizas. Por tanto, puede sembrarse un número muy bajo, preferiblemente menos de 1000 células por centímetro cuadrado de células en una placa de cultivo celular como se describe anterior.

[0112] Pocos días después de la siembra de las CMN, las células pueden formar colonias bien aisladas. Las colonias pueden crecerse hasta un tamaño deseado como al menos de aproximadamente 250 a aproximadamente 2000 células. En una realización se pica manualmente al menos una colonia de células y se inocula individualmente en una placa de cultivo celular recién preparada como una placa multipocillo.

[0113] Las poblaciones clonales aisladas pueden expandirse mediante pases seriados y usarse para establecer múltiples líneas de células madre neurales. Se han aislado muchas de estas líneas celulares a partir de diversas zonas del SNC humano incluyendo médula espinal, mesencéfalo y rombencéfalo. Las líneas celulares clonales son útiles para enriquecer un fenotipo celular especial como una proporción más alta de subtipos neuronales. Por ejemplo, las líneas celulares clonales enriquecidas en neuronas dopaminérgicas que expresan tirosina hidroxilasa, neuronas GABAérgicas, neuronas colinérgicas y neuronas de otros fenotipos específicos pueden aislarse con los procedimientos descritos.

[0114] En una realización, puede inducirse a una línea de células madre neurales policlonal o monoclonal a que adicionalmente se enriquezca en un subtipo particular de neuronas. Se han seleccionado varios factores de crecimiento y sustancias químicas y naturales para identificar inductores eficaces de neuronas en particular, como neuronas dopaminérgicas que expresan tirosina hidroxilasa y neuronas colinérgicas productoras de acetilcolina a partir de CMN del mesencéfalo o de la médula espinal. El factor, compuesto químico o combinación de ambos puede introducirse durante la fase de mitosis y/o la fase de diferenciación de las CMN. En una realización, una línea de células madre neurales para un fenotipo dopaminérgicos se enriquece adicionalmente como población donante para tratar la enfermedad de Parkinson.

[0115] Pueden obtenerse diversos subtipos neuronales a partir del aislamiento de células madre con un patrón deseado de diferenciación *in vitro*. Los resultados *in vitro* pueden reproducirse sustancialmente *in vivo*. Esto significa que puede predecirse la posible eficacia de las células madre *in vivo* mediante el patrón de diferenciación de las células madre *in vitro*. Tras la inyección dentro de sujetos en periodo postnatal vivos, las CMN, en un estado indiferenciado o prediferenciado, producen en gran medida un patrón de diferenciación *in vivo* observado *in vitro*. Por tanto, las CMN que dan lugar a neuronas productoras de tirosina hidroxilasa *in vitro* también generan neuronas productoras de tirosina hidroxilasa *in vivo*. Por el contrario, las CMN que no dan lugar a neuronas productoras de tirosina hidroxilasa *in vitro* constitutivamente no producen neuronas productoras de tirosina hidroxilasa *in vivo*.

[0116] Sin embargo, las señales de diferenciación *in vitro* están limitadas en comparación con aquellas que se producen *in vivo*. Por tanto, una fracción sustancial de las neuronas diferenciadas puede no expresar un fenotipo neurotransmisor principal. Pueden usarse señales adicionales, como señales de neuronas aferentes o eferentes, o

agentes miméticos como señales naturales, para reconfigurar los fenotipos diferenciados, durante el estadio mitótico de las CMN o durante su diferenciación. Las CMN tienen la capacidad de responder a señales presentes tanto *in vivo* como *in vitro*. Por tanto, una vez trasplantadas en la médula espinal con lesión isquémica, las CMN espinales generan una proporción sustancialmente más alta de neuronas productoras de GABA que *in vitro*. Así, las CMN son plásticas. Esta naturaleza plástica de las CMN es una característica de su multipotencialidad y, por tanto, esta plasticidad puede usarse para identificar agentes y condiciones inductores de fenotipos que pueden combinarse además con una población de CMN para redirigir sus propiedades.

[0117] Dicha reprogramación puede incluir tratar a las CMN de un tejido de médula espinal para obtener una expresión potenciada de fenotipos de neuronas motoras. Las condiciones de tratamiento incluyen el cocultivo de CMN y sus células diferenciadas con diversas células musculares o células derivadas del sistema nervioso periférico como células de la cresta neural o neuronas ganglionares. Las CMN también pueden tratarse con mezclas de moléculas conocidas por expresarse y producirse en neuronas motoras o en la médula espinal para potenciar la expresión en CMN de fenotipos de neuronas motoras.

[0118] Para inducir la expresión potenciada en CMN del fenotipo dopaminérgico del mesencéfalo humano, las CMN se tratan con moléculas como litio, GDNF, BDNF, pleiotrofina, eritropoyetina, medios condicionados de células como las células de Sertoli, o cualquier otro producto químico adecuado o células obtenidas mediante selección, o combinaciones de los mismos. Este incentivo puede permitir que las CMN trasplantadas expresen y mantengan el fenotipo dopaminérgico *in vivo*.

[0119] Las CMN de los procedimientos descritos pueden incluir células prediferenciadas para trasplante. Para obtener un rendimiento máximo de las células o simplificar el procedimiento, se recoge un cultivo en confluencia para trasplante que comprende principalmente una población de células indiferenciadas. Sin embargo, debe apreciarse que también puede existir una población menor de células que acabe de empezar a diferenciarse espontáneamente debido al aumento de la densidad celular.

[0120] En una realización, los pasos de CMN incluyen recoger y despegar las células a partir de un sustrato. En una realización, los procedimientos descritos incluyen recoger o despegar las células de un sustrato usando al menos una enzima. Puede evitarse el tratamiento enzimático cuando la duración del ciclo celular de las CMN es suficientemente corta como para desactivar los receptores del mitógeno sobre la superficie de las células. Sin embargo, la duración del ciclo celular de las CMN humanas es mucho mayor que la de las CMN de roedores, de modo que las CMN humanas no son tan sensibles al tratamiento enzimático. Por tanto, en los procedimientos descritos, el tratamiento enzimático se usa para recoger CMN derivadas de un humano. Aunque las CMN humanas pueden volverse temporalmente resistentes al mitógeno en presencia de tratamiento enzimático, la desactivación repetida de los receptores de mitógeno puede inducir una disminución de la proporción de CMN.

[0121] En una realización, tras la recogida de las células, estas se concentran mediante una breve centrifugación. Las células pueden lavarse además y resuspenderse en una solución final de uso clínico como solución salina, solución salina tamponada o, alternativamente, resuspenderse en una solución de almacenamiento o hibernación. Alternativamente, las células pueden resuspenderse en un medio de congelación, como medios más dimetilsulfóxido, o en cualquier otro agente crioprotector adecuado, y congelarse para su almacenamiento.

[0122] La solución de hibernación se formula para mantener la viabilidad de las células vivas durante un periodo de tiempo prolongado. En una realización, la solución de conservación puede adaptarse para ser utilizada para enviar células vivas en una formulación lista para usar a un centro de cirugía de trasplantes para su uso inmediato. Las condiciones adecuadas para enviar células vivas a un centro lejano también incluyen un dispositivo de aislamiento que pueda mantener un intervalo de temperatura estable entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 20°C durante al menos 24 horas. Las células vivas conservadas entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 8°C durante de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 48 horas son trasplantables para el tratamiento de una enfermedad o afección.

[0123] En una realización las células están concentradas en una solución tal como las soluciones de hibernación o congelación de uso clínico descritas anteriormente. En una realización las células están concentradas a una densidad celular apropiada que puede ser la misma o diferente de la densidad celular para la administración de las células. La densidad celular para administración puede variar entre aproximadamente 1000 células por microlitro y 1 000 000 de células por microlitro dependiendo de factores como el lugar de inyección, el estado neurodegenerativo del lugar de inyección, la dosis mínima necesaria para un efecto beneficioso y consideraciones de efectos secundarios relacionados con la toxicidad. En una realización, los procedimientos descritos incluyen

inyectar células a una densidad celular de aproximadamente 5000 a aproximadamente 50 000 por microlitro.

[0124] El volumen de medio en el que las células expandidas están suspendidas para su administración a una zona de tratamiento puede denominarse en este documento como el volumen de inyección. El volumen de inyección depende del lugar de inyección y del estado degenerativo del tejido. Más específicamente, el límite inferior del volumen de inyección puede determinarse en función del manejo de líquido práctico de suspensiones viscosas de alta densidad celular, así como de la tendencia de las células a agregarse. El límite superior del volumen de inyección puede determinarse en función de los límites de la fuerza de compresión ejercida por el volumen de inyección que son necesarios para evitar lesionar el tejido del huésped, así como del tiempo práctico de cirugía.

[0125] La baja supervivencia celular de las células donantes usando los procedimientos conocidos ha hecho necesaria la administración de una gran cantidad de células a una zona relativamente pequeña para conseguir un tratamiento eficaz. Sin embargo, el volumen de inyección supone una presión hidrostática ejercida sobre el tejido del huésped y el tiempo de inyección prolongado asociado a volúmenes de inyección grandes aumenta el riesgo quirúrgico. Adicionalmente, la sobreinyección de células donantes induce una compresión y posterior lesión del tejido paranquimático del huésped. En un intento por compensar las limitaciones del volumen, los procedimientos conocidos han requerido la preparación de suspensiones con alta densidad celular para las inyecciones. No obstante, una alta densidad celular promueve una agregación compacta de las células trasplantadas e inhibe la migración o difusión celular impidiendo que el tratamiento sea eficaz más allá de una zona limitada y comprometiendo la perfecta integración en el tejido huésped.

[0126] Por el contrario, como resultado de la mejora de la supervivencia *in vivo* de las células preparadas mediante los procedimientos descritos, se necesita un número menor de células para la inyección. De hecho, se ha demostrado que hay hasta de tres a cuatro veces el número de células inyectadas a los seis meses desde el momento de la inyección, lo que demuestra una supervivencia cuantitativa significativa usando los procedimientos descritos. Asimismo, debido a la supervivencia cuantitativa, puede conseguirse una administración reproducible de las dosis de células deseadas. Por consiguiente, en una realización, las células están concentradas a una densidad de aproximadamente 1000 a aproximadamente 200 000 células por microlitro. Se han usado de aproximadamente 5000 a aproximadamente 50 000 células por microlitro para un injerto eficaz. Alternativamente, se usan de aproximadamente 10 000 a 30 000 células por microlitro. Las células pueden administrarse a una zona de tratamiento suspendidas en un volumen de inyección de menos de 100 microlitros por sitio de inyección. Por ejemplo, en el tratamiento de las afecciones neurodegenerativas de un sujeto humano donde las inyecciones múltiples pueden hacerse bilateralmente a lo largo de la vía medular, puede usarse un volumen de inyección de 0,1 y aproximadamente 100 microlitros por sitio de inyección.

[0127] En los procedimientos descritos puede emplearse cualquier dispositivo adecuado para la inyección de células en una zona deseada. Por ejemplo, puede usarse una jeringa capaz de administrar volúmenes de submicrolitros durante un periodo de tiempo con una caudal sustancialmente constante. Las células pueden cargarse en el dispositivo mediante una jeringa o un tubo flexible, o cualquier otro dispositivo de transferencia adecuado.

[0128] El sitio de inyección adecuado para el tratamiento de una afección neurodegenerativa puede incluir al menos una zona de la médula espinal. Las células pueden implantarse al menos en un segmento o región específica de la médula espinal como la región cervical, torácica y lumbar de la médula espinal. En la región lumbar, por ejemplo, solo cinco pares de raíces nerviosas atraviesan el canal óseo de las vértebras saliendo cada par de raíces nerviosas de la médula en cada nivel lumbar distribuido a lo largo de una zona amplia. Debido a la baja densidad de raíces nerviosas en la región lumbar de la médula espinal, dicha región lumbar es especialmente adecuada para proporcionar un lugar seguro para la inyección de células. Las células pueden implantarse en la zona intermedia del parénquima de la médula espinal.

