

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 006**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2009** **PCT/US2009/061093**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2011** **WO11046570**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2009** **E 09850481 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016** **EP 2488209**

54 Título: **Procedimeinto de tratamiento de lesión crónica de tejido nervioso usando una estrategia de terapia celular**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.04.2017

73 Titular/es:

RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY OF NEW JERSEY (100.0%)
Old Queen's, Somerset Street
New Brunswick, NJ 08909, US

72 Inventor/es:

SABAAWY, HATEM

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 609 006 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).

DESCRIPCION

Procedimeinto de tratamiento de lesión crónica de tejido nervioso usando una estrategia de terapia celular

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden células madre adherentes de médula ósea suspendidas en un líquido farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de una lesión degenerativa o traumática en un tejido nervioso o en el cerebro.

Antecedentes de la invención

10 Las lesiones nerviosas y cerebrales, incluidas las lesiones traumáticas y degenerativas de los nervios periféricos y/o la médula espinal (SCI), permanecen aún sin tratamiento curativo. Con respecto a la SCI por ejemplo, incluso una contusión leve a la médula espinal puede dar lugar a la pérdida masiva neuronal y de células gliales, desmielinización, cavitación, y cicatrización glial. Cambios patológicos como estos tienen efectos funcionales perjudiciales que causan pérdida de la percepción sensorial, parálisis motora distal y deterioro funcional severo, con
15 un resultado final que depende del reemplazo axonal, remielinización y posiblemente regeneración neural. También se observan efectos similares con muchos trastornos neurodegenerativos que incluyen, entre otros, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica, degeneraciones multisistémicas, degeneración cerebelar y similares. Por consiguiente, son deseables una o más estrategias para reparar o regenerar tejido dañado con el resultado final de restaurar dicho tejido y efectos funcionales perdidos.

20 Una estrategia propuesta es el uso de células pluripotentes o células madre con el fin de tratar el área afectada. Las células estromales de la médula, en particular, son candidatos atractivos para tales propósitos porque tienen muchas de las características de las células madre y se ha demostrado que se diferencian en osteoblastos, condrocitos, adipocitos e incluso mioblastos. Por lo tanto, existe un potencial para su uso en la regeneración de tejido nervioso o cerebral dañado en un paciente.

25 Una de las principales dificultades es que los tipos de células de la médula ósea son relativamente raros y difíciles de identificar. Para este fin, gran parte de la investigación actual se ha centrado en aislar tipos particulares de células de interés y explorar metodologías para lograr la diferenciación de células neurales. La publicación de la solicitud de patente estadounidense N° 2007/0031387, por ejemplo, divulga el aislamiento de células mononucleares a partir de granulocitos dentro de una población de células de médula ósea. La patente estadounidense N°
30 7.098.027 aísla alternativamente células mononucleares usando centrifugación en gradiente de densidad, es decir, aislamiento de células que tienen una gravedad específica dentro del intervalo de 1,07 y 1,08 g/ml. En cualquiera de los dos casos, se contemplan las células mononucleares aisladas para su administración para el tratamiento de la lesión espinal u otros trastornos neurológicos.

35 Además del aislamiento celular, se han realizado numerosos intentos para diferenciar células de la BM antes de la administración en un medio *in vitro* o después de la administración *in vivo*. La patente N° 5.197.985, por ejemplo, ilustra procedimientos para regenerar tejidos mesenquimales y neuroectodérmicos usando células de médula ósea (BM) adultas. La diferenciación celular se lleva a cabo utilizando una composición cerámica porosa de fosfato tricálcico o hidroxapatita o combinaciones de los dos, como vehículo o portador para células mesenquimales derivadas de la médula, las cuales, cuando se implantan en defectos esqueléticos, promueven la diferenciación de
40 las células en tejido esquelético.

La patente estadounidense N° 6.528.245 divulga un procedimiento para seleccionar específicamente células estromales de médula ósea en una población de células de médula ósea incubando las células en un medio de cultivo plástico y retirando las células estromales que se adhieren al plástico. Estas células se diferencian entonces *in vitro* en presencia de ácido retinoico, factores de crecimiento y células neuronales fetales y se administran para
45 tratar trastornos neurodegenerativos. La publicación de la solicitud de patente estadounidense N° 2006/0275272 enseña igualmente procedimientos de tratamiento aislando y cultivando células estromales de médula ósea que se usan para tales propósitos. Finalmente, la patente estadounidense N° 7.279.331, enseña procedimientos similares de aislamiento de células estromales de médula ósea, las cuales son luego diferenciadas previamente *in vitro* en una célula neuronal usando antioxidantes y/o diversos factores de crecimiento.

50 La publicación de la solicitud de patente estadounidense N° 2006/0029580 enseña además un procedimiento para generar células progenitoras neurales incubando células de médula ósea en un cultivo suplementado con factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) y factor de crecimiento epidérmico (EGF). Las células progenitoras pueden entonces administrarse a un paciente que presenta una afección neuropatológica.

55 Además de las células de la BM, también se han explorado las células derivadas de tejido placentario u otro tejido postnatal para propósitos regenerativos neurales. La publicación de la solicitud de patente estadounidense N°

2006/0147426 se refiere a condiciones de cultivo celular para aislar células inducibles postnatales de linaje múltiple. Tales condiciones de cultivo incluyen sustrato extracelular de matriz, tensión de oxígeno, factores de crecimiento y vitaminas, densidad celular o cocultivo de células. La publicación de la solicitud de patente estadounidense N° 2005/0032209 enseña procedimientos y composiciones para regenerar o reparar tejido neural utilizando células derivadas del postparto. Estas células se derivan del tejido de la placenta o del cordón umbilical y se cultivan en un medio de L-valina en un ambiente de oxígeno al 5%.

Lo anterior presenta evidencia definitiva de que tipos de células pluripotentes de médula ósea y similares pueden diferenciarse en células mesenquimales, e ilustra adicionalmente la viabilidad y promesa de aplicación de estos tipos de células para el tratamiento de lesiones traumáticas o degenerativas a tejido nervioso o cerebral, tales como remielinización o regeneración del tejido axonal dañado. Sin embargo, incluso teniendo en cuenta las metodologías propuestas anteriormente, sigue existiendo la necesidad de poblaciones de células alternativas y estrategias novedosas para una diferenciación celular más predecible. Además, es necesario sortear las numerosas limitaciones éticas y técnicas que ahora limitan el uso generalizado del trasplante neural.

La presente invención a través de sus realizaciones y ejemplos responde a estas necesidades.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a composiciones para uso como se define en las reivindicaciones 1 a 9. Como se menciona en la presente memoria, la presente invención se basa en el descubrimiento de que las células adherentes de médula ósea (ABMC) pueden diferenciarse en y/o provocar la producción de tipos células neurales progenitoras, células formadoras de mielina, astrocitos, oligodendrocitos, neuronas maduras, axones mielinizados y similares. Más específicamente, se descubrió sorprendentemente que cuando se introducen ABMC aisladas en una lesión de un mamífero que padece una lesión nerviosa, tal como de la SCI, las células conducen tanto a la remielinización como a la regeneración axonal del tejido neural dañado en el sitio de la lesión. También se observó una coordinación motora mejorada y/o una reducción de la afección neurodegenerativa objetivo, particularmente cuando se combina con terapia física.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende células madre adherentes de médula ósea suspendidas en un líquido farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento de una lesión degenerativa o traumática de un tejido nervioso o del cerebro, en donde dichas células se pueden obtener mediante: a) el cultivo de una muestra biológica que comprende células madre de médula ósea adulta sobre un sustrato recubierto de poli-L-lisina durante 2 a 72 horas, de manera que una capa de células madre de médula ósea se adhiere a dicho sustrato sin expandir las células en el cultivo; b) el lavado de las células no adherentes de dicho sustrato y recoger las células madre adherentes de médula ósea; y c) suspender las células madre adherentes de médula ósea en un líquido farmacéuticamente aceptable; y en donde dicho tratamiento comprende: administrar dicha composición en o cerca del sitio de la lesión en una cantidad eficaz para provocar regeneración axonal o remielinización en el sitio de dicha lesión. Según una realización de este aspecto de la invención, la lesión es en el cerebro o en la médula espinal y se administran las células madre de médula ósea mediante inyección intratecal a través de punción lumbar en el líquido cefalorraquídeo, en o cerca del sitio de la lesión. De acuerdo con otra realización de este aspecto de la invención, la lesión es en un nervio periférico y las células madre de médula ósea se administran por sonografía local guiada aplicada a la raíz del nervio periférico.

En otra realización de la invención, las células madre adherentes de la médula ósea provocan regeneración axonal y remielinización en el sitio de la lesión. En otra realización de la invención, las células madre de médula ósea se derivan de aspirados de sangre de cordón umbilical o de la médula ósea.

Se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de células al paciente para tratar la lesión nerviosa o cerebral. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de células necesarias para provocar remielinización y/o regeneración axonal del tejido neural dañado en un sitio de lesión o bien para reparar el tejido nervioso o cerebral dañado. Esto a su vez puede facilitar una coordinación motora mejorada y/o una reducción de la afección neurodegenerativa objetivo. Una dosificación terapéuticamente eficaz está entre aproximadamente 10^4 hasta aproximadamente 10^7 ABMC/kg. Como se ejemplifica a continuación, en una realización no limitante, una dosificación terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 2×10^6 ABMC/kg.

Dicha dosis terapéuticamente eficaz puede proporcionarse al paciente como una administración única o administraciones acumulativas múltiples y puede incluir también uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables siempre y cuando no afecte adversamente la acción o diferenciación de las ABMC. En una realización, la dosificación acumulativa de dichas células madre de médula ósea se administra periódicamente en una serie de dos o más inyecciones. En una realización más específica, las inyecciones periódicas se realizan mensualmente.

La subpoblación aislada de ABMC es positiva para uno o más grupos de diferenciación (CD) de marcadores de la superficie de las células indicativos del potencial de diferenciación en linajes múltiples, en particular diferenciación

neural. En una realización de la invención, las células madre de médula ósea incluyen células positivas para uno o más marcadores seleccionados de CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 y CD271. De acuerdo con una realización más específica, las células madre de médula ósea son negativas para los marcadores CD34, CD38 y CD45. La presencia (o ausencia) de estos marcadores se puede confirmar usando uno o más procedimientos discutidos en la presente memoria o bien conocidos en la técnica.

En otra realización, que se ejemplifica a continuación, las ABMC incluyen o dan como resultado la producción de una o más células formadoras de mielina, células precursoras de astrocitos, astrocitos, células progenitoras neurales, células precursoras de oligodendrocitos, células oligodendrocitos, axones mielinizados, neuronas maduras, y similares. Con este fin, se encontró que las células recién formadas eran positivas para uno o más marcadores asociados con estos tipos de células tales como, pero sin limitarse a, NF70, Nestina, PDGFR, GFAP o TuJ1.

En la presente invención, las muestras biológicas que contienen células madre de médula ósea se obtienen primero usando procedimientos estándar conocidos en la técnica y como se discute en la presente memoria, por ejemplo, a partir de aspirados de sangre de cordón umbilical o de la médula ósea.

Como se ha indicado anteriormente, se proporciona una composición que comprende células madre adherentes de médula ósea suspendidas en un líquido farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento de una lesión degenerativa o traumática en un tejido nervioso o en el cerebro, por lo que dichas células pueden obtenerse mediante:

(a) cultivo de una muestra biológica que contiene células madre de médula ósea adulta sobre un sustrato recubierto con poli-L-lisina durante 2 a 72 horas, de manera que una capa de células madre de médula ósea se adhiere al sustrato sin expandir las células en cultivo;

(b) lavado de las células no adherentes del sustrato y recolección de las células madre de médula ósea; y

(c) suspensión de las células madre adherentes de médula ósea en un líquido farmacéuticamente aceptable;

donde dicho tratamiento comprende: administrar dicha composición en o cerca del sitio de la lesión en una cantidad efectiva para provocar regeneración axonal o remielinización en el sitio de la lesión.

En una realización, la etapa de cultivo se lleva a cabo durante aproximadamente 72 horas. En otra realización, después de la incubación, se eliminan las células no adherentes lavando el sustrato recubierto usando una o múltiples etapas de lavado. Las células adherentes se separan entonces del sustrato recubierto con poli-L-lisina.

A continuación, se administran las ABMC al paciente en o aproximadamente en el sitio de la lesión/daño usando cualquier modo de administración entendido en la técnica. En una realización no limitante, las ABMC pueden formularse para inyección directa, en o cerca del sitio de la lesión. Con este fin, se pueden suspender las células en una solución estéril, que puede incluir una o más de una solución salina fisiológica, agua destilada, fluido espinal u otros líquidos farmacéuticamente aceptables. Para el tratamiento de una lesión de la médula espinal, la administración es por inyección intratecal. También se proporcionan en la presente memoria realizaciones alternativas para modos de administración, o bien aquellas entendidas por un experto en la técnica.

Las ABMC y composiciones de la presente invención son ventajosas ya que contribuyen a la regeneración axonal y remielinización en una lesión de la médula espinal o de un nervio periférico. Son además ventajosas también para reparar el tejido nervioso o cerebral dañado/lesionado. Con respecto a los pacientes con lesión de la médula espinal, es decir, parálisis motora o pérdida sensorial, el trasplante de ABMC es eficaz para promover regeneración axonal y remielinización e inducir la reparación, particularmente cuando se combina con el entrenamiento funcional mediante fisioterapia. También se observó la regeneración de las fibras del tracto corticoespinal y fue acompañada de una mejoría funcional. Además, las ABMC produjeron factores neurotróficos y mediadores antiinflamatorios que dieron soporte al tejido del nervio huésped creando nuevas vías neuronales en los tejidos fibrosos de cicatrización, o expandiendo el brote o generando fibras neuronales regeneradas cortas.

