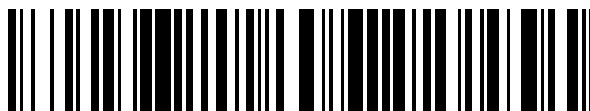


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 875**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
C12N 5/0797 (2010.01)
A61K 35/30 (2015.01)
C12N 5/0793 (2010.01)
C12N 5/079 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2007** **PCT/US2007/023184**
87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2008** **WO08057443**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2007** **E 07867349 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018** **EP 2086332**

54 Título: **Células madre mesenquimáticas derivadas de la médula ósea como fuente de progenitores neurales**

30 Prioridad:

03.11.2006 US 856515 P

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

17.04.2018

73 Titular/es:

**MULTIPLE SCLEROSIS RESEARCH CENTER OF
NEW YORK (100.0%)
521 WEST 57TH STREET,
NEW YORK, NY 10019, US**

72 Inventor/es:

**SADIQ, SAUD A. y
HARRIS, VIOLANE K.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 663 875 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

Células madre mesenquimáticas derivadas de la médula ósea como fuente de progenitores neurales

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea como una fuente de progenitores neurales para su uso en terapia con células madre autólogas de esclerosis múltiple.

10 **Antecedentes**

La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad autoinmunitaria humana crónica del sistema nervioso central (SNC) que afecta a 600.000 americanos y 2,5 millones de individuos en todo el mundo. La MS se diagnostica más a menudo entre las edades de 20 y 50 años y es la segunda después del traumatismo en producir discapacidad neurológica en adultos jóvenes. La enfermedad habitualmente comienza entre los 20 a 40 años de edad y hay dos formas principales. La MS de recaída/remisión (RR-MS) es la forma más frecuente (85 %-90 %) y afecta a las mujeres aproximadamente el doble más frecuente que en los hombres. La mayoría de los pacientes de RR-MS desarrollan posteriormente la segunda forma principal conocida como MS secundaria progresiva (SP-MS). Aproximadamente el 10 %-15 % de los pacientes presentan una rápida progresión después de la aparición de la enfermedad con ausencia de recaídas, que se denomina PP-MS primaria progresiva (Sospedra, et al., Annu Rev Immunol 23, 683 [2005]). La MS es una enfermedad altamente heterogénea en la que cada paciente difiere en la presentación clínica y la respuesta a los tratamientos.

Aunque la causa exacta de la MS es desconocida, patológicamente hay una destrucción inducida por la inflamación de la vaina de mielina que rodea los axones en el cerebro y la médula espinal dando lugar a una disminución de la conducción nerviosa. Clínicamente, la pérdida de mielina da lugar a una variedad de síntomas neurológicos y, en algunos pacientes, discapacidad importante. En la mayoría de los pacientes con enfermedad de recaída-remisión, la desmielinización inducida por inflamación se repara espontáneamente por los oligodendrocitos, las células del cerebro que producen y mantienen la mielina. La inflamación y desmielinización crónica da lugar eventualmente a la destrucción de los oligodendrocitos y la pérdida del axón. La fase secundaria progresiva de la MS se caracteriza por la neurodegeneración y deterioro funcional resistente al tratamiento.

Las opciones de tratamiento actuales para la MS son las terapias inmunomoduladoras e inmunosupresoras que son eficaces sobre todo durante la fase de recaída-remisión mediada por la inflamación de la MS. Estas terapias solo son parcialmente eficaces en el enlentecimiento de la fase progresiva de la MS, que puede ser muy neurodegenerativa. Hay una necesidad urgente de terapias que puedan parar o invertir la progresión de la MS mediante estrategias que impliquen la reparación neural y la regeneración.

Las terapias con células madre se mantienen muy prometedoras para la medicina regenerativa. Las células madre tiene el potencial de desarrollarse en muchos tipos celulares diferentes en el cuerpo. Las células madre se pueden dividir teóricamente sin límite para reponer las células que se necesiten reparar. Hay diferentes tipos de células madre con intervalos variables de opciones de compromiso. Las células madre embrionarias albergan un gran potencial para medicina regenerativa, sin embargo, tiene varias desventajas que incluyen la posibilidad del rechazo del trasplante y la posible formación de teratomas si las células no se han diferenciado apropiadamente antes del trasplante. Las células madre de adulto tales como las células madre neurales (NSC) y células precursoras de oligodendrocitos (OPC) tiene un potencial de desarrollo más restringido que las células madre embrionarias y en general se diferencian a lo largo de su linaje de origen. Aunque las células madre neurales de adulto representan una opción de tratamiento prometedora para los trastornos neurodegenerativos, tienen varias desventajas, que incluyen la dificultad de aislamiento, la capacidad de expansión limitada, y el rechazo inmunitario de las células donantes trasplantadas.

Las células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea (MSC) son otro tipo de célula madre de adulto que se diferencia en tejidos no hematopoyéticos incluyendo osteoblastos, adipocitos, condrocitos, y mioblastos (Ferrari, et al., Science 279:1528-1530 [1998]; Pittenger, et al., Science 287:143-147 [1999]; Prockop, et al., Science 276:71-74 [1997]). El uso de las células madre derivadas de médula ósea tiene muchas ventajas terapéuticas. La médula ósea es una fuente fácilmente accesible y autóloga de células madre, eliminando de esta manera el riesgo de rechazo. Como las células madre mesenquimáticas tienen una capacidad de expansión *ex vivo* enorme, es posible expandir una pequeña población de células en suficientes células para su aplicación clínica.

Las MSC tienen varias características *in vitro* impresionantes, haciéndolas un candidato muy atractivo para los trastornos neurodegenerativos e inmunológicos.

Las MSC presentan una plasticidad de diferenciación, lo que significa que son capaces de diferenciarse a lo largo de linajes distintos a los de su tejido de origen (Jiang, et al., Nature 418:41-49 [2002]; Woodbury, et al., J. Neurosci Res 69:908-917 [2002]). Las MSC son capaces de formar células con fenotipos neuronal y glial *in vitro* (Black et al., Blood Cells Mol Dis 27: 632-636 [2001]; Deng et al., Biochem Biophys Res Commun 282: 148-152 [2001]; Hermann,

et al., J. Cell Sci 117:4411-4422 [2004]; Sanchez-Ramos, et al., Exp. Neurol 164: 247-256 [2000]; Suzuki, et al., Biochem Biophys Res Commun 322: 918-922 [2004]; Woobury, et al., J Neurosci Res 61: 364-370 [2000]). Las MSC incubadas en presencia de factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) presentan una morfología celular de célula madre neural con un aumento de la expresión de marcadores de célula madre neural (Hermann, et al., J Cell Sci 117: 4411-4422 [2004]). Esos estudios aumentan la posibilidad de que las MSC son capaces de la sustitución celular en el cerebro y la médula espinal dañados.

Las MSC tienen una función inmunorreguladora. Se ha demostrado que las MSC pueden suprimir la activación y la proliferación de células T, B, NK, y dendríticas (Uccelli, et al., Expert Opin Biol Ther 6: 17-22 [2006]). Estas propiedades antiinflamatorias de las MSC sugieren una posible aplicación clínica en las enfermedades inmunomediadas.

Las MSC pueden promover la génesis de neuronas y oligodendrocitos a partir de células madre neurales (Bai, et al., Neurochem Res 32: 353-362 [2007]; Rivera, et al. Stem Cell 24: 2209-2219 [2006]). Estos estudios recientes demuestran que las MSC secretan factores tróficos que tienen influencia sobre la progenie de las células madre neurales, que pueden tener implicaciones clínicas en el aumento de la recuperación después de un amplio intervalo de lesiones del SNC.

Los hallazgos de que las MSC pueden generar células similares a las células madre neurales que expresan marcadores de célula madre neural (Hermann, et al., J Cell Sci 117: 4411-4422 [2004]) sugieren que los precursores neurales derivados de las MSC pueden ser una fuente más potente para su uso terapéutico en el SNC. Las MSC cultivadas en medios específicos de células madre neurales (medio libre de suero que contienen 20 ng/ml de EGF y bFGF) presentan morfología de neuroesfera con un aumento de los genes marcadores de célula madre neural (Nestina), genes gliales (FGAP, MBP) y genes neuronales (Map2, Neurofilamentos, Tirosina hidroxilasa, canales K⁺ dependientes de la tensión) (Hermann, et al., J Cell Sci 117: 4411-4422 [2004]; Hermann, et al., J Neurosci Res 83: 1502-1514 [2006]; Mareschi, et al., Exp Hematol 34: 1563-1572 [2006]). Al comparar las diferentes condiciones de cultivo para convertir MSC en precursores neurales, un estudio descubrió que las MSC cultivadas en medios de mantenimiento de progenitores neurales (NPMM, Lonza) adquirían las características morfológicas, marcadores neurales, y propiedades electrofisiológicas que sugieren una diferenciación neural (Mareschi, et al., Exp Hematol 34: 1563-1572 [2006]).

Uso de células madre mesenquimáticas en enfermedades neurológicas

Varios ensayos clínicos han analizado la seguridad y beneficio terapéutico de las MSC. Varios cientos de pacientes se han infundido con MSC coincidentes con HLA alogénicas en el contexto de trasplante de células madre hematopoyéticas para enfermedad malignas y enfermedades metabólicas innatas (Lazarus, et al., Biol Blood Marrow Transplant 11: 389-398 [2005]; Le Blanc, et al., Biol Blood Marrow Transplant 11: 321-334 [2005]). Se revirtieron graves enfermedades de injerto contra huésped (GvHD) con la infusión de MSC derivadas de un donante (Le Blanc et al., Lancet 363: 1439-1441 [2004]). En estos estudios, la infusión de aproximadamente 1-2 millones de células MSC/dk es bien tolerada sin efectos secundarios. Por lo tanto, los datos iniciales del ensayo clínico sugieren que las terapias basadas en MSC son muy prometedoras como inmunomoduladores, y ensayos adicionales en Fase I/II que estudian los efectos del papel de las MSC en el tratamiento de la GvHD están en curso (Giordano, et al., J Cell Physiol 211: 27-35 [2007]). Además, los ensayos clínicos que examinan las MSC en la osteogénesis imperfecta (Horwitz, et al., Proc Natl Acad Sci USA 99: 8932-8937 [2002]; Le Blanc, et al., Transplantation 79: 1607-1614 [2005]), infarto de miocardio (Chen, et al., Am J Cardiol 94: 92-95 [2004]; Katritsis et al., Catheter Cardiovas Interv 65: 321-329 [2005]), e ictus (Bang, et al., Ann Neurol 57: 874-882 [2005]) han demostrado la seguridad y eficacia del tratamiento en estas enfermedades también.

