

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 456**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0797** (2010.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 35/51** (2015.01)

**C12N 5/0789** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2007 E 07851154 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2099901**

54 Título: **Uso de una composición que contiene células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical humano para inducir diferenciación y proliferación de células precursoras neurales o células madre neurales a células neurales**

30 Prioridad:

**30.11.2006 US 867875 P**  
**01.12.2006 KR 20060120479**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.11.2015**

73 Titular/es:

**MEDIPOST CO., LTD. (100.0%)**  
**1571-17 Seocho-3dong, Seocho-gu**  
**Seoul 137-874, KR**

72 Inventor/es:

**OH, WONIL;**  
**YANG, YOON-SUN;**  
**CHANG, JONG WOOK;**  
**CHOI, SOO JIN y**  
**KIM, JU-YEON**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

ES 2 550 456 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Uso de una composición que contiene células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical humano para inducir diferenciación y proliferación de células precursoras neurales o células madre neurales a células neurales

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a usos de una composición que comprende células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical humano para inducir diferenciación y proliferación de células precursoras neurales o células madre neurales a células neurales.

**Antecedentes de la invención**

10 Accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad traumática del sistema nervioso central y enfermedad por lesión de la médula espinal implican disneuria provocada por lesión de células nerviosas, y se han tratado generalmente con medicamentos u operación quirúrgica, lo que puede dañar gravemente células normales.

15 Recientemente, se ha reconocido que una terapia de sustitución celular en la que se trasplantan células normales para sustituir células dañadas o destruidas es eficaz para tales enfermedades, y están estudiándose intensamente células madre, en particular, que pueden diferenciarse y proliferar para dar tejidos deseados.

Las células madre son células no especializadas que pueden proliferar ilimitadamente en la fase no diferenciada y pueden diferenciarse en diversos tejidos en respuesta a estímulos específicos.

20 Las células madre neurales, a partir de las cuales se forman neuronas y/o células gliales tales como astrocitos, oligodendrocitos y/o células de Schwann, también son células no diferenciadas que tienen potencial de autorreproducción. Se diferencian en células neurales, por ejemplo neuronas o células gliales a través de células precursoras neurales o células precursoras gliales.

25 Se sabe que las células madre mesenquimatosas, que se diferencian en hueso, cartílago, tejido adiposo, músculo, tendón, ligamento, tejido neural y otros, son viables para la terapia de sustitución celular. Se han obtenido células madre mesenquimatosas principalmente a partir de la médula ósea, pero tales células madre mesenquimatosas proporcionan sólo aplicaciones limitadas debido a su potencial restrictivo de diferenciación y proliferación. Además, deben realizarse operaciones complicadas y a menudo dolorosas que se componen de varias etapas para tal terapia de sustitución celular, además del problema de hallar un donante que tenga antígenos de histocompatibilidad idénticos a los de un paciente para excluir la reacción de injerto contra huésped durante el trasplante de médula ósea.

30 En los últimos años, la sangre de cordón umbilical se ha convertido en un objetivo para los investigadores debido a sus altas concentraciones de células madre. Se han realizado varios ensayos para tratar enfermedades sanguíneas trasplantando sangre de cordón umbilical a un paciente, y se han establecido bancos de sangre de cordón umbilical, que conservan la sangre de cordón umbilical en forma congelada hasta su uso, para la terapia de trasplante autólogo.

35 A diferencia de la médula ósea, la sangre de cordón umbilical puede obtenerse mediante una operación sencilla a partir de un cordón umbilical y provoca poca reacción de injerto contra huésped. Por estos motivos, se han realizado recientemente estudios a nivel mundial para la aplicación clínica de la sangre de cordón umbilical.

40 Los presentes inventores también han estudiado extensamente células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical y han encontrado que pueden inducir diferenciación y proliferación de células precursoras neurales o células madre neurales a células neurales.

**Sumario de la invención**

45 Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar el uso de una composición que comprende células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical (UCB-MSC) para inducir diferenciación y proliferación de células precursoras neurales o células madre neurales a células neurales *in vitro*, que comprende cultivar UCB-MSC con células precursoras neurales o células madre neurales.

50 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para inducir diferenciación y proliferación de células precursoras neurales o células madre neurales a células neurales *in vitro*, que comprende cocultivar células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical con las células precursoras neurales o las células madre neurales.

También se da a conocer en el presente documento una composición para inducir diferenciación y proliferación de células precursoras neurales o células madre neurales a células neurales, que comprende células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical como componente activo.

Según un aspecto todavía adicional de la presente invención, se proporcionan UCB-MSc para su uso en el tratamiento de una enfermedad por lesión nerviosa mediante la inducción de diferenciación y proliferación de células precursoras neurales o células madre neurales a células neurales.

