

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 396**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2010** **PCT/US2010/055956**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2011** **WO11059952**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2010** **E 10830580 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017** **EP 2499238**

54 Título: **Métodos y composiciones para expandir, identificar, caracterizar y mejorar la potencia de células progenitoras restringidas gliales derivadas de mamíferos**

30 Prioridad:

22.04.2010 US 326799 P

12.11.2009 US 260441 P

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

11.01.2018

73 Titular/es:

Q THERAPEUTICS, INC. (100.0%)

615 Arapeen Drive Suite 102

Salt Lake City, UT 84108, US

72 Inventor/es:

SANDROCK, ROBERT;

CAMPANELLI, JAMES T. y

EPPSTEIN, DEBORAH A.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 649 396 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

Métodos y composiciones para expandir, identificar, caracterizar y mejorar la potencia de células progenitoras restringidas gliales derivadas de mamíferos

5 Esta patente reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. de nº de serie 61/326.799, presentada el 22 de abril de 2010, y de la solicitud provisional de EE.UU. de nº de serie 61/260.441, presentada el 12 de noviembre de 2009.

Campo de la invención

10 La presente invención proporciona métodos de fabricación de una población de células progenitoras restringidas gliales (GRP) derivadas de mamíferos con fenotipos celulares potencialmente no previstos disminuidos y/o una desviación estándar disminuida de las células de la población, así como métodos para el uso de estas células. Se proporciona también en la presente invención un panel de anticuerpos para caracterizar GRP y un método para su uso en la caracterización de células GRP.

Antecedentes de la invención

15 Las células progenitoras restringidas gliales (GRP) se definen por su reactividad con el anticuerpo A2B5, que reconoce un subconjunto de gangliósidos de serie c (Dietrich *et al.*, *Glia* 2002 40: 65-77; Rao y Mayer-Proschel, *Dev. Biol.* 1997 188: 48-63; Saito *et al.*, *J. Neurochem.* 2001 78: 64-74; Windrem *et al.*, *Nat. Med.* 2004 10:93-97). Otras características antigénicas de las GRP incluyen una expresión moderada del marcador astrocítico proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y una baja expresión de los marcadores neuronales E-CAM (N-CAM polisialado o PSA-NCAM) y tubulina β -III (TuJ1) Dietrich *et al.*, *Glia* 2002 40: 65-77; Rao y Mayer-Proschel, *Dev. Biol.* 1997 188:48-63).

20 En el momento en que se aíslan las GRP, se han diferenciado ya endógenamente más allá de citoblastos neurales hasta células comprometidas de linaje restringido. No se ha observado que las GRP induzcan o produzcan teratomas.

25 Una categoría muy importante de neuronas en el cerebro y la médula espinal comprende aquellas cuyos axones están envainados en mielina. Cuando se daña esta vaina de mielina, se destruyen los oligodendrocitos, cuyos procesos vitales constituyen la capa de mielina aislante alrededor de los ejes neuronales. Las neuronas desmielinizadas no pueden conducir apropiadamente señales y eventualmente morirán.

30 Cuando el daño es incompleto, se activan los mecanismos de reparación endógena dando como resultado la remielinización y la vuelta parcial o total de la función (Lassmann *et al.*, *Mult. Scler.* 1997 3: 133-136; Prineas y Connell, *Ann. Neurol.* 1979 5: 22-31). Esto demuestra el punto crítico de que la remielinización puede conducir de hecho a una restauración de la función. Sin embargo, la mayoría de pacientes que experimentan desmielinización debido a diversas enfermedades o traumatismos no experimentan suficiente remielinización endógena (Prineas *et al.*, *Ann. Neurol.* 1993 33: 137-151), y a pesar de muchas necesidades y esfuerzos, se han hecho pocos progresos en el desarrollo de productos que puedan ayudar a restaurar la función perdida. Esto puede atribuirse parcialmente a las múltiples señales e intrincadas interacciones intercelulares que deben ocurrir para efectuar la regeneración de los oligodendrocitos productores de mielina dañados *in vivo*. Es significativo que se haya demostrado que la terapia celular resultante en remielinización es beneficiosa en modelos animales de desmielinización.

40 Totoiu *et al.* (*Exp. Neurol.* 2004 187: 254-265) reseñaron beneficios de implantes locales de GRP de múrido en el tratamiento de lesiones de médula espinal en un modelo de EM de múrido inducida vírica. Las GRP migraban y se diferenciaban en oligodendrocitos, dando como resultado una remielinización que parecía estar asociada con la preservación axonal. Observaron también una locomoción mejorada. Estudios posteriores (Hardison *et al.*, *Exp. Neurol.* 2006 197: 420-429) demostraron que las GRP de múrido eran capaces de sobrevivir y remielinizarse en presencia tanto de linfocitos T inflamatorios como macrófagos.

45 El ratón *shiverer*, que exhibe defectos en la producción de mielina normal debido a una mutación en el gen que codifica la proteína básica mielina, es un modelo para estudiar el efecto de trasplantes de células exógenas sobre la producción de mielina. La demostración de la producción de mielina por trasplantes celulares en *shiverer* es relevante para muchas enfermedades desmielinizantes, incluyendo MT y EM, así como aquellas de desmielinización. Se ha mostrado que las GRP humanas son capaces de una mielinización extendida y de alta eficacia del cerebro de ratón *shiverer* después de xenoinjerto perinatal (Windrem *et al.*, *Nat. Med.* 2004 10: 93-97). Se demostró la diferenciación en tipos celulares apropiados regionalmente (astrocitos y oligodendrocitos) sin evidencia de tumores. Estos estudios se extendieron para mostrar la remielinización tanto de cerebro como de médula espinal, que está acompañada de un rescate fenotípico sustancial en un subconjunto de los animales implantados (Windrem *et al.*, *Cell Stem Cell* 2008 2: 553-565).

Compendio de la invención

55 Un aspecto de la presente invención se refiere a métodos para fabricar células progenitoras restringidas gliales (GRP) de mamíferos, como se declara en las reivindicaciones adjuntas a la presente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para disminuir los fenotipos celulares no previstos en una población de células GRP y/o disminuir las desviaciones estándares en las células de la población de células GRP, como se declara en las reivindicaciones adjuntas a la presente.

- 5 La presente solicitud divulga un panel de anticuerpos para caracterizar células GRP que comprenden anticuerpos de gangliósidos de serie c (usando anticuerpo A2B5), GFAP y uno o más anticuerpos seleccionados del grupo consistente en Olig1, Olig2, O1, PDGFR- α , nestina, NG2, PSA-NCAM, TuJ1, Ki-67 y NeuN, y métodos para caracterizar células como células GRP con este panel de anticuerpos.