En un reciente ensayo clínico en Italia (Mazzini, et al., Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 4: 158-161 [2003]; Mazzini, et al., Neurol Res 28: 523-526 [2006]; Mazzini, et al., Neurol Sci [2007]), se trasplantaron MSC derivadas de médula ósea autólogas directamente en la médula espinal de nueve pacientes con esclerosis amiotrófica lateral (ALS), una enfermedad degenerativa de la neurona motora. El trasplante intramedular de una media de 32 millones de MSC autólogas era seguro y bien tolerado por los pacientes de ALS, con un periodo de seguimiento de 4 años. Los eventos adversos menores eran irradiación dolorosa intercostal y disestesia sensorial de las piernas, que desaparecían después de semanas. En 5 de los pacientes que recibieron el trasplante de MSC autóloga, había un enlentecimiento significativo del declive lineal en la escala de valoración funcional de ALS (Mazzini, et al., Neurol Res 28: 523-526 [2006]). Dada la naturaleza progresiva de esta enfermedad, estos hallazgos sugieren un beneficio clínico del trasplante de MSC y la garantía de ensayos adicionales. Los esperanzadores resultados clínicos del trasplante de MSC autólogas en la ALS y la seguridad y tolerancia observada en el seguimiento de 4 años sugiere que se podría tomar una estrategia similar para tratar otros trastornos neurodegenerativos tales como la MS.

Uso de las células madre mesenquimáticas en la MS

Basándose en los datos preclínicos que demuestran la inmunosupresión periférica en EAE, tiene lugar un estudio de investigación actualmente en la Universidad de Cambridge en Cambridge, Inglaterra. El estudio tiene como objetivo investigar la seguridad de la administración intravenosa de MSC autólogas en pacientes con esclerosis múltiple. Hay 20 pacientes inscritos en el estudio, y la dosificación será de 2 millones de células/kg (<http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00395200?session-id=F5A5DF2968E1567A594549F1CCE4B7EF?order=14>).

En un estudio piloto reciente llevado a cabo en Irán, se inyectaron MSC autólogas humanas por vía intratecal en diez pacientes con MS primaria progresiva y secundaria progresiva (Mohyeddin, et al., Irán J Immunol 4: 50-57 2007)]. Los investigadores inyectaron una media de 8,73 millones de células. La dosis más alta era de 13,2 millones de células y la dosis más baja era de 2,5 millones de células. Se hizo el seguimiento de los pacientes durante una media de diecinueve meses después del tratamiento con exámenes de seguimiento mensuales y una MRI a los 12 meses después de la inyección intratecal de MSC autólogas. Los pacientes se evaluaron en cuanto a los cambios en la valoración EDSS, los cambios en el número y tamaño de las lesiones en la MRI, y la mejora subjetiva. Los investigadores descubrieron que el trasplante de MSC autólogas intratecal era seguro y bien tolerado con efectos secundarios relacionados con el procedimiento de la inyección intratecal (por ejemplo, dolor de cabeza). Dos pacientes contrajeron una meningitis iatrogénica y ambos pacientes se trataron satisfactoriamente con antibióticos. También señalaron que la terapia se asociaba con alguna mejoría. Un paciente experimentó una disminución de la valoración EDSS. Cuatro pacientes presentaron una mejoría en las funciones diarias sin cambio en la valoración EDSS. Cinco pacientes experimentaron un aumento de la valoración EDSS, y los cinco informaron de una mejoría subjetiva a los tres meses del tratamiento. Los investigadores concluyeron que la inyección de MSC autólogas intratecal es un tratamiento seguro y prometedor para pacientes con MS.

El uso de precursores neurales derivados de MSC no se había informado anteriormente para su administración a seres humanos.

Sumario de la invención

La invención proporciona métodos para la diferenciación *in vitro* de células precursoras neurales derivadas de células madre mesenquimáticas según se define en las reivindicaciones independientes adjuntas. Se proporcionan adicionalmente métodos para tratar y/o reducir la gravedad de la esclerosis múltiple en un ser humano administrando precursores neurales derivados de células madre mesenquimáticas a un paciente que sufre esclerosis múltiple.

Las células precursoras neurales derivadas de células madre mesenquimáticas de acuerdo con la invención se pueden formar cultivando las células madre mesenquimáticas en un medio básico de progenitores neurales seguido por la colocación en placas de las células y el cultivo en factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF). Las células precursoras neurales se marcan entonces, tal como mediante inmunocitoquímica fluorescente, para su identificación. Las células precursoras neurales incluyen las células oligodendrogliales y/o neuronales.

La administración de precursores neurales derivados de células madre mesenquimáticas autólogas a un paciente puede incluir las etapas de: preparar un suero de crecimiento autólogo obtenido del paciente, recolectar células madre derivadas de médula ósea de un paciente que se va a tratar mediante dicho método; aislar y expandir las células madre mesenquimáticas derivadas de la médula ósea en el suero de crecimiento; cultivar y aislar las células precursoras neurales derivadas de las células madre mesenquimáticas a partir de las células madre mesenquimáticas; y la administración intratecal de dichos precursores neurales derivados de células madre mesenquimáticas autólogas a dicho paciente. Los precursores neurales derivados de células madre mesenquimáticas de acuerdo con la presente invención presentan un aumento de la cantidad de los marcadores Nestina, neurofilamentos y GFAP (proteína ácida fibrilar de la glía) y una disminución de la cantidad del marcador Vimentina.

Las características anteriores y otras de la invención, incluyendo distintos detalles nuevos de construcción y combinaciones de partes, se describirá ahora más particularmente en referencia a los dibujos adjuntos y puntualizados en las reivindicaciones. Se entenderá que los dispositivos y métodos particulares que forman parte de la invención se presentan a modo de ilustración solo y no como limitación de la invención. Los principios y características de la presente invención se pueden emplear en distintas y numerosas realizaciones si alejarse del alcance de la invención.

Breve descripción de las figuras

Estas y otras características, aspectos y ventajas de los aparatos y métodos de la presente invención se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, reivindicaciones adjuntas, y dibujos adjuntos, en los que:

FIG. 1: Aumento de la expresión del marcador neuronal y de la oligodendroglía en precursores neurales derivados de MSC (MSC-NP) y MSC después de la diferenciación.

La expresión de 133-tubulina (marcador neuronal) y 04 (marcador de diferenciación de la oligodendroglía temprano) está aumentada significativamente en las MSC-NP en comparación con las MSC cuando se cultivan en bFGF durante 3 semanas.

FIG. 2: Aumento de la expresión de marcadores neuronales y de la oligodendroglía en precursores neurales derivados de MSC después de la diferenciación *in vitro*. Los marcadores neuronales (β 3-tubulina y MAP-2) y los marcadores de la oligodendroglía (O1 y GalC) aumentan después de 3 semanas de diferenciación en bFGF. La expresión de nestina, que es un marcador de progenitor neural, está disminuida aproximadamente en un 50 % de las MSC-NP después de la diferenciación.

FIG. 3: Ilustra gráficamente que los precursores neurales derivados de MSC presentan características antiinflamatorias similares a las de las MSC mediante la inhibición de la proliferación de células T estimulada por PHA en un co-cultivo.

FIG. 4: Los precursores neurales derivados de MSC (MSC-NP) pierden su capacidad para diferenciarse en linajes mesodérmicos.

Las MSC-NP presentan una disminución de la capacidad para diferenciar entre adipocitos positivos a Aceite Rojo O (A) u osteocitos que contienen calcio (B) en comparación con las MSC.

FIG. 5: Ilustra gráficamente la disminución de la valoración clínica después de la administración intravenosa (A) o intracerebroventricular (B) de precursores neurales derivados de MSC de ratón en el momento de la aparición de EAE (día 10) en ratones.

FIG. 6: Aumento de la expresión de Nestina en precursores neurales derivados de MSC.

(A) Morfología en forma de huso de las MSC humanas aisladas de la médula ósea y crecimiento en MSCGM (medio de crecimiento de células madre mesenquimáticas) (10 % de suero) como se ve por microscopía óptica. (B) Morfología esférica de precursores neurales derivados de MSC. Los precursores neurales se derivaron de las MSC después del cultivo en NPMM durante 15 días. (C) Aproximadamente el 20 % de las MSC humanas expresan la proteína Nestina. (D) > 90 % de los precursores neurales derivados de MSC expresan la proteína Nestina. La expresión proteica de Nestina se determinó por inmunofluorescencia convencional. Las células se fijaron en un 4 % de para formaldehído y se marcaron con un anticuerpo de Nestina (Chemicon) seguido por un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa-594 (Molecular Probes). Los paneles A-C se visionaron con una magnificación de 100x y el panel D se visualizó con una magnificación de 200x.

FIG. 7: Los precursores neurales derivados de MSC (MSC-NP) presentan un aumento de la expresión proteica de Nestina, GFAP y Neurofilamento-M, y una disminución de la expresión de Vimentina y actina α SM en comparación con las MSC.

FIG. 8: Ilustra gráficamente el aumento de expresión proteica en los precursores neurales derivados de MSC de Nestina, GFAP y Neurofilamento-M, y disminución de la expresión de Vimentina y α SM en comparación con las MSC.