[0129] Las células pueden inyectarse en aproximadamente entre 5 y aproximadamente 50 sitios. Las células pueden inyectarse en aproximadamente entre 10 y aproximadamente 30 sitios. Al menos dos de los sitios pueden estar separados por una distancia de aproximadamente 100 micrómetros a aproximadamente 5000 micrómetros. La distancia entre los sitios de inyección puede ser de aproximadamente 100 a aproximadamente 600 micrómetros. La distancia entre los sitios de inyección puede determinarse en función de la generación de la presencia de células donantes sustancialmente ininterrumpida y contigua a lo largo de los segmentos medulares y en función del volumen medio de las inyecciones demostrado para conseguir aproximadamente 2-3 meses de supervivencia en modelos animales como ratas o cerdos. Las células pueden inyectarse a lo largo de ambos lados de la línea media de la médula espinal para abarcar la longitud de al menos varios segmentos lumbares útiles para el tratamiento de un síntoma comola espasticidad/rigidez o la supervivencia de las neuronas motoras. El número real de inyecciones en

humanos puede extrapolarse a partir de los resultados en modelos animales.

[0130] El sitio de inyección objetivo puede ser la sustancia gris de la médula espinal. Dentro de la sustancia gris, la punta de la aguja puede colocarse de modo que deposite las CMN a niveles específicos de la lámina. Por ejemplo, para administrar neuronas productoras de GABA/glicina para tratar la espasticidad/rigidez, las CMN se administran en la zona que abarca las láminas V-VII. Alternativamente, las CMN pueden administrarse en el cuerno dorsal de la sustancia gris, o en su proximidad, de diversos segmentos espinales, desde el cervical al lumbar, para tratar el dolor neuropático y el dolor crónico. Alternativamente, las CMN pueden administrarse en el cuerno ventral de la sustancia gris, o en su proximidad, de diversos segmentos espinales, desde el cervical al lumbar, para tratar enfermedades de neuronas motoras como el ELA.

[0131] Las células de los procedimientos descritos pueden generar grandes cantidades de neuronas *in vivo*. Cuando las CMN no están abiertamente prediferenciados antes del trasplante, las CMN pueden proliferar hasta dos o tres divisiones celulares *in vivo* antes de la diferenciación, aumentando aún más de este modo el número de células donantes efectivas. Tras la diferenciación, las neuronas secretan neurotransmisores específicos. Además, las neuronas secretan al medio circundante del trasplante *in vivo* los factores de crecimiento, enzimas y demás proteínas o sustancias que son beneficiosas para diferentes afecciones. Por consiguiente, pueden tratarse diversas afecciones mediante los procedimientos descritos debido a la capacidad de las células implantadas para generar grandes cantidades de neuronas *in vivo* y debido a que las afecciones neurodegenerativas pueden estar causadas o ser el resultado de elementos perdidos incluyendo elementos derivados de neuronas. Por tanto, los sujetos que sufren degeneración de los tejidos del SNC debido a la pérdida de dichos elementos derivados de neuronas, como factores de crecimiento, enzimas y otras proteínas, pueden ser tratados de forma eficaz mediante los procedimientos descritos.

[0132] Entre las afecciones que responden a los factores de crecimiento, enzimas y otra proteínas o sustancias secretadas por las neuronas implantadas se incluyen enfermedades lisosomales hereditarias como la enfermedad de Tay-Sach, la enfermedad de Niemann-Pick, la enfermedad de Batten, la enfermedad de Crabb, ataxia y otras.

[0133] Además, los procedimientos de tratamiento descritos incluyen implantar las células *in vitro* que pueden sustituir a neuronas dañadas o degeneradas, proporcionar un efecto inhibitor o estimulante sobre otras neuronas y/o liberar factores tróficos que contribuyen a la regeneración de las neuronas.

[0134] Pueden administrarse neuronas motoras adicionales para sustituir a las neuronas dañadas o degeneradas. Por ejemplo, entre los procedimientos descritos se incluyen proporcionar infraestructura neural suficiente dentro de la siringe de la médula espinal para rellenar la cavitación. La infraestructura neural es suficiente si es capaz de ralentizar la hipertrofia de la siringe asociada con la siringomielia como resultado de la lesión espinal traumática, de afecciones hereditarias o de cualquier otra causa. Debe apreciarse que proporcionar una infraestructura neural suficiente también ayuda a aliviar complicaciones adicionales surgidas de la degeneración de la médula espinal.

[0135] No todas las CMN son terapéuticas para una determinada enfermedad. Los tipos de poblaciones neuronales afectados en las distintas enfermedades pueden ser diferentes. Por tanto, una población donante terapéuticamente eficaz de CMN contribuye a sustituir al elemento neural perdido. Por ejemplo, el tratamiento de la espasticidad, convulsiones, trastornos del movimiento y otras enfermedades de hiperactividad muscular, puede incluir proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de células capaces de diferenciarse en neuronas inhibitoras productoras de GABA o glicina. Las diferentes poblaciones de CMN pueden evaluarse *in vitro* examinando el fenotipo neuronal diferenciado. El patrón de diferenciación *in vitro* se usa a continuación para predecir la eficacia de las células para producir el fenotipo apropiado *in vivo*, no solo en términos de un fenotipo neurotransmisor apropiado, sino también en términos de una morfología y migración apropiadas, y otras características fenotípicas de neuronas.

[0136] Las CMN pueden implantarse de modo que sean capaces de generar el subtipo neuronal correspondiente a los subtipos neuronales destruidos asociados con la etiología de los síntomas. Por ejemplo, la hiperactividad de circuitos excitadores en los sujetos puede estar causada por afecciones hereditarias o una lesión neuronal debido a traumatismo espinal, cirugía aórtica torácica/toracoabdominal, ictus, epilepsia, traumatismo cerebral, enfermedad de Huntington, incontinencia de vejiga, hiperactividad de defecación y otras contracciones musculares incontroladas surgidas por lesiones o afecciones hereditarias. La espasticidad, las convulsiones y otra hiperactividad se producen en el cerebro en oposición a la médula espinal debido a diversos orígenes etiológicos

diferentes. Se piensa que la epilepsia focal, por ejemplo, surge de una hiperactividad desregulada debido a la falta de control tonal ejercido por GABA sobre los circuitos. Para este fin, los procedimientos descritos incluyen proporcionar neurotransmisores inhibidores como GABA o glicina en las zonas afectadas mediante el trasplante de CMN expandidas *in vitro*. En el caso de espasticidad, convulsiones u otra hiperactividad, por ejemplo, se generan un

5 número de CMN que sean capaces de diferenciarse en neuronas inhibidoras, como neuronas productoras de GABA o productoras de glicina, se generan *in vivo* para ser trasplantadas para atenuar al menos un circuito neural hiperactivo asociado con espasticidad, convulsiones y otra hiperactividad neuronal. Los procedimientos descritos pueden, por tanto, aplicarse para tratar la epilepsia y afecciones similares de convulsiones.

10 **[0137]** Los procedimientos descritos también pueden aplicarse para tratar la paresia, parálisis, espasticidad, rigidez u otros síntomas motores, del habla o cognitivos consecuencia de la isquemia cerebral. La isquemia cerebral puede ocurrir como resultado de un episodio de ictus en el cerebro o de un ataque al corazón en el que la circulación sanguínea hacia el cerebro se interrumpe durante un periodo de tiempo significativo. Este es análogo, por tanto, a la isquemia de la médula espinal descrita anteriormente. Algunos sujetos con ictus desarrollan convulsiones de origen

15 central, así como otras deficiencias como pérdida de memoria, parálisis o paresia. Estas deficiencias de isquemia cerebral probablemente también son debidas a la pérdida selectiva de interneuronas inhibidoras en el hipocampo y/u otras zonas del cerebro. Por tanto, los procedimientos descritos pueden aplicarse al tratamiento de sujetos con ictus que sufren de paresia, parálisis, espasticidad u otros síntomas motores, del habla y cognitivos.

20 **[0138]** En el caso de paresia, paraplejía flácida y otras afecciones asociadas con una pérdida de control de la contracción muscular como el causado por ELA, lesión traumática de la médula espinal, lesión isquémica o afecciones hereditarias, los procedimientos descritos incluyen proporcionar implantación neuronal para ejercer una influencia trófica suficiente para retrasar la pérdida de neuronas motoras. En especial, los procedimientos descritos facilitan la capacidad de las CMN trasplantadas para secretar moléculas tróficas que puedan administrarse para

25 degenerar neuronas motoras en condiciones de biodisponibilidad óptimas. Entre estas moléculas tróficas se incluyen superóxido dismutasas obtenidas por exocitosis, como superóxido dismutasa (SOD1), enzimas lisosomales y moléculas no protéicas como antioxidantes producidos por la célula. Entre otros factores tróficos secretados por las células trasplantadas pueden incluirse el factor neurotrófico derivado de células global (GDNF), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), el factor de crecimiento epidérmico vascular (VEGF), pleiotrofina, factor de crecimiento

30 endotelial vascular (VEGF), eritropoyetina, midquina, insulina, factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1) y factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF-2) o cualquier otro elemento trófico beneficioso.

[0139] Otro factor que contribuye a la capacidad de los procedimientos descritos para tratar una amplia gama de afecciones neurodegenerativas incluye la capacidad de las células CMN diferenciadas para migrar ampliamente a

35 lo largo de las fibras neuronales existentes. La migración de las células injertadas da lugar a la distribución e integración global de las neuronas y/o glía donantes y a la administración global o dispersa del elemento terapéutico secretado por dichas células.

[0140] La amplia migración de las células permite la administración global y estable de proteínas y sustancias terapéuticas claves a través del sistema nervioso y del organismo de un sujeto que lo necesita. Por tanto, las células de los procedimientos descritos son vehículos de administración eficaces para proteínas y sustancias terapéuticas. Para estos objetivos de administración, los procedimientos descritos incluyen trasplantar las células en diversos sitios dentro del sistema nervioso incluyendo el parénquima del SNC, ventrículos, los espacios subdural, intratecal y epidural, zonas del sistema nervioso periférico así como zonas fuera del sistema nervioso como intestino, músculo,

45 sistema endovascular y zonas subcutáneas.

Ejemplo 1. Expansión de células madre/progenitoras de médula espinal humana

[0141] Se obtiene la médula espinal de al menos un donante de una edad de gestación de aproximadamente

50 7-8,5 semanas. Se disgrega un único tejido contiguo de la médula espinal en solución salina tamponada sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ usando trituración mecánica. La suspensión celular resultante se siembra, a continuación en placas de cultivo tisular cubiertas previamente con poli-L-ornitina o poli-D-lisina y fibronectina humana u otras proteínas de la matriz extracelular. Las placas o frascas tratadas de cultivo tisular se incubaron con 100 µg/ml de poli-D-lisina durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron tres veces con agua y se secaron. Después, se

55 incubaron con 25 mg/ml durante 5 minutos a temperatura ambiente. En algunas ocasiones, se usaron 10 mg/ml de fibronectina durante 1 hora a temperatura ambiente. En otras ocasiones, se usó 1 mg/ml de fibronectina durante 18 horas a 37°C. Los medios de cultivo compuestos por N2 (DMEM/F12 más insulina, transferrina, selenio, putrescina y progesterona) se suplementaron con factor de crecimiento básico recombinante humano 1 (bFGF). Puede usarse un intervalo de 0,1 ng/ml - 100 ng/ml. De forma óptima, se usan 10 ng/ml de bFGF.