La presente solicitud divulga también perfiles de expresión génica útiles en la caracterización de células GRP.

- 10 La presente invención divulga también un método para fabricar células neurales de mamífero desprovistas de células positivas de A2B5.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos para generar células precursoras de astrocitos, astrocitos, células precursoras de oligodendrocitos y/u oligodendrocitos, como se declara en las reivindicaciones adjuntas a la presente.

- 15 La presente solicitud divulga métodos para el uso de estas células GRP de mamíferos fabricadas para aumentar la remielinización de neuronas en un mamífero que padece una enfermedad, trastorno, lesión o daño asociado a la desmielinización de neuronas.

La presente solicitud divulga métodos para el uso de estas células GRP de mamíferos fabricadas para reducir la formación de cicatrices gliales.

- 20 La presente solicitud divulga métodos para el uso de estas células GRP de mamíferos fabricadas en el tratamiento de enfermedades o trastornos neurodegenerativos o daño o lesión del sistema nervioso o una parte del mismo en mamíferos.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A, 1B y 1C muestran curvas de crecimiento a escala piloto de tres preparaciones celulares independientes fabricadas de acuerdo con la presente invención.

- 25 Las Figuras 2A y 2B muestran curvas de crecimiento a escala de producción de células fabricadas de acuerdo con la presente invención.

Las Figuras 3A y 3B muestran una comparación de la viabilidad celular en suspensión frente a superficies tratadas con poli-L-ornitina (Figura 3B), así como la viabilidad en cada pasada y la recolección final (Figura 3A).

Descripción detallada de la invención

- 30 La presente invención proporciona métodos para la fabricación de células progenitoras gliales (GRP) de mamíferos. Se hace referencia también a las GRP como células precursoras restringidas gliales o células progenitoras gliales en la bibliografía.

- 35 Las células GRP de mamíferos de la presente invención pueden derivar de cualquier fuente de tejido de mamífero capaz de generar células positivas de A2B5s. Los ejemplos de tales fuentes de tejido de mamífero incluyen, sin limitación, fuentes embrionarias/fetales y adultas (incluyendo de todas las edades después del nacimiento), todas de tejidos que incluyen, pero sin limitación, neural, de cerebro, médula espinal, nervio óptico, epitelio olfatorio, endocrino, de piel, músculo, grasa, conectivo, de placenta, sangre de cordón, sangre, médula ósea, hueso, citoblastos embrionarios y células pluripotentes inducidas. Se entiende que capaz de generar células positivas de A2B5 incluye fuentes de tejido de mamífero diferenciadas en células positivas de A2B5, fuentes de tejido de mamífero desdiferenciadas en células positivas de A2B5, así como fuentes de tejido de mamífero desdiferenciadas y diferenciadas entonces en células positivas de A2B5.

- 40 Las células progenitoras restringidas gliales (GRP) de mamíferos se fabrican de acuerdo con la presente invención mediante clasificación *in vitro* de células reactivas con A2B5 de una fuente de tejido de mamífero capaz de generar células positivas de A2B5. Se cultivan entonces durante al menos 10 días *in vitro* (DIV) las células positivas de A2B5 sobre un sustrato. Se recolectan entonces las células cultivadas.

- 45 En una realización de la presente invención, el método comprende disociar tejido neural de mamífero tal como, pero sin limitación, tejido de prosencéfalo de cadáver fetal, tejido de médula espinal de cadáver fetal, tejido de cerebro o médula espinal de biopsia de mamífero o similar en una suspensión celular. En una realización, el tejido neural de mamífero se obtiene después del cierre del tubo neural. Para GRP humanas, el tejido neural obtenido después del cierre del tubo neural, por ejemplo en tejidos de aproximadamente 14 a aproximadamente 24 semanas gestacionales, se ha demostrado que procura un producto consistente. Se practica la disociación enzimática, mecánicamente o tanto enzimática como mecánicamente de acuerdo con métodos conocidos.

Las células reactivas con anticuerpo A2B5 pueden aislarse mediante diversos medios conocidos por los especialistas en la materia. Por ejemplo, en una realización, se aíslan las células reactivas con anticuerpo A2B5 usando clasificación celular activada magnética. Por ejemplo, las células pueden pasarse por una columna después de un marcaje sencillo con anticuerpo A2B5 usando la tecnología de perlas magnéticas Miltenyi o la tecnología de perlas magnéticas Dynal u otras tecnologías de separación de anticuerpo adecuadas conocidas. Como alternativa, las células positivas de anticuerpo pueden capturarse usando clasificación celular activada por fluorescencia o inmunoadsorción mediante métodos estándares. La columna (o FACS o discos de inmunoadsorción) enriquece las células A2B5(+) y reduce las células A2B5(-). El paso por una columna o columnas adicionales (o un FACS o disco o discos de inmunoadsorción adicionales) reduce eficazmente las células positivas intermedias y enriquece las células altamente positivas.

Se cultiva entonces la población positiva de A2B5 durante al menos 10 días *in vitro* (DIV), por ejemplo aproximadamente 10-20 DIV, 15-20 DIV, al menos 20 DIV y/o hasta 100 DIV o más, o al menos dos pasadas, y se recolectan y congelan las células cultivadas.

Este proceso de fabricación difiere de procesos de fabricación anteriormente descritos en que se usa un método de clasificación de células deseadas con un solo anticuerpo y el crecimiento se extiende desde 6 DIV sin pasada hasta un crecimiento de hasta 2 pasadas o más de 6 DIV, por ejemplo aproximadamente 10-20 DIV, 15-20 DIV, al menos 20 DIV o hasta 100 DIV o más. Además, las células se hacen crecer no en suspensión, sino en lugar de ello sobre un sustrato para adherencia de las células.

Los ejemplos de sustratos incluyen, pero sin limitación, poli-L-ornitina, poli-L-lisina y moléculas de matriz extracelular recombinantes o naturales o fragmentos de las mismas tales como, pero sin limitación, laminina, fibronectina y CELLstart™ (sustrato exento de productos xenogénicos para la adhesión y expansión de citoblastos embrionarios, mesenquimáticos y neurales humanos, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

Las curvas de crecimiento, rendimientos y fenotipos definidos inmunológicamente de células fabricadas de acuerdo con el método de la presente invención exhiben una variabilidad ajustada y fenotipos celulares no previstos disminuidos sin alterar su capacidad terapéutica.

La microscopía de contraste de fases revelaba un fenotipo morfológico estable antes de la primera pasada (6 DIV), al final de la segunda pasada (20 DIV; recolección) y hasta 100 días *in vitro*. Esta morfología de bipolar a multipolar es consistente entre preparaciones con tres preparaciones celulares independientes.