Ventajas adicionales de la presente invención serán apreciadas por un experto en la técnica con base en las enseñanzas y ejemplos proporcionados en la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 ilustra los hallazgos histopatológicos a las 16 semanas después de la terapia con células ABMC en el modelo SCI severo canino. (A) El epicentro de la médula espinal canina lesionada en el grupo de control teñido con H&E, mostró formación marcada de vacuolas (Inerte) y cicatrización glial. (B) El epicentro de la médula espinal lesionada de un perro en el grupo B tratado con ABMC autóloga, que revela remielinización y menos cavitación. (C)

Análisis cuantitativo de áreas de cavidad que muestran una disminución significativa en cavidades en perros tratados con ABMC autóloga. (D-F) Inmunotinción de proteína básica de mielina de médula espinal intacta en perros no lesionados (D), perro con SCI de control (E) y perro tratado con ABMC autóloga (F). (G) Recuperación de la tinción de proteína básica de mielina hasta niveles casi normales en perros intactos después del tratamiento con ABMC autóloga. (H) Puntajes locomotores base de los perros y 1, 4, 8, 12 y 16 semanas después de SCI demostrando una mejora significativa en perros tratados con ABMC autóloga tan pronto como 4 semanas después del trasplante. (I) Aumento de los movimientos de los miembros posteriores en perros tratados con ABMC autóloga en comparación con los controles.

La Fig. 2 ilustra la tinción con inmunofluorescencia multicolor de secciones de SCI de perros tratados con ABMC autóloga. (A) Sección transversal de la lesión de la médula espinal que muestra un tejido bien organizado que puentea la brecha de la médula espinal (flechas) que sólo se observó en secciones de perros tratados con ABMC autóloga. La sección es una superposición de baja potencia de imágenes brillantes e imágenes fluorescentes del marcador nuclear DAPI (azul), GFP (verde) como marcador para ABMC trasplantada, y NF70 (rojo) como un marcador neuronal. La expresión de las GFP fue generalizada tanto en la materia gris como en la blanca y en las raíces nerviosas circundantes. Zona cuadrada 1 en la materia gris de la médula espinal mostrando GFP colocalizada y tinción con NF70. Zona cuadrada 2 de sección transversal en tractos corticoespinales ventrales mostrando mayor aumento de la expresión de GFP (derecha), y axones con GFP colocalizada con NF70. Barra de escala, 200 µm. (B) Distribución de las células positivas para GFP de acuerdo con la distancia desde el epicentro. (C-F) Secciones transversales de tractos corticoespinales ventrales que demuestran la inmunoreactividad a GFP y NF70. (C) Tracto corticoespinal ventral mostrando GFP colocalizada y NF70 y que ilustra la diferenciación neuronal sustancial de los derivados de células con GFP. (D) Superposición de la sección en C en campo brillante. (E) Ampliación mayor que muestra axones remielinizados positivos para GFP con expresión estructural de NF70 (inerte). (F) Superposición de la sección en E en campo brillante. (G) GFP colocalizada y tinción con Nestina. (H) GFP colocalizada y tinción con PDGFR, recuadro que muestra ampliación de la zona cuadrada. (I) GFP colocalizada y tinción con GFAP, recuadro que muestra la ampliación de la zona cuadrada. La flecha en inerte indica el axón positivo para GFP, mientras que la punta de flecha apunta a un axón que carece de expresión de GFP. (J) GFP colocalizada y tinción con GRM1, GAD, A2B5 y AE en áreas de materia gris cerca del canal central. DAPI se utiliza para la tinción nuclear en todas las secciones. Barras de escala en A, 200 µm, en D y F, 10 µm.

La Fig. 3 ilustra el diseño del estudio de trasplante autólogo intratecal de ABMC en pacientes crónicos de lesión medular completa. El diagrama muestra la inscripción, los criterios de inclusión y los criterios de seguimiento.

La Fig. 4 ilustra la recuperación de pacientes con SCI crónica medida a los 18 meses después del trasplante de ABMC autóloga. (A) Niveles neurológicos mejorados en pacientes tratados con ABMC autóloga en comparación con los controles. Los pacientes de control mantuvieron un nivel neurológico torácico entre los niveles torácicos 1 y 12 (T1-T12), mientras que los pacientes tratados con ABMC autóloga alcanzaron niveles neurológicos lumbares y sacros hasta S5. (B) Cambios en las puntuaciones ASIA (eje izquierdo) y escalas ASIA (eje derecho) en los pacientes tratados en comparación con los controles. Tres pacientes de control tenían puntuaciones ASIA más bajas después de 18 meses que sus puntuaciones de línea base, mientras que los pacientes tratados con terapia celular mostraron puntuaciones mejoradas. (C) imágenes de RM antes y 12 meses después del trasplante autólogo de ABMC (paciente 6 con SCI cervical) mostrando compresión y edema de la médula espinal a nivel C6-C7, mientras que la imagen un año después del tratamiento demostró una zona curada con gliosis mínima.

La Fig. 5 ilustra la tripotencia de ABMC canina y la inducción neural. (A) Células caninas adherentes de BM aisladas después de 72 horas (ABMC) y teñidas con giemsa. Inerte muestra una imagen de mayor potencia de las células. (B) ABMC canina transfectada con GFP con un 95% de eficacia (todas las células en este campo son positivas para GFP). (C) Inducción neuronal de cABMC después de una semana que muestra la morfología neuronal (inerte superior) y neuroesfera (inerte inferior). (D) cABMC inducida por adipocitos y teñida con Oil Red. (E) diferenciación de osteocitos con tinción de Von Kossa (inerte superior) y tinción con fosfatasa alcalina (inerte inferior). (F) Tinción azul alcian de cABMC inducida por condrocitos ya sea en placas de cultivo de tejidos (inerte superior) o como agregados de sulfato de condroitina (flecha) en un cultivo en tubo tridimensional (inerte inferior). (G-I) imágenes brillantes y de GFT de cABMC inducida por la diferenciación neuronal y teñidas por Nestina.

La Fig. 6 ilustra las células de BM adherentes humanas aisladas después de 72 horas de pluripotencia (ABMC) que muestran transdiferenciación de triple linaje en adipocitos, osteocitos y condrocitos, así como inducción de neuroesferas y diferenciación neural. (A) tinción con Oil red de hABMC inducida por la diferenciación de los adipocitos. (B) diferenciación de osteocitos con tinción con fosfatasa alcalina. (C) tinción azul alcian de hABMC inducida para condrocitos. (D-F) Inducción neuronal de hABMC después de 4 días mostrando morfología neuronal. (G-I) Inducción de células neurales a partir de la formación de neuroesfera después de una semana.

La Fig. 7 ilustra células de BM humanas adherentes aisladas después de 72 horas (ABMC) de diferenciación neural. (A) Imagen de campo brillante de hABMC antes de la inducción. (B) hABMC transfectadas con GFP. (C) Expresión de Nestina en hABMC. (D) Inducción neuronal de hABMC después de 4 días mostrando morfología neuronal. (E) La misma neurona en D expresa NF70. (F) La misma neurona en D expresa TuJ1. (G) Morfología similar a los

astrocitos y expresión de PDGFR (recuadro) después de la inducción neural. (H) La expresión de TuJ1 en hABMC inducida (el recuadro superior muestra una mayor ampliación), mientras que la inerte inferior muestra células positivas para TuJ1 con dendritas largas. (I) Porcentaje de Nestina, PDGFR y células TuJ1 en hABMC en el paso 0 (P0) en comparación con las células del mismo paciente después del paso 6. Barras de escala en A, 20 mm, en D y G, 10 mm.

La Fig. 8 ilustra la tinción por inmunofluorescencia de secciones del tracto corticoespinal a las 16 semanas en trasplante de control y de ABMC. (A-D) Secciones de tractos corticoespinales de los perros de control. (E-H) Sección de tractos corticoespinales de perros tratados con ABMC autóloga. (A) Sección de campo brillante de los tractos corticoespinales laterales. (B) Imágenes fluorescentes del marcador nuclear DAPI (azul), GFP (verde) y del marcador neuronal NF70 (rojo). No se detectó expresión de GFP, aunque se detectó expresión leve de NF-70. (C) Campo brillante de los tractos corticoespinales ventrales. (D) Imágenes fluorescentes de tractos corticoespinales ventrales en C teñidos con DAPI, GFP y NF-70. (E) Tracto corticoespinal lateral de un perro de control. (F) Sección fluorescentes de los tractos corticoespinales laterales mostrando GFP colocalizada y NF-70. (G) Superposición de imágenes fluorescentes en F en el campo brillante en E. (H) Aumento más alto del cuadrado en G mostrando axones remielinizados positivos para GFP con expresión de NF70 colocalizada (amarillo). Barras de escala 100 μ m.

La Fig. 9 ilustra células derivadas de BM positivas para GFP y PDGFR que rodeaban el canal central y estaban asociadas con pequeños vasos dentro de la médula espinal. (A) Imágenes fluorescentes del marcador nuclear DAPI (azul), GFP (verde) como marcador para ABMC canino trasplantado, y marcador del PDGFR (rojo). Los núcleos DAPI alinean el canal central en la parte inferior izquierda de la imagen. (B) Superposición de las imágenes fluorescentes en el campo brillante que muestran axones positivos para GFP y pequeños vasos de la médula espinal. Barras graduadas, 50 μ m.

La Fig. 10 ilustra la obtención de imágenes por microscopía electrónica de secciones de SCI en perros de control que demuestran una marcada formación de vacuolas y un reemplazo axonal mínimo que reconstituyó menos del 1% de las secciones. (A) marcada formación de vacuolas y un único axón reemplazado en campo de baja potencia de perro de control de SCI. (B) Axón reemplazado con mielinización normal. (C) Célula formadora de mielina con cicatrización glial. (D) Excesiva formación de vacuolas y cicatrización alrededor de la célula formadora de mielina sin evidencia de remielinización. (E) Imagen de alta potencia de D. Barras de escala, 1 μ m.

La Fig. 11 ilustra la formación de imágenes con microscopio electrónico de secciones de perros de SCI tratados con ABMC que demuestran una regeneración axonal extensa. (A) Los axones regenerados eran de menor diámetro, y axones múltiples se asociaron con células multinucleadas formadoras de mielina lo que sugiere mielinización lateral. La limitada formación de vacuolas y un único axón reemplazado en campo de baja potencia de perro de control de SCI. (B) Axones remielinizados con borde grueso. (C) Múltiples axones pequeños que rodean un axón remielinizado mayor. (D) Células formadoras de mielina que se acoplan con axones múltiples. (E) Célula formadora de mielina con núcleos de múltiple lóbulos. (F) Célula formadora de mielina grande con múltiples núcleos y una membrana basal circundante. Barras de escala, 1 μ m.

La Fig. 12 ilustra el análisis FISH de secciones de SCI tratadas con MSC en perros que demuestran células diploides normales (flecha) marcadas con sonda de cromosoma canino 35 sin evidencia de fusión. (A) núcleo teñido con DAPI que mostraba un cromosoma 35 diploide teñido con una sonda marcada con rojo (Flechas). (B) Aumento mayor del núcleo diploide teñido con sonda roja de cromosoma 35 y en una célula positiva para GFP.

La Fig. 13 ilustra las respuestas potenciales evocadas motoras registradas en el músculo tibial posterior en un paciente tratado con ABMC y un paciente de control (registros representativos de un paciente de cada grupo). (A) Registros del paciente de control con actividad plana. (B) Paciente tratado con ABMC con registros realizados un año después de la terapia. La recuperación fue evidente en el paciente tratado con ABMC mediante respuesta evocada eléctricamente con una latencia de 20-30 ms registrada para el músculo tibial posterior.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden células madre adherentes de médula ósea suspendidas en un líquido farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento de una lesión degenerativa o traumática de un tejido nervioso o del cerebro, en donde dichas células se pueden obtener mediante: a) cultivo de una muestra biológica que comprende células madre de médula ósea adulta sobre un sustrato recubierto con poli-L-lisina durante 2 a 72 horas, de manera que una capa de células madre de médula ósea se adhiere a dicho sustrato sin expandir las células en cultivo; b) lavado de las células no adherentes de dicho sustrato y recolección de las células madre adherentes de la médula ósea; y c) suspender las células madre adherentes de médula ósea en un líquido farmacéuticamente aceptable; y en donde dicho tratamiento comprende: administrar dicha composición en o cerca del sitio de la lesión en una cantidad eficaz para provocar regeneración axonal o remielinización en el sitio de dicha lesión. Como se proporciona en la presente memoria, la presente invención se basa en el descubrimiento de que las células adherentes de médula ósea (ABMC) se diferencian en o inducen la producción de tipos de células progenitoras neurales, células formadoras de mielina, astrocitos, oligodendrocitos, neuronas maduras, axones

mielinizados y similares. Más específicamente, se descubrió sorprendentemente que cuando se introducen ABMC aisladas en un mamífero que sufre de una lesión nerviosa, por ejemplo de SCI, el efecto neto es remielinización y regeneración axonal del tejido neural dañado en el sitio de la lesión. Esto se observó para conducir adicionalmente a una mejor coordinación motora y/o una reducción de la condición neurodegenerativa objetivo, particularmente cuando se combina con terapia física.

Las poblaciones de células de médula ósea de la presente invención se pueden obtener usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. En una realización, la población de células de médula ósea puede ser aspirada mediante la remoción de fluido y células de la médula ósea a través de una aguja insertada en el hueso. La aspiración de médula ósea puede realizarse en la cresta ilíaca, pero no se limita a este sitio y puede realizarse en cualquier otro sitio del cuerpo donde se sabe que se puede aspirar o bien obtener células de médula ósea. En ciertas realizaciones, las células de médula ósea se obtienen de forma autóloga del paciente afectado. Sin embargo, la presente invención no está limitada y la población de células de médula ósea también puede obtenerse a partir de cualquier otra fuente conocida en la técnica, tal como, pero sin limitarse a, un banco de médula ósea (o fuentes similares o médula ósea derivada de una persona no familiar del paciente), médula ósea de un familiar o médula de cualquier otra fuente animal no fetal, sangre de cordón umbilical, tejido adiposo, fluidos biológicos, o cualquier otra fuente conocida en la técnica, que sea inmunológicamente compatible con el paciente.

Independientemente de su fuente, las células de médula ósea se aíslan del aspirado usando procedimientos estándar conocidos en la técnica. En una realización no limitante, el aspirado de médula ósea se diluye con una formulación reguladora, por ejemplo RPMI-1640, y se centrifuga en presencia de un medio de separación celular, tal como Ficoll- Plaque Plus^{MR} (Amersham Biosciences). El sobrenadante se elimina y las células sedimentadas se resuspenden y se mantienen utilizando medio estándar para el mantenimiento de células pluripotentes. En un ejemplo no limitante, dicho medio puede incluir DMEM que contiene cantidades bajas de glucosa y suplementado con FBS, L-glutamina, al menos un antibiótico de amplio espectro y CO₂. Pueden utilizarse también otros tipos de medio, como se conoce en la técnica.