### Breve descripción de los dibujos

- 5 Los objetos y características anteriores y otros de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de la invención, cuando se toma conjuntamente con los dibujos adjuntos, que muestran respectivamente:
- figura 1: un diagrama de una cámara Transwell usada para cocultivar células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical y células precursoras neurales;
- 10 figura 2: fotografías que muestran la diferenciación y proliferación de NG108-15 (NG108) observadas con un microscopio de contraste de fases (x100), 4 y 7 días tras el cultivo de NG108-15 solas o el cocultivo con las mismas de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical, respectivamente;
- figura 3: fotografías que muestran el resultado de inmunotinción para tubulina beta-III, un marcador temprano para diferenciación neuronal, 7 días tras el cultivo de NG108-15 solas o el cocultivo con las mismas de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical, respectivamente;
- 15 Figura 4: fotografías que muestran la diferenciación y proliferación de NG108-15 observadas con un microscopio de contraste de fases (x100), 7 días tras el cultivo de células NG108-15 solas, complementadas con AMPc o en cocultivo con células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical obtenidas de dos individuos diferentes (hUCB-MSc-1 y hUCB-MSc-2), respectivamente;
- 20 figura 5: fotografías que muestran la diferenciación y proliferación de células madre neurales derivadas de la corteza cerebral de un ratón fetal observadas con un microscopio de contraste de fases (x 100), 7 días tras el cocultivo de las células madre neurales con hUCB-MSc-1 y hUCB-MSc-2 de diversas concentraciones, respectivamente;
- figura 6: fotografías que muestran el resultado de inmunotinción para tubulina beta-III y proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP2), marcadores tempranos de diferenciación neuronal, 7 días tras el cultivo de células madre neurales derivadas de la corteza cerebral del ratón fetal solas o el cocultivo con las mismas de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical, respectivamente;
- 25 figura 7: un gráfico que muestra el número de células viables evaluadas mediante la tinción con azul tripano, 7 días tras el cocultivo de las NG108-15 con células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical de diversas concentraciones; y
- 30 figura 8: un gráfico que muestra el número de células viables evaluadas mediante la tinción con azul tripano, 7 días tras el cocultivo de células madre neurales, derivadas de la corteza cerebral del ratón fetal, con células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical de diversas concentraciones.

### Descripción detallada de la invención

- 35 La composición para inducir diferenciación y proliferación de células precursoras neurales o células madre neurales a células neurales comprende de manera característica células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical como componente activo.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "sangre de cordón umbilical" se refiere a la sangre extraída de la vena del cordón umbilical que une la placenta de un mamífero con una cría recién nacida del mismo.
- 40 El término "células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical" tal como se usa en el presente documento se refiere a células madre mesenquimatosas que se aíslan de la sangre de cordón umbilical de un mamífero, preferiblemente un ser humano.
- El término "una enfermedad por lesión nerviosa" tal como se usa en el presente documento se refiere a una enfermedad que va acompañada, entre otros, por disfunción de la conducta debida a nervios sensoriales o motores dañados. Las enfermedades por lesión nerviosa a modo de ejemplo incluyen accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad traumática del sistema nervioso central y enfermedad por lesión de la médula espinal.
- 45 El término "tratar" se refiere a: prevenir la manifestación de una enfermedad o un trastorno aún no diagnosticado en un animal, preferiblemente un mamífero, lo más preferiblemente un ser humano, que es propenso a adquirir tal enfermedad o trastorno; o inhibir el desarrollo de una enfermedad por lesión nerviosa.
- 50 El término "una célula neural" tal como se usa en el presente documento se refiere a una neurona del sistema nervioso central o periférico, y/o una célula glial tal como un astrocito, un oligodendrocito y/o una célula de Schwann.

5 En el aislamiento de un monocito que comprende células madre mesenquimatosas de la sangre de cordón umbilical, puede emplearse un método común tal como el método de gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Específicamente, dicho método comprende las etapas de reunir sangre de cordón umbilical de la vena umbilical tras el parto hasta el desprendimiento de la placenta; centrifugar la sangre de cordón umbilical con un gradiente de Ficoll-Hypaque para obtener monocitos; y eliminar contaminantes de los mismos. Los monocitos obtenidos pueden someterse a aislamiento de células madre mesenquimatosas de los mismos, o a ultracongelación para un mantenimiento seguro a largo plazo hasta su uso.

10 El aislamiento de células madre mesenquimatosas de monocitos derivados de sangre de cordón umbilical puede realizarse mediante el método de Yang SE *et al.* (Yang SE *et al.*, *Cytotherapy*, 6(5):476-486, 2004). Específicamente, se suspenden monocitos en un medio que contiene del 5 al 30% en peso, preferiblemente del 5 al 15% en peso de suero bovino fetal (FBS), incluyendo el medio uno convencional tal como DMEM,  $\alpha$ -DMEM, medio basal de Eagle o RPMI 1640. Entonces, se dividen las células en la suspensión en medios que tienen la misma composición descrita anteriormente y se cultivan en un incubador con un 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Cuando las células en cultivo forman una monocapa, se observan células madre mesenquimatosas que tienen una forma de huso. 15 Entonces, se subcultivan repetidamente las células madre mesenquimatosas hasta que las células se amplifican suficientemente.