Se representan curvas de crecimiento a escala piloto de células fabricadas de acuerdo con la presente invención en la Figura 1A a 1C. Se muestran tres preparaciones celulares independientes en las Figuras 1A, 1B y 1C, respectivamente, como en la comparación de crecimiento sobre plástico no tratado ("suspensión") y crecimiento sobre plástico de cultivo de tejido tratado con poli-L-ornitina. Las preparaciones celulares crecidas sobre matraces recubiertos de sustrato exhibían una pendiente aumentada y una eficacia de siembra aumentada.

Se representan curvas de crecimiento a escala de producción en las Figuras 2A y 2B. Estas curvas son similares a la escala piloto y demuestran que las células recolectadas a 20 DIV no están cercanas a la senescencia.

Se valoró la viabilidad celular mediante el método de exclusión con azul de tripano. Se muestra la comparación de la viabilidad en suspensión frente a superficies tratadas con poli-L-ornitina en la Figura 3B, mientras que se muestra la viabilidad en cada pasada y la recolección final en la Figura 3A. En todos los casos, los valores medios de viabilidad superaban el 90 %.

Se inmunofenotiparon células fabricadas de acuerdo con la presente invención usando un panel de anticuerpos que reconocen fenotipos deseados (progenitores restringidos gliales y su progenie) así como fenotipos celulares no previstos contaminantes potenciales (progenitores neuronales, neuronas, microglía y células endoteliales). Los anticuerpos en este panel se eligen de A2B5, GFAP, PDGFR- α , Olig1, Olig2, O1, nestina, NG2, PSA-NCAM, TuJ1, Ki-67 y/o NeuN. El inmunofenotipado con este panel único de anticuerpos mostraba una disminución de los fenotipos celulares potencialmente no previstos (PSA-NCAM y TuJ1) a más de 6 DIV frente a 6 DIV, así como una disminución de las desviaciones estándares en células producidas de acuerdo con el método de la presente invención.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para disminuir los fenotipos celulares potencialmente no previstos en una población de células GRP y/o disminuir las desviaciones estándares en células de la población de células GRP, que comprende recolectar células durante al menos 10 DIV. Se determina la disminución de los fenotipos celulares potencialmente no previstos y/o la disminución de las desviaciones estándares en células por comparación con células recolectadas a los 6 DIV.

Se ha encontrado también que congelar y descongelar una población de células GRP disminuye adicionalmente el fenotipo no previsto. Aunque se retienen los fenotipos deseables A2B5, GFAP y Ki-67 tras congelación/descongelación, se reducen los marcadores de fenotipos celulares no previstos (PSA-NCAM y TuJ1) en >50 %.

Por consiguiente, la presente invención divulga un método para disminuir los fenotipos celulares potencialmente no previstos en una población de células GRP que comprende congelación y descongelación de la población de células GRP.

5 La población de células GRP se fabrica de acuerdo con la presente invención y además se congela y descongela después de la recolección.

Como se entenderá por el especialista en la materia tras la lectura de esta divulgación, sin embargo, pueden usarse métodos alternativos para la fabricación de las GRP antes de la congelación. Por ejemplo, en una realización, se fabrica la población de células GRP mediante un método en el que se cultivan células positivas de A2B5 durante 6 DIV o menos. Se recolectan entonces las células cultivadas y se congelan. Después de descongelar, las células
10 pueden cultivarse durante 3 o más días adicionales *in vitro* (DIV), aumentando el número de células.

Además, el inmunofenotipado con este panel seleccionado de anticuerpos proporciona un medio fiable útil para caracterizar este producto terapéutico celular. Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a este panel de anticuerpos para caracterizar células GRP que comprende A2B5, GFAP y uno o más anticuerpos seleccionados del grupo consistente en Olig1, Olig2, O1, PDGFR- α , nestina, NG2, PSA-NCAM, TuJ1, Ki-67 y NeuN
15 y a métodos para caracterizar células como células GRP y/o documentar la pureza de la población celular con este panel de anticuerpos. En una realización, se caracterizan las células usando el panel de anticuerpos sembrando en primer lugar las células según protocolos estándares sobre cubreobjetos o en portaobjetos multicamerales o similares, dejando crecer durante una noche en condiciones de cultivo de tejido estándares y fijando entonces y tiñendo según procedimientos estándares. Las células inmunopositivas se identifican usando métodos de
20 microscopía estándares, y los porcentajes de células positivas de cada anticuerpo se definen respecto al número total de células (como se define por una tinción pan-nuclear: DAPI o similar). El siguiente inmunofenotipo usando este panel de anticuerpos es indicativo de una población de células de mamífero que son GRP: una mayoría de células son positivas de A2B5 y una o más de GFAP, nestina, NG2, PDGFR- α , Olig1, Olig2 y O1 y una mayoría de células son negativas de uno o más de PSA-NCAM, TUJ1, PECAM, CD68 y NeuN. Se entiende por "mayoría", como
25 se usa en la presente memoria, que más de un 50 % de las células sean positivas o negativas del anticuerpo seleccionado.

Además de la caracterización inmunocitoquímica del producto celular, se han identificado las dianas génicas cuya expresión se correlaciona con los diferentes tipos de células que pueden encontrarse en los aislamientos celulares. Se recogieron los datos de expresión génica de células no purificadas, células GRP recolectadas a los 6 DIV
30 originarias de tejidos cerebrales y células GRP producidas de acuerdo con el método de la presente invención. Aproximadamente 375 genes mostraron cambios de al menos 5 veces en el nivel de expresión (niveles crecientes y decrecientes) con un valor de $P \leq 0,01$ entre las células GRP recolectadas a los 6 DIV y células no purificadas. Usando estos datos, pueden generarse perfiles de expresión génica y evaluarse mediante técnicas tales como análisis de chip/matriz, PCR-TI multiplexada y PCRc como medio para identificar poblaciones celulares.