A partir de esta población de células de médula ósea, a continuación se aísla una subpoblación de ABMC. Las ABMC se aíslan cultivando las células sobre un sustrato recubierto con poli-L-lisina sin expandir las células en cultivo. Con este fin, las células pueden suspenderse en una placa, frasco, bolsa u otro material similar recubierto con poli-L-lisina conocido en la técnica para cultivar células pluripotentes. En una realización no limitante, las células se suspenden con una densidad de aproximadamente $2,0 \times 10^5$ células/cm². El sustrato de recubrimiento puede contener además cualquier medio estándar para la supervivencia de las células de médula ósea que se conozca en la técnica, por ejemplo α -MEM que contiene L-glutamina, uno o más antibióticos de amplio espectro y FBS, o similares.

La población de células de médula ósea se incuba en el sustrato recubierto con poli-L-lisina durante 2 a 72 horas para distinguir las células de médula ósea adherentes de las células de médula ósea no adherentes.

Después de la incubación, las células no adherentes se eliminan lavando el sustrato recubierto usando una o múltiples etapas de lavado. Cualquier agente de lavado conocido en la técnica puede ser utilizado para las etapas de lavado y puede incluir, pero no se limita a, solución salina, PBS, FBS, dH₂O, medio o agentes de lavado similares que son conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, las células se lavan tres veces para retirar las células no adherentes.

Después del lavado, las células adherentes se separan del sustrato de poli-L-lisina usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, se separan las ABMC aisladas del sustrato recubierto de poli-L-lisina incubando el sustrato en presencia de Accutase. En ciertas realizaciones, las células se elevan por incubación con Accutase a 37°C durante 5 min. Sin embargo, la presente invención no está limitada de este modo y también se contemplan procedimientos similares de elevación de células adherentes o procedimientos conocidos en la técnica.

Las células dentro de la subpoblación aislada de las ABMC son positivas para uno o más grupos de marcadores de superficie de células de diferenciación (CD) que son indicativas del potencial de diferenciación de linajes múltiples, en particular la diferenciación neural. Dichos marcadores pueden constar de, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 y CD271. En ciertas realizaciones, las ABMC de la presente invención no pueden exhibir expresión de CD14, CD34, CD38 y CD45. La presencia o ausencia de estos marcadores de superficie de células CD puede identificarse usando uno o más procedimientos conocidos en la técnica. En una realización, tal procedimiento incluye citometría de flujo después de la incubación durante 2 - 72 horas. También se pueden emplear inmunoensayos generales conocidos en la técnica para la identificación de marcadores de superficie celular y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Con este fin, tanto los anticuerpos policlonales como monoclonales pueden usarse en los ensayos. Cuando sea apropiado, pueden usarse otros inmunoensayos, tales como ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y radioinmunoensayos (RIA), como son conocidos por los expertos en la técnica. Los inmunoensayos disponibles se divulgan ampliamente en la literatura científica y de patentes. Véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 3.791.932;

3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521, así como Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor, N.Y (1989).

5 Antes de la administración, se prefiere que las ABMC se manipulen mínimamente desde la forma originalmente aislada en que se minimiza o se evita completamente su exposición a las condiciones ambientales y/o al medio que provocan la diferenciación.

10 Las ABMC de la presente invención se pueden administrar al paciente en o aproximadamente en el sitio de la lesión /daño. El modo de administración de las células puede variar dependiendo de diversos factores incluyendo el tipo de lesión/enfermedad que se está tratando, la edad del mamífero, si las células se diferencian, si las células tienen ADN heterólogo introducido en el mismo y similares. En la presente memoria se proporciona un ejemplo de administración de las células en el tejido espinal en la sección de Ejemplos experimentales. En ese ejemplo, las células se introducen en el líquido cefalorraquídeo del mamífero en forma intratecal cerca del sitio de una lesión de la médula espinal. Con este fin, se pueden introducir las células en el sitio deseado mediante inyección directa, tal como una inyección intratecal, mediante punción lumbar en el líquido cefalorraquídeo del paciente en o cerca del sitio de la lesión.

15 Sin embargo, la presente invención no se limita necesariamente a inyección intratecal o a una metodología de este tipo. En realizaciones alternativas, donde la lesión del nervio es en un nervio periférico, tal como la lesión en el nervio mediano asociado con el síndrome del túnel carpiano, las células pueden ser administradas por sonografía guiada local aplicada a la raíz del nervio periférico. Las células también pueden administrarse a un sitio próximo o dentro de la misma región corporal de la lesión y se permite que se infundan en el sitio de la lesión usando uno o más procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, con respecto a la administración a un sitio en el cerebro, las células se pueden administrar por vía intratecal, o bien usando uno o más de los procedimientos de la presente invención, y se les permite infundirse en el tejido dañado del cerebro.

25 Cuando sea necesario, las células pueden estar equipadas con uno o más grupos anexados, por ejemplo péptidos u otros agentes biológicos, facilitando el transporte a través de la barrera hematoencefálica. De nuevo, los procedimientos anteriores no son limitativos de la invención y las células pueden administrarse en un huésped por cualquier procedimiento siempre y cuando se puedan infundir las células de manera segura y ciertamente, tal como, pero sin limitarse a, en forma intravascular, en forma intracerebral, en forma parenteral, en forma intraperitoneal, en forma intravenosa, en forma epidural, intraespinal, en forma intraesternal, intraarticular, intrasínovial, intracerebral, intraarterial, intracardiaca o intramuscular. El trasplante de las células de la presente invención utilizando cualquiera de los modos anteriores, u otros modos similares conocidos en la técnica, también se pueden lograr usando técnicas proporcionadas en la presente memoria o conocidas en la técnica.

35 Las ABMC se usan generalmente para el trasplante como una composición en forma de suspensión en solución salina fisiológica, agua destilada, fluido espinal o similar. En una realización, por ejemplo, la composición está formada por las ABMC suspendidas en aproximadamente 150 µl de solución salina. De nuevo, la presente invención no está necesariamente limitada a esta composición y las ABMC también pueden formularse en una composición adecuada para administración como una suspensión en un regulador apropiado tal como PBS o bien dentro de un líquido farmacéuticamente aceptable. Las ABMC también pueden ser crioconservadas en solución salina fisiológica, y reconstituidas por suspensión en un disolvente anterior antes de su uso. El procedimiento de aislamiento y conservación de las ABMC y la preparación de una composición son conocidos por un experto en la técnica en relación con el trasplante de células. Tal composición de las ABMC es útil cuando es difícil obtener las ABMC en forma autóloga del paciente.

45 Como se indica en la presente memoria, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de células al paciente para tratar el nervio traumático o degenerativo o la lesión cerebral. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de células necesaria para provocar remielinización y/o regeneración axonal del tejido neural dañado en un sitio de lesión o bien reparar el nervio dañado o el tejido cerebral. Esto, a su vez, puede facilitar una mejor coordinación motora y/o una reducción de la afección neurodegenerativa objetivo. En una realización no limitante, entre aproximadamente 10^4 a 10^7 de las ABMC/kg del sujeto se administran al paciente como una cantidad terapéuticamente eficaz. En una realización adicional, y como se ejemplifica en los Ejemplos a continuación, una dosificación terapéuticamente efectiva puede ser de aproximadamente 2×10^6 ABMC/kg del sujeto.

55 La composición que contiene ABMC de la presente invención se puede administrar a un paciente con una lesión nerviosa o cerebral tan pronto como sea posible después de la lesión. Sin embargo, tal como se ilustra en los Ejemplos siguientes, un experto en la técnica comprenderá que la temporización del tratamiento o similar la determina generalmente un médico y no limita necesariamente a la presente invención. Con este fin, un paciente puede ser tratado en una etapa posterior dependiendo de sus condiciones y de otros factores.

Se puede proporcionar una dosificación terapéuticamente eficaz al paciente como administración única o múltiples

administraciones. En este último caso, la cantidad terapéuticamente eficaz puede dividirse entre múltiples administraciones, tales como entre 2 y 8 administraciones separadas. Dicha administración puede ocurrir sucesivamente durante un período de varios días o como administraciones discretas recibidas diariamente, semanalmente, mensualmente, etc. De nuevo, un experto en la técnica entenderá que el momento del tratamiento y/o el número de administraciones pueden ser determinados generalmente por un médico y no es necesariamente limitante para la presente invención.

La composición de las ABMC también puede contener cualquier aditivo farmacéuticamente aceptable siempre y cuando no afecte adversamente la acción o diferenciación de las ABMC. Por ejemplo, cuando un paciente es tratado con las ABMC recolectadas de una fuente exógena, se pueden administrar preliminarmente uno o más inmunosupresores conocidos. Los inmunosupresores se pueden seleccionar de los que se usan generalmente en el trasplante de médula o de órganos, tales como, pero sin limitarse a, ciclosporina, hidrato de tacrolimus (FK506), ciclofosfamida, azatioprina, mizoribina y metotrexato. La dosis de inmunosupresor puede determinarse apropiadamente considerando los tipos de fármaco, el origen de las ABMC que se van a administrar, la tolerancia del paciente y similares.

La presente invención es ventajosa por contribuir a la regeneración axonal y remielinización en un sitio de lesión de la médula espinal, o reparación de otros sitios nerviosos o cerebrales dañados (por ejemplo, daño nervioso periférico, daño cerebral, etc.). Con respecto a los pacientes que sufren de una lesión de la médula espinal, es decir, parálisis motora o pérdida sensorial, el trasplante de ABMC, particularmente cuando se combina con el entrenamiento funcional por fisioterapia, son promotores eficaces de la regeneración axonal y remielinización e induce reparación después de SCI. Como se ejemplifica a continuación, las ABMC incluyen o dan como resultado la producción de una o más células formadoras de mielina, células precursoras de astrocitos, astrocitos, células progenitoras neuronales, células precursoras de oligodendrocitos, células oligodendrocíticas, axones mielinizados, neuronas maduras y similares. Con este fin, se descubrió que las células recién formadas eran positivas para uno o más marcadores asociados con estos tipos de células tales como, pero sin limitarse a, NF70, Nestina, PDGFR, GFAP o TuJ1. También se observó la regeneración de las fibras del tracto corticoespinal y fue acompañada de una mejoría funcional.

Sin pretender estar limitado por la teoría, se supone que la regeneración axonal probablemente desempeña un papel principal, ya sea directamente o a través del reclutamiento de células progenitoras neurales de la cresta neural del cerebro que maduran en células de Schwann o células madre de tejido de la médula espinal en la región endodermal alrededor del canal central. En las ejemplificaciones a continuación, esta región fue donde se encontró el mayor número de células derivadas de ABMC, junto con marcadores colocalizados del progenitor residentes en la médula espinal. La ABMC también produce factores neurotróficos y mediadores antiinflamatorios que soportan el tejido de la médula espinal huésped creando nuevas vías neuronales en los tejidos fibrosos de la cicatriz o expandiendo el brote o generando fibras neuronales regeneradas cortas. Además, la ABMC puede proporcionar una guía para la conexión a los extremos distal y proximal del tejido nervioso, y facilitar la regeneración de las células trasplantadas.

La lesión de la médula espinal y de un nervio periférico y la lesión cerebral no se limitan necesariamente a lesiones físicas y pueden también estar asociadas con un estado de enfermedad. Por consiguiente, también se puede contemplar el uso de las ABMC para su uso en el tratamiento de estados patológicos neurodegenerativos. Por ejemplo, entre los recién nacidos y los niños, las células pueden usarse para el tratamiento de una serie de enfermedades genéticas, incluyendo, pero no limitándose a, la enfermedad de Tay-Sachs y la enfermedad relacionada de Sandhoff, el síndrome de Hurler y la mucopolisacaridosis y la enfermedad de Krabbe. Con respecto a las enfermedades adultas del SNC, las células de la presente invención son útiles para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington, epilepsia y similares. Otras enfermedades neurodegenerativas incluyen, pero no se limitan a, complejo de demencia por SIDA; enfermedades desmielinizantes, tales como esclerosis múltiple y mielitis transferasa aguda; trastornos extrapiramidales y cerebelosos, tales como lesiones del sistema corticoespinal; trastornos de los ganglios basales o trastornos cerebelosos; trastornos del movimiento hiperkinético, tales como corea de Huntington y corea senil; trastornos del movimiento hipocinético; parálisis supranuclear progresiva; lesiones estructurales del cerebelo; degeneraciones espinocerebelares, tales como ataxia espinal, ataxia de Friedreich, degeneraciones corticales cerebelares, degeneraciones de sistemas múltiples (Mencel, Dejerine Thomas, Shi- Drager y Machado-Joseph), trastornos sistémicos, tales como la enfermedad de Ruffum, abetalipoproteinemia, ataxia, telangiectasia; y trastorno multisistémico mitocondrial; y trastornos de la unidad motora, tales como atrofia muscular neurogénica; Síndrome de Down en la edad media; enfermedad difusa por cuerpos de Lewy; demencia senil del tipo de cuerpos de Lewy; síndrome de Wernicke-Korsakoff; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; panencefalitis esclerosante subaguda; enfermedad de Hallerorden-Spatz; y demencia pugilística. Véase, por ejemplo, Berkow y colaboradores, (eds.) (1987), The Merck Manual, (15ª edición), Merck and Co., Rahway, N.J..

Los siguientes ejemplos no limitativos expuestos a continuación ilustran ciertos aspectos de la invención.

Ejemplos

Materiales y Procedimientos: Aislamiento y cultivo de células de BM adherentes caninas (cABMC)

Todos los aspectos del cuidado y tratamiento de los animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del NIH y las directrices del comité de cuidado de los animales. Las ABMC se aislaron de los fémures de perros adultos. En resumen, se aislaron las células mononucleares de baja densidad utilizando Ficoll-Plaque Plus (Amersham Biosciences), y se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), bajo en glucosa suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS), con 2 mg/mL de L -glutamina (Gibco) y penicilina-estreptomicina al 0,3% (Gibco) a 37°C y concentración de CO₂ al 5%. Se sometieron las ABMC a citometría de flujo para determinar la pureza como lo describe Pittenger, M.F. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. Science 284, 143-7 (1999). La marcación con GFP *in vitro* se realizó mediante la adición del plásmido pCMV-AcGFP mezclado con Lipofectamina en proporción de 2:1 para cada placa y se incubó a 37°C durante 6 h antes del trasplante.

