

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 991**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0797 (2010.01)

A61K 35/50 (2015.01)

A61K 35/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2011 E 11746068 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2598154**

54 Título: **Procedimientos para tratar y/o revertir enfermedades y/o trastornos neurodegenerativos**

30 Prioridad:

28.07.2010 US 368409 P

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

27.05.2016

73 Titular/es:

NEURALSTEM, INC. (25.0%)
9700 Great Seneca Hwy., Suite 240
Rockville MD 20850, US;
SHYU, WOEI-CHERNG (25.0%);
LIN, SHINN-ZONG (25.0%) y
WANG, HSIAO-JUNG (25.0%)

72 Inventor/es:

SHYU, WOEI-CHERNG;
LIN, SHINN-ZONG;
WANG, HSIAO-JUNG y
JOHE, KARL K.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 571 991 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

Procedimientos para tratar y/o revertir enfermedades y/o trastornos neurodegenerativos

Antecedentes

5 Un ictus es la muerte repentina de las células cerebrales en un área localizada debido a un flujo sanguíneo inadecuado. Un ictus se da cuando el flujo sanguíneo se interrumpe en parte del cerebro. Sin que la sangre suministre oxígeno y nutrientes y retire productos de deshecho, las células cerebrales rápidamente empiezan a morir. Dependiendo de la región afectada del cerebro, un ictus puede provocar parálisis, deterioro del habla, pérdida de memoria y de la capacidad de razonamiento, coma o muerte.

Sumario

10 La presente divulgación se refiere a procedimientos para tratar y/o revertir enfermedades o trastornos neurológicos asociados a la pérdida de células neuronales (por ejemplo, muerte cerebral causada por ictus isquémico cerebral, ictus hemorrágico, parálisis cerebral o lesión cerebral traumática) en un cerebro. Tales procedimientos pueden ser útiles para tratar síntomas que resultan de ictus u otras lesiones cerebrales.

15 La presente divulgación también proporciona procedimientos para tratar una afección o un trastorno asociado a la pérdida de células neuronales en un cerebro incluyendo, por ejemplo, para tratar los síntomas resultantes de ictus cerebral u otras lesiones cerebrales, obteniendo una población expandida de células madre neurales e introduciendo una cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida de células madre neurales a al menos un área del cerebro de un sujeto, en el que la población expandida de células madre neurales se diferencia en neuronas que se integran *in vivo* en el cerebro del sujeto. Sin desear quedar ligados a teoría alguna de la presente invención, se cree que las neuronas integradas después promueven la reparación del tejido dañado reemplazando las neuronas muertas, regenerando las neuronas del hospedador y/o induciendo la plasticidad del circuito del hospedador para reestablecer las conexiones neuronales dañadas que incluyen las neuronas donantes.

20

En algunas realizaciones, introducir la cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida incluye inyectar al menos una porción de la cantidad terapéuticamente eficaz en una de una pluralidad de áreas del cerebro del sujeto.

25 En algunas realizaciones, expandir la al menos una célula madre neural incluye cultivar la célula madre neural en ausencia de suero.

En algunas realizaciones, expandir la al menos una célula madre neural incluye exponer la al menos una célula madre neural a al menos un factor de crecimiento. En algunas realizaciones, el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en bFGF, EGF, TGF-alfa, aFGF y combinaciones de los mismos.

30 En algunas realizaciones, al menos un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % de la población expandida de células madre es capaz de generar neuronas en el tejido cerebral del sujeto.

En algunas realizaciones, introducir la cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida de células madre incluye inyectar al menos una porción de la cantidad terapéuticamente eficaz en una pluralidad de áreas del tejido cerebral del sujeto.

35 En algunas realizaciones, las áreas del cerebro implican la ruta motora-las fibras neuronales que dirigen las señales eléctricas a y desde el cerebro, el tronco encefálico y la médula espinal que gobiernan la contracción muscular. Tales áreas incluyen la corteza motora, el cuerpo estriado, la cápsula interna, el tálamo, el mesoencéfalo, el tronco encefálico y el cerebelo. Debido a un ictus o a un traumatismo, un área o áreas discretas dentro de esta ruta pueden dañarse, dando como resultado síntomas de parálisis, espasticidad, rigidez y otras disfunciones motoras.

40 En otra realización, se inyecta una suspensión de las células madre neurales humanas derivadas de la médula espinal a, cerca de o alrededor del área o áreas afectadas. Las células inyectadas se diferencian en neuronas y glía que se integran en el área afectada para promover la reparación de la ruta motora que da como resultado la recuperación motora y/o la mejora de la disfunción motora.

45 En algunas realizaciones, el sujeto tuvo un evento que provocó una isquemia cerebral tal como un ataque al corazón o un ictus.

La presente divulgación también proporciona procedimientos para tratar el ictus en un sujeto en necesidad de los mismos que comprende aislar al menos una célula madre neural del tejido de la médula espinal de un humano; expandir *in vitro* dicha célula madre neural para formar una población expandida; concentrar la población expandida; e introducir una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha población expandida a al menos un área del cerebro del sujeto.

50

En otras realizaciones, la población expandida de células madre neurales deriva de un tejido de la médula espinal que incluye, por ejemplo, un tejido de una médula espinal fetal *post-mortem* de un humano.

En algunas realizaciones, la edad gestacional del feto *post-mortem* está entre aproximadamente 8,5 y aproximadamente 20 semanas.

En algunas realizaciones, expandir la al menos una célula madre neural incluye cultivar la célula madre neural en ausencia de suero.

- 5 En algunas realizaciones, expandir la al menos una célula madre neural incluye exponer la al menos una célula madre neural a al menos un factor de crecimiento. En algunas realizaciones, el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en bFGF, EGF, TGF-alfa, aFGF y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, al menos un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % de la población expandida de células madre es capaz de generar neuronas en el tejido cerebral del sujeto.

- 10 En algunas realizaciones, introducir la cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida de células madre incluye inyectar al menos una porción de la cantidad terapéuticamente eficaz en una pluralidad de áreas del tejido cerebral del sujeto.

Estas y otras realizaciones de la presente invención se describen en detalle adicional a continuación en el presente documento.

15 **Breve descripción de los dibujos**

El resumen anterior, así como la siguiente descripción detallada de la divulgación, se entenderá mejor cuando se lea junto con las figuras adjuntas.