20 Según la presente invención, tanto la diferenciación como la proliferación de células precursoras neurales o células madre neurales a células neurales puede inducirse mediante el cocultivo de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical con células precursoras neurales o células madre neurales. Concretamente, las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical son simultáneamente eficaces no sólo para inducir la diferenciación de las células precursoras neurales o células madre neurales para dar células neurales, sino también para sostener y reforzar tales efectos a través de un aumento del número de las células neurales, para potenciar sus efectos terapéuticos.

25 Por tanto, la presente invención proporciona usos de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical o una composición que comprende las células para inducir la diferenciación de células precursoras neurales o células madre neurales a células neurales y la proliferación de las células neurales resultantes.

30 Pueden usarse células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical o una composición que comprende las células para citoterapia de un paciente que padece enfermedades por lesión nerviosa, por ejemplo, accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedades de Pick, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades traumáticas del sistema nervioso central y enfermedad por lesión de la médula espinal, preferiblemente accidente cerebrovascular y enfermedad por lesión de la médula espinal.

La composición dada a conocer en el presente documento puede comprender además un aditivo farmacéuticamente aceptable.

35 Puede prepararse una formulación farmacéutica en una forma de dosificación unitaria empleando la composición dada a conocer en el presente documento según los procedimientos convencionales en la técnica. Es preferible una formulación para administración parenteral tal como una inyección o una forma de dosificación tópica. La formulación farmacéutica puede incluir además aditivos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, cargas, expansores, agentes de unión, agentes humectantes, disgregantes, diluyentes tales como tensioactivos y otros excipientes. 40

45 La formulación farmacéutica puede administrarse por vía parenteral según los procedimientos convencionales en la técnica, por ejemplo, por medio de inyección directa en una región de lesión así como inyección en el líquido cefalorraquídeo, por ejemplo, punción lumbar e inyección en el parénquima, vena o arteria. Preferiblemente, puede administrarse por medio de inyección directa en una región periférica u opuesta de la región de lesión de la médula espinal o del cerebro. Además, puede emplearse el método clínico de Douglas Kondziolka (Douglas Kondziolka, Pittsburgh, 1998) para administrar las formulaciones farmacéuticas inventivas en una región de lesión. Específicamente, se practica una incisión en el cráneo de un sujeto para hacer un orificio que tiene un diámetro de 1 cm y se inyecta una suspensión de células madre mesenquimatosas en HBSS (solución salina equilibrada de Hank) en el orificio empleando una jeringa de aguja larga y un marco estereotáctico.

50 Una dosis típica de las células madre mesenquimatosas puede oscilar entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^7$  células/kg de peso corporal/inyección, preferiblemente entre  $5 \times 10^5$  y  $5 \times 10^6$  células/kg de peso corporal/inyección, que puede administrarse en una única dosis o en dosis divididas. Además, debe entenderse que la cantidad del componente activo realmente administrada a un determinado paciente debe determinarse en vista de diversos factores relevantes incluyendo la cantidad de células neurales que van a diferenciarse y proliferar, la vía de administración elegida y el peso corporal, la edad y el sexo de un paciente individual. 55

La presente invención también proporciona un método para inducir diferenciación y proliferación de células precursoras neurales o células madre neurales a células neurales *in vitro*, que comprende cocultivar células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical con las células precursoras neurales o las células madre

neurales. El cocultivo puede llevarse a cabo mezclando las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical con las células precursoras neurales o las células madre neurales a una razón de 1:0,1 a 1:10, preferiblemente, de 1:1 a 1:2 basándose en su número de células y cortando la mezcla de células en un medio de cultivo celular convencional tal como DMEM,  $\alpha$ -DMEM,  $\alpha$ -MEM, medio basal de Eagle y RPMI 1640. El medio de cultivo puede comprender además un antibiótico, por ejemplo, gentamicina, y/o del 5 al 15% en peso de FBS. El periodo de cultivo puede oscilar entre 5 y 10 días.

La presente invención también proporciona el uso de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad por lesión nerviosa mediante la inducción de diferenciación y proliferación de células precursoras neurales o células madre neurales a células neurales. Se da a conocer en el presente documento la administración de las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical o una composición que comprende las mismas a la región de lesión de células nerviosas de un sujeto que necesita tratamiento de la enfermedad por lesión nerviosa. El sujeto puede ser un mamífero incluyendo un ser humano.

Cuando se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz, la célula madre mesenquimatosas derivada de sangre de cordón umbilical induce no sólo diferenciación de células precursoras neurales o células madre neurales del sistema nervioso central o periférico a células neurales, sino también la proliferación de las células neurales resultantes, dando como resultado de ese modo la recuperación de las funciones neurales y el tratamiento de tal enfermedad por lesión nerviosa. El efecto de tratamiento de la célula madre mesenquimatosas derivada de sangre de cordón umbilical se potencia enormemente y se sostiene durante un largo periodo de tiempo por su capacidad de proliferación de las células neurales regeneradas.

Los siguientes ejemplos y ejemplos de prueba se facilitan con el fin de ilustración únicamente, y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical

(Etapa 1) Adquisición de sangre de cordón umbilical (UCB)

Se obtuvo una muestra de UCB de la vena umbilical de una mujer parturienta con su consentimiento. Específicamente, se insertó una aguja de calibre 16 de una bolsa de recogida de UCB que contenía 44 ml de anticoagulante CPDA-1 (GREEN CROSS) en la vena umbilical para permitir el flujo de UCB al interior de la bolsa. Se procesó la sangre recogida en el plazo de 48 horas y la tasa de supervivencia celular estaba por encima del 90%.