[0142] El cultivo inicial resultante consta de neuronas postmitóticas y CMN proliferativas en una monocapa. Posteriormente, después de aproximadamente cinco a aproximadamente veinte días de cultivo, las CMN en división positivas para nestina dominan el cultivo sobre las neuronas que no se dividen o la glía que se divide lentamente. En estas condiciones de cultivo, las CMN están selectivamente favorecidas para su expansión. Se realiza un pase de la población de CMN expandidas mediante tratamiento enzimático, como usando tripsina. Las células se cultivan en medio sin suero o sustancialmente sin suero. Aunque las células pueden tolerar baja concentración de suero, es mejor evitar la exposición de las células al suero ya que este contiene muchas citoquinas, como LIP y CNTF que promueven la diferenciación glial de las CMN. Por tanto, durante el pase, la enzima usada se para añadiendo inhibidor específico de la enzima, como un inhibidor de tripsina, en lugar de suero. En cada pase, el número de células recogidas se cuentan, y una fracción se siembra de nuevo para una expansión adicional. Como se muestra en la figura 1, usando el procedimiento de la presente invención, las CMN humanas pueden expandirse hasta un aumento de población por encima de 10^{18} mientras se mantienen sus propiedades de crecimiento y diferenciación. Las células pueden expandirse de forma reproducible. Como se muestra en la figura 1, los pases en serie de las células se repiten tres veces con una curva de crecimiento y un tiempo de duplicación de las células reproducibles. Durante la expansión, prácticamente todas las células expresan nestina, el marcador *in vivo* de células neuroepiteliales mitóticas y no presentan antígenos de neuronas y glía diferenciada como tubulina beta de tipo 3 y GFAP. Las células también son negativas por inmunotinción para PSA-NCAM, un posible marcador de progenitores neuronales comprometidos, O4 y GalC, marcadores de oligodendrocitos y RC2, un marcador de glía radial. Por tanto, determinado por inmunotinción, las CMN mantienen de forma estable su expresión del perfil de antígenos durante el periodo de expansión prolongado. En las figuras 2A y B se muestra un ejemplo de la morfología y la expresión de nestina, respectivamente.

Ejemplo 2. Diferenciación de células madre/progenitoras de médula espinal humana

[0143] En cualquier momento durante la expansión de las CMN, los cultivos pueden diferenciarse mediante la retirada del mitógeno del cultivo, como bFGF. La diferenciación de las CMN se produce entre aproximadamente 1 a 3 días después de la retirada del mitógeno y son aparentes morfologías celulares heterogéneas diferenciadas. Entre aproximadamente los días 4 y 7 de diferenciación, los antígenos específicos de neuronas, como MAP2c, tau y tubulina beta de tipo III, pueden visualizarse mediante inmunotinción. Entre aproximadamente los días 12 y 14, son evidentes los procesos axonales elongados y fasciculados en todo el cultivo junto con una polarización clara del tráfico subcelular de proteínas. Aproximadamente el día 28, las proteínas sinápticas, como sinapsina y sinaptofisina, se localizan en las terminales axonales, apareciendo como tinciones punteadas. Puede proporcionarse una capa nodriza adicional de astrocitos para promover adicionalmente la maduración a largo plazo de las neuronas. Como se ilustra en la figura 3, la diferenciación de las CMN de la médula espinal humana genera cultivos mixtos de neuronas y glía donde las neuronas expresan de forma consistente antígenos específicos de neuronas como tau, MAP2ab (A) y tubulina beta de tipo 3 (B) y comprende aproximadamente el 50% del cultivo. Como se muestra en la figura 3B, el cultivo genera espontáneamente cables axonales largos agrupados que se extiende durante varios centímetros. Como se ilustra en la figura 3C, una proporción significativa de las neuronas son GABAérgicas. También se presentan neuronas motoras colinérgicas en el cultivo (figura 3D). La presencia de neuronas GABA significativas en cultivo predice la utilidad de las CMN de médula espinal humanas para tratar diversas afecciones neurológicas causadas por la disminución de la producción de GABA en determinados circuitos. Así mismo, la presencia de neuronas colinérgicas demuestra que las CMN de médula espinal humanas son capaces de diferenciarse en neuronas motoras y predice su utilidad para el tratamiento de diversas enfermedades de neuronas motoras causadas por la degeneración gradual de neuronas motoras. Para el tratamiento, las CMN se expanden con o sin afecciones de potenciación del fenotipo adicionales, se recogen e inyectan en una zona neural de deficiencia. Ejemplo 3. Expansión de células madre/progenitoras de mesencéfalo humano. Se obtiene un tejido mesencefálico de una edad de gestación fetal de 7-8,5 semanas. Las CMN del tejido mesencefálico se obtienen como se describe en el ejemplo 1. Se realizan pases seriados durante 160 días de periodo de cultivo neto y la expansión resultante se muestra en la figura 4. A lo largo del periodo de expansión, las CMN mantienen de forma estable su multitipotencialidad y potencial neurogénico, así como su potencial de diferenciación para dar lugar a neuronas dopaminérgicas. Las neuronas dopaminérgicas se evalúan mediante la expresión neuronal de tirosina hidroxilasa (TH) y del transportador de dopamina (DAT).

[0144] La expresión de DAT es un marcador de neuronas productoras de dopamina. La expresión de DAT en neuronas puede evaluarse midiendo su función para transportar dopamina radiomarcada a través de la membrana sináptica de las neuronas diferenciadas en cultivo. La función DAT en cultivos de CMN mesencefálicas humanas diferenciadas y CMN mesencefálicas humanas derivadas monoclonalmente se evalúan mediante el ensayo de captación de dopamina radiomarcada (figura 5). El resultado del ensayo muestra una actividad dopaminérgica

funcional sólida de CMN mesencefálicas humanas. Además, se muestra que el fenotipo dopaminérgico puede enriquecerse aislando la población monoclonal de CMN la cual es especialmente propensa a dar lugar a una proporción más alta de neuronas dopaminérgicas tras la diferenciación (figura 5).

5 **[0145]** Las CMN que generan neuronas dopaminérgicas enriquecidas son especialmente útiles para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. De forma similar, las CMN preprogramadas en el momento del aislamiento a partir del tejido para una diferenciación potenciada de un fenotipo específico pueden usarse para aislar otras neuronas deseadas específicas, como neuronas colinérgicas del prosencéfalo útiles para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, neuronas colinérgicas medulares útiles para el tratamiento de enfermedades de neuronas
10 motoras como ELA, neuronas serotoninérgicas útiles para el tratamiento de la depresión y neuronas GABAérgicas útiles para el tratamiento de la epilepsia y la enfermedad de Huntington.

[0146] **Ejemplo 4.** Diferenciación de células madre/progenitoras de mesencéfalo humano. Las CMN/progenitores mesencefálicas humanas pueden diferenciarse como se describe en el ejemplo 2. Durante el
15 periodo mitótico de las CMN o durante su diferenciación, la proporción del fenotipo deseado puede enriquecerse mediante el tratamiento del cultivo con diversos factores exógenos. Un ejemplo de estos factores capaces de enriquecer el fenotipo dopaminérgico a partir de las CMN mesencefálicas humanas se demuestra mediante medios condicionados de células de Sertoli, como se muestra en las figuras 6A y 6B.

20 **[0147]** En los estudios mostrados en las figuras 6A y 6B, las células madre neurales crioconservadas se descongelaron y sembraron en placas a una densidad de 40 000 células por pocillo en portaobjetos de cuatro cámaras en presencia de mitógeno y se dejaron proliferar durante 6 días, momento en el cual se elimina el mitógeno y se permitió que las células se diferenciaron durante 8 días. Las células se dividieron en cuatro grupos en función del tiempo y duración de la exposición a medio condicionado con células de Sertoli (SCCM, diluido 1:1 en N2a). Un
25 grupo se expuso a SCCM durante la proliferación y diferenciación (condición 1); un segundo grupo se expuso solo durante la proliferación (condición 2); un tercero se expuso solo durante la diferenciación (condición 3) y un cuarto no se expuso a SCCM (control o cont.). Los medios se cambiaron cada dos días y se añadió un mitógeno diariamente durante la fase proliferativa. Se mantuvieron cuatro pocillos por condición para poder realizar un marcaje con múltiples marcadores y se probaron tres líneas celulares: 796MB, 527MB y 566SC. Se omitieron de la figura las
30 células 566SC, derivadas de médula espinal que no tenía neuronas positivas para TH detectables.

[0148] Tras la diferenciación, las células se fijaron usando paraformaldehído al 4% y se inmunotñieron usando anticuerpos frente a MAP2 (clon AP20 [Sigma] que reconocen subtipos MAP2ab), tubulina-β específica de neurona (TuJ1 [Covance]) y tirosina hidroxilasa (Pel-Freez), así como GFAP (Dako) y GalC (Chemicon). Las células
35 inmunoteñidas se contaron usando un objetivo 40x y se contaron al menos tres campos para cada pocillo. Se detectaron pocas o ninguna célula GFAP+ o GalC+ tras el análisis de células mantenidas en cualquier condición, por lo que estos antígenos se excluyeron del análisis. Además, las células 566SC eran demasiado densas para poder contarlas tras el mantenimiento en las condiciones descritas y no se incluyeron en el análisis final.

40 **[0149]** El análisis muestra que las CMN mesencefálicas humanas pueden verse influenciados por el tratamiento con factores exógenos para buscar un factor proteico o compuestos químicos útiles para enriquecer adicionalmente las neuronas dopaminérgicas. Por tanto, pueden seleccionarse de forma eficaz nuevos factores químicos y proteicos naturales y sintéticos usando CMN humanas para obtener poblaciones especialmente útiles para el tratamiento de una indicación específica como la enfermedad de Parkinson.

45 **Ejemplo 5.** Tratamiento de la espasticidad y la rigidez en ratas mediante trasplante de células madre/progenitoras neurales medulares humanas. (Ejemplo de referencia)

[0150] Para inducir la isquemia de médula espinal transitoria se usa la técnica previamente descrita por Taira (1996). Las ratas Sprague Dawley (SD) se anestesian con halotano (1,5%). Se pasa un catéter Fogarty® 2 Fr a través de la arteria femoral izquierda y de la aorta torácica descendente hasta el nivel de la arteria subclavia izquierda. Para medir la presión arterial distal (PAD) por debajo del nivel de oclusión aórtica, se canula la arteria de la cola con un catéter de polietileno (PE-50).

55 **[0151]** La isquemia de la médula espinal se induce inflando el catéter de balón intraaórtico con 0,05 ml de solución salina. La hipotensión sistémica durante el periodo de oclusión aórtica se reproduce extrayendo parte de la sangre arterial (10,5-11 cc) de la arteria carótida canulada con un catéter PE-50. Con este procedimiento puede inducirse una hipotensión sistémica de aproximadamente 40 mmHg. La eficacia de la oclusión se evidencia por una caída inmediata y mantenida en la PAD medida en la arteria de la cola. Después de aproximadamente 10 minutos

de isquemia de la médula espinal inducida, se desinfla el balón y se reinfunde la sangre extraída de la arteria carótida. Cuando se estabiliza la presión sanguínea arterial (entre 20-30 minutos tras reestablecer el flujo), se retiran las vías arteriales y se cierran las heridas.