Descripción detallada

Los pacientes con esclerosis múltiple normalmente experimentan un declive neurológico progresivo debido al ataque autoinmunitario prolongado, el fallo de los mecanismos de re-mielinización endógenos, y la pérdida axonal. El uso de células precursoras neurales derivadas de MSC autólogas tiene el objetivo de revertir la neurodegeneración que se produce en la MS mediante la reparación y regeneración de las células dañadas. Los estudios preclínicos en animales demuestran que las terapias basadas en MSC tienen un beneficio significativo en los modelos de lesión del SNC y enfermedad desmielinizante. Los datos de los ensayos clínico han demostrado que la administración de MSC es segura y bien tolerada, sin embargo, no se han utilizado células precursoras neurales derivadas de MSC en ensayos clínicos. Además, los ensayos clínicos con pacientes de MS y ALS sugieren que las MSC pueden tener algún beneficio terapéutico. La presente invención se refiere por lo tanto a aclarar la seguridad, tolerancia, dosificación y eficacia de inyecciones intratecales de células precursoras neurales derivadas de MSC autólogas en pacientes con MS. Este tratamiento podría invertir la neurodegeneración en las placas de desmielinización de los pacientes con MS. Las inyecciones de células precursoras neurales derivadas de MSC autólogas podrían disminuir también la respuesta inflamatoria asociada con los ataques de MS. El trasplante de células precursoras neurales derivadas de MSC autólogas podría servir como una matriz eficaz para la neuro-regeneración con mínimos efectos secundarios adversos.

Los datos *in vitro* sugieren que la pre-diferenciación de las MSC en precursores neurales derivados de MSC es necesaria para la diferenciación en un fenotipo neuronal o de la glía más maduro. Aunque la diferenciación de las MSC en células tipo neuronal se había informado (Deng, et al., Biochem Biophys Res Commun 282: 148-152 [2001]; Sanchez-Ramos, et al., Exp Neurol 164: 247-256 [2000]; Woodbury, et al., J Neurosci Res 61:364-370 [2000]), estos cambios se atribuyen probablemente a toxicidad celular (Bertani, et al., J Cell Sci 118: 3925-3936 [2005]; Neuhuber, et al., J Neurosci Res 77: 192-204 [2004]). La conversión de MSC en precursores neurales derivados de MSC da como resultado el aumento significativo de la expresión de Nestina (véase, por ejemplo, la FIG. 7), que es necesaria para la diferenciación posterior en neuronas y astrocitos (Wislet-Gendebien, et al., J Cell Sci 116: 3295-3302).

Los inventores de la presente invención han demostrado que los precursores neurales derivados de MSC pero no las MSC, son capaces de la diferenciación *in vitro* en tipos celulares de la oligodendroglía (O4+) o neuronales (β 3-tubulina+) (FIG. 1 y 2). Además, los presentes inventores han generado datos que sugieren que los precursores neurales derivados de las MSC mantienen las propiedades antiinflamatorias de las MSC (FIG. 3), pero pierden su plasticidad de diferenciación (es decir, la diferenciación en osteoblastos o adipocitos) (FIG. 4).

Estos hallazgos sugieren que los precursores neurales derivados de las MSC es más probable que respondan a las señales de diferenciación en el SNC, y además pueden suprimir la respuesta inmunitaria y proporcionan un soporte trófico para las células dañadas. En total, estos datos apoyan lo racional de este protocolo para utilizar precursores neurales derivados de MSC para la terapia basada en células en la esclerosis múltiple.

El objetivo primario de la presente invención era determinar la seguridad y eficacia de la utilización de terapias con células precursoras neurales derivadas de células madre mesenquimáticas autólogas en la MS. Esto se consiguió llevando a cabo inyecciones intratecales de las células precursoras neurales derivadas de MSC autólogas aisladas y expandidas. Otro objetivo es determinar la tolerancia a los regímenes de dosificación de la administración intratecal de células precursoras neurales derivadas de células madre mesenquimáticas autónomas en diferentes periodos de tiempo.

Estudios en modelos animales de enfermedades neurológicas

Un gran número de estudios han demostrado la seguridad y eficacia del trasplante de MSC en modelos animales preclínicos de enfermedades del SNC. Los estudios *in vivo* que examinan la lesión de la médula espinal en ratas han demostrado que las MSC trasplantadas se dirigen eficazmente al tejido de la médula espinal lesionado y apoyan el crecimiento axonal promoviendo una recuperación clínica significativa (Chopp, et al., Neuroreport 11: 3001-3005 [2000]; Hofstetter, et al., Proc Natl Acad Sci USA 99: 2199-2204 [2002]; Ohta, et al., Exp Neurol 187: 226-278 [2004]; Satake, et al., Spine 29: 1971-1979 [2004]; Zurita, Neuroreport 15: 1105-1108 [2004]; Zurita, Neurosci Lett 402: 51-56). En los modelos de lesión cerebral isquémica de rata, las MSC trasplantadas migraban hacia el sitio de la lesión cerebral y mejoraban el resultado neurológico (Chen et al., Am J Cardiol 94: 92-95 [2004]; Lu, et al., J Neurosurg 97: 935-940 [2002]; Lu, et al., J Neurotrauma 18: 813-819 [2001]; Lu, et al., Neuroreport 12: 559-563 [2001]). El trasplante de MSC en otros múltiples modelos de enfermedad neurodegenerativa también ha demostrado una supervivencia, migración, y promoción eficaz de las redes neurales (Bae, et al., Stem Cells 25: 1308-1316 [2007]; Hellmann, et al., Neurosci Lett 395: 124-128 [2006]), demostrando las propiedades neuroprotectoras y neuroregenerativas de las MSC en modelos de roedor. Además, las MSC eran capaces de la re-mielinización funcional cuando se trasplantaban en una médula espinal desmielinizada (Akiyama, et al., J Neurosci 22: 6623-6630 [2002]). En los modelos de primates no humanos, la evaluación preclínica del implante de MSC en el SNC de monos Rhesus ha demostrado el injerto celular, la supervivencia y la migración dirigida a los sitios de la lesión, y el beneficio neurológico sin toxicidad (Deng, et al., Cytotherapy 8: 210-214 [2006]; Isakova, et al., Mol Ther 13: 1173-1184 [2006]), sugiriendo que las terapias basadas en MSC representan una estrategia terapéutica segura para los trastornos del SNC.

Existen datos preclínicos más limitados para los precursores neurales derivados de MSC en el SNC. En un estudio reciente se trasplantaron 100.000 MSC o precursores neurales derivados de MSC por vía intratecal en la cisterna magna en un modelo de ratón de ALS (Habisch, et al., J Neural Transm (en prensa) [2007]). El primer parámetro del resultado era el efecto sobre el tiempo de supervivencia, mientras las medidas del segundo resultado incluían la mejora de la función motora y la distribución celular subaracnoidea e intra-parenquimática. El trasplante intratecal de MSC o precursores neurales derivados de MSC no tenía efecto sobre el tiempo de supervivencia en ratones con ALS en comparación con los ratones tratados, probablemente debido a la falta de migración celular en la médula espinal. De manera interesante había un aumento significativo de la actuación motora presintomática en los ratones que recibían MSC o precursores neurales derivados de MSC. Había una distribución extensa de todas las células trasplantadas en el espacio subaracnoideo, así como una migración intra-parenquimática significativa. Este estudio demostraba que los precursores neurales derivados de MSC se toleran tan bien como las MSC, y muestran una supervivencia y características de migración en el SNC similares.

Estudios de MS en modelos animales

La administración de MSC también se ha ensayado en ratones con encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), un modelo experimental para esclerosis múltiple humana. La Encefalomiелitis Autoinmunitaria Experimental (EAE), también llamada Encefalomiелitis Alérgica Experimental, es un modelo animal de Esclerosis Múltiple. Los modelos animales de enfermedades humanas son enfermedades de especies no humanas (a menudo roedores) que se parecen mucho a sus equivalentes humanos y pueden estudiarse con vistas a entender mejor y tratar la forma humana. La EAE no es esclerosis múltiple, ni es una enfermedad única en una única especie, pero sus diferentes formas se parecen las distintas formas y estadio de la MS muy estrechamente en un gran número de maneras.

La EAE es una enfermedad autoinmunitaria desmielinizante e inflamatoria, adquirida, de recaídas crónicas o aguda del SNC. Los animales se inyectan con todo o parte de distintas proteínas que producen la mielina, la vaina aislante

que rodea las células nerviosas (neuronas). Estas proteínas inducen una respuesta autoinmunitaria en los animales – es decir, el sistema inmunitario del animal monta un ataque contra su propia mielina como resultado de la exposición a la inyección. Los animales desarrollan una enfermedad que presentan similitudes patológicas y clínicas con la MS en seres humano.

La EAE se ha inducido en varias especies animales diferentes incluyendo ratones, ratas, cobayas, conejos, macacos, monos Rhesus y titís. Por distintas razones que incluyen el número de herramientas inmunológicas, la disponibilidad, esperanza de vida y fecundidad de los animales y el parecido de la enfermedad inducida con la MS, los ratones y las ratas son las especies utilizadas más comúnmente.

Los animales se cruzan para producir fiablemente la susceptibilidad a la EAE en los animales. Como en los seres humanos y la MS, no todos los ratones o ratas tendrán una propensión natural a adquirir EAE. Además, diferentes cruzamientos desarrollarán diferentes formas de EAE, algunas de las cuales actuarán como buenos modelos para las diferentes formas de MS humana. Las formas diferentes de EAE también se utilizan como modelos para los diferentes estadios de MS.

La inyección intravenosa de MSC en ratones con EAE resultaba en una disminución de infiltrados inflamatorios; menos lesiones desmielinizantes, y mejora la función neurológica (Zappia, et al., Blood 106: 1755-1761 [2005]; Zhang, et al., Exp Neurol 195: 16-26 [2005]). Aunque algunas de las células inyectadas periféricamente se encontraron localizadas parenquimáticamente (Zhang, et al., Exp Neurol 195: 16-26 [2005]), la mayoría de las MSC se asociaron con órganos linfoides en los que modulan eficazmente la respuesta inmunitaria patogénica (Zappia, et al., Blood 106: 1755-1761 [2005]; Gerdoni, et al., Ann Neurol 61: 219-227 [2007]).