(Etapa 2) Aislamiento y amplificación de células madre mesenquimatosas

Se sometió la UCB obtenida en la etapa 1 a centrifugación usando un gradiente de Ficoll-Hypaque (densidad: 1,077 g/ml, Sigma) para obtener monocitos. Entonces se lavaron los monocitos varias veces para eliminar impurezas y se suspendieron en un medio basal mínimo que contenía del 5 al 15% en peso de FBS (HyClone) ( $\alpha$ -MEM, Gibco BRL). Posteriormente, se añadió una cantidad medida previamente de la suspensión al mismo medio que anteriormente y se cultivó en un incubador con un 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, mientras que se intercambiaba el medio por un lote nuevo de medio dos veces a la semana. Cuando las células en cultivo formaron una monocapa, se confirmó la generación de células madre mesenquimatosas que tenían una forma de huso con un microscopio. Se subcultivaron repetidamente las células madre mesenquimatosas así formadas hasta que las células se amplificaron suficientemente (Yang SE *et al.*, *Cytotherapy*, 6(5):476-486, 2004).

Ejemplo 2: Cultivo de NG108-15 (NG108)

Una célula derivada de cerebro de ratón, NG108-15 (híbrido de neuroblastoma X glioma) (ATCC, n.º de cat. ATCC-CRL-HB-12317), que tenía características fisiológicas y morfológicas similares a una célula precursora neural se cultivó en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) (glutamina 4 mM/l, glucosa 4,5 g/l, piridoxina-HCl 4,0 mg/l, hipoxantina-guanina 0,1 mM, aminopterin 400 nM, timidina 0,016 mM, FBS a del 5 al 15% en peso).

Ejemplo 3: Cultivo de células madre neurales

Se cultivaron células madre neurales derivadas de la corteza cerebral de un ratón fetal (Chemicon, n.º de cat. SCR029) en un medio basal de células madre neurales (FGF-2 20 ng/ml, EGF 20 ng/ml y heparina 2 mg/ml).

Ejemplo 4: Cocultivo de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical y NG108-15 (I)

Se cocultivaron las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical humano (hUCB-MS) del ejemplo 1 con NG108-15 del ejemplo 2 (hUCB-MS:NG108-15 = 1:1) empleando una cámara Transwell (figura 1) y el medio de cultivo del ejemplo 2. Como grupo de control, se cultivaron NG108-15 solas en el medio de cultivo del ejemplo 2. Tal como se muestra en la figura 1, la cámara Transwell se componía de compartimentos inferior y superior que estaban separados uno de otro por una membrana microporosa que tenía poros de 1  $\mu$ m. Se colocaron las hUCB-MS en el compartimento superior, y las NG108-15 en el compartimento inferior.

Se observó la diferenciación de NG108-15 con un microscopio de contraste de fases (X 100) a los 4 y 7 días. Tal como se muestra en la figura 2, NG108-15 cocultivadas con hUCB-MSc se diferenciaron a una forma células similares a neuronas maduras típicas en las que las células se extienden en ramificaciones largas y se diferencian para tener una forma de huso.

5 Se confirmó adicionalmente que las células diferenciadas eran células similares a neuronas a los 7 días empleando inmunotinción para tubulina-beta III, un marcador temprano de desarrollo neuronal. Específicamente, se cultivaron respectivamente hUCB-MSc, NG108-15 y una mezcla de las mismas en un cubreobjetos, y se bloquearon añadiéndolas a suero de cabra normal al 10% que contenía Triton X-100 al 0,3% durante 1 hora a temperatura ambiente. El 1<sup>er</sup> anticuerpo empleado en la inmunotinción, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-tubulina-beta III conjugado con ficoeritrina (Chemicon), se diluyó cien veces con el suero de cabra y se añadió al mismo. Se mantuvo la mezcla durante la noche a 4°C, y se lavó la mezcla resultante tres veces (cada vez durante 5 minutos) con PBS 0,01 M.

10 Tal como se muestra en la figura 3, NG108-15 cocultivadas con las células madre mesenquimatosas del ejemplo 1 presentaron una respuesta distinta a la inmunotinción para tubulina-beta III, verificando que las células diferenciadas eran células similares a neuronas.

#### Ejemplo 5: Cocultivo de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical y NG108-15 (II)

Se obtuvieron las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical humano mediante el método del ejemplo 1 a partir de dos individuos diferentes (hUCB-MSc-I y hUCB-MSc-2). Se cultivaron NG108-15 del ejemplo 2 solas o se cocultivaron con hUCB-MSc-1 o hUCB-MSc-2 según el método del ejemplo 4 durante 7 días. Se observaron la diferenciación y proliferación de las células con un microscopio de contraste de fases (x 100).

Como grupo comparativo, se añadió 1 mM de AMPc que induce la diferenciación de NG108-15 a células similares a neuronas (NeuroReport 9, 1261-1265, 1998) al medio de cultivo de NG108-15.