20 La Figura 1 muestra que el trasplante de células madre neurales derivadas de la médula espinal humana (CMME) mejoraron el comportamiento neurológico después de una isquemia cerebral. Los protocolos de medición del comportamiento neurológico se usaron para evaluar la función neurológica antes y después de la ligación de MCA en ratas implantadas con CMME (n = 10) y ratas control inyectadas con tampón (n = 10). Las ratas CMME mostraron una asimetría corporal significativamente reducida en comparación con las ratas control en un ensayo de oscilación corporal (Panel A). La actividad locomotora se examinó antes y después de la isquemia cerebral en todos los animales. La actividad vertical, el tiempo de movimiento vertical y el número de movimientos verticales mostraron un aumento significativo después de la isquemia cerebral en las ratas que recibían el trasplante de CMME en comparación con las ratas control (Paneles B-D). Adicionalmente, se realizó la medición de la fuerza de agarre para examinar la fuerza de las extremidades anteriores de todas las ratas experimentales después de cada uno de los dos tratamientos (Panel E). Los resultados revelaron una mayor relación de fuerza de agarre en el grupo CMME que en los grupos control.

30 Las Figuras 2A-B muestran imágenes obtenidas de un análisis inmunohistoquímico (IHQ) de las CMME trasplantadas exógenamente injertadas en el cerebro de rata isquémica. La penumbra de los cerebros de rata isquémica tratada con CMME se inmunotizó con anticuerpos para el anticuerpo nuclear específico humano (HuNu) (Figura 2A) y la enolasa específica neuronal (NES) (Figura 2B).

Descripción detallada

35 Los procedimientos desvelados se refieren al tratamiento de las enfermedades o los trastornos neurológicos asociados a la pérdida de células neuronales en el cerebro. Se ha descubierto ahora que una línea de células madre de médula espinal humana (CMME), cuando se trasplanta a un área peri-infartada en el cerebro, era capaz de sobrevivir y diferenciarse en masa en neuronas en el tejido dañado. De forma notable, las neuronas diferenciadas se integraron (es decir establecieron interconectividad con otras neuronas) en el tejido cerebral circundante y revirtieron los déficits motores. Como tal, los procedimientos de la presente divulgación pueden usarse para tratar, incluyendo revertir, enfermedades neurodegenerativas incluyendo, por ejemplo, enfermedades del cerebro. En particular, los procedimientos de la presente divulgación pueden usarse para tratar cualquier síntoma motor (por ejemplo, paresia, parálisis, espasticidad o rigidez) que surgen de la isquemia cerebral. Los síntomas motores pueden estar en fases aguda, subaguda o crónica de la enfermedad (por ejemplo, en ictus crónico).

45 La presente divulgación proporciona procedimientos para tratar y/o revertir una enfermedad o un trastorno neurológico o neurodegenerativo con pérdida de células neuronales (por ejemplo, muerte celular) en un cerebro (por ejemplo, un tejido cerebral tal como los hemisferios cerebrales, la corteza cerebral, la corteza motora subcortical, el cuerpo estriado, la cápsula interna, el tálamo, el hipotálamo, el hipocampo, el mesoencéfalo, el tronco encefálico y el cerebelo) obteniendo una población expandida de células madre neuronales (por ejemplo, una línea de células madre de médula espinal humana) e introducir una cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida de células madre neuronales a una de una pluralidad de áreas del cerebro de un sujeto, en el que la población de células madre neuronales es capaz de diferenciarse en neuronas que se integran *in vivo* en el tejido cerebral del sujeto.

55 La presente divulgación también proporciona procedimientos para tratar y/o revertir la paresia, la parálisis, la espasticidad, la rigidez o las condiciones de hiperactividad muscular asociadas a la isquemia cerebral en un sujeto en necesidad de los mismos aislando al menos una célula madre neural (por ejemplo, una línea de células madre de

médula espinal humana) de un mamífero; expandir *in vitro* dicha célula madre neural en una población expandida; concentrar la población expandida; e introducir una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha población expandida a al menos un área del cerebro del sujeto (por ejemplo, un tejido cerebral tal como los hemisferios cerebrales, la corteza cerebral, la corteza motora subcortical, el cuerpo estriado, la cápsula interna, el tálamo, el hipotálamo, el hipocampo, el mesoencéfalo, el tronco encefálico y el cerebelo). En una realización, al menos un 20 % de la población expandida es capaz de generar neuronas en el cerebro del sujeto.

Los procedimientos desvelados incluyen el uso de CMN para aliviar una afección neurodegenerativa. Como se usa en el presente documento, el término "CMN" también puede referirse a progenitores neurales o neuronales o a precursores neuroepiteliales. Las CMN pueden definirse funcionalmente de acuerdo con su capacidad para diferenciarse en cada uno de los tres tipos de células principales del SNC: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

En algunas realizaciones, "tratar" o "tratamiento" de una enfermedad, un trastorno o una afección incluye al menos parcialmente: (1) prevenir la enfermedad, el trastorno o la afección, es decir, provocar que los síntomas clínicos de la enfermedad, el trastorno o la afección no se desarrollen en un mamífero que está expuesto o predispuesto a la enfermedad, el trastorno o la afección pero no ha experimentado o mostrado todavía los síntomas de la enfermedad, el trastorno o la afección; (2) inhibir la enfermedad, el trastorno o la afección, es decir, impedir o reducir el desarrollo de la enfermedad, el trastorno o la afección o sus síntomas clínicos; o (3) aliviar la enfermedad, el trastorno o la afección, es decir, provocar la regresión de la enfermedad, el trastorno o la afección o sus síntomas clínicos.

En algunas realizaciones, "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de una composición activa que se requiere para conferir un efecto terapéutico en el sujeto. Una "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad suficiente de un agente o un compuesto que se administra que aliviará en algún grado uno o más de los síntomas de la enfermedad, el trastorno o la afección a tratarse. En algunas realizaciones, el resultado es una reducción y/o un alivio de los signos, los síntomas o las causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una "cantidad eficaz" para usos terapéuticos es la cantidad de la composición incluyendo un compuesto como se desvela en el presente documento requerida para proporcionar una disminución clínicamente significativa en los síntomas de la enfermedad sin efectos secundarios adversos indebidos. En algunas realizaciones, una "cantidad eficaz" apropiada en cualquier caso individual se determina usando técnicas, tales como un estudio de escalado de dosis. La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye, por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz. En otras realizaciones, una "cantidad eficaz" de un compuesto desvelado en el presente documento, tal como un compuesto de Fórmula (A) o de Fórmula (I), es una cantidad eficaz para lograr un efecto farmacológico deseado o una mejora terapéutica sin efectos secundarios adversos indebidos. En otras realizaciones, se entiende que "una cantidad efecto" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" varía de sujeto a sujeto, debido a la variación en el metabolismo, la edad, el peso, la condición general del sujeto, la afección a tratarse, la gravedad de la afección a tratarse y el juicio del médico que prescribe.