Aislamiento y cultivo de ABMC humanas (hABMC)

Se aislaron ABMC humanas usando aspirados de médula ósea de la cresta ilíaca de pacientes con SCI. Las muestras se obtuvieron después de firmar un consentimiento informado. Las células se diluyeron 1:1 con RPMI-1640 y se colocaron en capas sobre 15 mL de Ficoll-Plaque Plus en tubos de 50 mL y se centrifugaron durante 30 min a 800 g a temperatura ambiente. La interfase celular se diluyó hasta aproximadamente 15 mL con medio y se centrifugó durante 10 min a 400 g. Después de descartar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 1 mL de medio. Se contaron las células nucleadas, se suspendieron a una densidad de 2×10^5 células/cm² sobre placas recubiertas con poli-L lisina en medio estándar que contenía α -MEM suplementado con 2 mg/mL de L-glutamina, de antibiótico Antimicótico 1% y FBS al 10% (v/v) precubado seleccionado inactivado sin calor.

Las células se incubaron durante 3 días, y se retiraron las células no adherentes reemplazando el medio con tres etapas de lavado. Se aumentaron las células mediante incubación con Accutase a 37°C durante 5 min. Para la expansión para generar las MSC para comparación, e inducción neural, se prepararon ABMC como se describió anteriormente. Las células expandidas se dejaron crecer durante 12-16 días antes de que fueran pasadas y sembradas nuevamente en placa en una proporción de 1:4. La diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica se realizó como se describe en Pittenger, M.F. y colaboradores. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. Science 284, 143-7 (1999). Las ABMC fueron analizadas mediante citometría de flujo después de tinción con CD45-PC7, CD44-FITC, CD34-PE, CD73-PE, CD105-PE, CD106-PE, CD166-PE y CD271-PE (todos de BD Biosciences).

Inducción neuronal

La diferenciación neuronal se realizó como se describe en Arnholt, S. y colaboradores. Human Bone Marrow Sroma Cells Display Certain Neural Characteristic and Integrate in the Subventricular Compartment After Injection into the Liquor System. Eur. J. Cell. Biol. 85, 551-65 (2006), con modificación. La inducción de neuroesfera se realizó mediante cultivo en DMEM libre de suero suplementado con medio B27 al 2% (v/v) (Invitrogen) y los factores de crecimiento EGF (20 ng/mL, R&D Systems), β FGF (20 ng/mL) y heparina (5 mg/mL). La inducción neural se realizó utilizando células individuales preparadas por Accutase y se sembraron en placa con una densidad de 2000 células/cm² en DMEM/F12 libre de suero, con DMSO al 2% y forskolina 1 mM. Las células se mantuvieron bajo estas condiciones durante cuatro días y luego se analizaron mediante microscopía de inmunofluorescencia.

Modelo canino de lesión grave de la médula espinal

Se utilizaron dieciséis perros mestizos adultos sanos que pesaban $3,77 \pm 0,59$ Kg para el estudio experimental con lesiones de médula espinal. Todos los aspectos del cuidado y tratamiento de los animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del comité de cuidado de animales de la Universidad de El Cairo. Los perros anestesiados (pentobarbital sódico, 40 mg/kg) recibieron una lesión grave de la médula espinal (SCI) a nivel de L4 como se describe en el modelo de gato de Young, W. y colaboradores. Effect of High-dose Corticosteroid Therapy on Blood Flow, Evoked Potentials, and Extracellular Calcium in Experimental Spinal Injury. J. Neurosurg. 57, 667-73 (1982), con modificaciones. Brevemente, después de la laminectomía L4, se abrió la duramadre y se cortó la médula espinal. Los extremos cortados de la médula se retrajeron típicamente aproximadamente 3 mm y se inspeccionaron bajo un microscopio quirúrgico para asegurar la transección completa. El cuidado postoperatorio incluyó que los perros se mantuvieran calientes, y se les administró evacuación manual de la vejiga dos veces al día y antibióticos profilácticos. Los perros no tuvieron dificultad en la alimentación.

Los perros fueron asignados, en forma imparcial, a cuatro grupos de acuerdo con el tratamiento después de la SCI. El trasplante de las ABMC caninas se realizó una semana después de la SCI. Los perros fueron anestesiados usando los mismos procedimientos descritos anteriormente. El grupo de control no recibió ningún trasplante celular

después de la lesión. En los tres grupos que recibieron ABMC no manipuladas o ABMC inducidas para diferenciación neural durante 24 horas, o durante 72 horas, se inyectaron las células suspendidas en 150 µL de solución salina en el CSF por punción lumbar. La evaluación del comportamiento de la recuperación funcional de la extremidad posterior se realizó mediante grabación de vídeo. Cada perro fue grabado en video desde los costados y el lomo durante un mínimo de 10 pasos. Usando un sistema de puntuación de 15 puntos, se le dio puntaje al modo de andar de cada perro a partir de las cintas de video por parte de investigadores en forma ciega con respecto al tipo de tratamiento, y se registraron las puntuaciones medias al inicio, un día después de la CSI y a las 4, 8, 12 y 16 semanas después de la SCI.

Inmunotinción

Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% y se almacenaron en PBS a 4°C hasta que se tiñeron. Para evaluar los cambios histopatológicos, todos los perros fueron sacrificados a las 16 semanas después de la terapia celular. Los perros fueron perfundidos con PBS y paraformaldehído al 4%, y las médulas espinales de T10 a L5 se fijaron en formalina neutra tamponada al 10%, sumergidas en una solución descalcificante. Las secciones se embebieron en parafina y se cortaron secciones axiales de 4 µm de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), o Luxol fast blue para identificar mielina, o se usaron para análisis de fluorescencia. Las zonas mielinizadas y los volúmenes de las cavidades del epicentro de la médula espinal dañada se calcularon a partir de imágenes de las secciones transversales utilizando el software de análisis de imágenes AxioVision (Zeiss). La sección se identificó con la mayor área de cavitación, y esta área se midió para cada perro, y se expresó como la media ± SEM del control de los perros tratados con la terapia celular. Para la inmunofluorescencia, las secciones se procesaron las secciones sin parafina a través de la recuperación del antígeno durante 2 min, y luego se tiñeron con anticuerpos específicos apropiados para la reactividad cruzada canina.

Los anticuerpos primarios fueron anti-GFP monoclonal, Clontech (1:100); anti-GFAP policlonal, Dako (1:500); Tubulina anti-β-III monoclonal, Chemicon (1:200); anti-PDGFRα policlonal, Chemicon (1:80); anti-GAD6 monoclonal, Abcam (1:500); anti-Nestina policlonal, LifeSpan (1:100); anti-acetilcolinesterasa monoclonal AE-1, Millipore (1:50); anti-neurofilamento monoclonal de 70 kDa, Millipore (1:50); anti-A2B5 monoclonal, Millipore (1:100); y anti-GRM1 monoclonal, BD (1:100). Se utilizaron un kit de peroxidasa ABC y diaminobencidina reforzada con CoCl₂ (DAB) como cromógeno para tinción de la proteína básica mielina. Para microscopía fluorescente, se emplearon anticuerpos secundarios marcados con colorantes Alexa Fluor 488, 535 y 610 (Invitrogen). El área objetivo escogida para calcular los valores de GFP, nestina, PDGFR, TuJ1 y NF70 usando 100 cuadrados con un área superficial de 0,01 mm², cada uno utilizado para el conteo. Los valores se presentan como la media ± SEM. Un patólogo que no conocía el tipo de terapia, realizó todos los exámenes histológicos.

Trasplante en humanos

Se evaluaron pacientes elegibles para SCI, y se seleccionaron 159 pacientes para el cribado inicial. Se incluyeron 80 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión (50 SCI torácicas y 30 SCI cervicales) y se asignaron al azar a los dos grupos de control y terapia celular y ambos grupos recibieron terapia física estándar programada en el centro independiente de fuerzas militares para medicina física, rehabilitación y reumatología. Después de la admisión formal al ensayo y de la firma de un consentimiento informado detallado, todos los participantes en el grupo de trasplante fueron sometidos a aspiración de médula ósea bajo anestesia local para producir ABMC. Los aspirados se tomaron de la región ilíaca y se colocaron inmediatamente en un recipiente estéril en medio de cultivo frío y todo el procesamiento subsiguiente se realizó como se describió anteriormente en condiciones clínicas asépticas completas en el centro de células madre del hospital de la Universidad de El Cairo. Los pacientes recibieron una dosis celular acumulativa de 2×10^6 células/kg, el número de células ABMC y la viabilidad se evaluaron después de 72 horas de adherencia, y el procedimiento se repitió mensualmente hasta que se alcanzó esta dosis objetivo (la media fue de 4 inyecciones, el intervalo fue de 1-8 inyecciones).

Datos y análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como la media ± SEM. Los datos continuos se compararon mediante ANOVA de un factor seguido por la diferencia mínima significativa protegida de Fisher (PLSD) entre todos los grupos. Para el análisis cuantitativo de las células GFP trasplantadas en la médula espinal, se cortaron quince secciones transversales de cada médula espinal de perro con un espesor de 4 µm, separadas por 150 µm. Se contaron todas las células en cada sección con un promedio de 6 µm de diámetro. Se examinaron tres secciones de médula espinal por anticuerpo para las células doblemente positivas, y se contaron cuatro regiones por sección. Las áreas de cavitación se compararon entre los grupos de control y de terapia celular usando la prueba t de Student. Para las pruebas funcionales, las diferencias en las puntuaciones locomotoras entre los perros trasplantados y los controles se analizaron en cada punto de tiempo utilizando mediciones repetidas ANOVA. La significancia estadística se determinó en los niveles de $P < 0,05$.

Ejemplo 1 - Diferenciación *in vitro* de ABMC

Se aislaron seis muestras de BM canina y se cultivaron durante 72 horas sobre poli-L lisina bajo un protocolo aprobado. Se encontró que las ABMC caninas separadas a las 72 horas expresaban CD44, CD73, CD105, CD166, CD271, pero no tenían expresión o era despreciable para CD34, CD38 y CD45. Las ABMC caninas tenían una morfología oblonga plana (Fig. 5A) con un número limitado de células tipo fibroblastos que predominaron en el cultivo tradicional de MSC expandidas. Las ABMC caninas (Figura 5A) se transfectaron con plásmido que expresa GFP con una eficiencia de cerca del 90% (Figura 5B). Estas células conservaban su potencial pluripotencial y podían ser inmediatamente y potentemente inducidas a adipocitos, osteocitos y condrocitos (Fig. 5E-G). El cultivo de estas células en el medio de inducción neuronal, similar a las células humanas, dio lugar a la formación de neuroesferas, y los cambios morfológicos con mayor expresión de Nestina asociada con fenotipos neuronales (Fig. 5C, G-I).

A continuación se evaluó el potencial de diferenciación de linajes múltiples de ABMC a partir de 10 muestras de BM humanas cultivadas en matraces recubiertos con poli-L lisina durante 72 horas. Los análisis de citometría de flujo a las 72 horas revelaron que las ABMC humanas son > 90% positivas para CD90, CD105, CD166, CD271, pero no tenían expresión de CD34, CD45 y CD14. En comparación con la inducción tradicional en 2-3 semanas, las ABMC humanas pudieron ser inducidas en forma potente para diferenciación del triple linaje mesodérmico en adipocitos, osteocitos y condrocitos (Fig. 6A-C) en una semana. La inducción neuronal resultó en cambios morfológicos consistentes con la diferenciación neural (Fig. 6D-F), con morfología oligodendroglial típica en células que elaboran múltiples dendritas primarias (Fig. 6F), y con mayor potencia en comparación con células cultivadas expandidas del mismo paciente (Fig. 7I).

Las cantidades de neuroesferas generadas a partir de ABMC (n = 12 realizadas en placas de 6 pozos por triplicado) fueron ligeramente superiores pero no significativamente diferentes de aquellas neuroesferas generadas a partir de las mismas MSC de los pacientes que se expandieron en cultivo durante 6-8 semanas. Sin embargo, en comparación con MSC expandidas en cultivo, las ABMC pudieron ser inducidas en forma más potente para los tejidos precursores neurales residentes en la médula espinal como se demostró mediante inmunoreactividad sobrerregulada para la Nestina marcadora precursora de astrocitos (Figura 7C), el marcador precursor de oligodendrocitos, el receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- α) (Fig. 7G), y el marcador precursor neuronal, epítipo J1 de β -tubulina tipo III (TuJ1) (Figura 7H).

Los análisis cuantitativos de células inmunorreactivas del mismo paciente (n = 6 se hizo en placas de 6 pozos por triplicado) que fueron o bien inducidas para diferenciación neuronal inmediatamente o después de la expansión del cultivo, no revelaron una diferencia significativa en la expresión de Nestina, mientras que tanto PDGFR α como TuJ1 fueron significativamente mayores en ABMC que en las MSC expandidas en cultivo (Fig. 7I). Por lo tanto, estos estudios *in vitro*, aunque se realizaron en condiciones que no reflejan el comportamiento *in vivo* de las células trasplantadas, demuestran una ventaja para el uso de ABMC en comparación con MSC expandidas en cultivo.

Ejemplo 2 - Diferenciación *in vivo* de ABMC en modelo canino

Para establecer una estrategia de terapia celular en un modelo preclínico, se trasplantaron ABMC autólogas por vía intratecal en un modelo canino de SCI severa. Las contusiones severas en la médula espinal del perro realizadas en 16 perros similares al modelo 24 de SCI severo establecido en gatos, dieron como resultado una pérdida sensorial y parálisis del miembro posterior en todos los perros lesionados (n = 16) (Figura 1H). Una semana después de la lesión, los animales fueron divididos al azar en 4 grupos (n = 4/grupo), con el grupo A sirviendo como controles que no recibieron tratamiento celular. Los perros de los grupos B, C y D tuvieron BM aspirado de la cresta ilíaca y se aislaron las ABMC por adherencia a las placas durante 72 horas. Las células se transfectaron con plásmido que expresa GFP preparado como 2×10^6 ABMC/ Kg en 150 μ L de solución salina, y se inyectaron mediante punción lumbar. Los animales del grupo B recibieron ABMC no manipuladas. Para investigar si la diferenciación previa *in vitro* de ABMC para el linaje neural aumentó su potencial neural *in vivo*, los animales de los grupos C y D recibieron ABMC aisladas a las 72 horas de haber sido inducidas para diferenciación neural ya sea durante las últimas 24 horas (Grupo C) o para todas las 72 horas (Grupo D).