Los inventores han demostrado que la inyección de precursores neurales derivados de MSC de ratón en el momento de la aparición de la EAE en los ratones da como resultado una disminución similar en la valoración de la EAE comparada con los estudios descritos anteriormente. Se inyectaron un millón de células por vía intravenosa o por vía intra-cerebroventricular y se hizo el seguimiento de los ratones durante 3-4 meses. Como se ilustra en la FIG. 5A, había una disminución en el nivel total de discapacidad de los ratones inyectados por vía intravenosa con precursores neurales derivadas de MSC en comparación con los ratones inyectados con solución salina. Cuando las células se inyectaban directamente en el SNC (FIG. 5B) el inicio de la EAE estaba significativamente retrasado, así como disminuía la incapacidad total.

Base para la vía de administración intratecal

Los modelos animales preclínicos se han utilizado para examinar la seguridad y tolerancia de las MSC administradas por distintas vías. Se descubrió que la administración intravenosa era beneficiosa para enfermedades inmunomediadas periféricas, tal como EAE y enfermedad del injerto contra el huésped (GvHD) (Zappia, et al., Blood 106: 1755-1761 [2005]; Bartholomew, et al., Exp Hematol 30: 42-48 [2002]). Las MSC inyectadas por vía intravenosa se aclaran de la corriente sanguínea después de 1 hora (Koc, et al., J Clin Oncol 18: 307-316 [2000]), estando la mayoría de las células atrapadas en el pulmón. Se ha estimado que menos del 1 % de las MSC inyectadas alcanzan el SNC (Corti, et al., Brain 127: 2518-2532 [2004]), haciendo que la vía intravenosa de administración sea clínicamente inviable para las enfermedades del SNC debido al gran número de células necesarias.

La marca patológica de la esclerosis múltiple son las lesiones desmielinizadas multifocales en el cerebro. Las lesiones con grados variables de desmielinización/remielinización se observan a lo largo del cerebro y la médula espinal, aunque se ha señalado que las lesiones periventriculares tienen menos extensión de remielinización que de lesiones profundas de materia blanca (Patrikios, et al., Brain 129: 3165-317260 [2006]). La mayoría de la discapacidad física en la MS se produce por las lesiones en la médula espinal, de esta manera se cree que las células madre podrían suministrarse directamente en las lesiones de la médula espinal mediante inyección intramedular. Sin embargo, dicho procedimiento necesitaría neurocirugía e implica riesgos no deseados al paciente. Además, hay típicamente múltiples focos de desmielinización que contribuyen a la incapacidad, haciendo difícil suministrar células a todas las lesiones. Además, las inyecciones directas en el tejido del SNC sería peligroso y demasiado agresiva para una enfermedad no fatal.

La vía de suministro óptima debería sembrar los precursores neurales derivados de MSC en el cerebro y médula espinal mediante la circulación venosa, arterial o del líquido cefalorraquídeo. El suministro intravenoso de células madre es la vía menos invasiva de suministro y se ha demostrado que es segura y tolerable para las MSC. Sin embargo, la inyección IV de precursores neurales derivados de MSC no garantizaría que penetre un número de células madre en el cerebro y la médula espinal. Por lo tanto, los inventores han seleccionado una vía intratecal de suministro, que es mínimamente invasiva y sembraría células madre en el SNC mediante la circulación del líquido cefalorraquídeo, proporcionando un acceso potencial a las lesiones de la médula espinal y lesiones cerebrales periventriculares. Los estudios preclínicos que demuestran la capacidad de las MSC para migrar hacia las áreas cefálicas desde el sitio de inyección Bakshi, et al., J Neurotrauma 23: 55-65 [2006]; Lepore, et al., Brain Res 1045: 206-216 [2005]), sugiere la administración intratecal mediante punción lumbar es una vía eficaz de suministro de células madre en las áreas de la lesión del SNC. La inyección de medicaciones o células en el LCR permite a estos agentes evitar órganos extra-SNC y penetrar en el cerebro rápidamente. Mientras que el flujo general del LCR es de

rostral a caudal, existe algo de flujo retrógrado del LCR (Johnson, et al., Pharm Res 22: 1011-1037 [2005]). Varios tratamientos eficaces se administran por vía intratecal. Por ejemplo, se utiliza el Baclofeno (ITB) intratecal para tratar la espasticidad en pacientes ambulatorios con MS. En un estudio llevado a cabo por los inventores, treinta y seis pacientes con espasticidad grave se trataron con una infusión continua de ITB. Se hizo el seguimiento de los

5 pacientes desde 1 a 13 años. Los treinta y seis pacientes tenían una pérdida profunda de espasticidad como se evaluó por la escala de Ashworth (Sadiq, et al., J Neurol 253: 563-569 [2006]).

En modelos de enfermedad del SNC, las MSC se han inyectado por vía intracerebroventricular (Ohta, et al., Exp Neurol 187: 266-278 [2004]; Arnhold, et al., Eur J Cell Biol 85: 551-565 [2006]; Chen, et al., J Neurol Sci 189: 49-57 [2001]) y, en algunos casos, directamente en los tejidos del CNS patológicos (Chopp, et al., Neuroreport 11: 3001-3005 [2000]; Hofstetter, et al., Proc Natl Acad Sci USA 99: 2199-2204 [2002]). Aunque estas vías de suministro han probado que son eficaces en modelos animales, en los seres humanos se traduciría en un procedimiento altamente invasivo y potencialmente peligroso. Las MSC inyectadas por vía intratecal en la región lumbar de ratas tras una lesión de la médula espinal cervical, migraban y se acumulaban en el área de la lesión (Bakshi, et al., Neurotrauma 23:55-65 [2006]), demostrando la validez de esta estrategia. Debido a esta migración hacia rostral de las MSC, se deduce que las MSC son sensibles a la señalización quimiotáctica y moléculas de adhesión específicas (Bakshi, et al., J Neurotrauma 23: 55-56 [2006]; Lapore, et al., Brain Res 1045: 206-216 [2005]). Traducido en seres humanos, el suministro intratecal de células madre mediante la punción lumbar mínimamente invasiva puede tener un potencial terapéutico significativo.

En los seres humanos el primer problema que se tiene que afrontar es la seguridad y tolerancia. La vía más segura de suministro celular sería la vía i.v. o intratecal. Basándose en los modelos preclínicos descritos anteriormente, las células se administran a los sujetos humanos mediante punción lumbar.

En un ensayo con seres humanos sobre como comenzar, se tendrán en cuenta los siguientes procedimientos para demostrar la eficacia de la administración de precursores neurales derivados de células madre mesenquimáticas autólogas a seres humanos para tratar y/o reducir la gravedad de la MS.

Recolección de suero

Las células madre derivadas de médula ósea se aislaron y expandieron en suero autólogo a partir del mismo sujeto de investigación. El crecimiento de células madre en suero autólogo evita la introducción de productos animales potencialmente perjudiciales presentes en el suero bovino fetal (Stute, et al. Exp Hematol 32: 1212-1225 [2004]). El suero de cada sujeto de experimentación se recolectó antes del procedimiento de aspiración de médula ósea, en la visita de la inscripción. Un profesional sanitario recolecta aproximadamente 200 ml de sangre periférica de cada sujeto de experimentación en tubos pre-etiquetados con el identificador único del sujeto de investigación. A los pacientes se les dio fluidos orales y se tomaron los signos vitales antes de enviarlos a casa. La sangre se transfirió inmediatamente al laboratorio de cultivo celular. La sangre se centrifugó entonces, y el suero se recolectó y agrupó utilizando una técnica aséptica en una campana biosegura. El suero se filtró entonces a través de un filtro de 0,2 mm y entonces se almacenó en alícuotas en un congelador designado a -80 °C que se controlaba continuamente mediante un monitor del congelador con un sistema de alerta telefónica. Cada tubo de suero se marcará con el identificador único del sujeto de experimentación y la fecha. Cada lote de suero del paciente se almacenará en su propia caja también marcada con el identificador único del paciente. Los materiales que pueden contaminar o afectar adversamente los productos de terapia celular no se almacenarán en el congelador designado. El suero se utiliza para sustentar el crecimiento de las células madre mesenquimáticas autólogas.

Recolección de médula ósea

Se llevó a cabo una aspiración de médula ósea para obtener un aspirado de médula ósea a partir de la cresta ilíaca posterior en condiciones estériles a continuación de la inyección de un anestésico local. Se siguió el procedimiento de aspiración de médula ósea convencional utilizando un kit de médula ósea de adulto con una jeringa heparinizada. En los pacientes incapacitados que no se pueden transferir sin un elevador de Hoyer, es difícil acceder a la cresta ilíaca. En estos pacientes el aspirado de médula ósea se obtiene a partir del manubrio del esternón, a nivel del segundo espacio intercostal. Este procedimiento se llevó a cabo en una silla de ruedas. En los pacientes cuyo nivel de discapacidad les impedía ser capaces de posicionarse por sí mismos de manera que el hematólogo pudiera acceder a la cresta ilíaca también se llevó a cabo el aspirado desde el esternón. El procedimiento de aspiración de médula ósea se siguió utilizando un kit de médula ósea de adulto con una jeringa heparinizada. Se aspirarán aproximadamente 10 cc de médula ósea de cada paciente.