Se divulga también en la presente solicitud un método para fabricar células neurales de mamífero desprovistas de células positivas de A2B5. En este método, se aíslan células reactivas con el anticuerpo A2B5 de una fuente de tejido de mamífero capaz de generar células positivas de A2B5. Se recolectan entonces las células que permanecen
35 después de la retirada de las células reactivas con el anticuerpo A2B5. En una realización de este método, se cultivan las células durante uno o más días *in vitro* (DIV) sobre un sustrato. En este método, opcionalmente en las células recolectadas pueden agotarse además ciertos tipos celulares por congelación y descongelación de la población celular.
40

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para generar células precursoras de astrocitos, astrocitos, células precursoras de oligodendrocitos y/u oligodendrocitos a partir de las GRP fabricadas de acuerdo con la presente invención. En este método, las células GRP fabricadas de acuerdo con la presente invención se
45 cultivan en condiciones que promuevan la diferenciación en astrocitos y/u oligodendrocitos. En una realización, se cultivan las células GRP en condiciones que promuevan la diferenciación en astrocitos. Dos ejemplos no limitantes de formulaciones de medios que promueven la diferenciación en astrocitos incluyen: 1) crecimiento de GRP en DMEM/F12, suplemento N1 o N2, FGF básico o BMP4, con estos factores de crecimiento presentes en el intervalo de ng/ml o el intervalo de 10-100 ng/ml; y 2) DMEM/F12, suplemento N1 o N2, FBS al 1-10 % y FGF básico en el
50 intervalo de ng/ml o el intervalo de 10-100 ng/ml. En otra realización, se cultivan las células GRP en condiciones que promuevan la diferenciación en oligodendrocitos. Dos ejemplos no limitantes de formulaciones de medios y condiciones que promueven la diferenciación en oligodendrocitos incluyen: 1) crecimiento de GRP en medio DMEM/F12 que carece de factores de crecimiento durante 2 días y transferencia de células a un medio DMEM/F12 suplementado con N2 o PDGF-AA, presentes en el intervalo de ng/ml o el intervalo de 10-100 ng/ml, y T3 en el
55 intervalo de 1-100 nM; y 2) crecimiento de GRP en medio DMEM/F12 suplementado con N2 o T3 en el intervalo de 100 nM, N-acetilcisteína en el intervalo de 10 μ g/ml y PDGF-AA y CNTF en el intervalo de ng/ml o el intervalo de 10-100 ng/ml.

Se practicaron experimentos que confirmaron que las GRP preparadas de acuerdo con el método de la presente invención exhiben parámetros de expresión definidos y reproducibles de antígenos seleccionados, y son
60 consistentes en su capacidad de diferenciarse en astrocitos y oligodendrocitos, pero no neuronas, en un entorno *in*

vivo también. Además, los experimentos mostraron que estas GRP exhibían características de supervivencia, migración y diferenciación celular en oligodendrocitos productores de mielina así como astrocitos en modelos animales. En conjunto, estos estudios demuestran que las GRP fabricadas de acuerdo con el método de la presente invención se integran exitosamente, se diferencian en oligodendrocitos y astrocitos y remielinizan axones en tejido neural demielinado del cerebro y la médula espinal.

Por tanto, la presente solicitud divulga también métodos para usar células GRP fabricadas de acuerdo con la presente invención para producir astrocitos y oligodendrocitos *in vivo* en mamíferos y para aumentar la remielinización de neuronas en un mamífero que padece una enfermedad, trastorno, lesión o daño asociado a la desmielinización de neuronas. Pueden administrarse entre 0,01 y 100 millones de células por trasplante parenquimático directo usando catéteres o agujas familiares para neurocirujanos especialistas en la materia, que implica una o más inyecciones. Estos trasplantes pueden practicarse después de acceder al tejido neural directamente mediante el uso de una trepanación o laminectomía. Como alternativa, los trasplantes pueden practicarse en la médula espinal mediante suministro percutáneo guiado por TAC sin necesidad de acceso visual directo del tejido diana neural por un radiólogo de intervención especialista en la materia. Adicionalmente, pueden administrarse células al líquido cefalorraquídeo (LCR) tal como por punción lumbar u otros métodos adecuados en lugar de directamente en el parénquima. Las células pueden administrarse también por administración intravenosa para ciertas enfermedades. Finalmente, se están realizando actualmente varios ensayos clínicos con otros tipos de células neurales para estas enfermedades. Pueden adaptarse rutinariamente por los especialistas en la materia protocolos y procedimientos similares usados en estos ensayos clínicos con otras células neurales para uso con las GRP fabricadas de acuerdo con la presente invención.

Se demostró la supervivencia, migración, proliferación y diferenciación de GRP humanas fabricadas de acuerdo con la presente invención, cuando se xenoinjertaban en los cerebros de ratón *shiverer*, un modelo de comportamiento glial *in vivo* (Nave, *J. Neurosci. Res.* 1994 38: 607-612). El ratón *shiverer* posee una mutación recesiva autosómica que da como resultado la incapacidad de estos ratones de desarrollar proteína básica de mielina (MBP). Los oligodendrocitos endógenos formados en el SNC de ratones *shiverer* no consiguen ensamblar mielina compactada (Privat *et al.*, *Neurosci. Lett.* 1979 12: 107-112). Para maximizar la supervivencia del injerto, se desarrolló una cepa de ratón *shiverer* que porta también una mutación recesiva autosómica en el gen *Rag2* que codifica una proteína esencial para la generación de linfocitos B y T maduros, y por lo tanto exhibe inmunodeficiencias mediadas por células (Shinkai *et al.*, *Cell* 1992 68: 855-867). Se implantaron en ratones inmunodeficientes *shiverer/rag2* homocigóticos dobles recién nacidos 100.000 GRP humanas en un solo sitio orientado a la zona subventricular. 8 o 12 semanas después del implante, se sacrificaron los animales y se valoró inmunocitoquímicamente la supervivencia y distribución de las GRP humanas y su progenie. La distribución generalizada de células humanass documenta la capacidad de las GRP humanas de sobrevivir y migrar en este modelo inmunocomprometido genéticamente. Se han observado resultados similares en la supervivencia, migración y diferenciación *in vivo* en *shiverer/rag2* tanto con GRP de 6 DIV como de 20 DIV.

Se valoró inmunocitoquímicamente el potencial de diferenciación de las GRP humanas *in vivo* en secciones cerebrales de estos ratones. Se sacrificó un grupo de ratones a las 8 semanas después del implante, mientras que se sacrificó otro grupo por razones humanitarias en el momento en que el deterioro neurológico daba como resultado una deambulación notablemente alterada y episodios frecuentes de convulsiones sostenidas (típicamente de 12 a 18 semanas postnatal). Se tiñeron secciones cerebrales con anticuerpos antiproteína básica de mielina (MBP; no se observa expresión de MBP intacta reconocida por este anticuerpo en ratones *shiverer*, por tanto la expresión de MBP es únicamente de GRP humanas implantadas) y anti-GFAP humana (que no reconoce GFAP de murino). Aunque la cuantificación de los números de astrocitos y oligodendrocitos no era factible, se confirmó que se generaban los dos tipos celulares a partir de GRP humanas *in vivo* midiendo el área de inmunorreactividad de MBP y GFAP *in vivo* después del sacrificio. Estos datos detallan la capacidad de las GRP humanas de la presente invención de diferenciarse en los fenotipos celulares apropiados.