El rendimiento locomotor y la recuperación funcional de las extremidades posteriores se evaluaron cada 4 semanas durante 16 semanas después del trasplante usando un sistema de puntuación de 15 puntos de video grabación desarrollado para 25 SCI de canino. La función motora de las extremidades posteriores estaba intacta en todos los animales antes de la SCI, y todos tuvieron una puntuación de 14-15 puntos (Fig. 1H). Después de la lesión, los perros quedaron parapléjicos sin sensación de dolor profundo, y los puntajes de las extremidades traseras eran cero. No se midieron diferencias significativas (P = 0,75) entre los tres grupos de perros B, C y D, que recibieron ABMC no manipulada (n = 4) o ABMC inducida para la diferenciación neuronal ya sea durante 24 horas (n = 4) o 72 horas (n = 4). A diferencia de los 7 perros tratados de control del grupo A, los perros que recibieron trasplante autólogo de ABMC (n = 12) alcanzaron casi la recuperación máxima a las 8 semanas después del trasplante con recuperación significativa de su función motora a las 16 semanas (Fig. 1H y Tabla 1), y movimientos espontáneos mejorados de las extremidades posteriores (Fig. 1I) detectados en la primera semana, lo que sugiere los primeros

efectos neuroprotectores locales de las ABMC. A las 16 semanas después del tratamiento, se sacrificaron los perros y se fijaron las médulas espinales, y se analizaron por histología e inmunotinción. Las secciones de los perros de control mostraron una formación severa de vacuolas, en contraste con la cavitación mínima en las secciones tratadas con ABMC (Fig. 1A-C). La inmunotinción con anticuerpos anti-proteína básica mielina (MBP) reveló remielinización significativa en perros tratados con ABMC comparado con los controles (Fig. 1D-G). La tinción con MBP en secciones de ABMC alcanzó hasta el 85% de los niveles de MBP en médulas intactas (Fig. 1 D-G), lo que indica remielinización sustancial.

Tabla 1. Recuperación de la actividad locomotora después de la inyección de ABMC posterior a la SCI severa en perros

Puntaje de campo abierto (media + SEM)					
	Semana 1	Semana 4	Semana 8	Semana 12	Semana 16
Control (n=4)	1,9 + 0,1	2,2 + 1,2	3,6 + 2,1	3,8 + 0,6	3,5 + 0,8
ABMC (n=4)	1,7 + 0,2	8 + 2,5	11 + 0,9	11 + 1,4	11 + 2,2
ABMC + (24 h) (n=4)	1,8 + 0,3	8,9 + 2,1	10,9 + 0,8	12 + 1,2	11 + 1,9
ABMC + (72 h) (n=4)	1,9 + 0,1	8,7 + 1,8	9,9 + 1,2	12 + 1	12 + 1,8

Para investigar los mecanismos de remielinización y si el trasplante de ABMC mejora la regeneración de axones lesionados, se realizó inmunohistoquímica multicolor usando GFP como marcador para el ABMC trasplantado en asociación con los marcadores progenitores neurales residentes en la médula espinal. Se detectaron células positivas para GFP dentro de los límites de lesión SCI (Figura 2A), pero no en secciones de perros de control (Figura 8A-D). Numerosas células positivas para GFP se distribuyeron ampliamente desde el epicentro (figura 2B) y se encontraron en la sustancia gris y blanca de la médula espinal lesionada y se distribuyeron en la zona límite de la lesión, alrededor del canal central y en la sustancia gris contralateral (Fig. 2A), indicando que las células BM inyectadas por vía intratecal migraron rostralmente al sitio de la lesión. Las células derivadas de BM positivas para GFP y PDGFR se encontraron alrededor del canal central y asociadas con pequeños vasos dentro de la médula espinal (Fig. 9), que se desarrollaron posiblemente a través de neovascularización. Además, al menos el 30% de las células positivas para GFP en la materia gris también fueron positivas para el neurofilamento de 70 kDa (NF70), un marcador específico para las neuronas maduras (Figura 2A).

El funículo dorsal de la médula espinal consiste en gran parte de axones mielinizados. Se observó tinción intensa de GFP en el funículo dorsal con varias células con grandes límites nucleares y citoplasmáticos, indicando mielización periférica. En secciones de animales de control, las micrografías electrónicas demostraron axones desmielinizados, extensa formación de vacuolas y cicatrización glial en un ambiente extracelular libre de astrogliosis (Fig. 10). El análisis cuantitativo de la mielización central versus periférica en micrografías electrónicas de secciones de los perros trasplantados con ABMC demostró que los axones remielinizados son predominantemente de células que forman mielina de tipo periférico (Figura 11A-C). En los axones más pequeños (Fig. 11D-F) se observaron axones mielinizados oligodendrocitos con mielización central y vainas finas de mielina características en casi un tercio del total de los axones remielinizados.

Se encontró que estos axones remielinizados eran dualmente positivos para GFP y GFAP (Figura 2I), y se asociaron con astrocitos caracterizados por nucléolos multilobulares y grandes procesos intermedios ricos en filamentos que se extendían hasta múltiples axones remielinizados (Fig. 11). También se detectaron astrocitos y células formadoras de mielina derivadas de ABMC marcada con GFP en la lesión recuperada de la médula espinal. Además, se detectaron significativamente más axones positivos para GFP que expresan NF70 dentro de las secciones transversales de los tractos corticoespinales ventrales (Fig. 2C-F) en los perros tratados con ABMC, con expresión de GFP marcando claramente axones remielinizados (Fig. 8E-H, e inerte en la Fig. 2F), aunque no se detectó ninguno en los controles (Fig. 8A-D).

La regeneración de los tractos corticoespinales ventrales y laterales, que controlan los movimientos voluntarios, a partir de ABMC positivas para GFP sugiere una regeneración axonal más robusta dentro del sitio de la lesión en los perros trasplantados y revela la potencia de regeneración neural de ABMC, ya que estos tractos fueron tradicionalmente valorados como aquellos con menor capacidad de regeneración. Además, el predominio de los perfiles doblemente marcados de las células positivas para GFP que expresan los marcadores progenitores neurales coinciden con la diferenciación neural ávida en la materia gris y blanca. Las células positivas para GFP expresaron marcadores de los tejidos precursores neuronales residentes incluyendo el marcador progenitor neural Nestina en

aposiciones sinápticas de alta densidad (Fig. 2G), el marcador precursor de oligodendrocito PDGFR en aposiciones sinápticas de menor densidad (Fig. 2H), y el marcador precursor de astrocitos GFAP en haces nerviosos (Fig. 2I).

La ABMC positiva para GFP contribuyó al destino de la célula neural terminal, como se demostró mediante la detección de células positivas para GFP que se colocalizaron como se muestra por inmunoreactividad con marcadores neurotransmisores excitadores, inhibidores (GABA) y colinérgicos. Las células dualmente marcadas con GFP y ya sea el receptor glutamato metabotrópico excitador GRM1, la glutamato decarboxilasa inhibidora (GAD) como un marcador para señales GABAérgicas y se detectaron las señales de acetilcolinesterasa colinérgica (AE-1) (Fig. 2J) en la médula regenerada. Además, se observaron células positivas para GFP poco frecuentes que se colocalizaron como se muestra por inmunoreactividad con A2B5, un antígeno gangliósido presente en los precursores gliales comunes O-2A (Figura 2J) que tienen características de células madre neurales. Colectivamente, estos datos demuestran la regeneración neural derivada de ABMC dentro del microambiente de la médula espinal.

Para excluir la posible aparición de eventos de fusión como un mecanismo para la regeneración, se analizaron secciones de médulas espinales caninas que fueron sometidas a experimentos de injerto. Las células que expresan GFP con coloración nuclear DAPI se examinaron usando una sonda de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) del cromosoma 35 canino. Todas las células examinadas (n = 500) eran diploides (Fig. 12).

Ejemplo 3 - Diferenciación *in vivo* de ABMC en humanos

Los estudios preclínicos en el modelo canino de SCI severa revelaron que las ABMC autólogas trasplantadas en forma intratecal dirigida al sitio de la lesión, y que dio lugar a materia blanca y gris reemplazada, regeneración neuronal y axonal, neovascularización, proliferación de astrocitos con remielinización significativa y mejoramiento funcional en puntajes de locomoción, sin efectos secundarios detectados.

Estos datos nos llevaron a iniciar un ensayo clínico aleatorio de fase I / II para investigar la seguridad y la eficacia del trasplante intratecal autólogo de ABMC en pacientes con SCI de niveles cervical y torácico completos. Los criterios de selección (figura 3) incluyeron pacientes que habían completado al menos 6 meses de fisioterapia después de una lesión sin recuperación espontánea. Los pacientes estudiados fueron 9 mujeres y 71 hombres, de 16 a 45 años de edad. El período transcurrido desde su lesión osciló entre 12 y 36 meses con ASIA completa, una SCI traumática, niveles neurológicos entre C3 y T12 sin evidencia de mejoría neurológica durante al menos 6 meses y ausencia de enfermedades sistémicas concomitantes (Fig. 3). Durante el período de inscripción, se evaluaron 159 pacientes con SCI crónica completa. Un total de 80 pacientes se inscribieron después de firmar un consentimiento informado, en virtud de un protocolo aprobado por los comités de revisión de ensayos clínicos de la Universidad de El Cairo y la Universidad Al-Azhar.

Los pacientes fueron asignados al azar a dos grupos equilibrados: 50 pacientes; 40 con SCI torácica y 10 con CSI cervical fueron asignados a trasplante autólogo de ABMC en combinación con fisioterapia estándar, mientras que 30 pacientes correspondientes, 20 con SCI torácica y 10 con SCI cervical fueron asignados únicamente a fisioterapia estándar, como grupo de control. Los pacientes fueron evaluados antes del tratamiento con terapia celular para establecer las medidas basales. Tanto los pacientes tratados como los pacientes de control paralelo fueron monitoreados, y las mediciones de escala ASIA fueron realizadas por observadores en forma ciega durante el período del ensayo, en el centro independiente de las fuerzas militares para medicina física, rehabilitación y reumatología. Los riesgos asociados con la punción lumbar y las inyecciones celulares plantearon preocupaciones éticas significativas que limitaron la inclusión de un grupo de control inyectado en forma simulada.

Los pacientes fueron evaluados mediante exámenes clínicos para el desarrollo de dolor neuropático, quistes, siringomielia o sobrecrecimiento celular. Todos los pacientes trasplantados recibieron luego aspirados de BM, de los cuales se permitió que las células BM autólogas mínimamente manipuladas se adhirieran durante 72 horas (ABMC) en condiciones estériles en la Unidad de Células Madre del hospital de la Universidad de El Cairo. Antes del trasplante de ABMC, se verificaron muestras de fenotipo celular, viabilidad y esterilidad. Todos los 50 pacientes tratados con terapia de células ABMC autóloga por trasplante intratecal mediante punción lumbar recibieron una dosis acumulativa de células objetivo 2×10^6 células/kg, y el procedimiento se repitió mensualmente hasta que se alcanzó esta dosis objetivo (la media fue de 4 inyecciones, el intervalo fue de 1-8 inyecciones). Se examinaron las mediciones de los puntajes ASIA y FIM y SSEP, y se realizó la MRI de la médula espinal en todos los pacientes que consintieron y toleraron la MRI en la línea base antes del trasplante y cada seis meses durante 18 meses.

Los datos del ensayo fueron revisados regularmente por el comité de revisión del Ministerio de Salud egipcio y por un comité de revisión alemán independiente. Los 50 pacientes que recibieron terapia celular experimentaron efectos secundarios leves comunes con las punciones lumbares incluyendo dolor de cabeza (30 pacientes, 60%), dolor lumbar (5 pacientes, 10%), movimientos involuntarios (8 pacientes, 16%) y alteración de la visión (1 paciente, 2%). Todos los efectos secundarios mencionados fueron temporales y duraron de 12 horas a pocos días después de la punción lumbar, y se resolvieron completamente mediante tratamiento sintomático. Durante los 18 meses posteriores al trasplante, no se detectaron efectos secundarios a largo plazo en pacientes tratados con ABMC y ninguno de los pacientes tratados experimentó infección, pérdida de líquido cefalorraquídeo, dolor neuropático

adicional, deformidad espinal o desarrolló de masas visibles a través de las imágenes de MRI.

Todos los pacientes que recibieron terapia de ABMC autólogas además de fisioterapia estándar tuvieron una respuesta favorable y una mejora significativa en sus funciones neurológicas en comparación con los pacientes de control que solamente recibieron fisioterapia (Figura 4). Los pacientes tratados con ABMC autólogas tuvieron un aumento significativo en sus puntajes ASIA y FIM y recuperación de la función muscular electrofisiológica a los 6 meses después del trasplante (Fig. 4A-B).

A los 18 meses después del trasplante (Tabla 2), 20 pacientes con SCI torácica (50%) mostraron una escala ASIA mejorada del grado A hasta grado C, 15 pacientes (37,5%) mejoraron del grado A hasta grado B, mientras que 5 pacientes (12,5%) permanecieron en el grado A (los criterios detallados de pacientes con SCI torácica se enumeran en la tabla 3). Para los 10 pacientes con SCI cervical tratados con terapia celular ABMC, 2 pacientes (20%) mejoraron de grado A hasta grado C, 3 pacientes mejoraron de grado A hasta grado B y 5 pacientes permanecieron en grado A (los criterios detallados de pacientes con SCI cervical se enumeran en la tabla 4). Estos cambios se asociaron con la recuperación de la compresión y edema de la médula espinal (mostrados en la Fig. 4C en las imágenes de MRI de 6 paciente con una SCI cervical C6-C7 un año después del trasplante). Además, estos cambios se asociaron con actividades cotidianas mejoradas y mejoras significativas en la calidad de vida. Dos pacientes representativos: paciente 1 (con una SCI cervical C6) era tetrapléjico, y un paciente (con una SCI torácica T9) era hemipléjico antes de la terapia celular y ambos fueron capaces de caminar y recuperar la movilidad nueve meses a un año después de la terapia celular.