- 5 **[0152]** Tras la inducción de isquemia de la médula espinal, se evalúa la recuperación de la función motora a intervalos de aproximadamente 2 días usando una escala locomotora de campo abierto de 21 puntos modificada (escala BBB). Solo los animales con una puntuación de BBB de 0-4 se seleccionaron para el estudio de trasplante para los grupos experimentales.
- 10 **[0153]** Aproximadamente de 7 a 21 días después de la lesión isquémica, las ratas espásticas con una puntuación BBB de 0 a 4 se anestesian con halotano al 1,5-2% en una habitación aireada y se colocan en un aparato de unidad espinal. A continuación se realiza una laminectomía parcial de la vértebra T11-L2. Un capilar de vidrio con un diámetro de la punta de 80-100 μm se conecta con un microinyector controlado por presión. Las ratas se inyectan con 0,5 μl de suspensión celular que contienen 5000, 10 000, 15 000 o 20 000 células madre/progenitoras medulares humanas por inyección. Cada rata recibe un total de 6 a 8 inyecciones en cada lado de la médula espinal (derecha e izquierda), distribuidas uniformemente entre los segmentos L2 a L6 expuestos. El centro de la inyección está dirigido dentro de la sustancia gris central (láminas V-VII) (distancia entre la superficie dorsal de la médula espinal a nivel L3: 1 mm). Tras la implantación, la incisión se limpia con H_2O_2 al 3% y una mezcla de penicilina y estreptomina y se cierra en 2 capas. A continuación, se deja que las ratas se recuperen.
- 15
20
- [0154]** El tratamiento inmunodepresor con FK-506 (Prograf; Fujisawa; 1 mg/kg; i.p) se inicia en todos los animales aproximadamente 3 días antes del trasplante medular. Tras el trasplante, los animales reciben tratamiento inmunodepresor diario durante todo el periodo de supervivencia. El rechazo inmune de esto injertos pueden prevenirse de forma eficaz con FK-506. Las ratas sobreviven durante aproximadamente 2 a 7 semanas (n = 5 para cada punto temporal).
- 25
- [0155]** Al final de los periodos de supervivencia, las ratas se anestesian con pentobarbital (40 mg/kg; i.p.) y se perfunden por vía transcardíaca con solución salina heparinizada durante 1-2 minutos seguido de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0,1 M. Las médulas espinales se diseccionan y posteriormente se fijan en el mismo agente de fijación durante la noche a 4°C. Tras la postfijación, el tejido de la médula espinal se crioprotege en una solución de sacarosa escalonada (10, 20 y 30%) durante un total de tres días. A continuación se realizan cortes coronales, parasagittales u horizontales de la médula espinal congelada (10-30 μm). Para el estudio inmunohistoquímico, los cortes en flotación (30 μm) se colocan en PBS, 0,1 M (pH = 7,4) que contiene suero de cabra normal (SCN) al 5%, Tritón X100 (TX) al 0,2% durante dos horas a temperatura ambiente para bloquear la actividad proteica inespecífica. Esto va seguido de la incubación durante la noche a 4°C con diversos anticuerpos específicos humanos primarios.
- 30
35
- [0156]** Tras la incubación con anticuerpos primarios, los cortes se lavan 3 veces con PBS y se incuban con anticuerpos secundarios de conejo o ratón anticabra conjugados con un marcador fluorescente (Alexa 488 o 594; 40 4 $\mu\text{l/ml}$; Molecular Probes). Todas las preparaciones bloqueantes y de anticuerpos se realizan en PBS 0,1 M/TX al 0,2%/SCN al 5%. En los experimentos de marcaje doble, se aplican simultáneamente anticuerpos primarios para diferentes especies, seguido por la aplicación de anticuerpos secundarios conjugados con diferentes marcadores fluorescentes. En los experimentos control se omiten los anticuerpos primarios. Para la tinción nuclear general se añade DAPI (3 $\mu\text{l/ml}$) a las soluciones finales de anticuerpo secundario. Tras la tinción, los cortes se secan a 45 temperatura ambiente y se cubren con el kit antidecoloración Prolong (Molecular Probes).
- [0157]** Los cortes se analizan usando un microscopio de fluorescencia Leica. Las imágenes (512 x 512 píxeles) se obtienen con una cámara digital Olympus y se procesan con Adobe Photoshop 5.5 (Adobe Systems, Mountain View, CA). Para confirmar la colocalización de diferentes anticuerpos en cortes con doble tinción las 50 imágenes se obtienen con un sistema de microscopio de deconvolución DeltaVision que incluía una cámara Photometrics CCD montada en un microscopio Nikon (Applied Precision, Inc.). En general, se obtienen seis cortes ópticos espaciados en 0,1 o 0,2 μm . Se utilizan los objetivos 20x, 40x y 60x (NA 1.3). Los grupos de datos se deconvolucionan y analizan usando el software SoftWorx (Applied Precision, Inc.) en una estación de trabajo Silicon Graphics Octane.
- 55
- [0158]** El número total de neuronas injertadas inmunoreactivas con el anticuerpo NUMA humano se estima usando un muestreo estereológico, sin sesgo y sistemático. Para la cuantificación estereológica se usa cada décimo corte previamente teñido obtenido de los segmentos espinales L2-L6 tras aplicar un esquema de muestreo fraccionador. Las imágenes ópticas (de 1 μm de espesor) se obtienen mediante un microscopio DMLB de Leica

usando un objetivo con aceite de inmersión 100x con apertura numérica 1.3. Las imágenes ópticas se obtienen usando una cámara digital (Olympus) y software ImagePro (Media Cybernetics) suministrada con una platina motorizada Z controlada por StagePro (Media Cybernetics). El número total de células injertadas se calcula a continuación aplicando la fórmula del fraccionador $N = Q \times 1/hsf \times 1/asf \times 1/ssf$, donde N es el número total de núcleos positivos, Q es la suma de las células contadas, hsf es la fracción de muestreo de espesor (*height sampling fraction*), asf es la fracción de muestreo de área (*area sampling fraction*) y ssf es la fracción de muestreo de corte (*slice sampling fraction*).

[0159] Para proporcionar una vista tridimensional reconstruida de las CMN humanas injertadas en la médula espinal isquémica, se usan imágenes obtenidas previamente a partir de cortes seriados de médulas espinales. Como media, se usan aproximadamente 60-100 cortes seriados para la reconstrucción tridimensional. En la primera etapa, se abre un paquete de imágenes seriadas usando el software Ellipse y se alinean usando el módulo Allign desarrollado por el cliente (VidiTo, SK). El proceso de alineamiento consiste en definir dos puntos de referencia morfológicos en todas las imágenes seriadas de la médula espinal (el primer punto: centro del canal central; el segundo punto: borde medio del cuerno dorsal), y un posterior alineamiento procesado por ordenador de todas las imágenes. Para identificar los bordes de los cuernos dorsal y ventral, a continuación se dibujan líneas en el paquete de imágenes previamente alineadas usando el módulo Laminar Maps (Ellipse). Finalmente, el paquete de imágenes previamente alineadas y marcadas en Laminar Maps se usa para la reconstrucción tridimensional usando un constructor 3D (Media Cybernetics).

[0160] El cultivo de CMN medulares humanas sobre astrocitos de rata durante de dos a tres semanas mostró una maduración dependiente del tiempo y un desarrollo de fenotipo neuronal en la mayoría de los cultivos. Esto se confirma mediante tinción con anticuerpos específicos humanos frente a NSE o MOC. También se identifican numerosas neuronas con un árbol axodendrítico bien desarrollado. La mayoría (85-90%) de las neuronas positivas para NSE son positivas para GABA. La expresión de sinaptofisina en axones y dendritas se observa en algunas neuronas positivas para MOC.

[0161] Se observa una sólida supervivencia de las células cuando se injertan a los veintinueve días de la lesión isquémica. Estas se expresan como injertos bilaterales claramente identificados inmunoreactivos para NUMA, MOC o NSE, todos anticuerpos específicos humanos. El análisis de los cortes horizontales obtenidos de los segmentos de la médula espinal injertados muestra una clara migración de las células positivas para NUMA entre sitios de inyecciones individuales. La mayoría de las células positivas para NUMA muestran colocalización con inmunoreactividad MOC.

[0162] El marcaje doble de los cortes de la médula espinal con anticuerpos NUMA y GABA analizados con un microscopio confocal muestra un promedio del 25-35% de células positivas para GABA. Se observa una expresión reproducible del fenotipo GABAérgico en todos los animales injertados a las siete semanas de supervivencia.

[0163] En el mismo punto temporal (es decir, siete semanas después del injerto), la tinción doble con sinaptofisina y anticuerpo NUMA muestra una red densa positiva para sinaptofisina dentro de los injertos.

[0164] Solo ocasionalmente se mostrará colocalización de células positivas para NUMA con el anticuerpo GFAP. Estas células se localizan típicamente en la periferia de los injertos.

[0165] La estimación estereológica de células positivas para NUMA muestra una media de $75\,460 \pm 5\,697$ células injertadas persistentes dentro de los injertos individuales. Esto representa un promedio de 3-3,6 veces más células que las originalmente inyectadas. El antígeno de ciclo celular Ki67 es un marcador de células mitóticas activas. La tinción de los cortes de médula espinal a las dos o a las siete semanas tras el injerto muestra inmunoreactividad con hKi67 solo a las dos semanas del injerto. Solo ocasionalmente (1-2 células/10 cortes) se encuentran células positivas para Ki67 a las siete semanas de supervivencia. Estos resultados indican que las CMN medulares humanas injertadas y sus progenies se expanden en un número equivalente hasta una media de aproximadamente tres duplicaciones celulares durante el periodo inicial de dos semanas que, a continuación, se convierten en postmitóticas y establemente integradas.

[0166] Se realiza una reconstrucción volumétrica de los segmentos L3-L5 trasplantados usando las imágenes obtenidas de los cortes seriados de médula espinal de 40 µm de espesor teñidas con anticuerpos MOC y DAPI (número total de 150-200 secciones). La reconstrucción tridimensional del injerto muestra un implante positivo para MOC bien reconocido orientado en dirección rostrocaudal distribuido dentro del intervalo de la sustancia gris. Como se ilustra en la figura 7 y en la figura 8, el efecto funcional de las CMN medulares humanas se evalúa injertando las

células y midiendo el beneficio de la recuperación motora mediante la puntuación BBB.

[0167] Con respecto al grado de recuperación del comportamiento observado en el estudio actual se han visto tres grupos principales tras el injerto. Primero grupo, animales que mostraron la recuperación más sólida y capacidad para andar (BBB <16); segundo grupo, animales que mostraron mejora en la movilidad activa de las 3 articulaciones de las extremidades inferiores pero no podían mantenerse en pie (BBB alrededor de 8) y, el tercer grupo en el que los animales no mostraron ninguna recuperación (es decir, no respondedores). Aunque no está claro el motivo de las diferencias en la capacidad de respuesta al injerto los autores especulan que sutiles diferencias en las posiciones del injerto con respecto a las neuronas aferentes primarias desinhibidas y/o motoneuronas α desinhibidas pueden ser importantes. Además, hay que señalar que los animales sobreviven solo 3 meses en el estudio actual. Se especula que una supervivencia postinjerto más larga y una rehabilitación física continuada probablemente se asociarán con un grado más alto de recuperación funcional. No obstante, en contraste con el grupo de tratamiento, no se observó recuperación significativa en ninguno de los animales inyectados solo con medio de cultivo.

15

[0168] **Ejemplo 6.** Tratamiento de enfermedades de neuronas motoras mediante trasplante de CMN medulares humanas (ejemplo de referencia). Las CMN de los procedimientos descritos ofrecen beneficios tanto clínicos como biológicos que son potentes y significativos. Para este fin, los procedimientos descritos permiten el tratamiento de afecciones tanto diseminadas a través del sistema nervioso central, como la ELA, como localizadas en una zona en particular, como en el caso de isquemia de la médula espinal descrita anteriormente. En la ELA, aunque el injerto en la médula lumbar puede omitir otras porciones vitales del aparato motor segmental, es decir, la columna de neuronas motoras cervicales responsable de los movimientos respiratorios, los procedimientos descritos de implantación de CMN en la médula espinal facilitan la liberación de BDNF y GDNF y de otros factores a partir de las células trasplantadas en el LCR donde puede producirse un efecto más amplio sobre las neuronas motoras del huésped a lo largo de la médula.

[0169] Sorprendentemente, se ha encontrado que injertos parciales de CMN humanas en los segmentos lumbares del entorno de la médula espinal neurodegenerativa sobreviven, sufren una amplia diferenciación neuronal y promueven la supervivencia y función de las neuronas motoras tanto en el sitio de implantación como en otras localizaciones. Las CMN retrasan significativamente la aparición de los síntomas y extiende la vida de ratas SOD1 G93A, un modelo de ELA humana (esclerosis lateral amiotrófica).