Se llevó a cabo también una tinción dual de las secciones cerebrales usando anticuerpos contra NeuN, una proteína expresada en la mayoría de las neuronas, y antígeno nuclear humano (HuNA). Se recogieron estos datos de los mismos animales usados para determinar la expresión de MBP y GFAP. Las GRP humanas en un animal sacrificado a las 8 semanas se concentraban cerca del cuerpo calloso y se observaron menos de un 0,3 % de células positivas dobles de HuNA/NeuN. La capacidad de estas células de diferenciarse en glía y no neuronas es relevante para el uso en enfermedades neurodegenerativas, en las que se ha reseñado ramificación axonal aberrante asociada con hipersensibilidad de tipo alodinia cuando se han usado citoblastos neurales (que dan lugar tanto a neuronas como glía) como terapia celular (Hofstetter *et al.* *Nat. Neurosci.* 2005 8: 346-353; Macias *et al.*, *Exp. Neurol.* 2006 201:335-348).

Se valoró también la supervivencia y distribución celular de GRP humanas después de administración intramédula espinal en ratas. Se implantaron sesenta mil (60.000) GRP humanas en un volumen de 1 µl en las médulas espinales de 12 ratas atímicas al nivel de C-4. Se sacrificaron 4 animales en cada uno de los tres puntos temporales (1, 4 y 12 semanas después del implante). Se perfundieron los animales con paraformaldehído en el sacrificio, se recolectaron sus médulas espinales y se analizó en 1 cm de médula cervical la presencia de GRP humanas usando la tinción con anticuerpo HuNA de secciones transversales. No se detectaron masas proliferantes en las médulas espinales de ratas atímicas implantadas con células humanas después de 1, 4 y 12 semanas después del implante.

Se observó la supervivencia de células humanas implantadas en los puntos temporales de 4 y 12 semanas. Estaban presentes GRP humanas a lo largo de la sección de área transversal de la médula espinal, con la densidad celular máxima observada en la columna dorsal donde se practicaron las inyecciones. 1 de 4 animales a 1 semana después del implante y 4 de 4 animales a las 4 y 12 semanas después del implante tenían GRP humanas presentes tras necropsia. A las 4 semanas, aproximadamente 2/3 de las secciones analizadas tenían GRP humanas (extensión rostrocaudal de 0,63 cm) y las 12 semanas todas las secciones analizadas tenían GRP humanas (extensión rostrocaudal de 1 cm).

Se determinó la supervivencia y distribución celular de GRP humanas preparadas de acuerdo con el proceso de la presente invención después de la administración intramédula espinal de dos dosificaciones celulares diferentes. No se detectaron anomalías de la médula espinal por necropsia macroscópica a los 28 días después del implante. El análisis inmunocitoquímico usando anticuerpos HuNA y Ki-67 no reveló masas proliferantes en las médulas espinales de ratas atímicas a la dosis de 800.000 o 1.200.000 GFP humanas totales/animal. La GRP humanas estaban presentes a lo largo del área de sección transversal de la médula espinal, con la densidad celular máxima observada en la columna dorsal donde se practicaron las inyecciones. La colocalización de HuNA/ Ki-67 era muy baja en los animales inyectados con 800.000 células totales y se detectaron GRP humanas en todas las secciones teñidas con anticuerpo HuNA sobre todo el segmento de médula espinal de 1 cm que se analizó. La densidad de células GRP humanas en la médula espinal de ratas inyectadas con 1.200.000 células totales era demasiado alta para conteo manual; sin embargo, la valoración visual de la colocalización de HuNA/Ki-67 era similar a la observada en los animales de baja dosificación.

Se han establecido las condiciones para inducir una lesión desmielinizada inflamatoria focal en la médula espinal de ratas de Lewis. Este modelo animal imita la patología de la mielitis transversal en seres humanos y se usó para definir la capacidad de las GRP humanas trasplantadas producidas de acuerdo con la presente invención de sobrevivir en la cercanía de la lesión desmielinizada focal inducida. El modelo de rata está basado en un modelo publicado (Kerschensteiner *et al.*, Am. J. Pathol. 2004 164: 1455-1469) que se ha modificado para inducir más fiablemente evidencias clínicas e histológicas de desmielinización inflamatoria focal. Se inmunizaron ratas de Lewis adultas con glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) suspendida en adyuvante incompleto de Freund, seguido 10 días después de laminectomía de T9 e inyección de un cóctel de factor de necrosis tumoral α , interleucina 6, interferón α y bromuro de etidio (EtBr). Se observó inflamación focal en la columna dorsal de una rata de Lewis 4 días después de la inyección del cóctel. Se resolvió la inflamación activa en gran medida 10-14 días después de la inyección de las citocinas y EtBr; sin embargo, persistía una desmielinización extensa de la región. Se detectaron GRP humanas implantadas en esta región a las 3, 8 y 14 semanas después del implante con una dispersión rostrocaudal de hasta 13 mm, demostrando que pueden sobrevivir en lesiones desmielinizadas.

Se valoró también la supervivencia de GRP humanas producidas de acuerdo con la presente invención en un entorno inflamatorio que imita el de esclerosis múltiple. Se inyectaron a ratas agutí oscuro hembra (150-175 gramos de peso corporal) 10 mg de MOG en adyuvante de Freund incompleto en la base de la cola. Las ratas desarrollaron enfermedad clínica (puntuación de EAE de 2,5-3,0; paresis de miembros posteriores) a los 10-12 días después de inmunización. Empezando dos días antes del implante de célula GRP humanas, y diariamente después de ello, se inyectaron a las ratas ciclosporina A a 10 mg/kg IP. Se practicaron laminectomías a nivel torácico (T8-T9) y cada animal recibió una sola inyección de aproximadamente 150.000 GRP humanas en 2 μ l de solución salina en la columna dorsal. Se implantaron en los animales GRP humanas a los 2 o 7 días después de los síntomas de enfermedad. Se sacrificaron los animales 1 semana, 2 semanas y 4 semanas después del implante. Se detectaron las células GRP humanas injertadas usando anticuerpo HuNA en secciones transversales de 40 μ m de médula espinal cerca del sitio de implante. Se usó anticuerpo OX42 para detectar CD11b sobre la superficie de microglías activadas de hospedador que están presentes durante una respuesta inflamatoria. Se usó tinción con hematoxilina y eosina (H y E) para determinar la infiltración de macrófagos y microglía. La tinción con HuNA se localizaba estrechamente con la inmunotinción con OX42 1 semana después del trasplante. Una tinción con H y E pronunciada alrededor del sitio de inyección es también indicativa de infiltración del hospedador de macrófagos y microglía. A las 2 semanas después del trasplante, no se observaba ya colocalización de HuNA con la inmunotinción de OX42, mientras que se seguía observando tinción con H y E, aunque menos pronunciada. Las GRP humanas trasplantadas eran capaces de sobrevivir en la médula espinal de rata DA/EAE hasta 12 semanas, el punto temporal más largo valorado, después de inyección tanto 2 días como 7 días después del inicio de la enfermedad. Por tanto, las GRP humanas eran capaces de sobrevivir en condiciones que imitan aquellas encontradas en lesiones inflamatorias de esclerosis múltiple humana.