Independientemente de las mediciones de escala, todos los pacientes tratados con ABMC autólogas, incluyendo aquellos que permanecieron en el grado A de ASIA, notaron funciones neurológicas mejoradas tan pronto como 4-6 semanas después del trasplante. Los pacientes experimentaron una respuesta mejorada a los estímulos táctiles y sensoriales primero y después aumentaron la fuerza muscular que se observó primero en los músculos distales de las extremidades inferiores y luego en los músculos del muslo. Los pacientes con mejoría de grado ASIA mostraron mejores movimientos de tronco que les permitió sentarse y voltearse en la cama. Además, la mejora de la fuerza muscular se asoció un mejor desempeño sexual, y con mayor control intestinal del esfínter de la vejiga que permitió a estos pacientes vivir sin catéter. Estos efectos se reflejaron en la mejora de los niveles neurológicos y la FIM en los pacientes tratados con ABMC comparado con los controles (Fig. 4A y Tablas 3-4). Todos los pacientes mostraron SSEP no cortical antes del tratamiento, mientras que el 65% de los pacientes tratados con ABMC pero ninguno de los pacientes de control mostraron reaparición del impulso cortical (Fig. 13) a los 6 meses a un año después del trasplante. Por lo tanto, la terapia con células ABMC autólogas mejoró significativamente las funciones motoras y sensoriales en pacientes con SCI crónica completa.

Tabla 2. Respuesta clínica en todos los pacientes con SCI a los 18 meses posteriores al tratamiento

Respuesta clínica	Fisioterapia estándar		Fisioterapia estándar + ABMC	
	SCI cervical (n=10) Nº de pacientes (%)	SCI torácica (n=20) Nº de pacientes (%)	SCI cervical (n=10) Nº de pacientes (%)	SCI torácica (n=20) Nº de pacientes (%)
COMPLETO				
(ASIA escala A a E)	Ninguno en todos los grupos			
PARCIAL				
(ASIA escala A a D)	Ninguno en todos los grupos			
(ASIA escala A a C)	Ninguno	Ninguno	2(20)	20(50)
(ASIA escala A a B)	1(10)	3(15)	3(30)	15(37,5)
SIN RESPUESTA				
(ASIA escala A permanece A)	9(90)	17(85)	5(50)	5(12,5)

Tabla 3. Demografía de pacientes con SCI torácica, tratamiento y resultado clínico 18 meses después de la terapia. PT, fisioterapia; ITC, terapia celular intratecal con ABMC; Inj., número de inyecciones de BM; FIM, mediciones de independencia funcional

Pt. #	Edad/ Sexo	Nivel de SCI	Inj. de BM	Terapia	Puntaje ASIA		Puntaje FIM		Pt. #	Edad/ Sexo	Nivel de SCI	Inj. de BM	Terapia	Puntaje ASIA		Puntaje FIM	
					Antes/Después	Antes/Después	Antes/Después	Antes/Después						Antes/Después	Antes/Después	Antes/Después	Antes/Después
1	18/M	T4	5	PT+ITC	76 / 171	6 / 52			31	17/M	T6	6	PT+ITC	132 / 212	11 / 52		
2	16/F	T8	3	PT+ITC	112 / 208	11 / 54			32	20/M	T7	5	PT+ITC	105 / 172	7 / 31		
3	36/M	T8	3	PT+ITC	112 / 216	7 / 53			33	30/F	T6	3	PT+ITC	112 / 203	7 / 47		
4	23/F	T12	1	PT+ITC	168 / 206	6 / 26			34	45/M	T12	2	PT+ITC	168 / 206	6 / 27		
5	40/M	T10	3	PT+ITC	148 / 218	18 / 56			35	32/M	T10	3	PT+ITC	148 / 192	18 / 45		
6	38/M	T10	5	PT+ITC	144 / 221	5 / 52			36	23/F	T4	5	PT+ITC	144 / 206	13 / 52		
7	32/M	T6	5	PT+ITC	104 / 185	24 / 42			37	35/M	T5	5	PT+ITC	104 / 185	24 / 42		
8	28/F	T8	6	PT+ITC	132 / 221	13 / 52			38	37/M	T6	6	PT+ITC	132 / 221	13 / 52		
9	32/M	T6	5	PT+ITC	104 / 162	10 / 30			39	41/M	T5	5	PT+ITC	104 / 162	10 / 30		
10	27/M	T4	4	PT+ITC	76 / 171	6 / 52			40	19/M	T4	4	PT+ITC	76 / 171	6 / 52		
11	22/M	T6	5	PT+ITC	112 / 208	9 / 54			41	18/M	T6	-	PT	95 / 104	13 / 13		
12	27/F	T8	3	PT+ITC	112 / 216	7 / 53			42	34/M	T7	-	PT	112 / 115	15 / 15		
13	35/F	T12	6	PT+ITC	168 / 206	4 / 26			43	28/M	T5	-	PT	100 / 108	13 / 13		
14	25/M	T10	8	PT+ITC	148 / 218	18 / 56			44	26/M	T9	-	PT	154 / 159	11 / 11		
15	35/M	T10	3	PT+ITC	144 / 221	5 / 52			45	24/M	T10	-	PT	164 / 164	13 / 13		
16	25/M	T6	4	PT+ITC	104 / 185	22 / 42			46	37/M	T6	-	PT	145 / 147	11 / 11		
17	28/M	T8	6	PT+ITC	132 / 221	11 / 52			47	24/M	T12	-	PT	170 / 170	13 / 13		
18	26/M	T6	2	PT+ITC	104 / 162	8 / 30			48	18/M	T6	-	PT	154 / 162	13 / 20		
19	28/M	T7	5	PT+ITC	116 / 210	9 / 52			49	26/M	T9	-	PT	143 / 156	13 / 13		
20	30/M	T8	4	PT+ITC	76 / 171	6 / 52			50	25/M	T10	-	PT	95 / 95	15 / 15		
21	25/M	T11	6	PT+ITC	139 / 218	5 / 49			51	28/M	T6	-	PT	112 / 112	16 / 16		
22	21/F	T11	2	PT+ITC	163 / 205	4 / 25			52	27/M	T6	-	PT	146 / 146	12 / 12		
23	23/M	T7	6	PT+ITC	106 / 172	9 / 32			53	28/M	T9	-	PT	147 / 138	15 / 15		
24	32/M	T6	6	PT+ITC	76 / 172	6 / 48			54	32/M	T8	-	PT	104 / 95	11 / 11		
25	37/F	T8	4	PT+ITC	112 / 208	9 / 54			55	30/M	T8	-	PT	146 / 148	14 / 15		
26	33/M	T9	4	PT+ITC	112 / 216	7 / 50			56	21/M	T6	-	PT	146 / 146	13 / 13		
27	26/M	T12	1	PT+ITC	158 / 195	4 / 31			57	28/M	T5	-	PT	104 / 95	11 / 11		
28	23/M	T7	3	PT+ITC	150 / 210	17 / 54			58	31/M	T9	-	PT	112 / 114	11 / 20		
29	21/M	T10	5	PT+ITC	126 / 134	22 / 30			59	28/M	T10	-	PT	126 / 130	15 / 15		
30	19/M	T6	4	PT+ITC	104 / 210	22 / 45			60	27/M	T5	-	PT	112 / 128	13 / 16		

5

Tabla 4 Datos demográficos, tratamiento y evolución clínica del paciente con SCI cervical 18 meses después de la terapia. PT, fisioterapia; ITC intratecal ABMC terapia celular; FIM medida de independencia funcional.

Pt. #	Edad / sexo	Nivel de SCI	Inyecciones de BM	Terapia	Puntaje ASIA		Puntaje FIM	
					Antes/Después	Antes/Después	Antes/Después	Antes/Después
1	16/M	C8	5	PT+ITC	70/126		1/14	
2	26/M	C4	3	PT+ITC	59/109		3/14	
3	34/M	C5	2	PT+ITC	61/144		2/21	
4	19/M	C4	7	PT+ITC	60/110		4/12	
5	29/M	C3	1	PT+ITC	67/78		1/5	
6	37/M	C7	4	PT+ITC	79/171		1/18	
7	24/M	C6	3	PT+ITC	63/120		4/21	
8	18/M	C5	6	PT+ITC	50/92		3/20	
9	36/M	C4	3	PT+ITC	70/118		4/14	

ES 2 609 006 T3

Pt. #	Edad / sexo	Nivel de SCI	Inyecciones de BM	Terapia	Puntaje ASIA Antes/Después	Puntaje FIM Antes/Después
10	26/M	C7	4	PT+ITC	54/111	2/15
11	18/M	C6	-	PT	62/68	1/1
12	36/M	C4	-	PT	59/25	3/3
13	12/M	C5	-	PT	61/64	2/2
14	28/M	C7	-	PT	60/27	1/1
15	26/M	C3	-	PT	67/40	1/1
16	28/M	C7	-	PT	79/67	2/2
17	30/M	C8	-	PT	63/67	2/2
18	25/M	C8	-	PT	95/104	4/4
19	33/M	C6	-	PT	70/126	3/4
20	23/M	C6	-	PT	59/109	2/4

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende células madre adherentes de médula ósea suspendidas en un líquido farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de una lesión degenerativa o traumática en un tejido nervioso o en el cerebro, en la que dichas células se pueden obtener mediante:
 - (a) cultivar una muestra biológica que comprende células madre adultas de médula ósea sobre un sustrato recubierto con poli-L-lisina durante 2 a 72 horas, de manera que una capa de células madre de médula ósea se adhiere a dicho sustrato sin expandir las células en cultivo;
 - (b) lavar las células no adherentes de dicho sustrato y recoger las células madre adherentes de la médula ósea; y
 - (c) suspender las células madre adherentes de médula ósea en un líquido farmacéuticamente aceptable;y en la que dicho tratamiento comprende:
administrar dicha composición en o cerca del sitio de la lesión en una cantidad eficaz para provocar regeneración axonal o remielinización en el sitio de dicha lesión.
2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que dicha lesión traumática es una lesión de la médula espinal o una lesión de un nervio periférico.
3. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que dicha lesión es en el cerebro o médula espinal y dichas células de médula ósea se administran por inyección intratecal mediante punción lumbar en el líquido cefalorraquídeo en o cerca de dicho sitio de lesión y/o dicha lesión es de un nervio periférico y dichas células de médula ósea se administran mediante sonografía guiada por administración local a la raíz de dicho nervio periférico.
4. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que dicha lesión degenerativa es esclerosis lateral amiotrófica.
5. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que dichas células de médula ósea se derivan de aspirados de sangre del cordón umbilical o de la médula ósea.
6. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que entre aproximadamente 10^4 y aproximadamente 10^7 células de médula ósea/kg se administran acumulativamente a través de una o más inyecciones.
7. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que dichas células de médula ósea comprenden células positivas para uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 y CD271 y/o dichas células de médula ósea consisten esencialmente en células negativas para los marcadores CD34, CD38 y CD45.
8. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que dichas células de médula ósea provocan diferenciación, posterior a la administración, de un tipo celular seleccionado del grupo que consiste en una célula formadora de mielina, una célula precursora de astrocitos, un astrocito, una célula progenitora neural, una célula precursora de oligodendrocitos, una célula de oligodendrocito, un axón mielinizado y una neurona madura.
9. La composición para el uso de la reivindicación 8, en la que dichas células de médula ósea provocan diferenciación, posterior a la administración, de al menos uno de un tipo celular positivo para NF-70, células progenitoras de astrocitos que expresan Nestina, células precursoras de oligodendrocitos que expresan PDGFR- α , o un precursor de astrocitos que expresa GFAP.