En una realización, las CMN son multipotenciales de tal manera que cada célula tiene la capacidad de diferenciarse en una neurona, un astrocito o un oligodendrocito. En otra realización, las CMN son bipotenciales de tal manera que cada célula tiene la capacidad de diferenciarse en dos de los tres tipos celulares de las CMN. En otra realización, las CMN incluyen células la menos bipotenciales que generan tanto neuronas como astrocitos *in vitro* en incluyen al menos células unipotenciales que generan neuronas *in vivo*.

Las condiciones de crecimiento pueden influir en la dirección de la diferenciación de las células hacia un tipo celular u otro, indicando que las células no se comprometen hacia un único linaje. En las condiciones de cultivo que favorecen la diferenciación neuronal, las células, particularmente de CMN humanas, son ampliamente bipotenciales para las neuronas y los atrocitos y la diferenciación en oligodendrocitos es mínima. De esta manera, los cultivos celulares diferenciados de los procedimientos desvelados pueden dar lugar a neuronas y astrocitos. En una realización, la relación de neuronas a astrocitos es de aproximadamente 20:80 a aproximadamente 80:20, por ejemplo aproximadamente 50:50.

En una realización de los procedimientos desvelados, las células a trasplantarse en sujetos derivan de tejido cerebral. En otra realización, las CMN se aíslan del tejido cerebral fetal humano a edades gestacionales de entre aproximadamente 8,5 y aproximadamente 20 semanas. Debe apreciarse que la proporción de la población aislable de células madre neurales puede variar con la edad del donante. La capacidad de expansión de las poblaciones celulares también puede variar con la edad del donante. Tal especificidad regional y temporal de las CMN indica que las CMN se comportan como progenitores restringidos de destino y no como células blancas o una única población de células.

Las CMN del mesoencéfalo ventral, por ejemplo, son distintas a las CMN obtenidas de la médula espinal en la misma etapa gestacional. En particular, las CMN del mesoencéfalo ventral exclusivamente dan lugar a neuronas dopaminérgicas que expresan tirosina hidroxilasa, mientras que las CMN de la médula espinal generan exclusivamente neuronas colinérgicas que generan acetilcolina. Ambos tipos celulares, sin embargo, generan simultáneamente las neuronas más ubicuas que producen glutamato y GABA. Por lo tanto, en una realización, los procedimientos desvelados incluyen obtener CMN del mesoencéfalo ventral para tratar afecciones aliviadas o atenuadas, al menos en parte, por la implantación de neuronas dopaminérgicas que expresan tirosina hidroxilasa.

Las CMN también pueden aislarse de tejidos post-natales y adultos. Las CMN derivadas de tejidos post-natales y adultos son cuantitativamente equivalentes con respecto a su capacidad de diferenciarse en neuronas y glía, así como en sus características de crecimiento y diferenciación. Sin embargo, la eficiencia del aislamiento *in vitro* de las CMN de diversos SNC post-natales y adultos puede ser mucho menor que el aislamiento de las CMN de los tejidos fetales que albergan una población más abundante de CMN. Sin embargo, como con las CMN derivadas de fetos, los procedimientos desvelados permiten que al menos un 30 % de las CMN derivadas de fuentes neonatales y adultas se diferencien en neuronas *in vitro*. De esta manera, los tejidos post-natales y adultos pueden usarse como se describe anteriormente en el caso de las CMN derivadas de fetos.

Pueden obtenerse diversos subtipos neuronales a partir de la manipulación de las células madre embrionarias expandidas en cultivo. De esta manera, los subtipos neuronales específicos, basados en los procedimientos desvelados, pueden aislarse y purificarse de otras células irrelevantes o indeseadas para mejorar el resultado, como se necesite, y pueden usarse para el tratamiento de las mismas afecciones neurodegenerativas.

Las CMN en los procedimientos desvelados pueden derivar de un sitio y trasplantarse a otro sitio dentro del mismo sujeto como un autoinjerto. Adicionalmente, las CMN en los procedimientos desvelados pueden derivar de un donante genéticamente idéntico y trasplantarse como un isoinjerto. Todavía adicionalmente, las CMN en los procedimientos desvelados 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 inmunosupresores potentes, los aloinjertos y los xenoinjertos de precursores neurales no humanos, tales como precursores neurales de origen porcino, pueden injertarse en sujetos humanos.

Una muestra de tejido puede disociarse mediante cualquier procedimiento convencional. En una realización, el tejido se disocia mediante trituración mecánica suave usando una pipeta y un tampón libre de cationes divalentes (por ejemplo, solución salina) para formar una suspensión de células disociadas. Se desea una disociación suficiente para obtener células individuales en gran parte para evitar la densidad celular local excesiva.

Para la aplicación comercial exitosa de las CMN, es deseable mantener cultivos robustos y consistentes que tengan habilidades de expansión y diferenciación estables a través de muchos pasos sucesivos. Como se describe anteriormente, los procedimientos de cultivo pueden optimizarse para lograr la expansión a largo plazo, estable, de una línea celular individual de CMN de diferentes áreas y edades del desarrollo del SMN manteniendo sus propiedades progenitoras distintas. En una realización, las células madre pueden cultivarse de acuerdo con los procedimientos expuestos en los documentos de EE.UU n.º 7.691.629, EE.UU n.º 5.753.506, EE.UU n.º 6.040.180 o EE.UU n.º 7.544.511, las totalidad de los cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

En una realización, las CMN de los procedimientos desvelados pueden incluir células pre-diferenciadas para el trasplante. Para el máximo rendimiento de las células y por simplicidad del procedimiento, se cultiva un cultivo confluyente para el trasplante que comprende principalmente una población de células indiferenciadas. Debe apreciarse, sin embargo, que también puede existir una menor población de células justo empezando a diferenciarse espontáneamente debido a la densidad celular aumentada.

En una realización, las CMN se concentran en una solución tales como soluciones clínicamente usables de hibernación o de congelamiento descritas anteriormente. En una realización las CMN se concentran a una densidad celular apropiada que puede ser la misma o diferente de la densidad celular para la administración de las células. En una realización, la densidad celular para la administración puede variar de aproximadamente 1.000 células por microlitro a aproximadamente 1.000.000 células por microlitro dependiendo de factores tales como el sitio de la inyección, el estado neurodegenerativo del sitio de inyección, la dosis mínima necesaria para un efecto beneficioso y las consideraciones de efectos secundarios de toxicidad. En una realización, los procedimientos desvelados incluyen inyectar CMN a una densidad celular de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 50.000 células por microlitro.

El volumen de los medios en los cuales las CMN expandidas se suspenden para transportar al área de tratamiento pueden denominarse en el presente documento el volumen de inyección. El volumen de inyección depende del sitio de inyección y del estado degenerativo del tejido. Más específicamente, el límite inferior del volumen de inyección puede determinarse mediante el manejo líquido práctico de suspensiones viscosas de alta densidad celular así como la tendencia de las células a agruparse. El límite superior del volumen de inyección puede determinarse por los límites de la fuerza de compresión ejercida por el volumen de inyección que son necesarios para evitar lesionar el tejido hospedador, así como el tiempo práctico de cirugía.