Reactivos de cultivos celulares

Uno de los problemas en la bibliografía con respecto a los reactivos de cultivo celular en las terapias basadas en células madre es el uso del suero bovino fetal (FBS) (Mannello, et al., Stem Cells 25: 1603-1609 [2007]), ya que los antígenos de suero bovino pueden permanecer asociados a las células produciendo una reacción inmunológica. Los inventores han eliminados los riesgos asociados al FBS utilizando suero autólogo. Independientemente, varios ensayos clínicos han inyectado MSC expandidas en medios suplementados con FBS sin efectos secundarios

asociados al FBS significativos (Lazarus et al., Biol Blood Marrow Transplant 11: 389-398 [2005]; Le Blanc, et al., Lancet 363: 1439-1441 [2004]; Horwitz, et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:8932-8937 [2002]; Bang, et al., Ann Neurol 57: 874-882 [2005]; Mazzini, et al., Neurol Sci [2007]; Mohyeddin, et al., Iran J Immunol 4: 50-57 [2007]; Karussis, et al., J Neurol Sci [2007]). Un estudio reciente demostraba que los pacientes trasplantados con MSC alogénicas desarrollaban anticuerpos anti-FBS clínicamente insignificantes y ningún alo-anticuerpo específico de MSC (Sundin, et al., Haematologica [2007]). En todos los ensayos clínicos con MSC hasta la fecha, las MSC se expandían en medios con FBS y L-Glut, se hacía un pasaje con tripsina, se re-suspendían en solución salina o líquido cefalorraquídeo y se suministraban por vía intravenosa (Lazarus, et al., Biol Blood Marrow Transplant 11: 389-398 [2005]; Le Blanc, et al., Lancet 363: 1439-1441 [2004]; Horwitz, et al., Proc Natl Acad Sci USA 99: 8932-8937 [2002]; Bang, et al., Ann Neurol 57: 874-882 [2005]), por vía intramedular (Mazzini, et al., J Neuro Sci [2007]), o por vía intratecal (Mohyeddin, et al., Iran J Immunol 4: 50-57 [2007]; Karussis, et al., J Neurol Sci [2007]), sin efectos secundarios asociados con la infusión. De manera similar a estos ensayos, el producto celular final de acuerdo con la presente invención se lava completamente y se re-suspende en una solución salina de calidad clínica antes de la inyección al ser humano para evitar la infusión de reactivos del cultivo celular. Una descripción de todos los reactivos del cultivo celular que se utilizan en este protocolo se describe posteriormente en el presente documento.

Medio básico: El medio básico que se utiliza para expandir las MSC (MSCBM) se fabrica en unas instalaciones que cumplen las regulaciones GMP en Lonza. El MSCBM se suplementa con Gluta-MAX (Invitrogen), que es un dipéptido estable que sustituye la L-Glutamina, un aminoácido esencial necesario para el crecimiento celular óptimo. Como el Gluta-MAX se metaboliza en las células, no se espera ninguna toxicidad asociada a la infusión. Además, el medio utilizado para cultivar las MSC para la infusión en seres humanos se suplementa frecuentemente con L-glutamina sin efectos secundarios evidentes (Lazarus et al., Biol Blood Marrow Transplant 11: 389-398 [2005]; Le Blanc, et al., Lancet 363: 1439-1441 [2004]; Horwitz, et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:8932-8937 [2002]; Bang, et al., Ann Neurol 57: 874-882 [2005]; Mazzini, et al., Neurol Sci [2007]; Mohyeddin, et al., Iran J Immunol 4: 50-57 [2007]; Karussis, et al., J Neurol Sci [2007]). El MSCBM se suplementa adicionalmente con un 10 % de suero autólogo. El medio básico utilizado para generar precursores neurales derivados de MSC (NPMM) también se fabricó en unas instalaciones que cumplen las regulaciones GMP en Lonza. El NPMM consiste en un medio básico (NPBM) con tres suplementos: 1) factor de crecimiento recombinante humano (rhEGF), 2) factor de crecimiento de fibroblastos básico recombinante humano (rhbFGF), y 3) factor de supervivencia celular neural (NSF-1). El EGF y bFGF se utilizan cada uno a una concentración final de 20 ng/ml. Se proporcionan las soluciones de reserva de EGF y bFGF en una solución salina que contiene un 0,1 % de albúmina sérica bovina (BSA) como vehículo proteico, que se diluye entonces a una concentración final de un 0,0002 % de BSA. Mecánicamente, el EGF y bFGF se unen a los receptores de superficie celular, y los complejos receptor ligando se internalizan y degradan dentro de la célula. Para asegurar la retirada completa de los factores de crecimiento antes de la inyección de los precursores neurales derivados de MSC, las células se lavan completamente 3 veces con solución salina. Los niveles de EGF y bFGF se ensayan por ELISA durante cada etapa de lavado y ninguna cantidad de factores de crecimiento permanecían asociadas con el producto celular final. El NSF-1 es una formulación propia utilizada para sustentar el crecimiento de las células progenitoras neurales. De acuerdo con Lonza, un componente del NSF-1 es de origen bovino. Lonza ha establecido que todos sus productos derivados de bovinos son de origen aprobado por la USDA, minimizando de esta manera la posible transmisión de priones o virus. La reserva de NSF-1 se diluye adicionalmente 50 veces hasta su concentración de trabajo en el medio básico.

Tripsina: Se pasaron las MSC cada vez con TrypLE (Invitrogen), una alternativa producida microbianamente a la tripsina animal. La tripsina es una serina proteasa que se encuentra en el sistema digestivo, que se utiliza para escindir proteína extracelulares necesarias para el anclaje celular a la placa de plástico. La tripsina se purifica a partir de páncreas porcino, mientras que la TrypLE se fabrica en un proceso de fermentación controlada que está completamente libre de componentes derivados de animales y seres humanos. La exposición prolongada a tripsina (o TrypLE) da lugar a toxicidad celular y se tiene que tener cuidado de minimizar la exposición de las células a la TrypLE, que se añade muy poco tiempo y entonces se lava completamente. No hay razones para creer que la serina proteasa TrypLE se mantenga asociada con las células, ya que daría lugar a toxicidad celular.

Antibióticos: Los medios se suplementan con una solución antibiótica-antimicótica (Sigma) que contiene penicilina, estreptomycin, y anfotericina B durante el cultivo inicial de la fracción celular mononuclear de la médula ósea. La solución antibiótica-antimicótica se omite después del medio en al primer pasaje celular y durante todos los pasajes posteriores.

Aislamiento de MSC a partir de la médula ósea

La muestra de médula ósea estéril del sujeto se coloca en una bolsa pre-etiquetada e inmediatamente se transfiere desde la clínica al laboratorio de cultivo de células madre. Todo el manejo de la médula ósea y sus células madre derivadas se hace en un laboratorio dedicado al procesamiento de células madre en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar de bioseguridad de nivel 2. Un investigador científico transfiere la muestra de médula ósea a un tubo cónico estéril de 50 ml. Las células mononucleadas de la muestra de médula ósea se aíslan por centrifugación en gradiente de densidad. Se diluyen 10 ml de muestra de médula ósea en 20 ml de solución salina equilibrada de Hank (Sigma) se depositan sobre 15 ml de Ficoll-Paque PREMIUM, libre de endotoxinas (GE Healthcare, Life Sciences) en un tubo cónico estéril diferente, y se centrifuga a 400 x g durante 40 minutos. La capa

de células mononucleadas se retira, se transfiere a un nuevo tubo cónico de 50 ml, y se lava dos veces por centrifugación a 100 x g durante 10 minutos en solución salina equilibrada de Hank. En este momento se llevará a cabo un ensayo de viabilidad con azul tripano y se hará el recuento de las células. Las células se colocan en un matraz de cultivo celular estéril (matraz T de 75 cm² con tapa con respiradero) en un medio que consiste en 15 ml de MSCBM (Lonza) L-Glutamina estable (GlutaMAX, Invitrogen), y un 10 % de suero autólogo del paciente recolectado previamente, y se incuban a 37 °C en una incubadora humidificada con un 5 % de CO₂. Se añadirá una solución antibiótica-antimicótica (Sigma) que contenga penicilina, estreptomycin, y anfotericina B al medio hasta el primer pasaje de células y después se omite en el medio durante todo el resto de los pasajes. Todas las formulaciones se marcan con el identificador único apropiado para evitar la contaminación cruzada de reactivos.

Expansión de MSC y crioconservación

El medio de cultivo se cambia cada 3-4 días para retirar las células (hematopoyéticas) no ancladas. Cuando el cultivo inicial alcanza un 80 % de confluencia, las células se despegan de la superficie por disociación enzimática utilizando la Tryp-LE (tripsina de origen animal, Invitrogen), se lavaron en PBS para retirar la tripsina, y se recolocaron en un matraz T de 150 cm² con tapa con respiradero con 25 ml de medio, y se marcó como pasaje nº 1. Cuando las MSC del pasaje nº 1 alcanzaban un 80-90 % de confluencia, las células se volvieron a tripsinizar (TrypLE), se contaron y 300.000 células se volvieron a colocar en un nuevo matraz T de 150 cm² (densidad celular 2000 células/cm²) y se marcaron como pasaje nº 2. El resto de las células del pasaje nº 1 (aproximadamente 3-9 millones de células) se crioconservaron en un medio de congelación que contienen un 10 % de suero autólogo y un 10 % de DMSO. Las células se centrifugaron (100 x g durante 5 minutos) y el aglomerado celular se re-suspendió en medio de congelación a una concentración de 1 millón de células por ml. Se transfiere 1 millón de células (o 1 ml) a viales de 2 ml y se marcan con cada identificador único del sujeto de investigación. Los crioviales se transfieren a un contenedor de congelación con isopropanol durante una noche a -80 °C, y después de almacenaron en nitrógeno líquido. Los niveles de nitrógeno líquido se controlan electrónicamente para asegurar que las muestras se mantienen a una temperatura apropiada. Cuando las MSC del pasaje nº 2 alcanzan un 80-90 % de confluencia, se volvieron a colocar 300.000 células en un nuevo matraz T de 150 cm² (densidad celular 2000 células/cm²) y se marcaron como pasaje nº 3, y el resto de las células se crioconservaron. Las células del pasaje nº 3 se cultivaron hasta un 80-90 % de confluencia y se utilizaron para la caracterización y control de calidad de las MSC (véase posteriormente). También se recolectaron 500.000 células del pasaje nº 3 para el análisis de expresión genética (véase "Ensayo de calidad de las células" posteriormente). Todas las MSC utilizadas para la expansión posterior, selección de precursores neurales, e inyección autóloga se derivan de las reservas crioconservadas del pasaje nº 1 o pasaje nº 3.