La eficacia demostrada en la presente memoria de las células GRP fabricadas de acuerdo con la presente invención en múltiples modelos animales para enfermedades o trastornos neurodegenerativos relacionados con células gliales es indicativa de su utilidad en el tratamiento o alivio de síntomas de estas enfermedades o trastornos neurodegenerativos. Se ha mostrado que las células gliales desempeñan papeles importantes en la patogénesis de la enfermedad neurodegenerativa esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Howland *et al.* PNAS 99, 1105, 1995; Clement *et al.* Science 302, 113, 2003; Rothstein *et al.* Ann. Neurol. 38, 73, 1995). Los astrocitos desempeñan muchas funciones importantes en el SNC, incluyendo regulación cerebrovascular, modulación de la transmisión sináptica (p.ej., transporte de glutamato) así como otros efectos que incluyen la liberación de factores de crecimiento y la provisión de soporte trófico para neuronas así como glía. Las células gliales pueden reducir o prevenir también la

formación de astrocitos reactivos, que causan efectos nocivos en muchas enfermedades neurodegenerativas, y las células gliales pueden reducir los niveles de cicatrización glial tal como aparece en lesión de médula espinal y varias enfermedades neurodegenerativas. Además, se ha demostrado que el trasplante de células gliales normales, que posteriormente se diferencian en astrocitos, en un modelo de rata de ELA, es neuroprotector en este modelo (Lepore *et al.* Nature Med. 11, 1294, 2008). Estos datos indican el beneficio terapéutico de los progenitores gliales en un modelo de enfermedad neurodegenerativa, y estudios adicionales indican que la terapia con células progenitoras gliales será beneficiosa en otras enfermedades o trastornos neurodegenerativos incluyendo, pero sin limitación, enfermedades de Parkinson, Alzheimer, Huntington y Alexander (Maragakis y Rothstein Nature Clinical Practice Neurology 2, 679, 2006), esclerosis múltiple (Windrem *et al.* Cell Stem Cell. junio de 2008 5; 2(6): 553-65, Hardison *et al.* Exp Neurol. febrero de 2006; 197(2): 420-9), otras enfermedades desmielinizantes (Duncan, J Inherit Metab Dis. 2005; 28(3) :357-68) y lesión de médula espinal (Keirstead *et al.* J Neurosci. mayo de 2005 11; 25 (19): 4694-705, Mitsui *et al.* J Neurosci. octubre de 2005 19; 25(42): 9624-36.

Por consiguiente, la presente solicitud divulga métodos para el uso de células GRP de mamíferos fabricadas de acuerdo con la presente invención en el tratamiento de enfermedades o trastornos neurodegenerativos relacionados con células gliales en mamíferos, así como lesiones o daño en el sistema nervioso o una porción del mismo. Se entiende por lesión o daño incluir la lesión o daño inducido por cualquier causa incluyendo, pero sin limitación, traumatismo, fármacos, radiación y lesión o daño inmunomediado. Adicionalmente, se espera que al suministrar células gliales sanas que producen factores de crecimiento asociados, etc., las células de la presente invención serán útiles para tratar enfermedades o trastornos neurodegenerativos así como lesiones del sistema nervioso en mamíferos no específicamente relacionados con células gliales. En estos métodos de tratamiento, pueden administrarse entre 1 y 100 millones de células fabricadas de acuerdo con la presente invención mediante trasplante parenquimático directo usando catéteres o agujas familiares para los neurocirujanos especialistas en la materia. Estos trasplantes pueden practicarse después de acceder al tejido neural directamente mediante el uso de una trepanación o laminectomía. Como alternativa, los trasplantes pueden practicarse en la médula espinal mediante suministro percutáneo guiado por TAC sin necesidad de acceso visual directo al tejido diana neural por un radiólogo de intervención especialista en la materia. Adicionalmente, las células pueden administrarse al LCF mediante punción lumbar en lugar de directamente al parénquima. Finalmente, se están realizando varios estudios clínicos con otros tipos de células neurales para estas enfermedades. Pueden adaptarse rutinariamente por los especialistas en la materia protocolos y procedimientos similares usados en estos ensayos clínicos para uso con las GRP fabricadas de acuerdo con la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para fabricar células progenitoras restringidas gliales (GRP) de mamíferos, comprendiendo dicho método:
 - (a) la clasificación *in vitro* de células reactivas con A2B5 a partir de una fuente de tejido de mamífero capaz de generar células positivas de A2B5;
 - (b) el cultivo de las células positivas de A2B5 durante al menos 10 días *in vitro* (DIV) sobre un sustrato; y
 - (c) la recolección de las células cultivadas.
2. El método de la reivindicación 1, en el que se aíslan células reactivas con A2B5 usando clasificación celular activada magnética o usando clasificación celular activada por fluorescencia o inmunoadsorción, preferiblemente en el que se pasan las células dos o más veces por una columna que comprende perlas magnéticas para aislar células reactivas con el anticuerpo A2B5 o una clasificación celular activada por fluorescencia o disco de inmunoadsorción.
3. El método de la reivindicación 1, en el que las células se cultivan durante 10-20 DIV, preferiblemente 15-20 DIV, más preferiblemente al menos 20 DIV, aún más preferiblemente durante 100 DIV o más.
4. Un método para fabricar células progenitoras restringidas gliales (GRP) de mamíferos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo dicho método:
 - (a) disociar, preferiblemente enzimática y/o mecánicamente, tejido neural de mamífero en una suspensión celular;
 - (b) clasificar *in vitro* las células reactivas con A2B5 de la suspensión celular;
 - (c) cultivar las células positivas de A2B5 durante al menos 10 días *in vitro* (DIV) sobre un sustrato; y
 - (d) recolectar las células cultivadas.
5. El método de la reivindicación 4, en el que el tejido neural de mamífero, preferiblemente tejido de prosencéfalo de cadáver fetal, tejido de médula espinal de cadáver fetal o tejido de cerebro o médula espinal de biopsia de mamífero, se obtenía de un mamífero después del cierre del tubo neural.
6. Un método para disminuir los fenotipos celulares potencialmente no previstos seleccionados de progenitores neuronales, neuronas, microglía y células endoteliales en una población de células GRP y/o disminuir las desviaciones estándares en células de la población de células GRP a más de 6 días *in vitro* (DIV) en comparación con células recolectadas a los 6 días *in vitro* (DIV), comprendiendo dicho método:
 - (a) clasificar *in vitro* las células reactivas con A2B5 de una fuente de tejido de mamífero capaz de generar células positivas de A2B5; y
 - (b) cultivar las células positivas de A2B5 durante al menos 10 días *in vitro* (DIV) sobre un sustrato.
7. El método según la reivindicación 6, comprendiendo dicho método:
 - (a) disociar tejido neural de mamífero en una suspensión celular;
 - (b) clasificar *in vitro* las células reactivas con A2B5 de la suspensión celular;
 - (c) cultivar las células positivas de A2B5 durante al menos 10 días *in vitro* (DIV) sobre un sustrato; y
 - (d) recolectar las células cultivadas.
8. Un método para generar células precursoras de astrocitos, astrocitos, células precursoras de oligodendrocitos y/u oligodendrocitos que comprende fabricar células progenitoras restringidas gliales (GRP) de mamíferos, comprendiendo las etapas de método:
 - (a) clasificar *in vitro* las células reactivas con A2B5 de una fuente de tejido de mamífero capaz de generar células positivas de A2B5;
 - (b) cultivar las células positivas de A2B5 durante al menos 10 días *in vitro* (DIV) sobre un sustrato; y
 - (c) recolectar las células cultivadas; y
 posteriormente cultivar las células GRP en condiciones que promuevan la diferenciación en células precursoras de astrocitos, astrocitos, células precursoras de oligodendrocitos y/u oligodendrocitos.