25 Tal como se muestra en la figura 4, NG108-15 cocultivadas con las células madre mesenquimatosas se diferenciaron a una forma de células similares a neuronas maduras. No hubo ninguna diferencia significativa entre hUCB-MSc-1 y hUCB-MSc-2 en sus actividades de inducción de diferenciación.

#### Ejemplo 6: Cocultivo de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical y células madre neurales (I)

Se cultivaron las células madre neurales del ejemplo 3 solas (grupo de control) o se cocultivaron con hUCB-MSc-1 o hUCB-MSc-2 del ejemplo 5 en el medio de cultivo del ejemplo 3, empleando la cámara Transwell. Se colocaron las hUCB-MSc en el compartimento superior y las células madre neurales en el compartimento inferior.

Se añadieron respectivamente hUCB-MSc-1 y hUCB-MSc-2 al medio en la concentración de 500, 1000, 2000, 4000 y 6000 células/cm<sup>2</sup>, respectivamente, y se cocultivaron las células madre neurales con la concentración de 2000 células/cm<sup>2</sup>. Se observaron la diferenciación y proliferación de las células con un microscopio de contraste de fases (x100) (figura 5) a los 7 días.

35 Tal como se muestra en la figura 5, las células madre neurales cocultivadas con las células madre mesenquimatosas se diferenciaron a una forma de neuronas maduras. No hubo ninguna diferencia significativa entre hUCB-MSc-1 y hUCB-MSc-2 en sus actividades de inducción de diferenciación. Además, el grado de diferenciación y proliferación de las células madre neurales era directamente proporcional a la concentración de las células madre mesenquimatosas con las que se cocultivaron.

#### Ejemplo 7: Cocultivo de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical y células madre neurales (II)

Se cultivaron las células madre neurales del ejemplo 3 solas (grupo de control) o se cocultivaron con hUCB-MSc del ejemplo 1 (hUCB-MSc:células madre neurales = 1:1) en el medio de cultivo del ejemplo 3, empleando una cámara Transwell. Se colocaron las hUCB-MSc en el compartimento superior y las células madre neurales en el compartimento inferior.

Se levó a cabo la inmunotinción a los 4 y 7 días empleando el método del ejemplo 4 para tubulina-beta III y proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP2), marcadores tempranos de desarrollo neuronal, de manera que se confirmó que las células diferenciadas eran neuronas.

50 Tal como se muestra en la figura 6, las células madre neurales cocultivadas con las células madre mesenquimatosas del ejemplo 1 presentaron una respuesta distinta a la inmunotinción para tubulina-beta III y MAP2, verificando que las células diferenciadas eran neuronas.

#### Ejemplo 8: Cocultivo de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical con células precursoras neurales o células madre neurales

Se cultivaron NG108-15 del ejemplo 2 solas (grupo de control) o se cocultivaron con hUCB-MSC del ejemplo 1, y se cultivaron las células madre neurales del ejemplo 3 solas (grupo de control) o se cocultivaron con hUCB-MSC-1 o hUCB-MSC-2 del ejemplo 5, según los métodos de los ejemplos 4 y 6, respectivamente. Se contó el número de células viables a los 7 días empleando la tinción con azul tripano (figuras 7 y 8).

- 5 Tal como se muestra en las figuras 7 y 8, los números de NG108-15 y las células madre neurales aumentaron en proporción a la concentración de las células madre mesenquimatosas con las que se cocultivaron, lo que implica que las células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical pueden ser simultáneamente eficaces no sólo para inducir la diferenciación de las células precursoras neurales o células madre neurales a células neurales, sino también para sostener y reforzar tales efectos a través del aumento del número de las células neurales.
- 10

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una composición que comprende células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical (UCB-MSC) para inducir diferenciación y proliferación de células precursoras neurales o células madre neurales a células neurales *in vitro*, que comprende cocultivar UCB-MSC con células precursoras neurales o células madre neurales.  
5
2. Método para inducir la diferenciación y proliferación de células precursoras neurales o células madre neurales a células neurales *in vitro*, que comprende cocultivar células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical con las células precursoras neurales o las células madre neurales.
3. Método según la reivindicación 2, en el que la razón de células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical con respecto a células precursoras neurales o células madre neurales empleadas está en el intervalo de 1:0,1 a 1:10.  
10
4. Células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical (UCB-MSC) para su uso en la inducción de diferenciación y proliferación de células precursoras neurales o células madre neurales a células neurales en un paciente que padece una enfermedad por lesión nerviosa.
5. Células madre mesenquimatosas derivadas de sangre de cordón umbilical para su uso según la reivindicación 4, en las que la enfermedad por lesión nerviosa es accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad traumática del sistema nervioso central o enfermedad por lesión de la médula espinal.  
15  
20