La baja supervivencia de las células donantes usando procedimientos conocidos ha necesitado el transporte de una gran cantidad de células a un área relativamente pequeña para procurar el tratamiento eficaz. El volumen de inyección, sin embargo, es la presión hidrostática ejercida en el tejido hospedador y el tiempo de inyección prolongado asociado a altos volúmenes de inyección exacerba el riesgo quirúrgico. Adicionalmente, la sobreinyección de las células donantes da lugar a una compresión y una posterior lesión del tejido parenquimatoso hospedador. Intentando para compensar las restricciones del volumen, los procedimientos conocidos han requerido la preparación de suspensiones de alta densidad celular para las inyecciones. Sin embargo, una alta densidad celular promueve el agrupamiento ajustado de las células trasplantadas e inhibe la migración o la dispersión celular

previniendo el tratamiento efectivo más allá un área limitada y comprometiendo la integración perfecta en el tejido hospedador.

En contraste, como resultado de la supervivencia mejorada *in vivo* de las células preparadas mediante los procedimientos desvelados, se necesita un menor número de células por inyección. De hecho, hasta tres a cuatro veces el número de células inyectadas han mostrado existir después de seis meses desde el momento de la inyección demostrando una supervivencia cuantitativa significativa usando los procedimientos desvelados. Además, debido a la supervivencia cuantitativa, puede lograrse la administración reproducible de las dosis celulares deseadas. En consecuencia, en una realización, las CMN se concentran hasta una densidad de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 200.000 células por microlitro. En otra realización, se han usado de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 50.000 CMN por microlitro para el injerto eficaz. En otra realización, se usan de aproximadamente 10.000 a 30.000 CMN por microlitro. En otra realización, las CMN pueden transportarse a un área de tratamiento suspendidas en un volumen de inyección de menos de aproximadamente 100 microlitros por sitio de inyección. Por ejemplo, en el tratamiento de afecciones neurodegenerativas de un sujeto humano donde pueden realizarse múltiples inyecciones, puede usarse un volumen de inyección de 0,1 y aproximadamente 100 microlitros por sitio de inyección.

Cualquier dispositivo adecuado para inyectar las células en un área deseada puede emplearse en los procedimientos desvelados. En una realización, se usa una jeringa capaz de transportar volúmenes de submicrolitros durante un periodo de tiempo a una velocidad de caudal sustancialmente constante. Las células pueden cargarse en el dispositivo a través de una jeringa o un tubo flexible o cualquier otro dispositivo de transferencia adecuado.

En una realización, el sitio de inyección deseado para el tratamiento de una afección neurodegenerativa incluye al menos un área del cerebro. En otra realización, las células se implantan a al menos un segmento o una región específicos del cerebro tal como la corteza cerebral, los hemisferios cerebrales, el tálamo, el hipotálamo, el mesoencéfalo, el cerebelo, el puente o el bulbo raquídeo.

En otra realización, las células se inyectan entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 sitios en el cerebro. En una realización, las células se inyectan entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 sitios en el cerebro. Al menos dos de los sitios pueden separarse por una distancia de aproximadamente 100 micras a aproximadamente 5000 micras. En una realización, la distancia entre los sitios de inyección es de aproximadamente 400 a aproximadamente 600 micras. La distancia entre los sitios de inyección puede determinarse basándose en generar presencia de células donantes sustancialmente ininterrumpida y contigua a lo largo del tejido cerebral y basándose en el volumen medio de inyecciones demostraron lograr una supervivencia de aproximadamente 2-3 meses en modelos animales tales como ratas o cerdos. El número actual de inyecciones en humanos puede extrapolarse a partir de los resultados en modelos animales.

Las CMN de los procedimientos desvelados pueden generar grandes números de neuronas *in vivo*. Donde las CMN no se pre-diferencian abiertamente antes del trasplante, las CMN pueden proliferar hasta dos a cuatro divisiones celulares *in vivo* antes de diferenciarse, de esta manera aumentando adicionalmente el número de células donantes eficaces. Tras la diferenciación, las neuronas secretan neurotransmisores específicos. Además, las neuronas secretan al medio circundante al trasplante *in vivo* factores de crecimiento, enzimas y otras proteínas o sustancias que son beneficiosas para diferentes condiciones. En consecuencia, puede tratarse una diversidad de afecciones mediante los procedimientos desvelados debido a la capacidad de las células implantadas de generar grandes números de neuronas *in vivo* y debido a que las afecciones neurodegenerativas pueden provocarse por o dar como resultado elementos que faltan incluyendo elementos derivados de neuronas. Por lo tanto, los sujetos que padecen neurodegeneración de tejidos del SNC debido a la carencia de tales elementos neuronales, tales como factores de crecimiento, enzimas y otras proteínas, pueden tratarse eficazmente mediante los elementos desvelados.

Los procedimientos desvelados también pueden aplicarse para tratar paresia, espasticidad, rigidez o cualquier otro síntoma motor, del habla o cognitivo, que surgen de la isquemia cerebral. La isquemia cerebral puede darse como resultado de un evento de ictus en el cerebro o a partir de un ataque al corazón en el cual la circulación sanguínea al cerebro se interrumpe durante un periodo de tiempo significativo. Es, de esta manera, análogo a la isquemia de médula espinal descrita anteriormente. Algunos sujetos de ictus desarrollan convulsiones de origen central así como otros déficits tales como pérdida de memoria, parálisis o paresia. Estos déficits de la isquemia cerebral también parecen deberse a la pérdida selectiva de interneuronas inhibitorias en el hipocampo y/u otras áreas cerebrales. De esta manera, los procedimientos desvelados pueden aplicarse para tratar sujetos de ictus que padecen paresia, parálisis, espasticidad u otros síntomas motores, del habla o cognitivos.