[0170] La rata SOD1 G93A representa un modelo completo para los síntomas neuropatológicos y clínicos de una forma especialmente agresiva de ELA. ([Nagai y col., 2001; Howland y col., 2001]). Las CMN de médula espinal fetal humana pueden injertarse en la médula lumbar de ratas y ratones SOD1 G93A donde se produce una amplia diferenciación de las neuronas y donde las neuronas diferenciadas forman posteriormente contactos sinápticos con neuronas huésped y expresan y liberan GDNF y BDNF. El modelo de rata SOD1 G93A, por ejemplo, caracterizado por una enfermedad de neuronas motoras fulminante puede usarse para estudiar y demostrar los efectos beneficiosos de las CMN en la enfermedad. Para este fin, los injertos de CMN empleados en los procedimientos descritos sobreviven bien en un entorno neurodegenerativo y ejercen potentes efectos clínicos. Al menos una parte de estos efectos está relacionado con la capacidad de estos injertos de expresar y liberar factores de crecimiento de neuronas motoras. Por consiguiente, las CMN injertadas de los procedimientos descritos retrasan la aparición y progresión de la enfermedad de neuronas motoras fulminante y alargan la esperanza de vida de estos animales en más de diez días, a pesar del restringido programa de injertos que se limitó a la protuberancia lumbar.

45

[0171] Las CMN humanas (NSI-566RSC) del tejido de la médula espinal de un feto humano postmortem de ocho semanas de gestación se expanden en medio sin suero con factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) durante aproximadamente 10-12 pases antes del injerto (Johe y col., 1996). El destino de estas células se sigue de forma fiable con anticuerpos frente a antígenos nucleares humanos (HNu) (Yan y col., 2003). Todos los procedimientos quirúrgicos que usan estas células se realizan según los protocolos incorporados a este documento por referencia aprobados por los Comités de atención y uso animal de las Instituciones médicas Johns Hopkins usando anestesia con gas (enflurano:oxígeno:óxido nitroso = 1:33:66) y procedimientos asépticos.

[0172] Las CMN vivas o muertas se injertan en la protuberancia lumbar (L4 y L5) de ratas SOD1 G93A de nueve semanas de edad (220-300 g) con mezcla de géneros sobre una unidad estereotáctica espinal de Kopf dirigida con un microscopio. Las células muertas se preparan mediante congelación y descongelación repetida antes del trasplante. Las suspensiones celulares se administran en condiciones asépticas mediante ocho inyecciones aproximadamente dirigidas al cuerno ventral en ambos lados de dicho cuerno ventral (5×10^4 CMN por sitio de inyección, cuatro inyecciones por sitio de inyección) con micropipetas de vidrio biseladas estiradas conectadas, a

través de una conexión de silastic, a microjeringas Hamilton de 10 μ l. Todas las ratas recibieron FK-506 (1 mg/kg i.p) para evitar el rechazo inmune en función de los datos piloto que indicaban que, en animales sin tratar o en animales que recibieron ciclosporina, la supervivencia del injerto no excedía de un mes.

5 **[0173]** Se comprueba la fuerza motora y el peso de las ratas dos veces a la semana. Entre las pruebas de fuerza motora se incluyen la escala de valoración locomotora de Basso, Beattie y Bresnahan (BBB) (Basso y col., 1995) y la escala de plano inclinado (Rivlin y Tator, 1977). Para la prueba de puntuación BBB, los animales se prueban durante 4 o 5 minutos en campo abierto. Todo el rendimiento locomotor se registra y valora según la escala. Para la prueba de plano inclinado, las ratas se colocan en la alfombrilla de plano inclinado y el ángulo se ajusta al
10 punto máximo al que su posición pueda estabilizarse durante unos 5 segundos. A continuación este ángulo se registra como la puntuación en plano inclinado del animal. Las puntuación de la escala BBB y de plano inclinado se analizan mediante MANOVA seguido de una prueba LSD de Fisher *a posteriori*. El inicio de la enfermedad se define como el punto en que el peso corporal empieza a descender drásticamente. La evolución de la enfermedad como efecto de un tipo de injerto (injerto de células vivas o muertas) se analiza comparando la edad de inicio de la
15 enfermedad con la edad de muerte entre los dos grupos (con una prueba t de Student), así como con análisis de supervivencia de Kaplan-Meier seguido de una prueba de rango logarítmico.

[0174] Las ratas se sacrifican con perfusión-fijación cuando su puntuación BBB (véase a continuación) es menor de 3, un estadio en el cual solo una articulación presenta movimiento o no se observa movimiento alguno, y el
20 animal se considera moribundo.

[0175] Se preparan tejidos de animales perfundidos con paraformaldehído tamponado a pH neutro al 4%. Los segmentos de médula espinal toracolumbar con raíces y nervios lumbares unidos se fijan adicionalmente mediante inmersión en el mismo agente de fijación durante cuatro horas más. Los bloques que contienen la zona de injerto
25 completa más 1 mm de borde por encima y por debajo del bloque se crioprotegen y congelan para su procesamiento adicional. Las raíces L3-S1 se procesan por separado como preparaciones completas montadas o tras separar las raicillas con puntas coaguladas con calor de pipetas de vidrio. Los bloques se cortan en el plano transversal o sagital (35 μ m). La supervivencia y diferenciación de las CMN se estudian con inmunofluorescencia de doble marcaje que combina, en la mayoría de los casos, HNu, un marcador específico humano, con otro marcador celular, y se realiza
30 como se describe en Yan y col., 2004.

[0176] Se usa un método no estereológico para contar el número total de células HNu(+), así como células con marcaje doble con HNu y un marcador fenotípico en campos de gran aumento (100x) seleccionados al azar a partir de sus preparaciones inmunofluorescentes para estudiar la diferenciación de CMN. Se usa un campo de cada
35 seis cortes espaciados ~1 mm a lo largo de la zona de injerto de cada animal. Se mezclan cantidades de perfiles HNu(+) y marcaje doble a partir de los seis campos contados de cada caso y se agrupan por protocolo experimental. Se generan cantidades promedio de células con marcaje sencillo o doble para cada grupo de tratamiento (n = 6 por grupo).

40 **[0177]** Para evaluar la supervivencia de neuronas motoras en ratas injertadas con células vivas o muertas (n = 4 de cada), se evalúan los tejidos de los animales sacrificados a los 128 días de edad. Se recogen muestras de cada sexto corte de la región L3-S1 de cada animal según los requisitos estereológicos (Yan y col., 2004), y las neuronas motoras α , identificadas como células multipolares con un núcleo diferenciado y un diámetro del cuerpo >35 μ m, se cuentan con un fraccionador óptico según se describe en Yan y col., 2004. Las diferencias entre
45 animales injertados con células vivas en comparación con células muertas se analizan con la prueba t de Student.

[0178] Para la determinación mediante ELISA de factores neurotróficos motores, se toman muestras de LCR con una jeringa de calibre 25 G del cuatro ventrículo de los animales anestesiados con gas. Las muestras de tejidos que contienen los sitios injertados y las zonas adyacentes a estas se cortan transversalmente a partir de cortes de
50 médula espinal de 1 mm de espesor. Se procesan las muestra de LCR o de tejido y se determina en primer lugar la proteína total como se describe en Sheng y col., 2003. Los niveles de GDNF y BDNF se miden en muestras de LCR y médula espinal usando el sistema E-Max ImmunoAssay (Promega, Madison, WI). La absorbancia del cromógeno TNB se lee a 450 nm. La varianza en las concentraciones entre muestras de injertos vivos, áreas adyacentes a los injertos e injertos de células muertas se analiza con una prueba ANOVA unilateral seguida por una prueba a
55 *posteriori* de comparación múltiple de Turkey. Las diferencias en la concentración en LCR entre animales injertados con células vivas en comparación con células muertas se analizan con la prueba t de Student.

[0179] Para la inmunofluorescencia de factores neurotróficos motores, las muestras de proteínas del LCR o de la médula espinal preparadas como para ELISA se someten a electroforesis con marcadores de peso molecular y

se transfieren a membranas de nitrocelulosa. Las transferencias se bloquean con TBS, pH 7,4, que contiene suero de burro al 5% y, a continuación, se incuba con anticuerpos frente a GDNF y BDNF (1:500; durante la noche a 4°C) en primer lugar y, a continuación, con IgG de burro anticabra unida a HRP (para GDNF) e IgG anticonejo (para BDNF) (1:2000; Jackson ImmunoResearch) (1 h, TA). Todos los anticuerpos se diluyen en TBS que contiene suero de burro al 5%. Las transferencias se desarrollan con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal (Pierce) y se exponen a una película Kodak-XAR (Eastman de Kodak, Rochester, NY). A continuación, las transferencias se cortan en tiras y se repite la inmunotransferencia con un anticuerpo frente a β -actina (1:500, Sigma) e IgG anti-ratón de burro conjugado con HRP (1:10 000, Jackson Immunoresearch). Las bandas inmunoreactivas se analizan con el software Quantity One de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las relaciones de la densidad de las bandas (GDNF o BDNF: β actina) se calculan por animal y las medias por grupo se introducen para análisis estadístico como en el casos de los experimentos de ELISA.

[0180] Las CMN humanas en la médula espinal de ratas SOD1 G93A a las 22 semanas posteriores al injerto se identifican mediante inmunotinción con un anticuerpo HNu específico humano. Se demuestra que las células HNu(+) sobreviven en el cuerno ventral (A) y se tiñen, en su gran mayoría, con marcadores de estirpe neuronal como el epítipo asociado a microtúbulos TUJ-1. Las CMN humanas se identifican mediante su característica proteína nuclear humana (HNU) y sus destinos fenotípicos se siguen con inmunocitoquímica doble para HNu y epítipos específicos de precursores neurales, neuronas y células de la glía. Al final de los experimentos en ratas SOD1 G93A, las CMN humanas muestran un injerto sólido y una supervivencia a largo plazo excelente. La mayoría de las células HNu(+) (70,4 \pm 6,4%) se diferenciaban en la estirpe neuronal en función de su colocalización con TUJ-1. Aproximadamente un quinto (19,3 \pm 5,6%) de las células HNu(+) se localizaban con nestina y muy pocas (1,3 \pm 0,9%) células HNu(+) eran positivas para GFAP.

[0181] La capacidad de las CMN humanas para integrarse dentro de los circuitos del huésped se comprueba con marcadores pericariales para células del injerto/huésped y marcadores selectivos para las terminales del huésped o el injerto. En los cortes se hace una tinción para HNu para establecer el origen del injerto, para TUJ-1 para establecer la diferenciación neuronal y con un anticuerpo monoclonal para la proteína Basson (BSN) presináptica que reconoce epítipos de rata y de ratón, pero no epítipos humanos. Se encuentra que un gran número de células HNu(+), TUJ-1(+) en localizaciones parenquimales están en contacto con botones sinápticos originarios de la rata.

[0182] En microscopía confocal, las células neuronales derivadas de CMN con núcleos HNu(+) y citoplasma TUJ-1(+) están en contacto con terminales de rata. Por el contrario, las preparaciones teñidas para TUJ-1 y sinaptofisina específica humana muestran campos terminales densos de botones pequeños yuxtapuestos a las neuronas del huésped, especialmente neuronas motoras grandes y pequeñas. Una neurona motora del huésped está en contacto con un gran número de botones derivados del injerto. Las secciones horizontales teñidas para HNu y NF-70 humano muestran un gran número de axones derivados del injerto dejando el injerto a la izquierda y recorriendo preferentemente la sustancia blanca del funículo ventral. Las células/procesos con inmunoreactividad ChAT se usan para delimitar la sustancia gris de la blanca en el cuerno ventral. Un gran número de axones marcados con anticuerpos específicos humanos frente al epítipo de neurofilamento NF70 se encuentran asociadas con los sitios de injerto, lo que evidencia que muchas CMN humanas se diferencian en neuronas de proyección; estos axones muestran una preferencia por la sustancia blanca del cuerno ventral.