FIG. 1

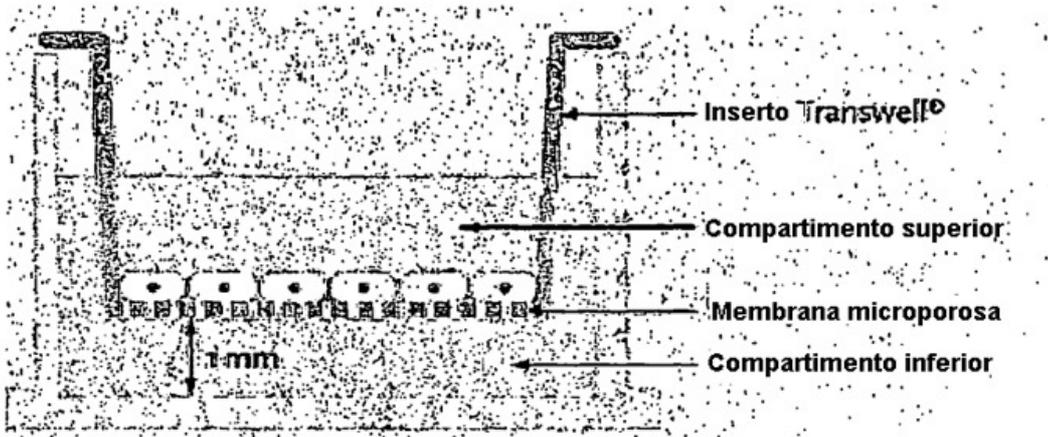


FIG. 2

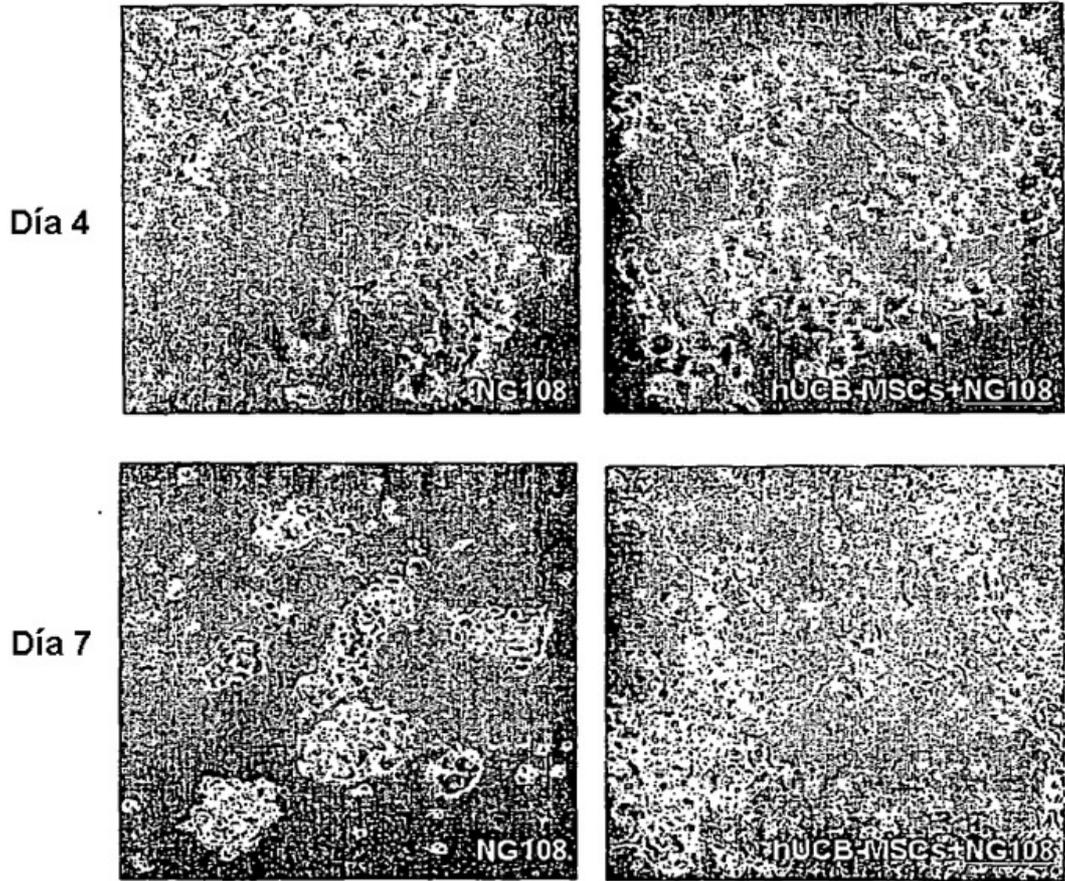


FIG. 3