Sin descripción adicional, se cree que un experto en la materia puede, usando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, fabricar y utilizar los agentes de la presente divulgación y practicar los procedimientos reivindicados. Los siguientes ejemplos funcionales se proporcionan para facilitar la práctica de la presente divulgación, y no han de construirse limitando de ninguna forma el resto de la divulgación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Expansión de células madre/progenitoras neurales de médula espinal humana

Se obtuvo la médula espinal de al menos un donante de edad gestacional de aproximadamente 8,5 semanas. Se disoció un único tejido contiguo de la médula espinal en solución salina tamponada con fosfato libre de Ca^{++} y Mg^{++} usando trituración mecánica. La suspensión celular resultante se sembró en placas de cultivo de tejidos pre-cubiertas tanto con poli-L-ornitina o poli-D-lisina como con fibronectina humana u otras proteínas de la matriz extracelular. Las placas de cultivo de tejidos tratadas o los matraces se incubaron con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de poli-D-lisina durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se lavaron tres veces con agua y se secaron. Después se incubaron con 25 mg/ml durante 5 minutos a temperatura ambiente. A veces, se usaron 10 mg/ml de fibronectina durante 1 hora a temperatura ambiente. A veces, se usó 1 mg/ml de fibronectina durante 18 horas a 37 °C. Se suplementaron medios de cultivo que consistían en N2 (DMEM/F12 más insulina, transferrina, selenio, putrescina y progesterona) con 1 factor de crecimiento de fibroblastos básico recombinante humano (bFGF). En una realización, puede usarse un intervalo de 0,1 ng/ml -100 ng/ml . En una realización, se usaron óptimamente 10 ng/ml de bFGF.

El cultivo inicial resultante consiste en neuronas post-mitóticas y CMN proliferativas en una monocapa. Posteriormente, después de aproximadamente cinco a aproximadamente veinte días en cultivo, las CMN en división, positivas a nestina dominaron el cultivo sobre las neuronas no en división o la glía lentamente en división. En estas condiciones de cultivo, las CMN se favorecen selectivamente para la expansión. La población de CMN en expansión se hace un pasaje de tratamiento enzimático suave, tal como usando tripsina. Las células se cultivaron después en un medio libre de suero o sustancialmente libre de suero. Aunque la baja concentración de suero puede tolerarse por las células, es mejor evitar la exposición de las células al suero ya que el suero contiene muchas citocinas tales como LIF y CNTF que promueven la diferenciación glial de las CMN. De esta manera, durante los pasajes, la enzima usada se paró añadiendo un inhibidor específico de enzima, tal como un inhibidor de tripsina, en lugar de suero. En cada pasaje, se contó el número de células cultivadas y se sembró una fracción para la expansión adicional. Usando este procedimiento, las CMN humanas pueden expandirse más allá de un aumento de 10^{18} veces en la población manteniendo sus propiedades de crecimiento y diferenciación. Durante la expansión, casi todas las células expresan nestina, el marcador *in vivo* de las células neuroepiteliales mitóticas, y están ausentes de antígenos de neuronas y glía diferenciadas tales como beta tubulina tipo 3 y GFAP. Las células también eran negativas por inmunotinción para PSANCAM, un posible marcador de progenitores neuronales comprometidos, y RC2, un marcador de glía radial. De esta manera, determinado por inmunotinción, las CMN mantienen de forma estable su expresión del perfil antigénico a lo largo de todo el periodo de expansión prolongado.

Ejemplo 2: Diferenciación de células madre/progenitoras neurales de médula espinal humana

En cualquier punto durante la expansión de las CMN, los cultivos pueden diferenciarse por la retirada del mitógeno en el cultivo tal como bFGF. La diferenciación de las CMN sobreviene en aproximadamente 1-3 días después de la retirada del mitógeno, y son aparentes distintas morfologías celulares heterogéneas. Aproximadamente el día 4-7 de la diferenciación, pueden visualizarse antígenos específicos de neuronas, tales como MAP2c, tau y beta tubulina tipo III por inmunotinción. Aproximadamente el día 12-14, los procedimientos axonales elongados fasciculados son evidentes a lo largo de todo el cultivo junto con la clara polarización del tráfico proteico subcelular. Aproximadamente el día 28, las proteínas sinápticas, tales como la sinapsina y la sinaptofisina, se localizan en los terminales axónicos, apareciendo como tinción puntiforme. Puede proporcionarse una capa suministradora adicional de astrocitos para promover adicionalmente la maduración a largo plazo de las neuronas. La diferenciación de las CMN de médula humana genera cultivos mezclados de neuronas y glía en los que las neuronas expresan robustamente antígenos específicos de neuronas tales como tau, MAP2ab y beta tubulina tipo 3 y comprenden aproximadamente el 50 % del cultivo. Adicionalmente, el cultivo genera espontáneamente cables axónicos largos desordenados que se estrechan varios centímetros. Una proporción significativa de las neuronas son GABAérgicas estando también presentes neuronas motoras colinérgicas en el cultivo. La presencia de neuronas GABA significativas en el cultivo predice la utilidad de las CMN de médula humana para tratar diversas afecciones neurológicas provocadas por la producción de GABA disminuida en cierto circuito. De la misma manera, la presencia de neuronas colinérgicas demuestra que las CMN de médula humana son capaces de diferenciarse en neuronas motoras y predice su utilidad para tratar diversas enfermedades de las neuronas motoras por la degeneración gradual de las neuronas motoras. Para el tratamiento, las CMN pueden expandirse con o sin condiciones adicionales de potenciamiento de fenotipo, recolectarse e inyectarse en un área neural de deficiencia.

Ejemplo 3: Trasplante de células madre/progenitoras neurales de médula espinal humana al cerebro

Una célula madre neuronal puede aislarse de un mamífero, expandirse *in vitro* y después introducirse (por ejemplo, trasplantarse) a una o más áreas en un sujeto (por ejemplo, el cerebro de un sujeto) afligido por una enfermedad y/o un trastorno neurodegenerativos.

En un procedimiento ejemplar para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, se indujo isquemia cerebral (por ejemplo, un ictus) en ratas Sprague-Dawley machos adultos (que pesaban 250-300 g) el día 9 sometiendo las ratas a una ligación de tres vasos mediante procedimientos modificados descritos anteriormente (véase, Chen y col., 1986; Shyu y col. 2004). Brevemente, las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral (0,4 g/kg, intraperitonealmente)

y se agruparon las CCA bilaterales con clips arteriales no traumáticos. Después, usando un microscopio quirúrgico, se perforó una craneotomía de 2 x 2 mm donde el cigoma se fusiona al hueso escamoso. El MCA derecho se ligó después con una sutura de nailon de 10-O. Se midió continuamente el flujo sanguíneo cortical con un flujómetro Doppler láser (PF-5010, Sistema Periflux, Perimed AB, Estocolmo, Suecia) en ratas anestesiadas. Después, se realizó una trepanación (diámetro de 1 mm) en la región frontoparietal derecha para permitir la colocación de fotodetectores. Después se colocó una sonda (0,45 mm de diámetro) estereotáxicamente en la corteza (1,3 mm posterior, 2,8 mm lateral al bregma y 1,0 mm por debajo de la duramadre). Después de 90 minutos de ligación, la sutura en el MCA y los clips arteriales en los CCA se retiraron para permitir la reperfusión. Mientras las ratas estaban con anestesia, se monitorizó su temperatura corporal central con una sonda termistora y se mantuvo a 37 °C con una almohadilla calefactora durante la anestesia. Después de recuperarse de la anestesia, se mantuvo la temperatura corporal a 37 °C con una lámpara calefactora.