Caracterización y control de calidad

Los cultivos de MSC consisten en una población heterogénea de células, incluso cuando se generan como una colonia derivada de una única célula (Prockop, et al., Proc Natl Acad Sci USA 100 Suppl 1:11917-11923 [2003]). Además, no hay marcadores específicos adecuados para las MSC. De acuerdo con la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (Dominici et al., Cytotherapy 8: 315-317 [2006]), los criterios mínimos para definir las MSC humanas incluyen 1) adherencia plástica, 2) morfología con forma de huso, 3) expresión de antígenos de superficie de (CD105⁺/CD73⁺/CD90⁺) y carencia de expresión de marcadores hematopoyéticos (CD45⁺/CD34⁺/CD14⁺/CD79⁺) y MHC (HLA-1⁺/HLA-DR⁺), y 4) diferenciación *in vitro* en adipocitos, osteoblastos, y condroblastos. Las MSC derivadas de la médula ósea se evalúan por este conjunto de criterios para cada paciente. Por ese conjunto de criterios, las MSC del paciente se comparan con las MSC del control sano del mismo pasaje (adquirido en Lonza). La adherencia plástica y la morfología se evalúan y documentan con un microscopio óptico invertido Olympus IX71 conectado a una cámara digital. La expresión de antígenos de superficie se evalúa por inmunocitoquímica fluorescente, particularmente citometría de flujo (BD FACS Aria) utilizando FITC (anticuerpo marcados con isotiocianato de fluoresceína) contra CD105, CD73, CD90, CD45, CD34, CD14, CD79, HLA-I, y HLA-DR (todos ellos adquiridos en BD). Los linfocitos de sangre periférica se utilizan como control positivo para los marcadores hematopoyéticos y las MSC de Lonza se utilizan como control positivo para MSC. Los isotipos de control también están incluidos. La diferenciación *in vitro* de las MSC en adipocitos, osteoblastos, y condroblastos se lleva a cabo utilizando medios y métodos proporcionados por Lonza, y se compara con las MSC de Lonza, así como los controles no diferenciados. La diferenciación adipogénica se evalúa cualitativamente mediante tinción con Aceite Rojo O. El número de células positivas al Aceite Rojo O se espera que sea del 30-100 %. Posteriormente a la diferenciación osteogénica, la deposición de calcio se puede cuantificar utilizando el StanbioTotal Calcium LiquiColor (Stanbio Labs). El intervalo esperado de contenido en calcio en una placa de 6 pocillos confluyente es de 10.000-50.000 ng/μl. La diferenciación condrogénica se evalúa cualitativamente mediante inmunotinción de secciones de aglomerados condrogénicos embebidos en parafina para el colágeno Tipo II, indicativo de la diferenciación condrogénica satisfactoria. Las MSC del paciente deben cumplir todos los criterios anteriores antes de la expansión de MSC para su inyección y continuación en el estudio.

Expansión de MSC a partir de reservas crioconservadas

Aproximadamente 1 mes antes de la inyección de células madre, un vial (1 millón de células) de las MSC del pasaje nº 1 o el pasaje nº 2 del sujeto de investigación se retira del almacenamiento de nitrógeno líquido, se descongela rápidamente, se centrifuga para retirar el DMSO, e inmediatamente se coloca en un matraz T de 150 cm² que

contiene un medio completo (MSCBM suplementado con Gluta-MAX y un 10 % de suero autólogo). Cuando las células alcanzan un 80 % de confluencia, se hacen pasajes exactamente como se ha descrito anteriormente a nuevos matraces de 150 cm² a una densidad de 2000 células/cm². Se hacen pasajes con las células 3-5 veces adicionalmente y se expanden para producir hasta 50 millones de células.

Selección de células precursoras neurales a partir de células madre mesenquimáticas

Los precursores neurales derivados de MSC se seleccionan despegando las MSC expandidas utilizando TrypLE como se ha descrito anteriormente. Se retiran 500.000 MSC para los análisis de expresión genética (véase el ensayo de calidad posteriormente). Se recolocan 50.000 células en un matraz T de 25 cm² para el análisis del cariotipo posterior (véase el ensayo de calidad posteriormente). Las células restantes se agrupan, se centrifugan y se re-suspenden en medio NPMM de Lonza (Medio básico de progenitores neurales, factor de supervivencia neural-1, 10 ng/ml de EGF, y 20 ng/ml de bFGF). Las células se colocan en placas a una densidad de 4-6 x 10⁴ células/cm² en un matraz T de 75 cm² de bajo anclaje (BD Falcon) en 15 ml de NPMM. El medio de cultivo se cambia cada 2-3 días mediante centrifugación de los agrupamientos de precursores neurales, y se re-suspenden en NPMM. Los precursores derivados de MSC se cultivan durante 10-15 días. Dos días antes de la inyección, se retiran 500.000 precursores neurales derivados de MSC para el análisis de expresión genética.

Ensayo de calidad de las células:

Análisis de expresión genética: Debido a la complejidad inherente en un sistema biológico comparado con un producto farmacéutico, habrá alguna variabilidad en cada producto celular. Además, la naturaleza heterogénea de las MSC sugiere que habrá alguna variabilidad en los niveles de expresión genética entre los pacientes. Con estas advertencias in mente, el análisis de expresión de cada una de las MSC y precursores neurales derivadas de MSC del paciente se lleva a cabo con el fin de obtener una evaluación cuantitativa del estado de diferenciación celular como un reflejo de la pureza y potencia de cada producto celular. Las muestras de 500.000 MSC (obtenidas después de la expansión completa) y 500.000 precursores neurales derivados de MSC (obtenidos dos días antes de la fecha de la inyección) se almacenan el RNA Protect (QIAGEN) a -20 °C. Cada lote de MSC expandidas y diferenciadas y precursores neurales derivados de MSC se comparan con 500.000 MSC obtenidas en el pasaje nº 3 en el momento de la crioconservación. Uno o dos días antes de la fecha de la inyección, se extrae el ARN utilizando el kit RNA Easy (QIAGEN). Se utiliza 1 µg de ARN como matriz para la síntesis de ADNc (Superscript III, Invitrogen). Se utilizan 2 µl de matriz de ADNc como matriz para una PCR cuantitativa en tiempo real utilizando la detección de SyBr verde (Roche) y cebadores previamente validados en un Roche Lightcycler 2.0. Un control positivo (ADNc de cerebro humano) se incluye en cada análisis, lo que también sirve como un lote para el calibrador de lotes. Un control negativo (no matriz de ADN) también se incluye cada vez. Un control negativo de transcriptasa no inversa también se incluye cada vez para evaluar la contaminación con ADN genómico. Las muestras se analizan en cuanto a los niveles de ARN de Nestina (un marcador específico de precursores neurales), neurofilamento (marcador neuronal), GFAP ("proteína ácida fibrilar de la glía", un marcador de precursores neurales y de la glía) y Vimentina (un marcador de MSC). Se utiliza el RPLP (proteína P0 ribosómica ácida 60S) como un gen de referencia. Para cada muestra, se determina la relación gen:RPLP y se compara con la relación gen:RPLP de la muestra calibradora para determinar el nivel de expresión relativa de cada gen. Además, se determinan los cambios en la expresión genética para cada par de muestras de MSC y precursor neural derivado de MSC como veces de aumento o disminución del nivel de expresión genética relativa. Los inventores han determinado previamente las relaciones relativas de cada uno de los genes anteriores en MSC y precursores neurales derivados de MSC de tres muestras de pacientes y 1 muestra del control sano (Lonza). El aumento de Nestina en los precursores neurales derivados de MSC varía desde 2-4 veces. El aumento de neurofilamento varía de 5-15 veces, el aumento de GFAP varía desde 7-10 veces, y la disminución de Vimentina varía desde 0,4-0,7 veces. Estos cambios cuantitativos en los niveles de ARN se correlacionan con los cambios en la expresión proteica de estos marcadores (FIG. 8). Para cada paciente, y antes de cada inyección, las parejas de MSC y precursores neurales derivados de MSC se analizarán en cuanto a estos cambios en los niveles de expresión genética. Los precursores neurales derivados de MSC que fallan al presentar cambios de expresión genéticas en el intervalo esperado se desechan y no se inyectan. En este caso, la expansión de MSC y la inducción del precursor neural derivado de MSC se repite comenzando con otra reserva crioconservada. Los precursores neurales derivados de MSC deberían fallar el ensayo de calidad una segunda vez para retirar el paciente del estudio.

Ensayo de esterilidad: 1-2 días antes de la inyección de células madre autólogas, el medio celular condicionado se ensaya por PCR en cuanto a niveles traza de contaminación. El ensayo PCR detecta sensiblemente contaminación por micoplasmas y eubacterias del cultivo. El kit de detección de micoplasmas VenorGeM se adquiere en sigma, y el kit de detección de eubacterias OnarEUB se adquiere en Minerva Biolabs. Cada ensayo de PCR se lleva a cabo por un biólogo molecular experimentado en el MSRCNY. El ensayo de calidad por PCR incluirá tanto controles positivos como negativos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cualquiera de las muestras que se confirman positivas para la contaminación se desecharán y no se utilizan para la inyección, y se investigará la fuente de la contaminación. Las posibles fuentes de contaminación incluyen reactivos de cultivo celular, incubadora de CO₂, contaminación de la campana de flujo laminar, u una técnica inapropiada. Todos los reactivos sospechosos de ser una fuente de contaminación se desechan y todo el equipamiento se limpiará. Todos los precursores neurales derivados de MSC se confirmaron negativos para contaminación por PCR antes de la inyección en cualquier sujeto

de investigación. Al mismo tiempo que el análisis por PCR, cada muestra del medio acondicionado se envió a una compañía externa (Clongen Laboratories, LLC) para el ensayo de esterilidad mediante el método de cultivo. En el evento en el que se vea un resultado positivo, la fuente de la infección se investigará metódicamente. Además, el paciente se reevaluará en cuanto a signos de infección. El paciente tendrá un CBC diferencial. Si el paciente no muestra signos de infección no se llevará a cabo la punción lumbar debido a los riesgos del procedimiento.