[0183] Los injertos de CMN en la médula lumbar de ratas SOD1 G93A prolongan la esperanza de vida y retrasan la muerte de las neuronas motoras y el inicio y progresión de la enfermedad. En la figura 9 se muestra un análisis de la progresión de las medidas clínica y patológica en casos con injertos de células vivas (L) y células muertas (control, C). Los animales injertados con CMN vivas mostraban un aumento significativo de la supervivencia tanto mediante análisis de Kaplan-Meier como de punto final. En la gráfica de Kaplan-Meier (figura 9A) se muestra una separación significativa entre los animales experimentales y controles en el transcurso de la observación (P = 0,0003). Las gráficas de tiempo de las puntuaciones de campo abierto de BBB y de la prueba del plano inclinado (figura 9B) muestran una progresión significativamente más lenta de la debilidad muscular en animales injertados con CMN vivas en comparación con los animales que habían recibido CMN muertas.

[0184] En un grupo pequeño de animales que reciben CMN vivas o muertas se examina el efecto de las CMN sobre la supervivencia de las neuronas motoras en la protuberancia lumbar (L3-S1) de ratas Tg y se sacrifican a los 128 días de edad. La esperanza de vida media en los animales injertados con CMN muertas es de 138 días mientras que las ratas injertadas con CMN vivas vivían durante 149 días. Por tanto, se observa una diferencia significativa de 11 días entre las ratas experimentales y control (P = 0,0005). El tiempo medio hasta la aparición de la enfermedad es de 115 días para los animales que reciben células muertas y de 122 días para los animales que se

injertan con CMN vivas. Se observa una diferencias significativa de 7 días en el tiempo hasta la aparición de la enfermedad entre los dos grupos ($P = 0,0001$).

- [0185]** La cantidad estimada estereológicamente de neuronas motoras α es de 6418 para los animales que recibieron CMN vivas y 3206 para las ratas que se injertaron con CMN muertas, es decir, hay el doble de neuronas en la protuberancia lumbar de los animales experimentales en comparación con los animales control de la misma edad. Se observa una diferencia de 3212 células en la protuberancia lumbar entre los grupos de CMN vivas y muertas ($P = 0,01$) en una rata experimental representativa y una rata control a los 128 días de edad.
- 10 **[0186]** Entre los posibles mecanismos de neuroprotección proporcionados por las CMN humanas sobre las neuronas motoras en degeneración se incluyen la expresión y liberación de dos péptidos con efectos tróficos clásicos sobre las neuronas motoras de mamífero [BDNF y GDNF] (Henderson y col., 1994; Koliatsos y col., 1993). Se determina la expresión y liberación de GDNF y BDNF en la médula espinal de ratas SOD1 G93A injertadas. En las preparaciones de médula y las muestras de LCR se evalúa la presencia de BDNF y GDNF mediante
15 inmunotransferencia y ELISA. Las concentraciones de GDNF en el parénquima y el LCR con células vivas (L1 y L2) y animales injertados con células muerta (C) se determinan mediante ELISA. L1 representa las concentraciones a través del sitio de injerto, mientras que L2 refleja las concentraciones en los tejidos un segmento por encima o por debajo. La varianza entre grupos es significativa y está causada por una gran diferencia entre los grupos L1 o L2 y C
- 20 **[0187]** La diferencia en las concentraciones en LCR entre los grupos experimental (células vivas, L) y control (células muertas, C) también es significativa según la prueba t. El ELISA mostró una concentración de $0,912 \pm 0,050$ pg/ μ g en el sitio del injerto y de $0,819 \pm 0,115$ pg/ μ g a una distancia de un segmento en la médula espinal de los animales con injertos de CMN vivas. En animales injertados con CMN muertas, estas concentraciones eran de $0,368 \pm 0,026$ pg/ μ g en los segmentos de la médula espinal que contenían el injerto. En el LCR, la concentración de
25 GDNF era de $0,027 \pm 0,012$ pg/ μ l en el grupo experimental y de $0,006 \pm 0,002$ pg/ μ l. Estos datos muestran un aumento de tres veces en la expresión y liberación de GDNF en la médula y de cinco veces en la secreción de GDNF en el LCR de los animales con CMN vivas.
- [0188]** La inmunotransferencia también muestra una concentración normalizada de GDNF mayor en animales injertados con CMN vivas. La inmunotransferencia para GDNF confirma el patrón del ELISA de aumento por la detección de una proteína de 16 kDa. En la inmunotransferencia también se muestra una densidad normalizadas de GDNF de $0,860 \pm 0,007$ en injertos de células vivas y de $0,708 \pm 0,052$ en injertos de células muertas.
- [0189]** Se determina la tinción del ELISA de BDNF en el parénquima y el LCR de ratas experimentales y ratas control. El análisis del ELISA muestra una concentración de $0,086 \pm 0,014$ pg/ μ g en el sitio del injerto (L1) y de $0,054 \pm 0,009$ pg/ μ g a una distancia de un segmento en los animales experimentales (L2). En las ratas control, la concentración de BDNF era de $0,010 \pm 0,003$ pg/ μ g en los segmentos que contienen injerto. Las diferencias entre las concentraciones en LCR de ratas experimentales y ratas control son significativas. En el LCR, la concentración de BDNF era de $0,041 \pm 0,013$ pg/ μ l en los animales experimentales y de $0,010 \pm 0,008$ pg/ μ l en los controles. Estos
40 resultados indican un aumento de ocho veces en la concentración de BDNF en la médula espinal y de cuatro veces en el LCR de los animales experimentales. En conjunto, los datos del ELISA sugieren una secreción más difundida de GDNF en comparación con BDNF en animales injertados con CMN vivas, especialmente en el LCR.
- [0190]** La inmunocitoquímica también muestra que la gran mayoría de las células HNu(+) injertadas expresan GDNF. Las propias células injertadas constituyen la fuente del GDNF en animales con injertos vivos. En las preparaciones con doble tinción para HNu (rojo) y GDNF (verde), se muestra la abundante inmunoreactividad de GDNF dentro del citoplasma de las CMN injertadas. En animales que reciben injertos vivos, existe una intensa inmunoreactividad alrededor de las estructuras citoplásmicas que recuerdan a las vesículas secretoras de las neuronas motoras del huésped.
50
- [0191]** La microscopía confocal mediante una neurona motora huésped teñida con GDNF y sinaptofisina humana (esta última para marcar las terminales derivadas del injerto) indica la localización de GDNF en estructuras vesiculares pero no en las terminales derivadas del injerto localizadas en la superficie de la neurona motora huésped ilustrada. Los cortes teñidos con anticuerpos frente a sinaptofisina humana (para marcar todos los terminales del injerto que inervan las neuronas motoras del huésped) y frente a GDNK muestran ausencia de cualquier
55 colocalización de las dos proteínas en botones que contiene las neuronas motoras del huésped.
- [0192]** Las ratas con injertos vivos muestran una elaboración de rutas que se originan en el injerto e inervan estructuras dentro y alrededor del canal central. En contraste con la ausencia de proteína GDNF en los terminales

que conectan con las neuronas motoras del huésped, la inmensa mayoría de las terminales de axones derivadas de CMN que inervan el canal central se colocalizan con la inmunoreactividad con GDNF. La extendida colocalización de la sinaptofisina humana y GDNF se observa dentro de las terminales derivadas del injerto que inervan las células ependimales del canal central. Estos patrones anatómicos indican que el GDNF probablemente es captado por los terminales de las neuronas motoras del huésped que inervan el injerto mediante el transporte retrógrado y no se administra a estas neuronas mediante transporte transináptico (Rind y col., 2005).

[0193] La resistencia aparente de las CMN injertadas al proceso degenerativo en curso en el cuerno ventral de las ratas SOD1 G93A es especialmente prometedor. La supervivencia y completa diferenciación de las CMN descritas en este documento es una potente indicación de que la señalización inflamatoria/excitotóxica que implica a las neuronas motoras presentes en SOD1 G93A (Rosthstein y col., 1992; Howland y col. 2002; Turner y col., 2005) no tiene toxicidad evidente sobre las células. Este factor por sí solo hace que surja el optimismo sobre futuras técnicas usando injertos para restaurar la función motora en una enfermedad de neuronas motoras degenerativa.

15 [0194] Ejemplo 7. Tratamiento de la lesión traumática de la médula espinal mediante trasplante de células madre neurales/células progenitoras de médula espinal humana. Tratamiento de siringomielia. (Ejemplo de referencia)

[0195] Las células madre neurales humanas expandidas se inyectaron en ratas Sprague-Dawley adultas inmunodeprimidas o en ratas desnudas atímicas inmunodeficientes. Se produjeron lesiones por contusión de C₄₋₅ en ambos grupos un mes antes del trasplante. Los receptores del injerto (n = 24) sobrevivían entre 60 y 150 días después del trasplante. Las CMN derivadas de humanas formaban grandes agregados celulares compuestos de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Estos injertos rellenaban cada lesión invariable y completamente. Las neuronas NeuN+/núcleos humanos+ con aspecto inmaduro a menudo suponían el 50% de la población de células del donante. Estas neuronas envían procesos neurofilamentos humanos + a través tanto de la sustancia gris como de la sustancia blanca a distancias de al menos 2 cm desde el sitio del injerto. Se apreció una intensa inmunoreactividad con sinaptofisina humana específica en la proximidad tanto de las neuronas del huésped como del injerto y células GFAP+ aparentemente no reactivas se colocaban próximas a las neuronas del donante. Además, esos trasplantes apoyaban el crecimiento de fibras TH+ y 5HT+ que parecían surgir de las fuentes del huésped. Por tanto, esta línea de CMN parece contar con cualidades similares al SNC fetal favorables para la reparación de la sustancia gris intramedular.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para preparar una población de células madre neurales capaces de generar neuronas en una médula espinal del receptor que comprenda:
- 5
- a) expandir al menos una célula madre neural obtenida directamente del tejido de mamífero en un recipiente de cultivo recubierto previamente con 0,1 µg/ml a 1 mg/ml de uno o más polímeros capaces de promover la adhesión de las células;
- 10 b) concentrar la población expandida, en el que la menos la célula madre neural se obtiene de fuentes de mamífero diferentes a embriones humano, en el que cultivar la célula madre neural en ausencia de suero, en el que expandir la célula madre neural incluye exponer la célula madre neural a al menos un factor de crecimiento y en el que la expansión celular excede las treinta duplicaciones de las células sin diferenciación.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1,
- en el que la población expandida es capaz de generar neuronas productoras de GABA *in vivo*; o
- en el que la población expandida es capaz de generar neuronas productoras de glicina *in vivo*; o
- 20 en el que al menos el 40% de la población expandida es capaz de generar neuronas en la médula espinal; o
- en el que al menos el 30% de la población expandida es capaz de diferenciarse en neuronas *in vitro*; o
- 25 en el que el polímero se selecciona a partir del grupo compuesto por poli-D-lisina, poli-L/D-lisina, poli-L-lisina, poli-D-ornitina, poli-L-ornitina, fibronectina, lamina, colágeno y combinaciones de los mismos.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el factor de crecimiento se selecciona a partir del grupo compuesto por bFGF, EGF, TGF-alfa, αFGF y combinaciones de los mismos.
- 30
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula madre neural se aísla a partir de una fuente seleccionada entre el grupo compuesto por un sistema nervioso central, un sistema nervioso periférico, médula ósea, sangre periférica, sangre de cordón umbilical y al menos un embrión.
- 35 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el mamífero es un mamífero en desarrollo.
6. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que la edad de gestación del mamífero en desarrollo está entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 20 semanas.
- 40