Después, las ratas sometidas al procedimiento de ligación de tres vasos se dividieron en dos grupos. El primer grupo ("grupo de trasplante") recibió células NSI-566RSC (una línea de células madre de médula humana, línea "CMMH"; lote clínico, Neuralstem, Inc. EE.UU.) y el segundo grupo ("grupo control") recibió un vehículo control. La línea celular NSI-566RSC derivó de un tejido de médula espinal fetal. Se usaron células madre de un lote clínico GMPC (pasaje 12) en el presente estudio. El día de la cirugía, un vial criopreservado se descongeló, se lavó y se concentró de acuerdo con el protocolo de Neurastem. Todos los animales del estudio recibieron una inyección una vez al día de FK506 (o Prograf) a 1 mg/kg intraperitonealmente para suprimir su sistema inmune.

Se administraron células NSI-566RSC o vehículo control el día 7 al grupo de trasplante y control, respectivamente. Se les inyectó estereotáxicamente a las ratas del grupo de trasplante aproximadamente 2×10^5 células NSI-566RSC en una suspensión de 5 μ l a través de una jeringa Hamilton de calibre 30 en 3 áreas subcorticales, de 3,0 a 5,0 mm por debajo de la duramadre. Las coordenadas aproximadas para estos sitios eran 1,0 a 2,0 mm anterior al bregma y 3,5 a 4,0 mm lateral a la línea media, 0,5 a 1,5 mm posterior al bregma y 4,0 a 4,5 mm lateral a la línea media y 3,0 a 4,0 mm posterior al bregma y 4,5 a 5,0 mm lateral a la línea media. La aguja se retiró en el lugar durante 5 minutos después de cada inyección y se aplicó una pieza de cera ósea a los defectos del cráneo para prevenir la fuga de la solución inyectada. Las ratas experimentales del grupo control con vehículo se trataron estereotáxicamente con el tampón de suspensión sin las células.

Las evaluaciones del comportamiento neurológico se realizaron 3 días antes de la isquemia cerebral y los días 1, 7, 14, 21 y 28 después del tratamiento. Los ensayos midieron (a) asimetría corporal, (b) actividad locomotora y (c) fuerza de agarre. Las puntuaciones del tratamiento previo se grabaron para normalizar aquellas tomadas después de la isquemia cerebral. Para la asimetría corporal, se usó el ensayo de oscilación corporal (EOC) para evaluar la asimetría corporal después de la ligación de MCA y se evaluó cuantitativamente, como se ha descrito previamente (Borlongan y col., 1998). Inicialmente, se examinó en los animales el movimiento lateral, con sus cuerpos suspendidos por sus colas. La frecuencia de oscilación inicial de la cabeza contra-lateral al lado isquémico se contó en veinte ensayos continuos y se normalizó, como se ha descrito previamente (Chang y col., 2003) (Figura 1, Panel A). Para la actividad locomotora, las ratas se sometieron a una monitorización de Actividad Animal VersaMax (Accuscan Instruments, Inc. Columbus, OH) durante aproximadamente 2 horas para grabar el comportamiento de cada una de las ratas experimentales. La monitorización de Actividad Animal VersaMax contiene 16 sensores infrarrojos horizontales y 8 verticales espaciados 87 cm. Los sensores verticales se sitúan a 10 cm desde el suelo de la cámara. La actividad locomotora se contó como el número de haces roto por el movimiento de una rata en la cámara. Tres parámetros verticales definidos en la opción del menú del fabricante se calcularon durante 2 horas por la noche: (i) actividad vertical, (ii) tiempo vertical y (iii) número de movimientos verticales (Figura 1, Paneles B-D). Para la fuerza de agarre, las ratas se analizaron usando un Medidor de Fuerza de Agarre (TSE-Systems, Alemania) como se ha descrito previamente, con modificación (Dunnett y col., 1998). En breve, la relación de fuerza de agarre de cada extremidad anterior se midió separadamente y se calculó como la relación entre la fuerza media de 20 tirones del lado contralateral a la isquemia y aquella del lado ipsilateral. Además, la relación de la fuerza de agarre posterior al tratamiento y anterior al tratamiento se calcularon también y los cambios se presentaron como un porcentaje del valor previo al tratamiento (Figura 1, Panel E). En general, los investigadores se cegaron cuando se midieron los cambios comportamentales en el grupo tratado con células y el control.

Aproximadamente veintisiete días después de que las ratas se sometieran al procedimiento de ligación de tres vasos, las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral (0,4 g/kg, intraperitonealmente) y sus cerebros se fijaron por perfusión transcardíaca con solución salina, seguido de una perfusión y una inmersión en paraformaldehído al 4 %, antes de retirarse y embeberse en sacarosa al 30 %. Se cortó una serie de secciones adyacentes de 20 μ m de grosor de cada cerebro en el plano coronal, se tiñeron con H&E y se observaron mediante un microscopio de luz (Nikon, E600, Japón). Las células humanas injertadas se identificaron después por diversos anticuerpos específicos humanos (HuNu, sinaptofisina, hNSE, hNF y otros) (véase, Figuras 2A-2B). Para la inmunotinción BrdU, el ADN se desnatura primero incubando cada sección en formamida al 50 % o citrato en solución salina convencional 2X a 65 °C durante 2 horas, después en HCl 2 N a 37 °C durante 30 minutos y finalmente se aclaró en ácido bórico 0,1 M con pH 8,5. Después, las secciones se aclararon con tampón Tris y se trataron con H₂O₂ para bloquear la peroxidasa endógena. El procedimiento de inmunotinción se realizó después usando el procedimiento de biotina marcada con estreptoavidina (BMEA) (Kit DAKO LASB-2, Peroxidasa, DAKO, EE.UU.). El tejido cerebral, en una rebanada recubierta con silano, se colocó después en tampón citrato hirviendo (pH 6, ChemMate, DAKO, EE.UU.) dos veces durante 5 minutos en un horno microondas a 750 W, después de la desparafinización y la rehidratación.