Análisis del cariotipo: Una muestra de MSC que se cultiva en un matraz T de 25 cm² (recolocado después de la expansión completa) se somete al análisis del cariotipo para ensayar cualquier anomalía cromosómica que pueda aparecer durante la expansión *ex vivo*. Se ha demostrado que la frecuencia de las aberraciones cromosómicas durante la expansión *ex vivo* de las células madre mesenquimáticas es muy baja, produciéndose solamente en las células del último pasaje (Rubio, et al., Cancer Res 65: 3035-3039 [2005]). Las células madre mesenquimáticas que se utilizan en este protocolo serán células de pasajes tempranos con un tiempo de cultivo *ex vivo* entre 1 y 2 meses, que está bien dentro del periodo de tiempo en el que se pueden manejar con seguridad (Rubio, et al., Cancer Res 65: 3035-3039 [2005]). Los resultados del análisis del cariotipo se obtienen antes de la inyección de precursores neurales derivados de MSC. Si se determina cualquier anomalía cromosómica en las MSC expandidas, se desechan los precursores neurales derivados de MSC correspondientes y no se inyectan.

Experimentación

Expresión proteica de Nestina en precursores neurales derivados de MSC

La expresión proteica de Nestina se determinó por inmunofluorescencia convencional. Se fijaron las células en un 4 % de paraformaldehído y se marcaron con anticuerpo Nestina (Chemicon) seguido por un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa-594 (Molecular Probes). La FIG. 6 ilustra el aumento de expresión de nestina en precursores neurales derivados de MSC. Los precursores neurales del panel B se derivaron de las MSC después del cultivo en el medio de mantenimiento de progenitores neurales (NPM). Los paneles A-C de la FIG. 6 se visionaron con una magnificación de 100x y el panel D se visionó con una magnificación de 200x.

Cambios en la expresión genética de células precursoras neurales a partir de MSC

El cultivo de MSC se expandió en el medio de cultivo de células madre mesenquimáticas (MSCGM) con 4 pasajes. Las MSC-NP se seleccionaron a partir de las MSC cultivando durante 15 días en NPM. Las células se colocaron en portaobjetos de 8 pocillos revestidos de PDL/laminina y se ensayaron 18 horas después en cuanto a la expresión proteica por inmunofluorescencia convencional. Las células se inmunomarcaron con anticuerpos contra Nestina (1:2000), GFAP (1:500), Neurofilamento-N (NF-M, 1:1000), Vimentina (1:5000), isoforma alfa de músculo liso de actina α SM (1:1000), todos adquiridos en Chemicon. Los anticuerpos secundarios contra IgG de ratón o IgG de conejo conjugados con Alexa-594 eran de Molecular Probes. El anticuerpo secundario solo se incluía como control. Las células marcadas se montaron con DAPI y se visionaron con un microscopio de fluorescencia Olympus BX60 con una magnificación de 200x. El aumento de expresión proteica de nestina, GFAP, y neurofilamento-M, y la disminución de la expresión de Vimentina y actina α SM en los precursores neurales derivados de MSC en comparación con MSC se representa en las FIG. 7 y 8.

Diferenciación *in vitro* de precursores neurales derivados de MSC

Las MSC-NP se diferenciaron en tipos celulares neuronales y de la oligodendroglía *in vitro*. Las MSC-NP se seleccionaron a partir de las MSC cultivando durante 15 días en NPM. Las células se colocaron en placas en portaobjetos de 8 pocillos revestidos con matrigel y se cultivaron en medio básico solo (control) o que contenía 100 ng/ml de bFGF durante 21 días. Las células se fijaron en un 4 % de paraformaldehído y se inmunomarcaron con anticuerpos primarios contra β -tubulina clase III (1:1000), galactocerebrósido (GalC, 1:50), y Nestina (1:1000), todos de Chemicon. Los anticuerpos secundarios conjugados fluorescentemente contra IgG o IgM de ratón (Alexa 594) o IgG de conejo (Alexa-488) eran de Molecular Probes. Las células marcadas se montaron con DAPI y se visionaron con un microscopio de fluorescencia con un Olympus BX60 con una magnificación de 200x. Las FIG. 1 y 2 ilustran el aumento de la expresión de marcadores neuronales y de la oligodendroglía en precursoras neurales derivadas de MSC (MSC-NP) y MSC después de la diferenciación *in vitro*.

Características antiinflamatorias de progenitores neurales derivados de MSC

Las células T alogénicas marcadas con CFSE de la sangre periférica se estimularon con PHA (fitohemaglutinina) durante 4 días. Las células se cultivaron solas o se co-cultivaron con MSC humanas del donante 1) o los precursores neurales derivados de MSC del donante 1 y del donante 2. La proliferación de células T se midió por análisis FACS basándose en la disminución de fluorescencia de CFSE de las células CD3+. La presentación antiinflamatoria de los precursores neurales derivados de MSC se ilustra en la FIG. 3.

Pérdida de capacidad de diferenciación de los precursores neurales derivados de MSC

Para la inducción adipogénica, las MSC y MSC-NP se cultivaron en MSCGM (control) o en medio de inducción de adipocitos que contiene insulina, dexametasona, indometacina, e IBMX durante 3 semanas. Las células se fijaron y se tiñeron las vacuolas lipídicas con Aceite Rojo O. Para la inducción osteogénica, las MSC o MSC-NP se cultivaron o MSCGM (control) o medio de inducción de osteocitos que contiene dexametasona, ácido ascórbico, y P-glicerofosfato durante 3 semanas. Se ensayó el depósito total de calcio con el kit Calcium (CPC) Liquicolor (Stanbio Laboratory). La pérdida de capacidad de los precursores neurales derivados de MSC para diferenciarse en linajes mesodérmicos se muestra en la FIG. 4.

Preparación de células madre autólogas para la inyección

Antes de la inyección, los precursores neurales derivados de MSC se agruparon y recolectaron por centrifugación. Los agrupamientos celulares se rompen en una suspensión de células únicas por incubación con TrypLE durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces en cloruro sódico USP al 0,9 % de calidad de inyección, para retirar cualquier traza de medio y factores de crecimiento. Se re-suspendió un total de 10 millones de células en 0,2 ml de cloruro sódico USP al 0,9 % de calidad de inyección, se transfirió a un pequeño tubo estéril, y se colocó en un envase estéril marcado para el transporte al IMSMP. 10 millones de células es una dosis relativamente baja y se calculó utilizando medias de los ensayos con animales y seres humanos.

Inyección de células madre autólogas

Los pacientes recibieron inyecciones intratecales de las células madre aisladas y expandidas en condiciones estériles siguiendo el procedimiento convencional. Se utilizó una bandeja LP esterilizada. Se estableció un campo estéril, y se utilizó lidocaína al 1 % como anestésico local. El investigador primario aspiró 6 ml de LCR a nivel de la L3-L4 utilizando una aguja de calibre 25. Un kit LP convencional tiene una aguja de calibre 20 sin embargo en este estudio se utilizará una aguja de calibre 25 para disminuir la incidencia de dolores de cabeza asociados con la punción lumbar. Si el acceso está limitado en el nivel de L3-L4, se utilizará el nivel de L2-L3 como sitio alternativo. Las células madre se añadieron a 3 ml de LCR, y el LCR y la mezcla de células madre se inyecta por vía intratecal, y después seguido por 3 ml adicionales de LCR. Este procedimiento lleva aproximadamente 30 minutos. Inmediatamente a continuación de este procedimiento, el paciente se infunde con 80 mg de Tobramicina y 500 mg de Vancomicina (McKesson Corporations). Esta infusión lleva aproximadamente cuatro horas. La vancomicina es el fármaco de elección para *S. epidermidis*, que sería un contaminante de la piel durante el procedimiento de la punción lumbar. También es el fármaco utilizado para tratar el *S. pneumoniae*. La vancomicina también está indicada en el uso empírico en meningitis hasta que se identifique un organismo. La tobramicina es sinérgica con la vancomicina y también el tratamiento de elección para infecciones con pseudomonas. También se indican la vancomicina y tobramicina en el uso empírico para tratar la meningitis en todos los procedimientos más intuitivos (The Manual of Medical Therapeutics, 30ª Edición). Las inyecciones se producen cada tres meses y los pacientes se someten a tres rondas de tratamiento. La fase de tratamiento de este estudio llevará 9 meses y los pacientes se seguirán durante 12 meses después del tercer tratamiento (final). Esta es una cantidad adecuada de tiempo para que las células se integren y para que cualquier problema con la seguridad y la tolerancia se vuelva evidente.

Programa de dosificación en seres humanos

Las inyecciones de células madre autólogas se producen a intervalos de tres meses en el curso de nueve meses. 10 millones de precursores neurales derivados de MSC se inyectarán en cada tratamiento. Esta dosis se calculó basándose en los datos de seguridad preclínica donde $2,5 \times 10^6$ (Black, et al., Blood Cells Mol Dis 27: 632-636) células MSC derivadas de médula ósea se injertaban en el SNC de macacos rhesus sanos sin efectos adversos evaluados durante un periodo de 6 meses (Isakova, et al., Mol Ther 13: 1173-1184 [2006]). Se calculó el HED (<http://www.fda.gov/cber/gdlns/dose.htm>) y era $1,5 \times 10^5$ (Woodbury, et al., J Neurosci Res 69: 908-917) células/kg o aproximadamente 10 millones de células por paciente. Esta dosis era segura y bien tolerada en el ensayo clínico de MS llevado a cabo en Irán (Mohyeddin, et al., Iran J Immunol 4: 50-57 [2007]). Los pacientes recibieron inyecciones intratecales de 2,5 millones a 13 millones de MSC. Una dosis de diez millones de células también se consideraba una dosis baja en comparación con el suministro intramedular de MSC en el ensayo de ALS (que varaba entre 7-150 millones de células) (Mazzini, et al., Neurol Res 28: 523-526 [2006]). Los estudios preclínicos han concluido que una baja dosis de células inyectadas múltiples veces es más eficaz que inyecciones únicas con una dosis alta (Bakshi, et al., J Neurotrauma 23: 55-65 [2006]; Lepore, et al., Brain Res 1045: 206-216 [2005]), que es consistente con el diseño del estudio de los inventores. Inmediatamente después de la infusión celular, los pacientes también recibirán una infusión de 80 mg de Tobramicina y 500 mg de Vancomicina. Esta medicación se suministrará por McKesson Corporation.