FIG. 1

Expansión de células madre neurales humanas

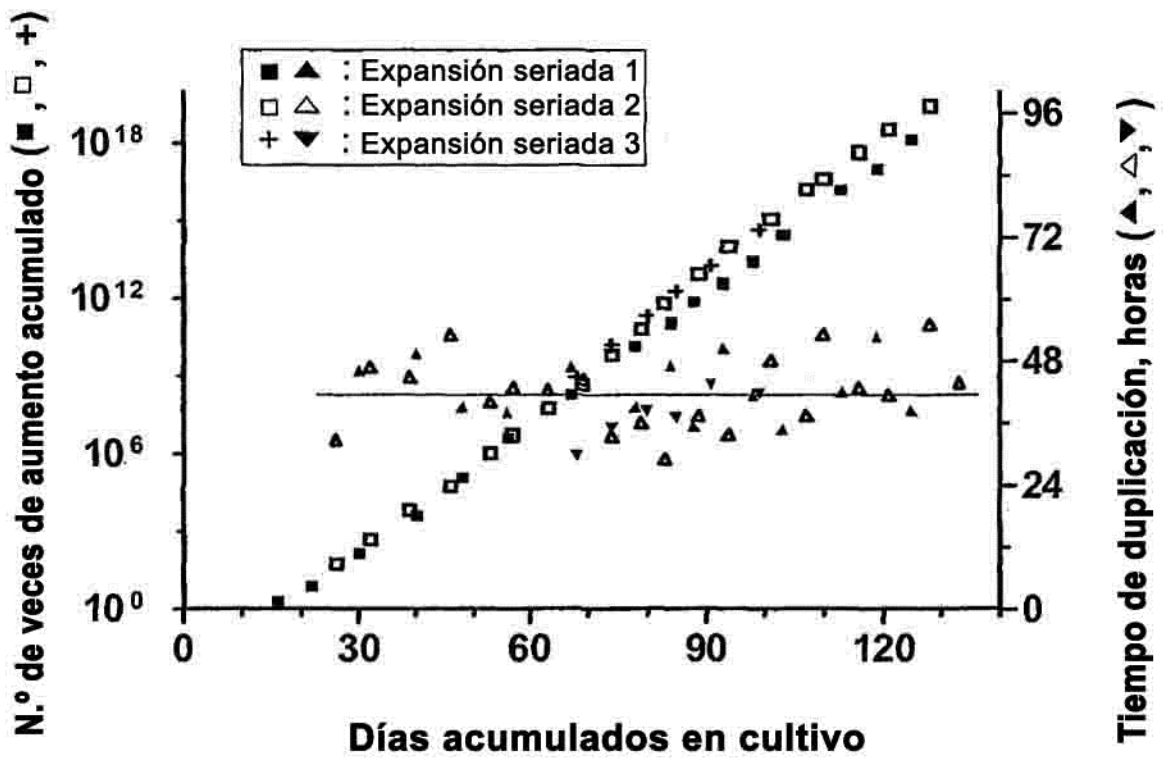


FIG. 2

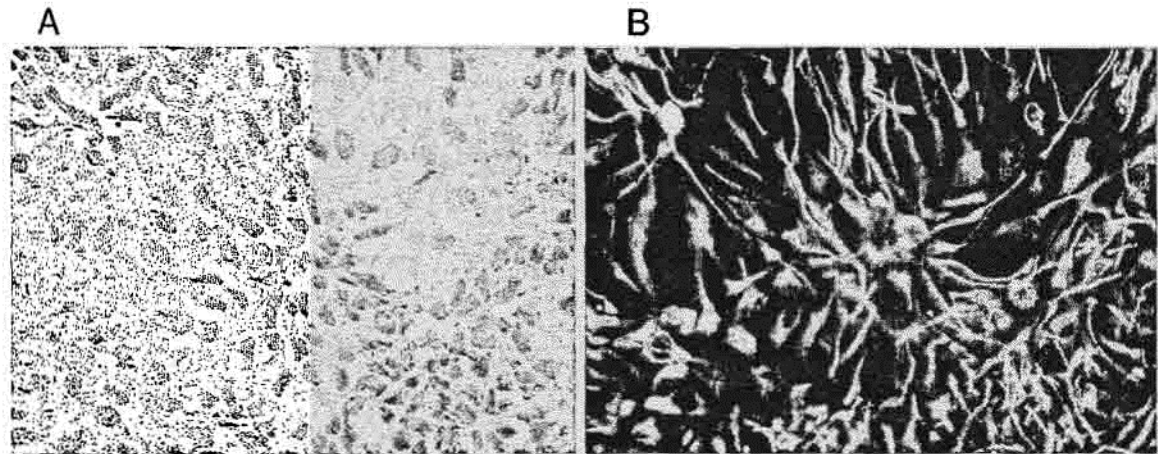


FIG. 3

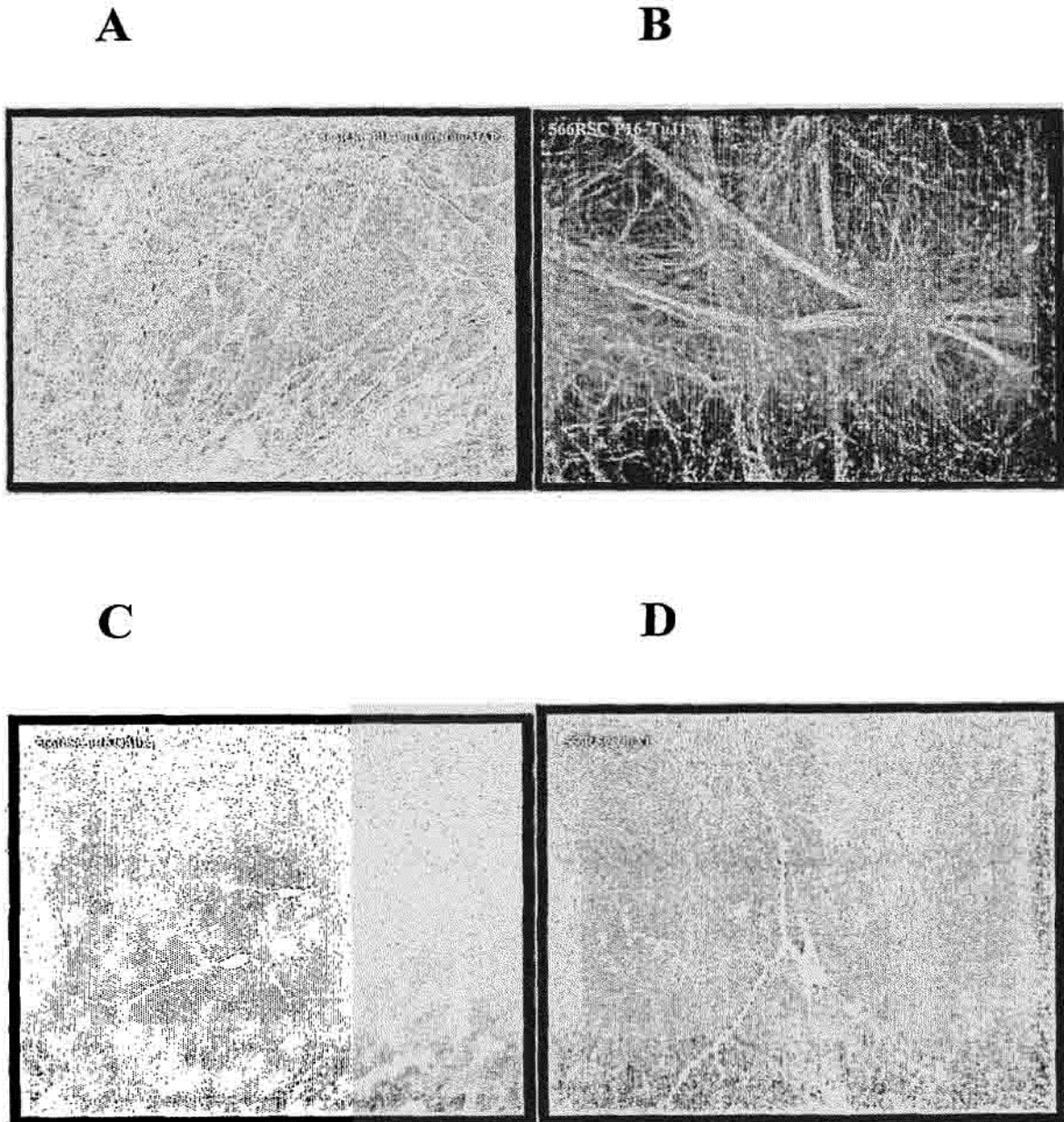


FIG. 4

Expansión de células madre neurales de mesencéfalo humanas