Después, los tejidos se incubaron con los anticuerpos para BrdU primarios apropiados diluidos (para la identificación nuclear, dilución 1:400, Sigma, EE.UU.), a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con solución salina tamponada con Tris, que contenía un 0,1 % de Tween 20 (TBS-T), los especímenes se incubaron secuencialmente durante 10 a 30 minutos con inmunoglobulinas biotiniladas anti-conejo y anti-ratón (1:200, R&D Systems, EE.UU.) y estreptavidina marcada con peroxidasa. La tinción se realizó después de una incubación de 10 minutos con una solución de cromógeno sustrato preparada recientemente, que contenía un 3 % de 3-amino-9-etilcarbazol y peróxido de hidrógeno. Finalmente, las rebanadas se contratiñeron ligeramente con hematoxilina, se lavaron con agua y después se montaron. Se tiñeron secciones de control negativo con preparaciones idénticas de espécimen de tejido cerebral, salvo porque se omitieron los anticuerpos primarios. La cuantificación de las células inmunoreactivas de BrdU se contaron digitalmente usando una lente objetiva 60X (Carl Zeiss LSM510, Alemania) a través de un sistema de análisis de imagen de ordenador (Imaging Research, Canadá).

Adicionalmente, los marcadores específicos del tipo celular co-localizados con CPN trasplantadas exógenas y células madre buscadoras endógenas (BrdU inmunorreactivas), pueden identificarse por análisis de colocación inmunofluorescente mediante microscopía confocal de láser de barrido. En estudios de colocación inmunofluorescente, cada sección coronal se trata con anticuerpos específicos, por ejemplo, proteína ácida fibrilar glial (GFAP para astrocitos, 1:400, Sigma, EE.UU.), factor de Von-Willebrand (FvW para células endoteliales, Sigma, 1:400, EE.UU.), antígeno nuclear neuronal (Neu-N para núcleos neuronales, 1:200, Chemicon, CA), Nestina (para dendritas neuronales, 1:200, Chemicon, CA), proteína asociada a microtúbulos 2 (PAM-2 para dendritas neuronales, 1:200; BM, Alemania), factor derivado de células del estroma 1 (FDE-1, 1:200) y receptor CXC tipo 4 (RCXC4, 1:22) de Chemokine, y Prp^C (1:300, M20, Santa Cruz) con tinción Cy3 (Jackson Immunoresearch PA EE.UU., 1:500, EE.UU.).

Como se muestra en la Figura 1, los animales tratados con células NSI-566RSC mostraron mejoras en la oscilación corporal, el movimiento vertical, la actividad vertical, el tiempo de movimiento vertical y la fuerza de agarre comparados con animales tratados con el vehículo control.

Los aspectos, incluyendo las realizaciones, de la presente materia objeto descrita anteriormente pueden ser beneficiosos solos o en combinación, con uno o más aspectos o realizaciones. Sin limitar la descripción anterior, de acuerdo con un aspecto de la materia objeto del presente documento, se proporcionan procedimientos para tratar una enfermedad o un trastorno asociados a la pérdida de células neuronales en un cerebro, comprendiendo los procedimientos: obtener al menos una célula madre del tejido de la médula espinal de un humano; expandir la al menos una célula madre para formar una población expandida de células madre; e introducir una cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida de células madre a al menos un área del cerebro de un sujeto.

De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, la población expandida de células madre se diferencia en neuronas que se integran *in vivo* en el cerebro del sujeto.

De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, la enfermedad o el trastorno están provocados por isquemia, hemorragia o traumatismo cerebrales.

De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, la enfermedad o el trastorno implica parálisis, deterioro del habla, pérdida de memoria o de la capacidad de razonamiento.

De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, la enfermedad o el trastorno implica disfunción motora o déficit cognitivo.

De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, el feto *post-mortem* tiene una edad gestacional de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 20 semanas.

De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, expandir la al menos una célula madre neural incluye cultivar la célula madre neural en ausencia de suero.

De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, expandir la al menos una célula madre neural incluye exponer la al menos una célula madre neural a al menos un factor de crecimiento.

De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en bFGF, EGF, TGF-alfa, aFGF y combinaciones de los mismos.

De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, al menos un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % de la población expandida de células madre expandida es capaz de generar neuronas en el tejido cerebral del sujeto.

De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, al menos un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % de la población expandida de células madre expandida es capaz de diferenciarse en neuronas *in vivo*.

5 De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, introducir la cantidad terapéuticamente eficaz de la población de células madre expandida incluye inyectar al menos una porción de la cantidad terapéuticamente eficaz en una pluralidad de áreas del tejido cerebral del sujeto.

10 De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, las áreas incluyen los hemisferios cerebrales, la corteza cerebral, la corteza motora subcortical, el cuerpo estriado, la cápsula interna, el tálamo, el hipotálamo, el hipocampo, el mesoencéfalo, el tronco encefálico y el cerebelo.

De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, el sujeto experimentó un evento que provocó isquemia cerebral.

15 De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, el evento es un ictus.

20 Sin limitar la anterior descripción, de acuerdo con otro aspecto de la materia objeto del presente documento, se proporcionan procedimientos para para tratar el ictus en un sujeto en necesidad de los mismos, comprendiendo los procedimientos: aislar al menos una célula madre neural del tejido de la médula espinal de un humano; expandir *in vitro* dicha célula madre neural para formar una población expandida; concentrar la población expandida; e introducir una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha población expandida a al menos un área del cerebro del sujeto.

De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, la médula espinal es de una edad gestacional de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 20 semanas.

25 De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, expandir la al menos una célula madre neural incluye cultivar la célula madre neural en ausencia de suero.

De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, expandir la al menos una célula madre neural incluye exponer la al menos una célula madre neural a al menos un factor de crecimiento.

30 De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en bFGF, EGF, TGF-alfa, aFGF y combinaciones de los mismos.

De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, al menos un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % de la población expandida de células madre es capaz de generar neuronas en el tejido cerebral del sujeto.

35 De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, introducir la cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida de células madre incluye inyectar al menos una porción de la cantidad terapéuticamente eficaz en una pluralidad de áreas del cerebro receptor.

40 De acuerdo con otro aspecto que puede usarse o combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores o siguientes, las áreas del cerebro receptor incluyen los hemisferios cerebrales, la corteza cerebral, la corteza motora subcortical, el cuerpo estriado, la cápsula interna, el tálamo, el hipotálamo, el hipocampo, el mesoencéfalo, el tronco encefálico y el cerebelo.