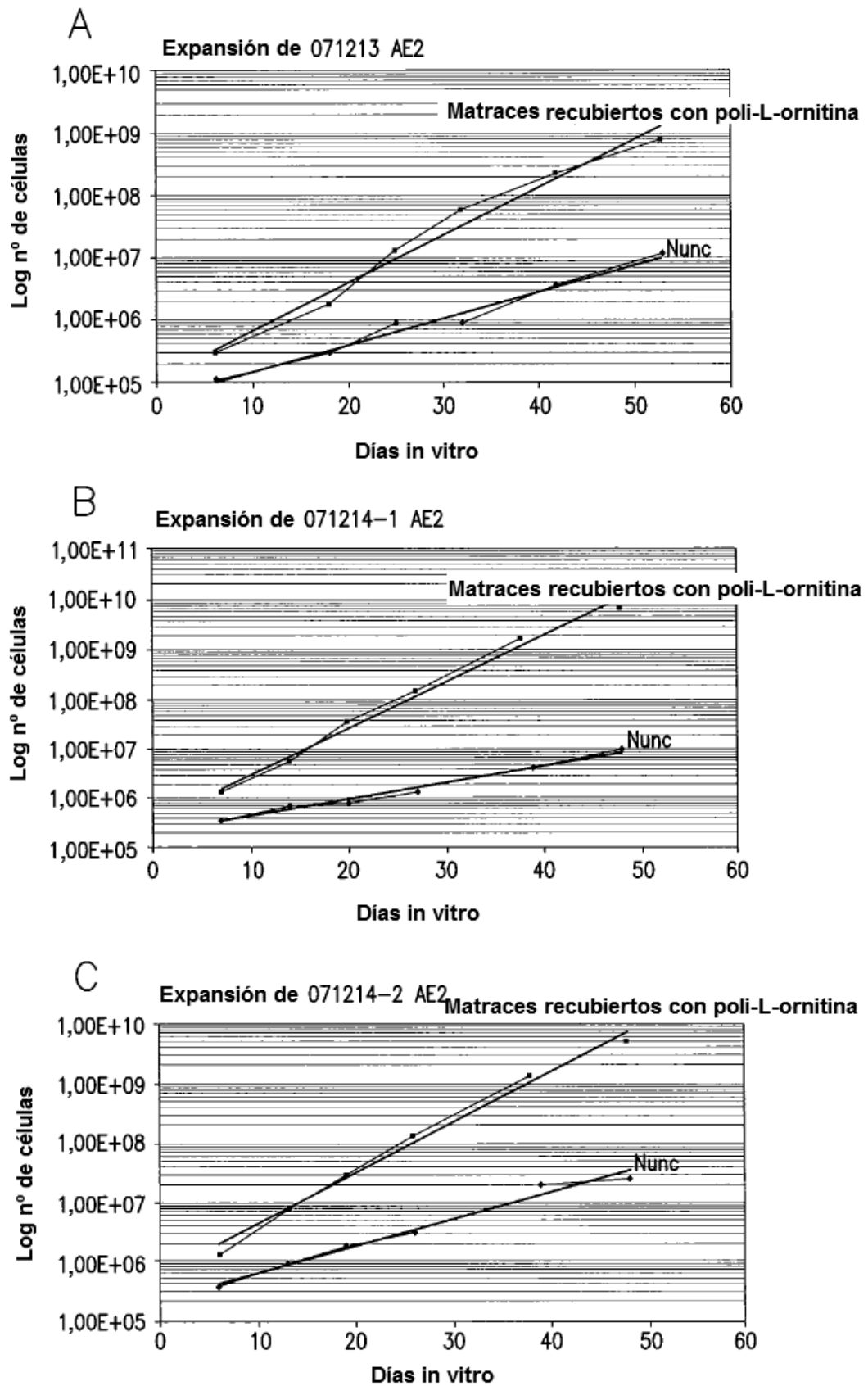


FIG. 1

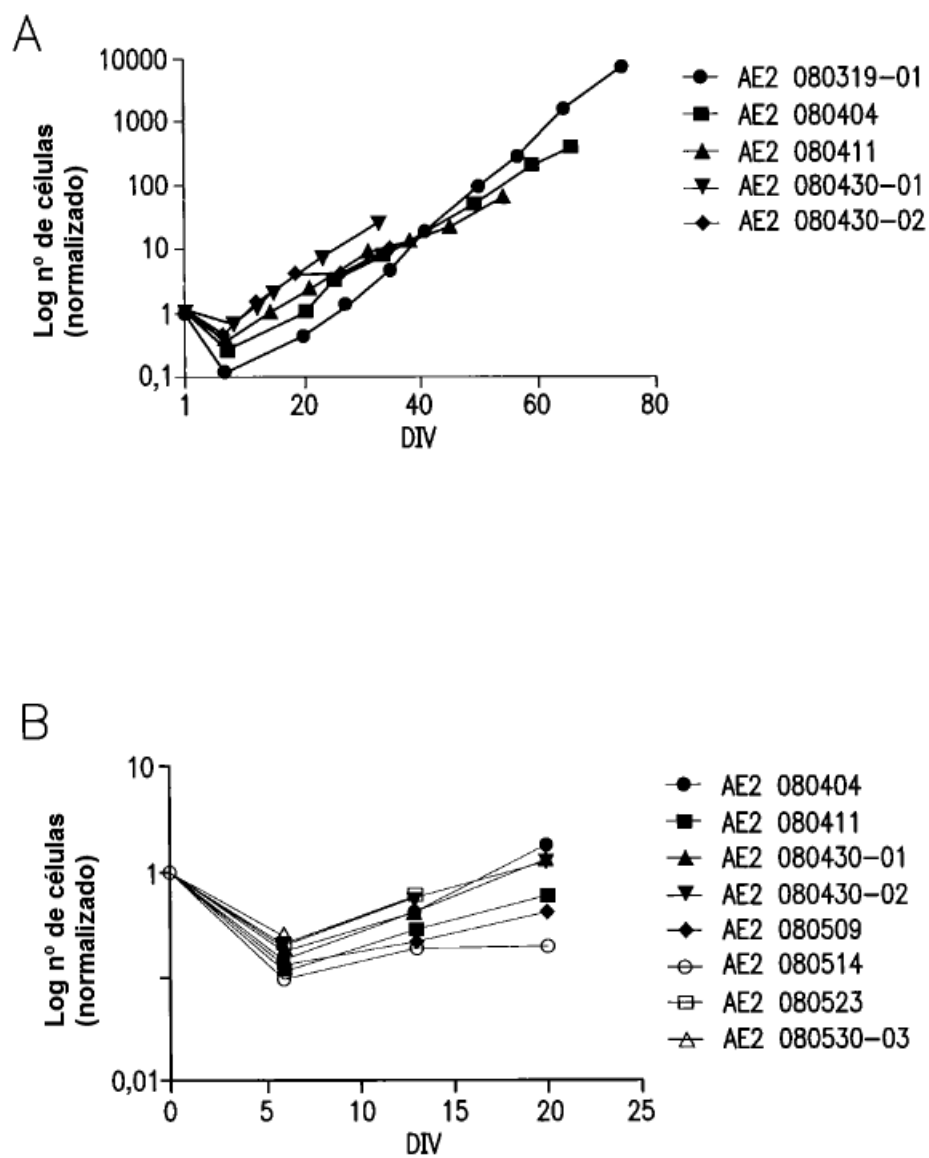