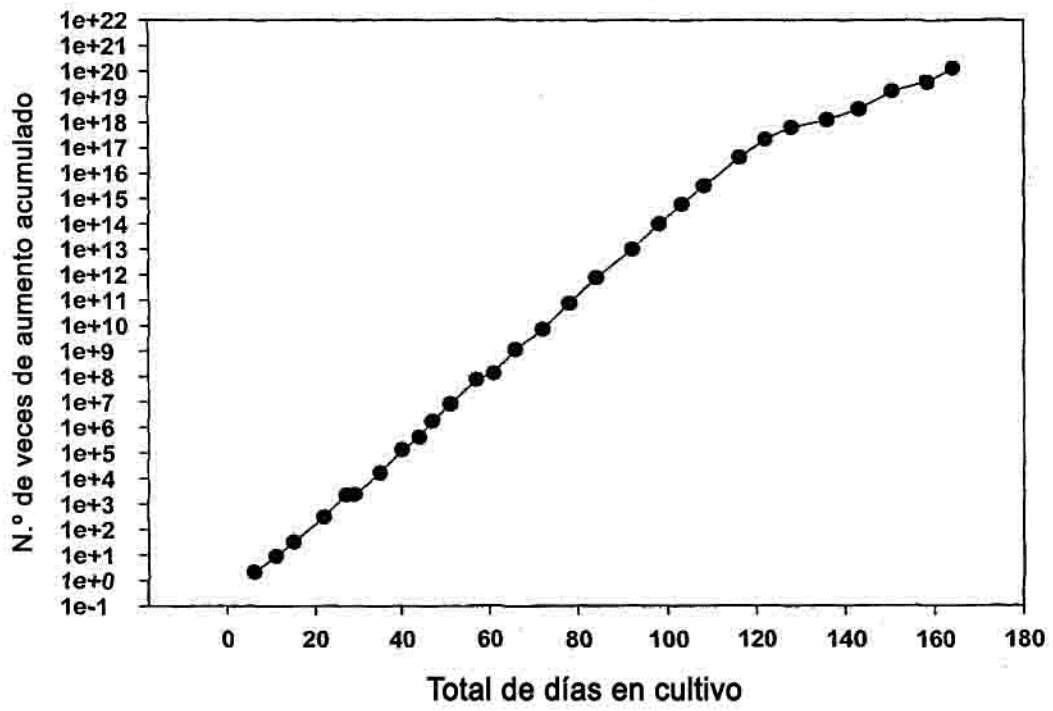


FIG. 5

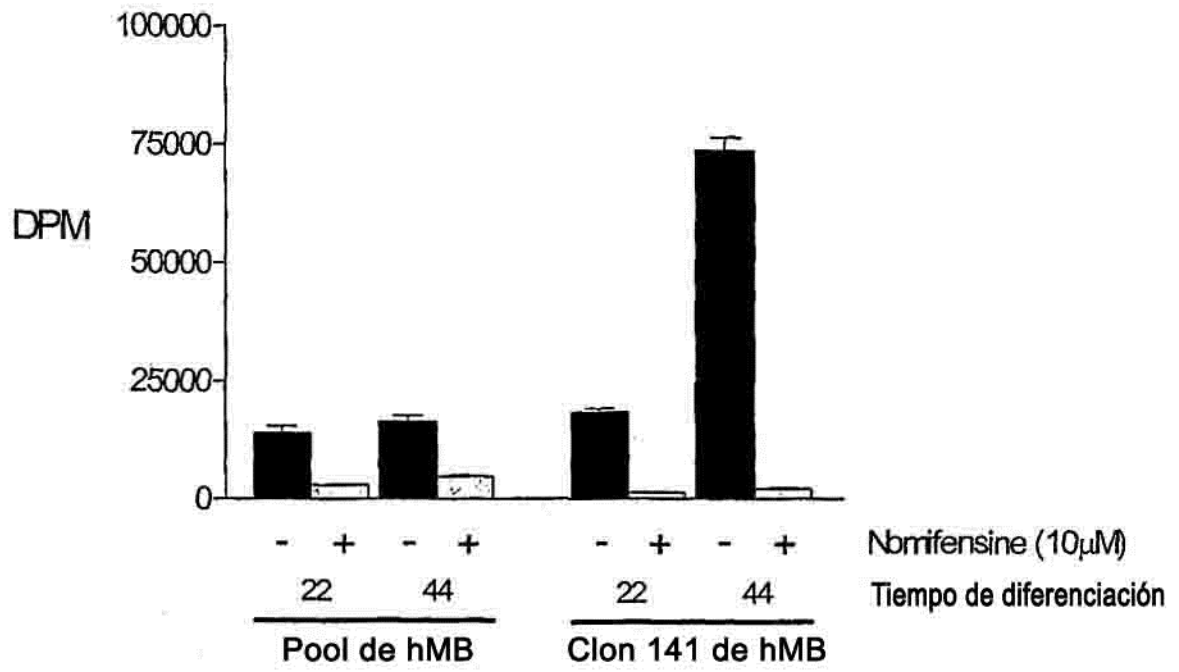


FIG. 6A

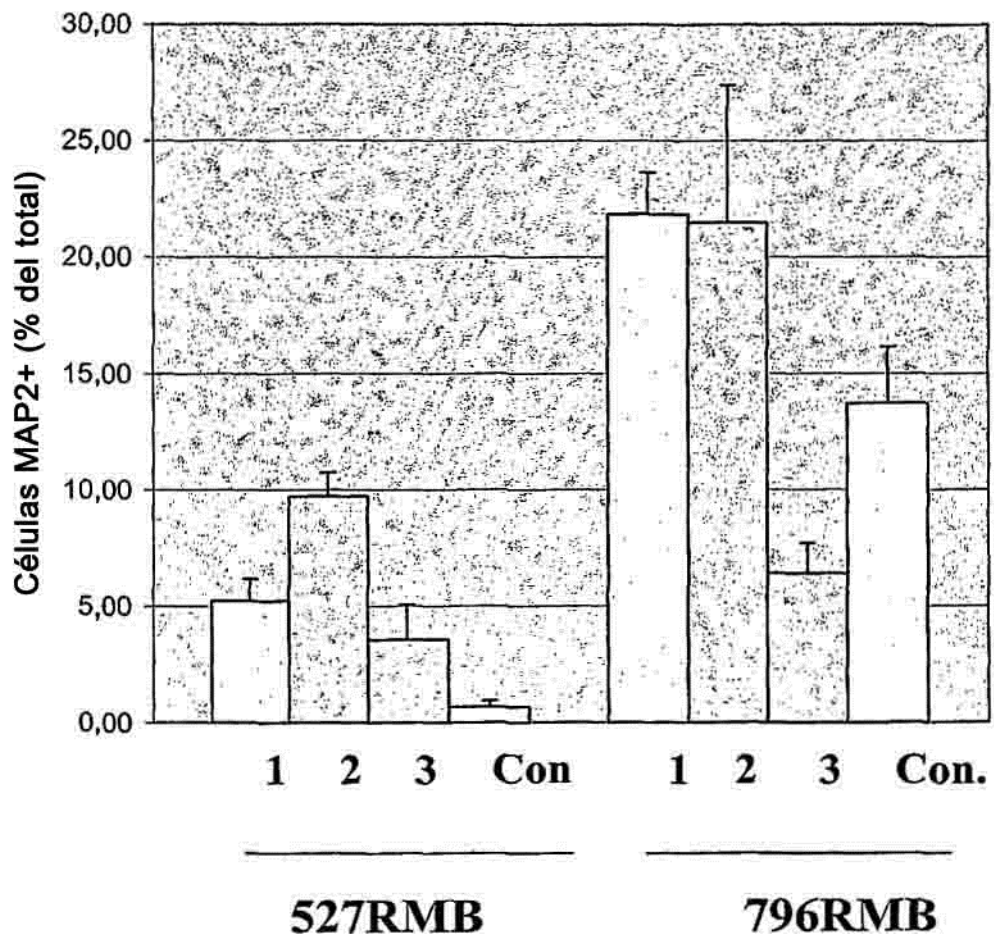


FIG. 6B

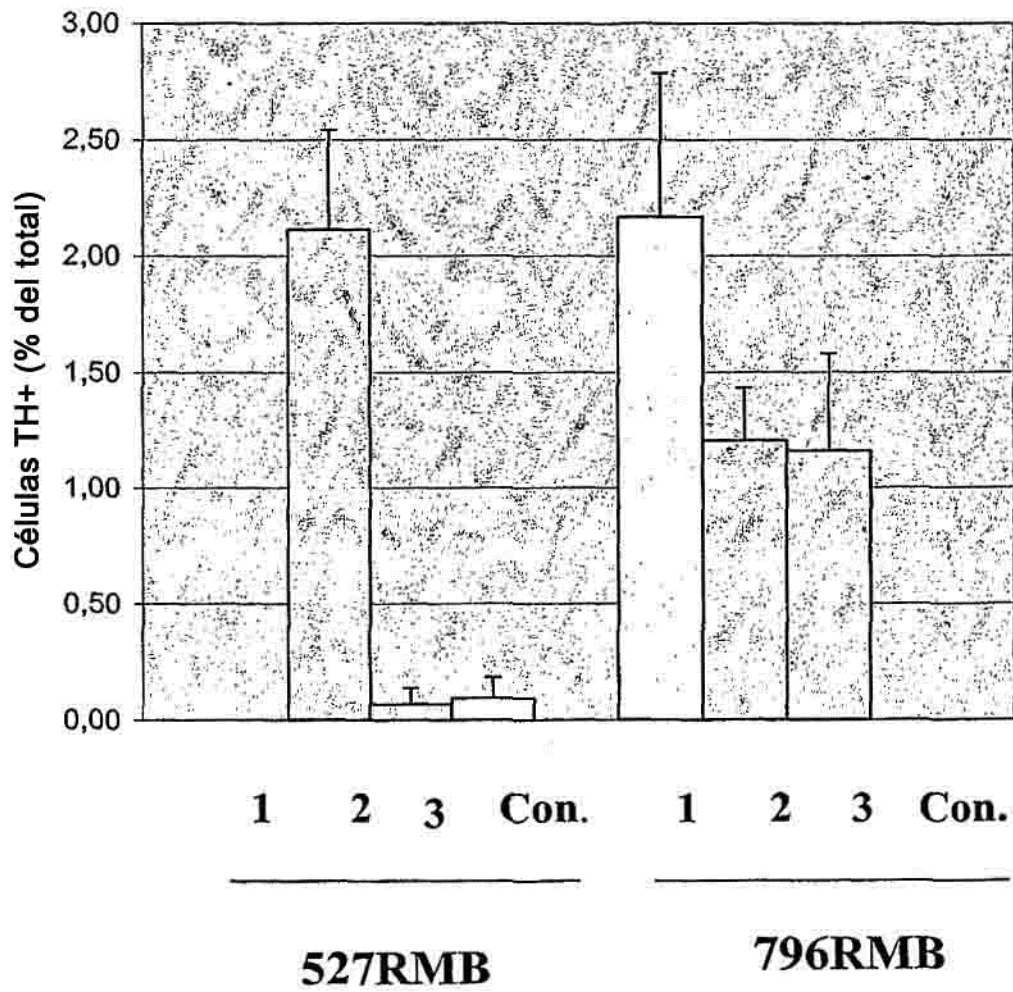


FIG. 7

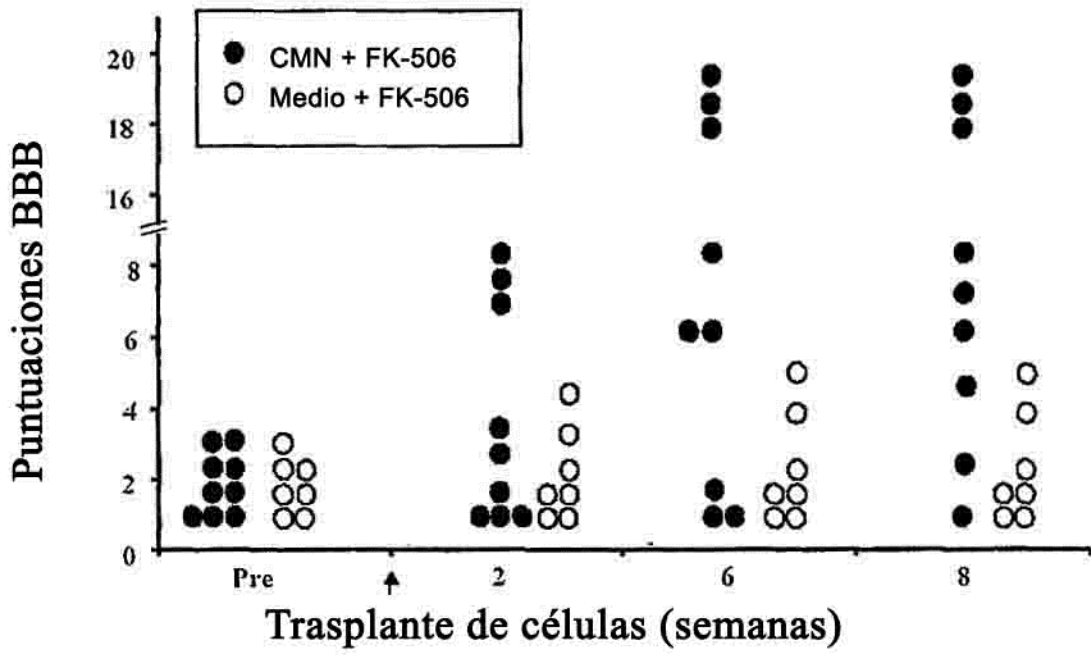


FIG. 8

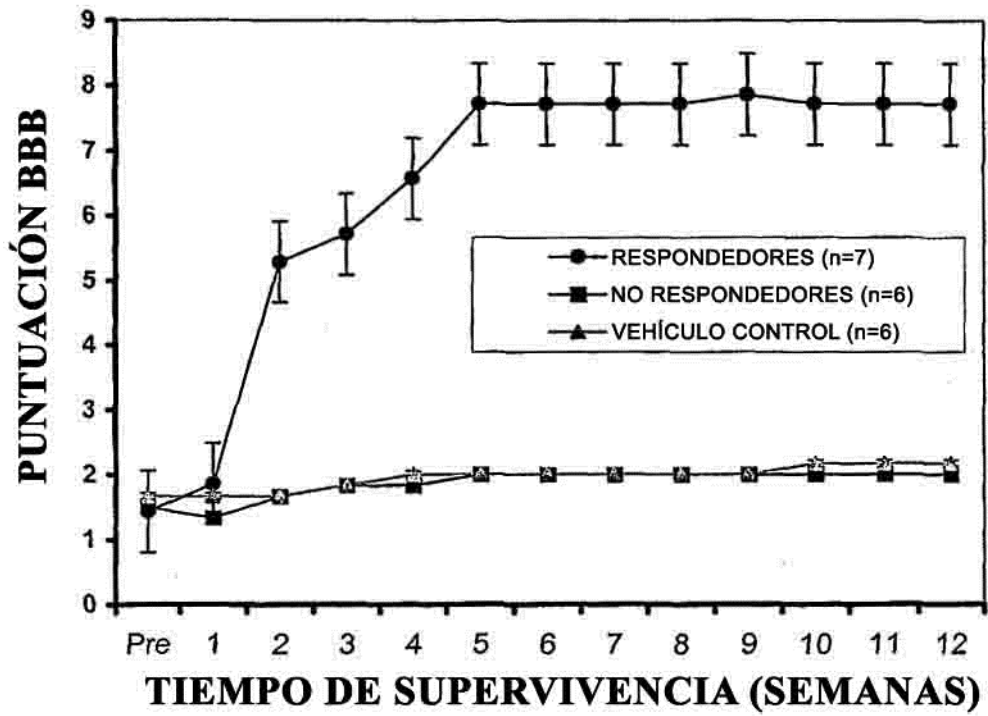


FIG. 9