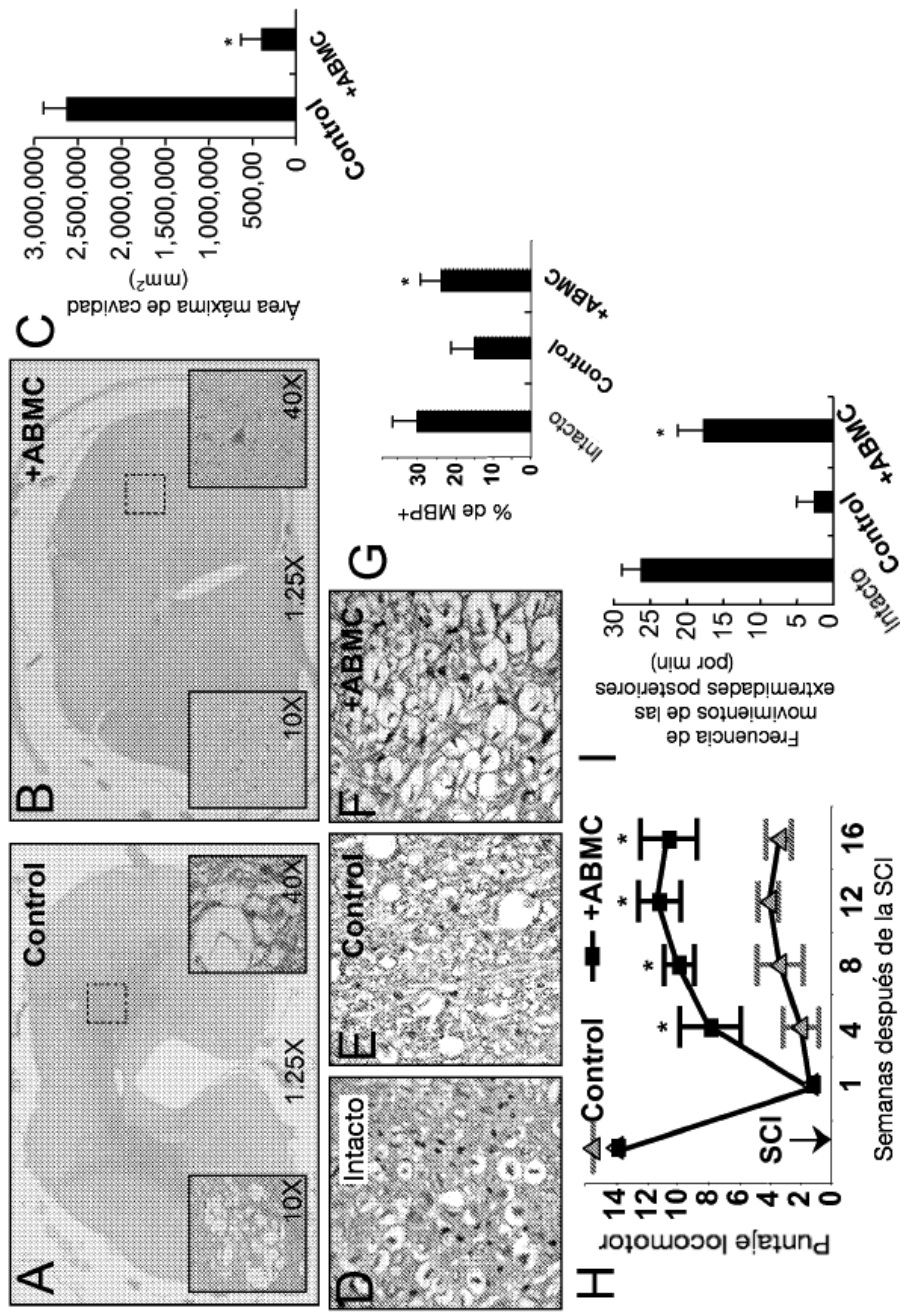


Figura 1

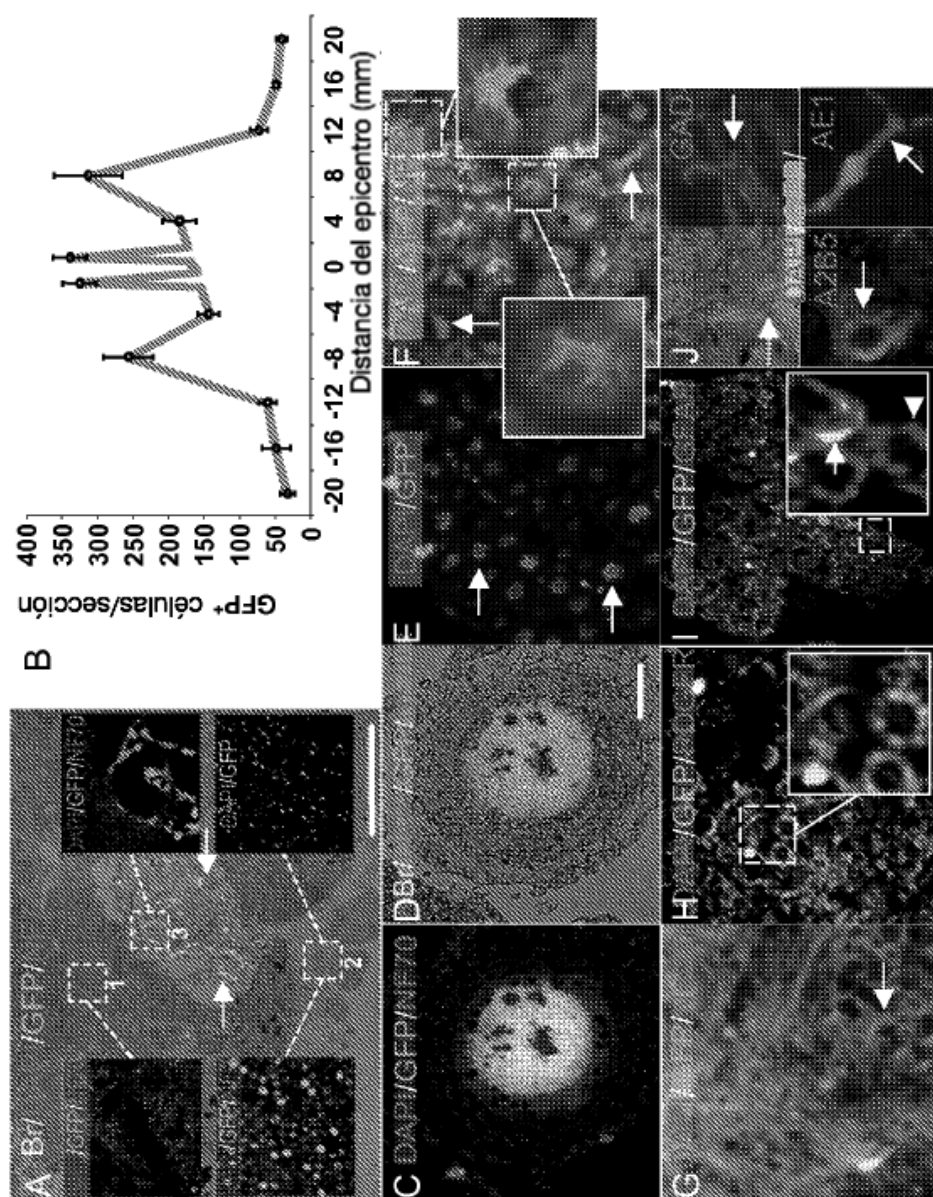


Figura 2

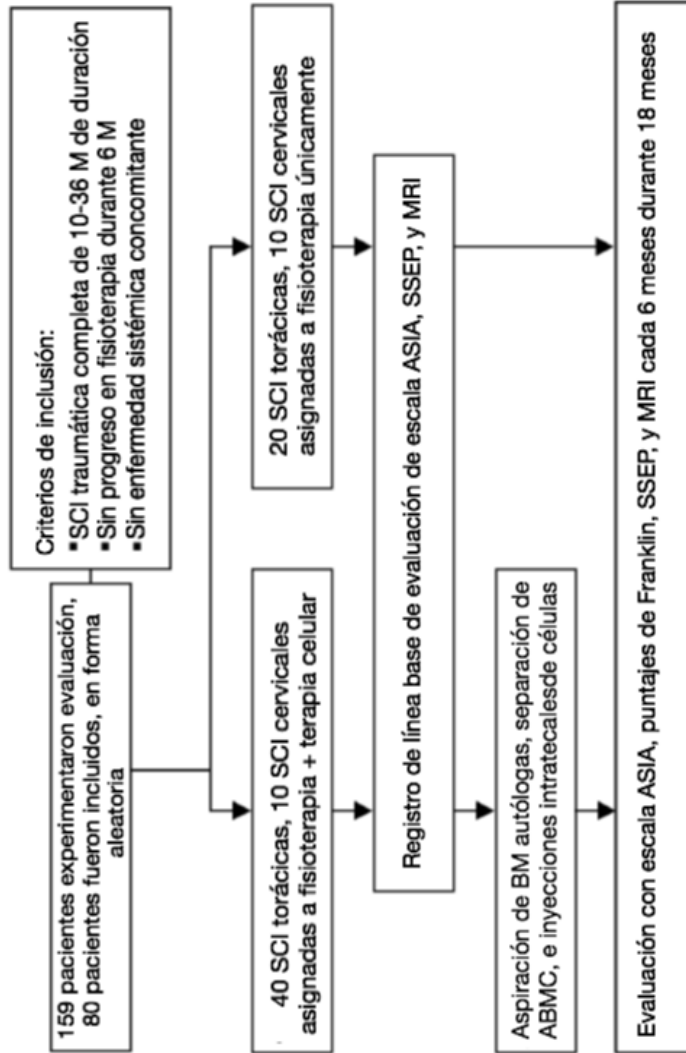


Figura 3

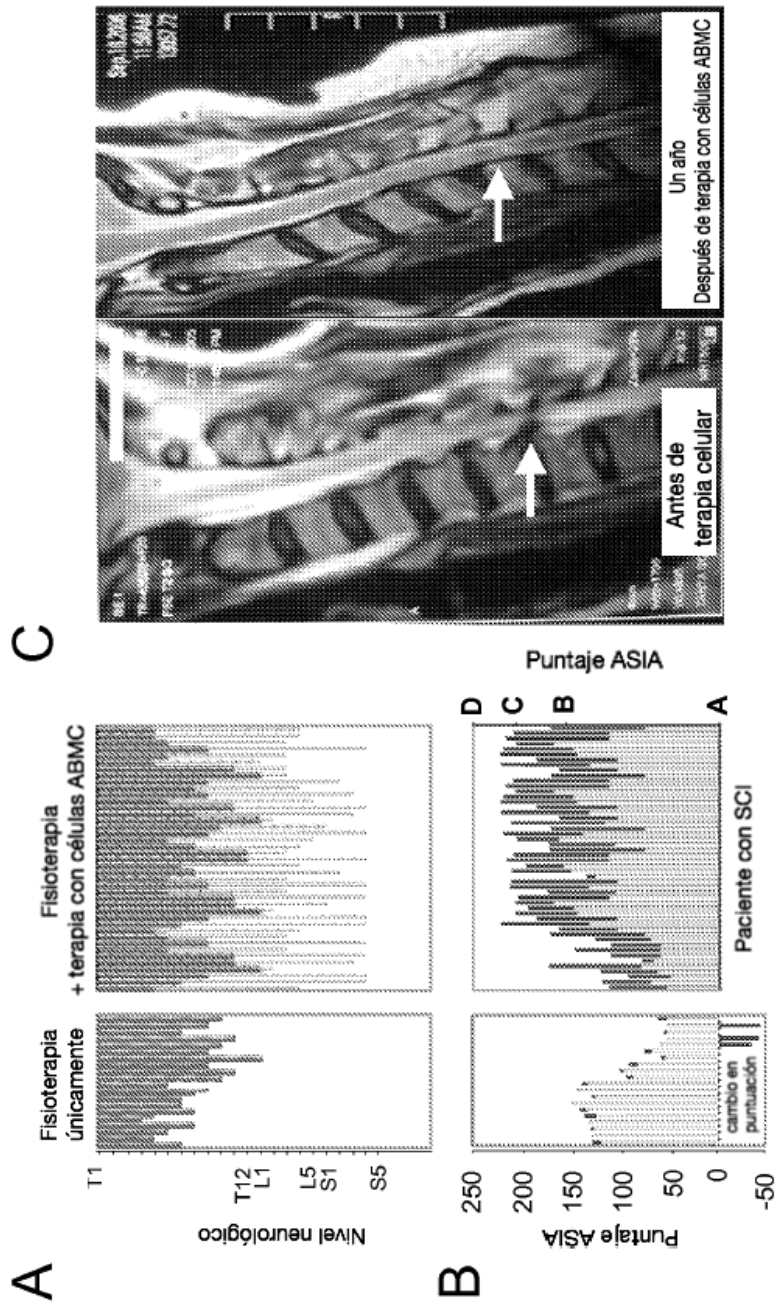


Figura 4

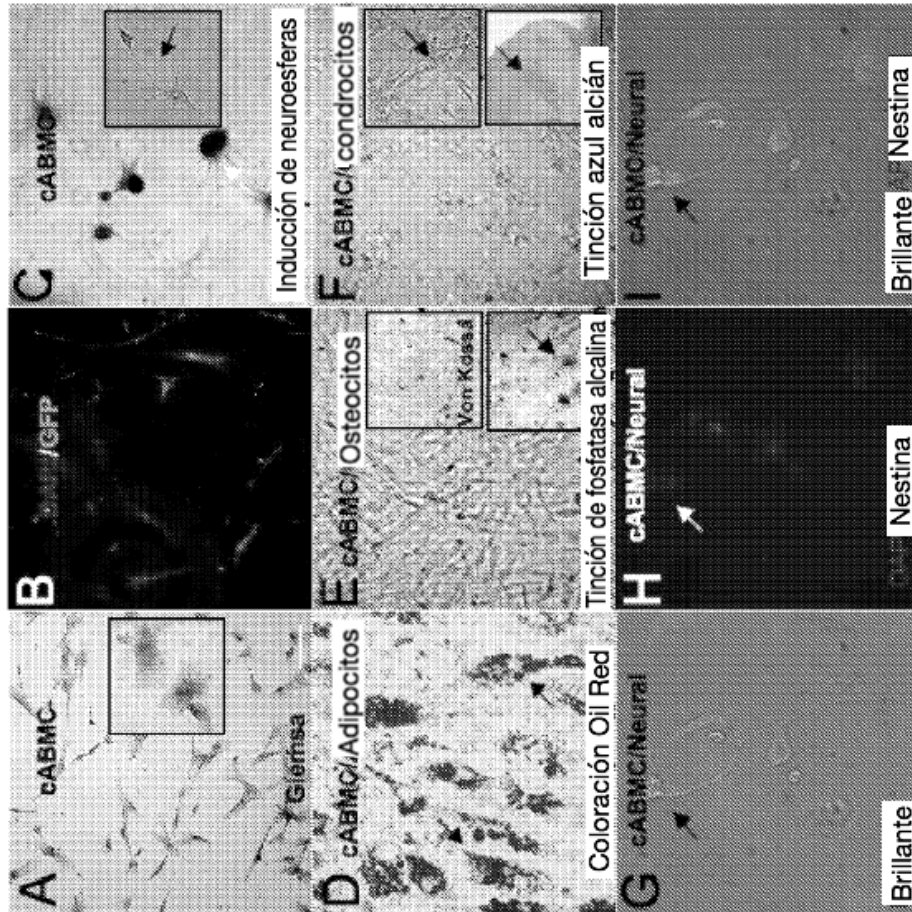


Figura 5

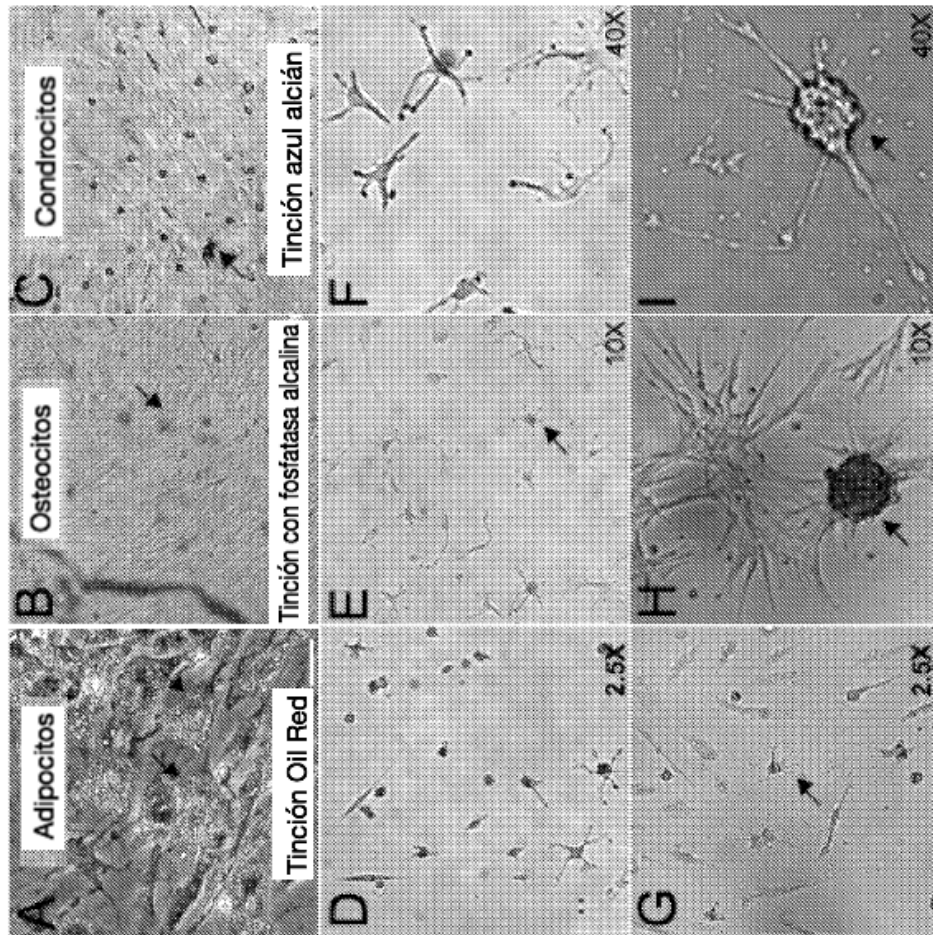


Figura 6

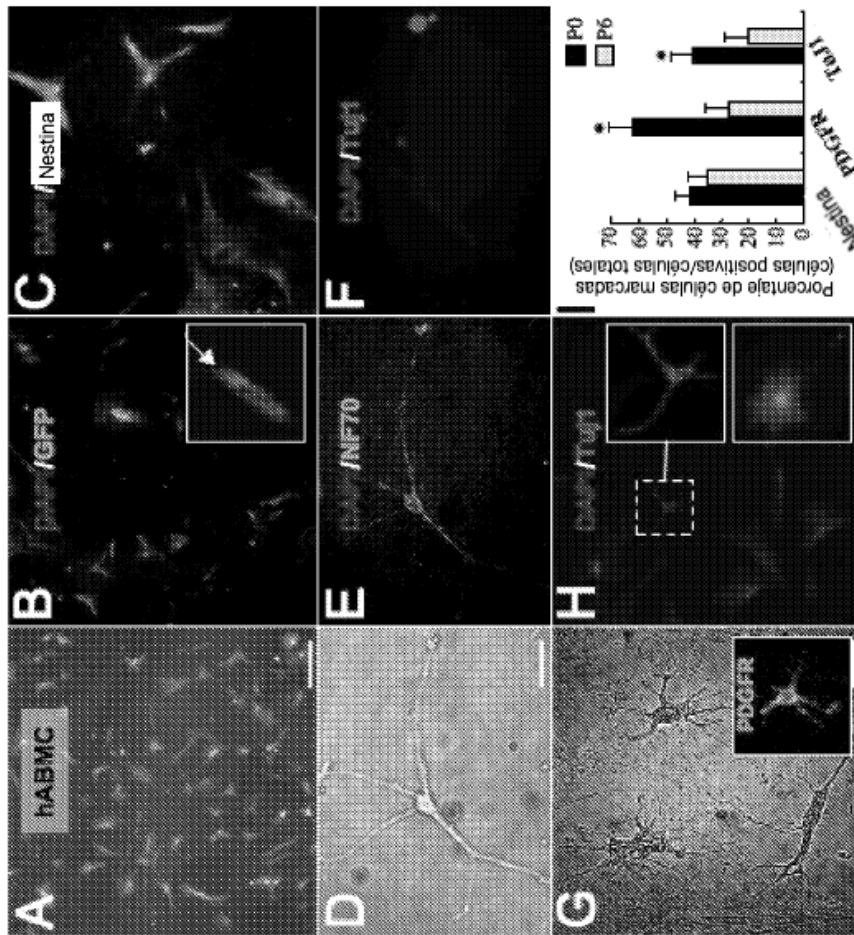