REIVINDICACIONES

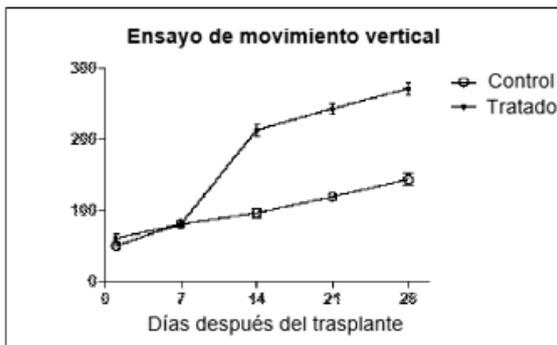
- 5 1. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una población expandida de células madre neurales a partir de al menos una célula madre neural obtenida a partir del tejido de la médula espinal de un ser humano, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno asociado a la pérdida de células neuronales en cerebro, en la que la población de células madre neurales es para la administración a al menos un área del cerebro de un sujeto; y en la que la población de células madre neurales es para la administración a, cerca de o alrededor de, el área o las áreas, el cerebro del sujeto afectadas por la pérdida de células neuronales.
2. La población de células madre para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la población expandida de células madre se diferencia en neuronas que se integran *in vivo* en el cerebro del sujeto.
- 10 3. La población de células madre para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la enfermedad o el trastorno están provocados por isquemia, hemorragia o traumatismo cerebral.
4. La población de células madre para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la enfermedad o el trastorno implican parálisis, deterioro del habla, pérdida de memoria o de la capacidad de razonamiento.
- 15 5. La población de células madre para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la enfermedad o el trastorno implican disfunción motora o déficit cognitivo.
6. La población de células madre para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que al menos un 50 % de la población expandida de células madre es capaz de diferenciarse en neuronas *in vitro*.
7. La población de células madre para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el sujeto experimentó un evento que provocó isquemia cerebral y, opcionalmente, en la que el evento es un ictus.
- 20 8. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una población de células madre neurales que se ha concentrado a partir de una población expandida de células madre neurales *in vitro* a partir de al menos una célula madre neural aislada a partir del tejido de la médula espinal de un ser humano, para su uso en el tratamiento de ictus en un sujeto en necesidad de la misma, en la que la población de células madre neurales es para la administración a al menos un área del cerebro objeto; y en la que la población de células madre neurales es para la administración a, cerca de o 25 alrededor del área o las áreas del cerebro del sujeto afectadas por la pérdida de células neuronales.
9. La población de células madre para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que al menos un 20 %, por ejemplo al menos un 30 %, de la población expandida de células madre es capaz de generar neuronas en el tejido cerebral del sujeto.
- 30 10. La población de células madre para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la médula espinal es de un feto *post-mortem* de una edad gestacional de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 20 semanas.
11. La población de células madre para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que expandir la al menos una célula madre incluye cultivar la célula madre en ausencia de suero.
- 35 12. La población de células madre para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que expandir la al menos una célula madre incluye exponer la al menos una célula madre a al menos un factor de crecimiento y, opcionalmente, en la que el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en bFGF, EGF, TGF-alfa, aFGF y combinaciones de los mismos.
- 40 13. La población de células madre para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que al menos una porción de la cantidad terapéuticamente eficaz de la población expandida de células madre es para la administración por inyección en una pluralidad de áreas del cerebro receptor.
14. La población de células madre para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que las áreas del cerebro receptor incluyen los hemisferios cerebrales, la corteza cerebral, la corteza motora subcortical, el cuerpo estriado, la cápsula interna, el tálamo, el hipotálamo, el hipocampo, mesoencéfalo, el tronco encefálico y el cerebelo.

Figura 1

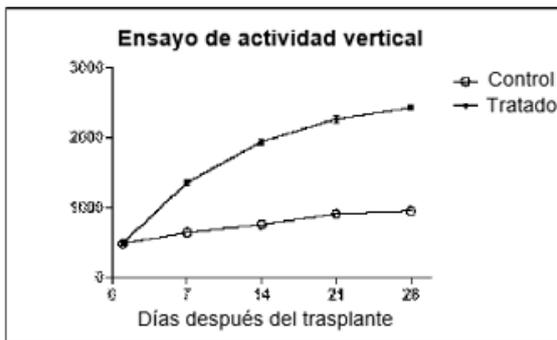
A.



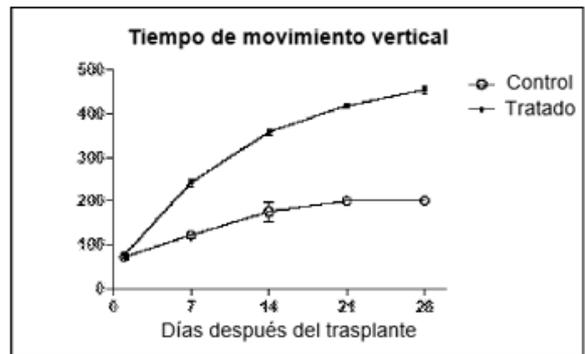
B.



C.



D.



E.

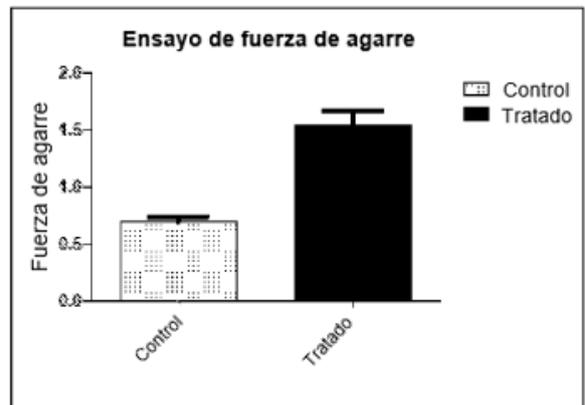


Figura 2A

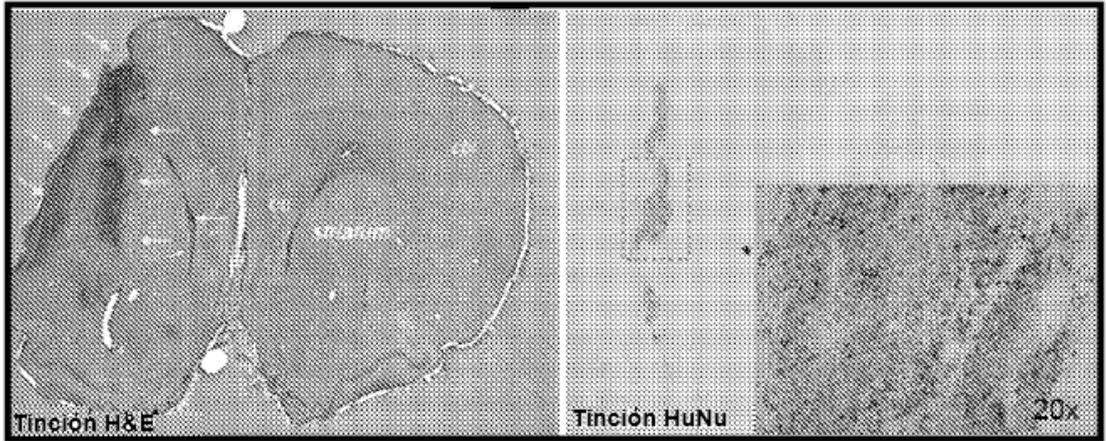


Figura 2B