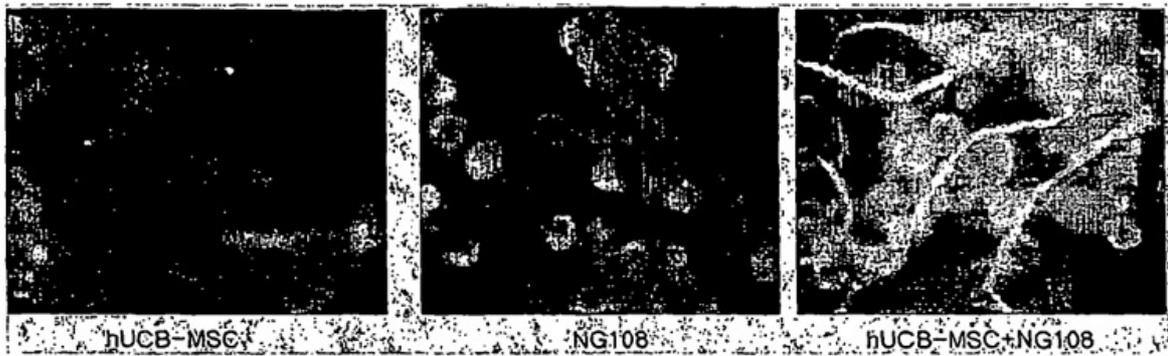


FIG. 4

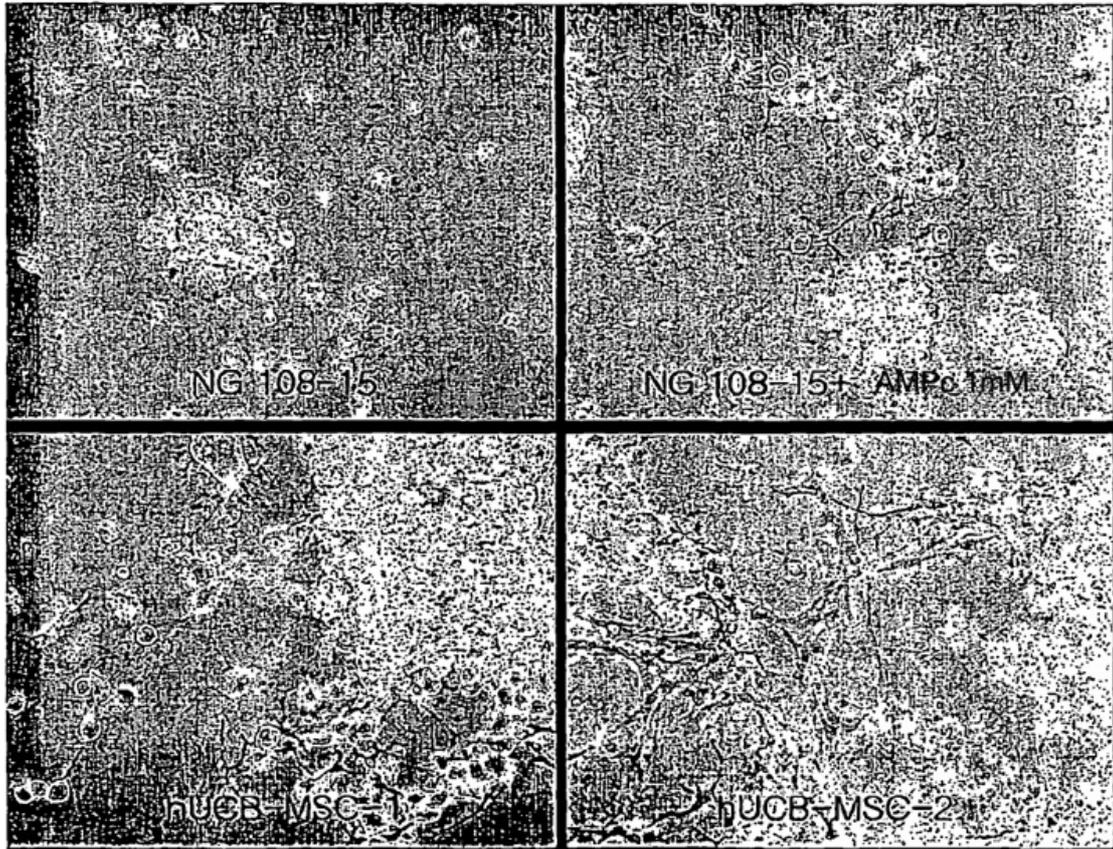
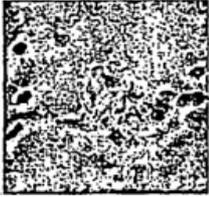