Figura 7

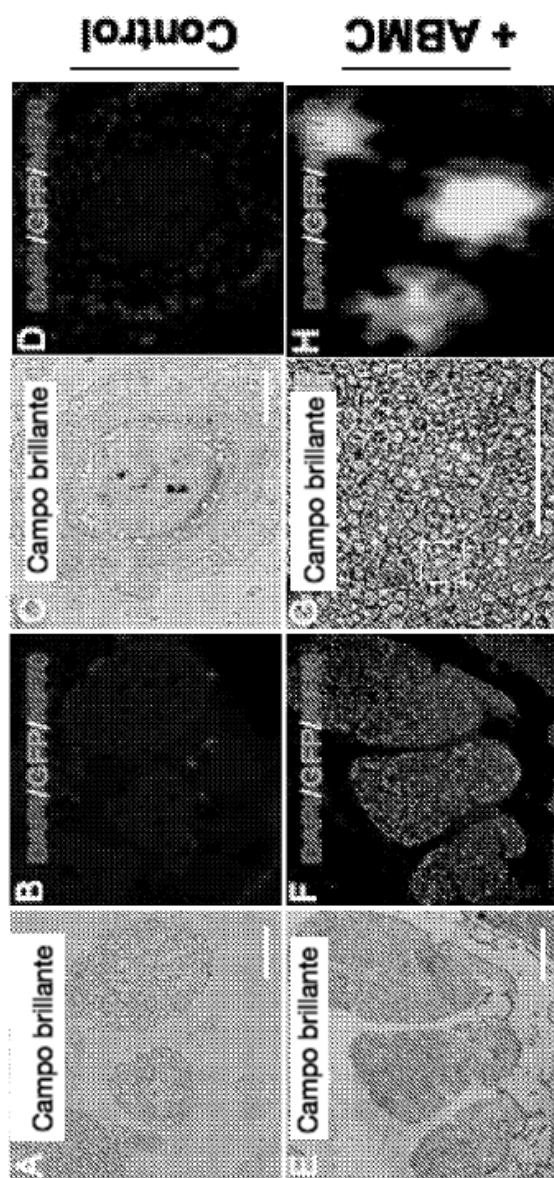


Figura 8

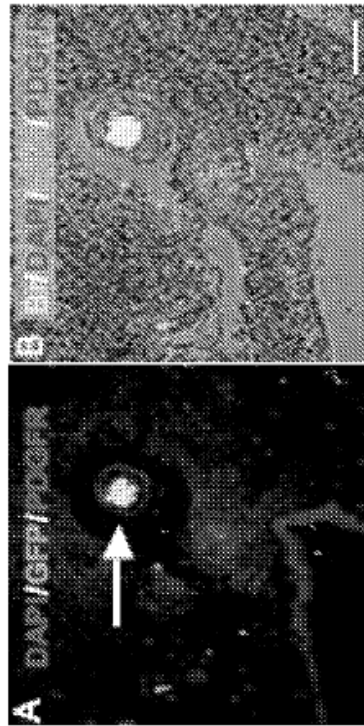


Figura 9

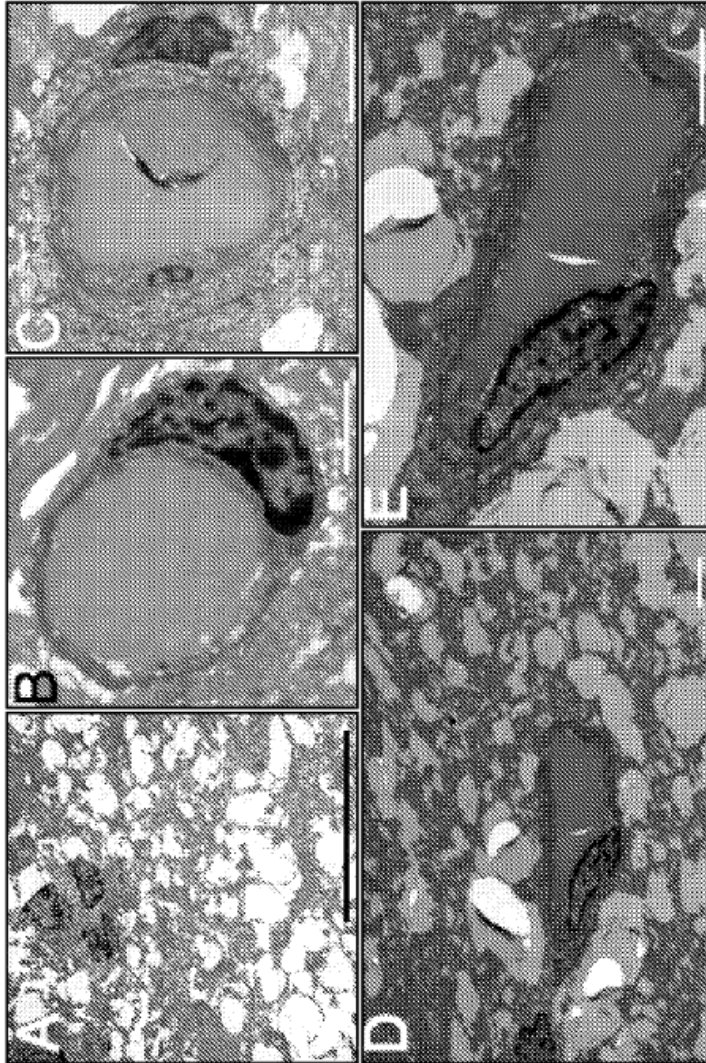


Figura 10

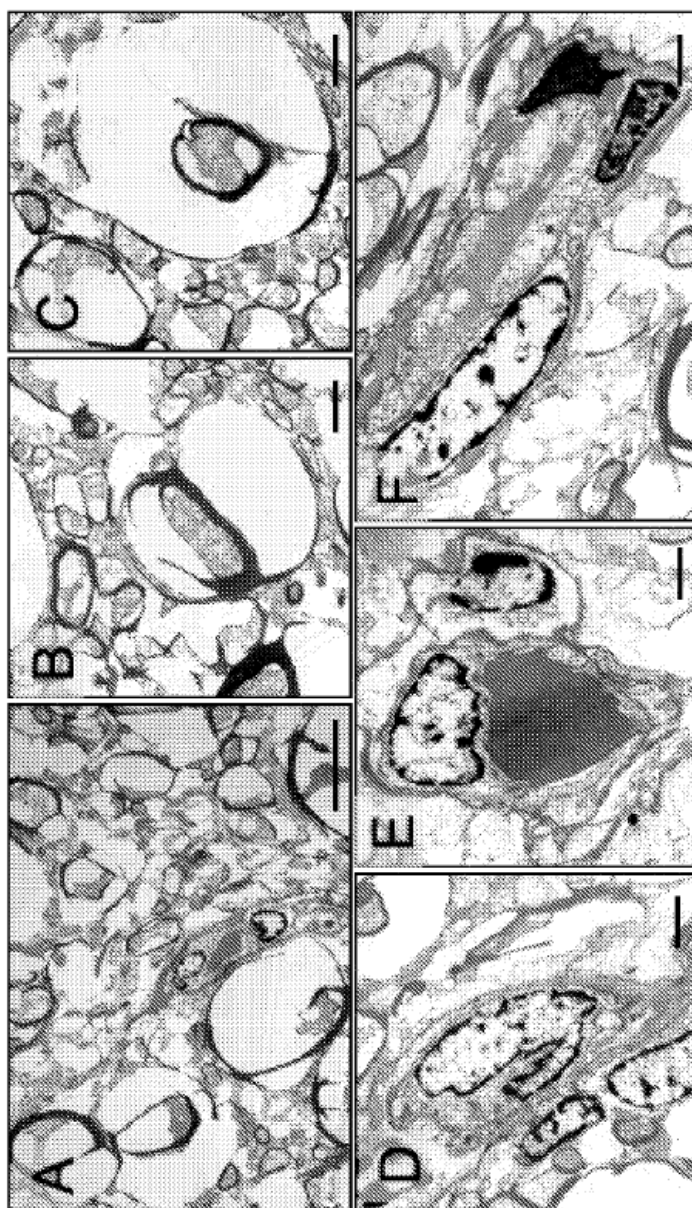


Figura 11

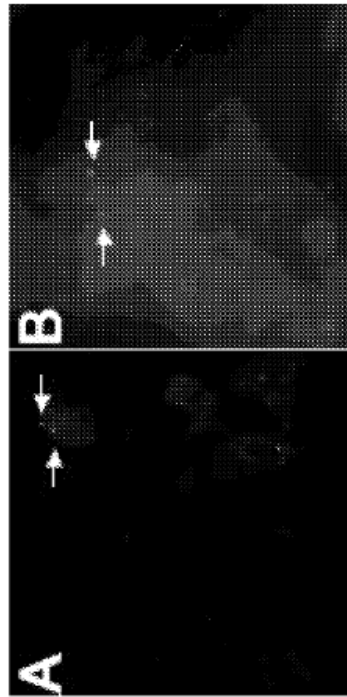


Figura 12

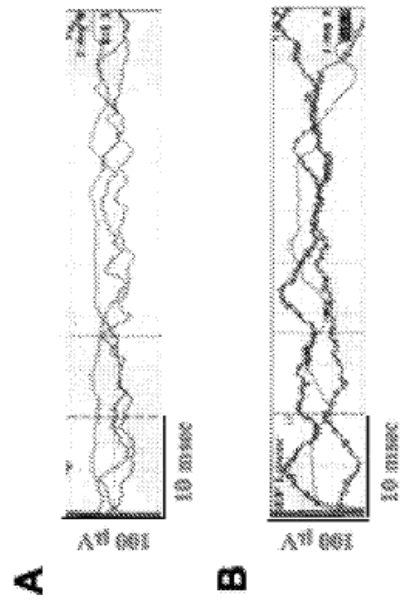


Figura 13