FIG. 2

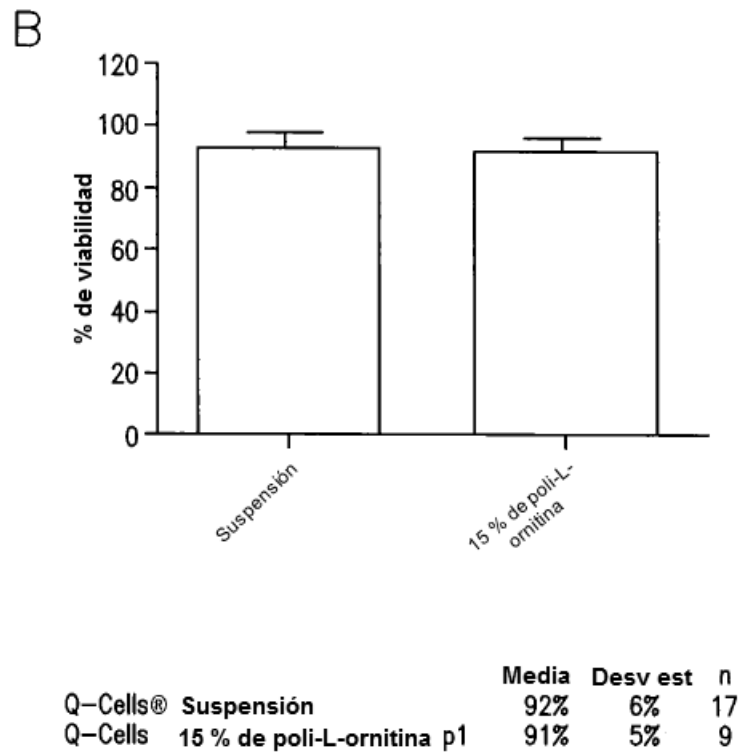
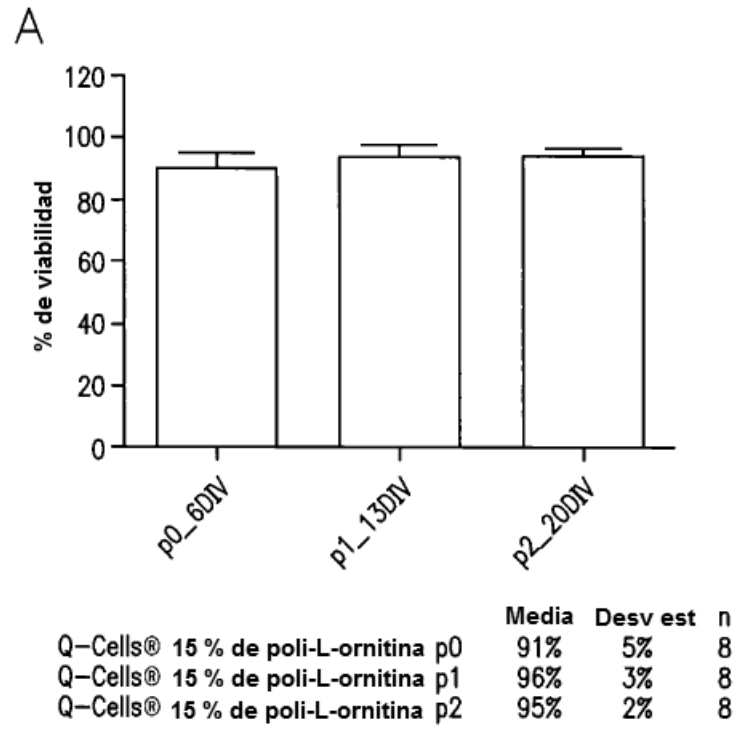


FIG. 3