FIG. 5

A) Células madre neurales sólo



B) Células madre neurales + hUCB-MSC

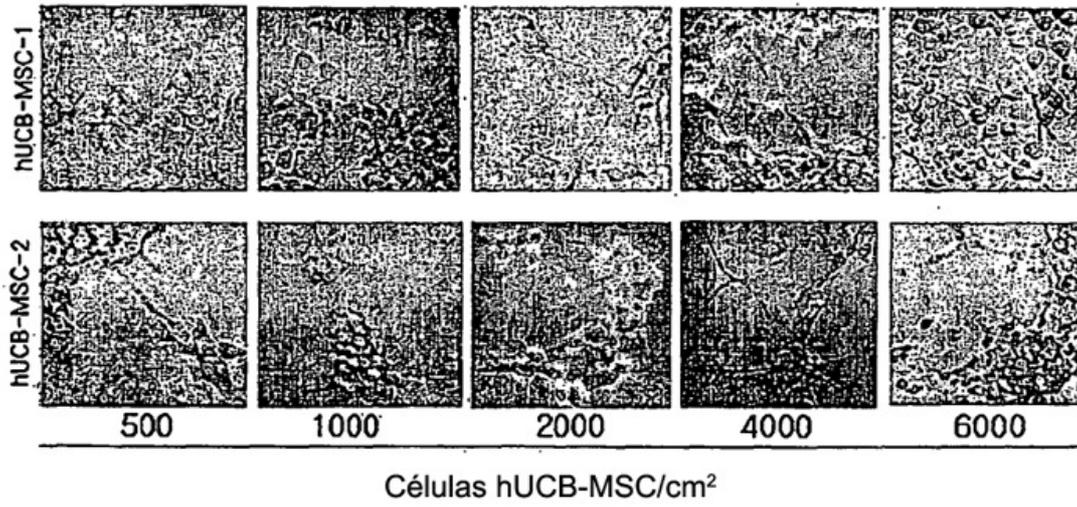


FIG. 6

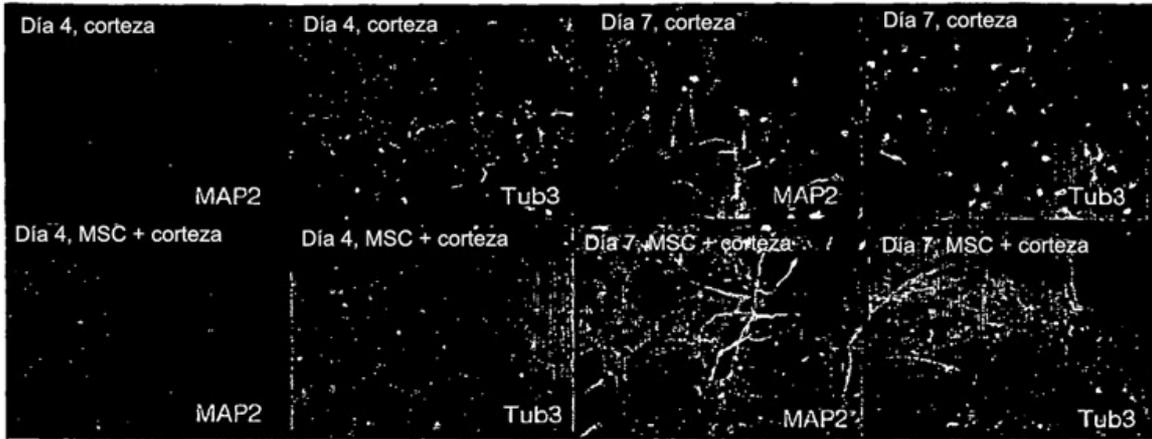


FIG. 7

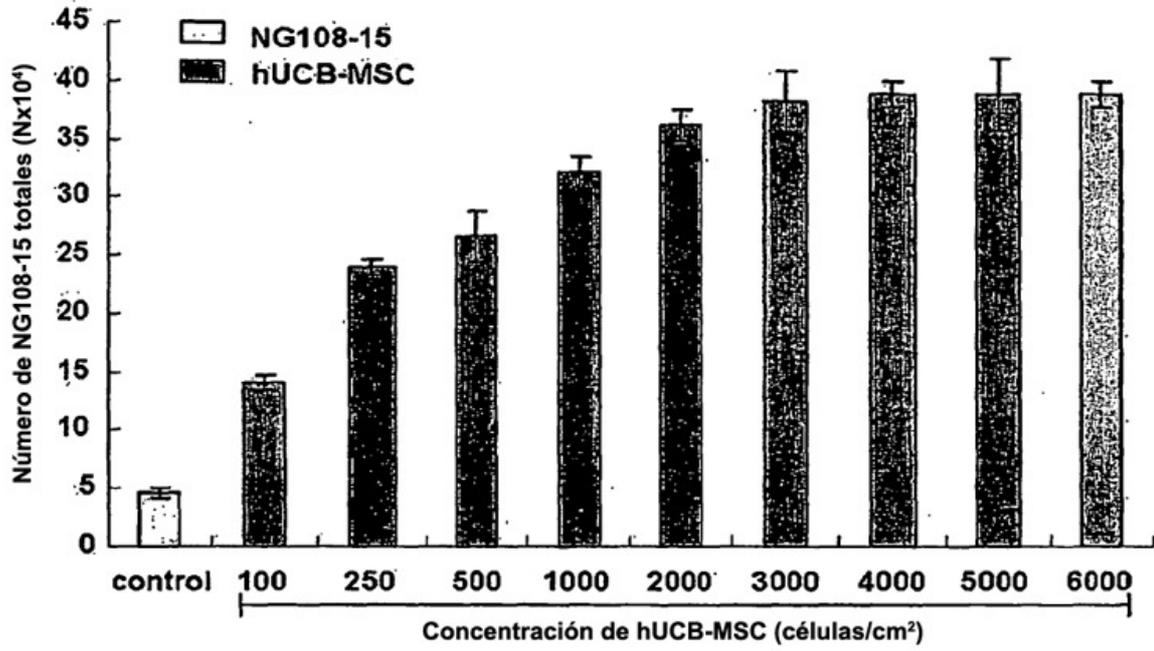


FIG. 8