Las células se fabricaron siguiendo todas las regulaciones de Buenas Prácticas de Fabricación. Las células se crioconservaron en un medio que contiene un 10 % de suero autólogo y un 10 % de DMSO en crioviales de 2 ml. Los crioviales se marcaron con cada identificador único de cada sujeto de investigación y se almacenaron en nitrógeno líquido, cada lote de suero se almacena en una caja etiquetada por separado. La localización del almacenamiento para cada muestra se registra en una base de datos que se guardó en una copia de seguridad. Los

niveles de nitrógeno líquido se controlan electrónicamente para asegurar que las muestras se mantienen a una temperatura apropiada. Todas las células madre mesenquimáticas utilizadas para la expansión posterior, selección de precursores neurales, e inyección autóloga se derivan de las reservas criopreservadas. No hay pruebas de que las células almacenadas en nitrógeno líquido en una manera sin alterar pierdan ni la viabilidad determinada *in vitro* o actividad biológica. Por lo tanto, no es necesario asignar una fecha de caducidad a las MSC almacenadas continuamente en nitrógeno líquido. Aproximadamente 1 mes antes de la inyección de células madre, las células madre mesenquimáticas del sujeto de investigación se retiran del almacenamiento en nitrógeno líquido se expanden en Medio Básico de Células Madre Mesenquimáticas que contiene suero autólogo, como se describe anteriormente. Se hacen pasajes con las células 3. 5 veces en matraces de cultivo tisular y se expanden para producir 50 millones de células. Las MSC se cultivan posteriormente en Medio de Mantenimiento de Progenitores Neurales durante 10-15 días para generar precursores neurales derivados de MSC.

Aunque se han expuesto y descrito las que se consideran realizaciones preferidas de la invención, se entenderá, por supuesto, que se podrían hacer fácilmente distintas modificaciones y cambios en la forma o detalle como se define en las reivindicaciones adjuntas. Se pretende por lo tanto que la invención no se limite a las formas exactas descritas e ilustradas, sino que se debería considerar que cubre todas las modificaciones que puedan encontrarse en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la diferenciación *in vitro* de células precursoras neurales a partir de células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea, que comprende:
 - (a) expandir las células madre mesenquimáticas aisladas derivadas de médula ósea recolectadas de un paciente, en un medio básico que comprende el suero de crecimiento autólogo obtenido del paciente.
 - (b) cultivar y aislar las células precursoras neurales derivadas de células madre mesenquimáticas a partir de células madre mesenquimáticas; y
 - (c) llevar a cabo el análisis de expresión genética para identificar los precursores neurales derivados de células madre mesenquimáticas, que presentan un aumento de 2-4 veces en la cantidad de nestina, un aumento de 5-15 veces en la cantidad de neurofilamento, un aumento de 7-10 veces en la cantidad de GFAF (proteína ácida fibrilar de la glía) y una disminución de 0,4-0,7 veces de Vimentina.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la etapa (b) comprende el cultivo de dichas células madre mesenquimáticas obtenidas de la etapa (a) en un medio básico para progenitores neurales (NPBM) suplementado con factor -1 de supervivencia neural (NSF-1), 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF), y 20 ng/ml de factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), para generar dichos precursores neurales.
3. El método de la reivindicación 2, donde dicho EGF es EGF recombinante humano (rhEGF) y dicho bFGF es bFGF recombinante humano (rhbFGF).
4. El método de cualquier reivindicación precedente, donde dichas células madre mesenquimáticas de la etapa (a), y dichos precursores neurales de la etapa (b) se cultivan en matraces de cultivo de baja adherencia.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde dichos precursores neurales se aíslan recolectando los agrupamientos celulares de precursores neurales que flotan, preferentemente por centrifugación y re-suspendiendo dichas células recolectadas en dicho medio de cultivo NPBM suplementado.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicha recolección de agrupamientos celulares de precursores neurales que flotan y re-suspensión en dicho medio de cultivo NPBM, se llevan a cabo cada 2-3 días.
7. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde los precursores neurales derivados de células madre se cultivan en la etapa (b) durante 10-15 días.
8. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente donde dicho análisis de expresión genética comprende el análisis de los niveles de ARN de Nestina, Neurofilamento, Proteína Ácida Fibrilar de la Glía (GFAP) y Vimentina, en una muestra de células precursoras neuronales y una muestra de células madre mesenquimáticas.
9. El método de cualquier reivindicación precedente donde dicho sujeto tiene esclerosis múltiple.

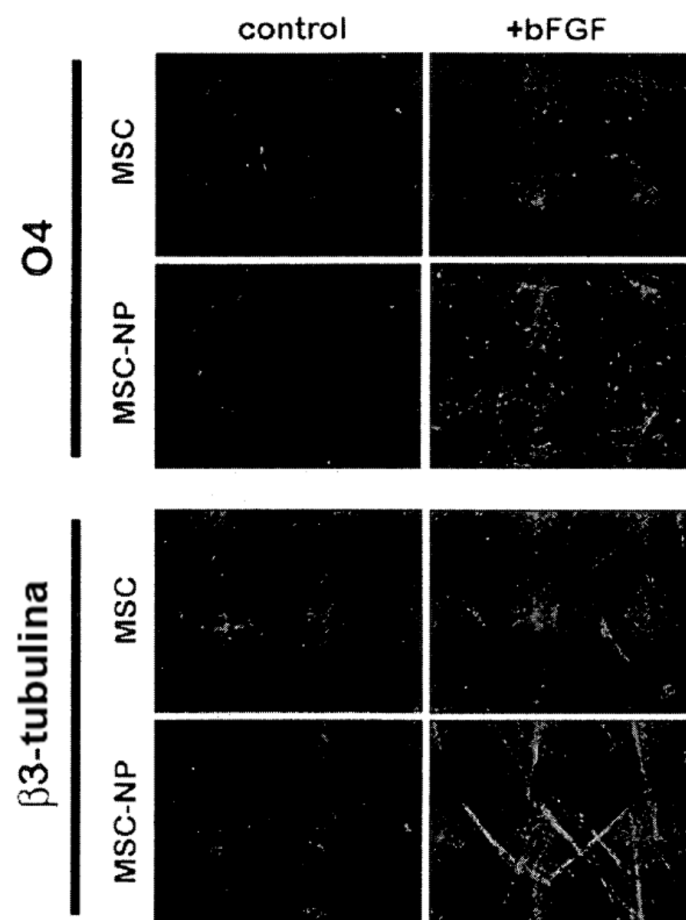


FIG. 1

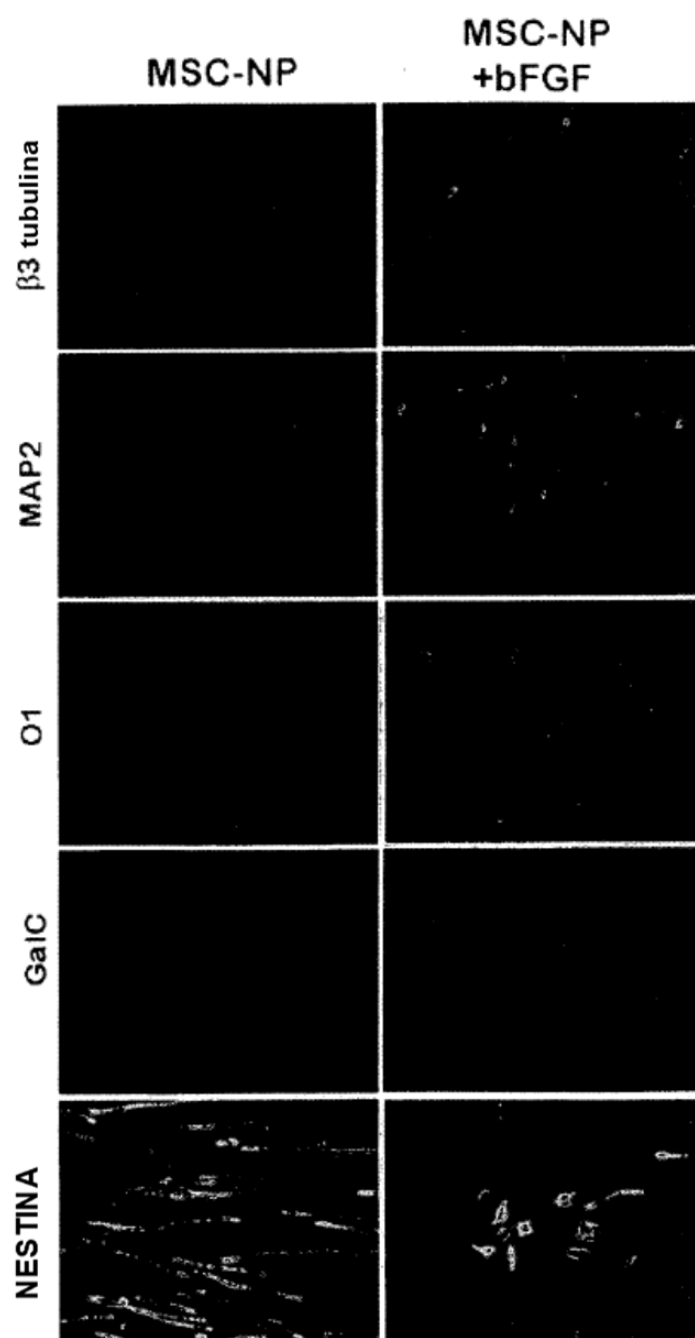


FIG. 2

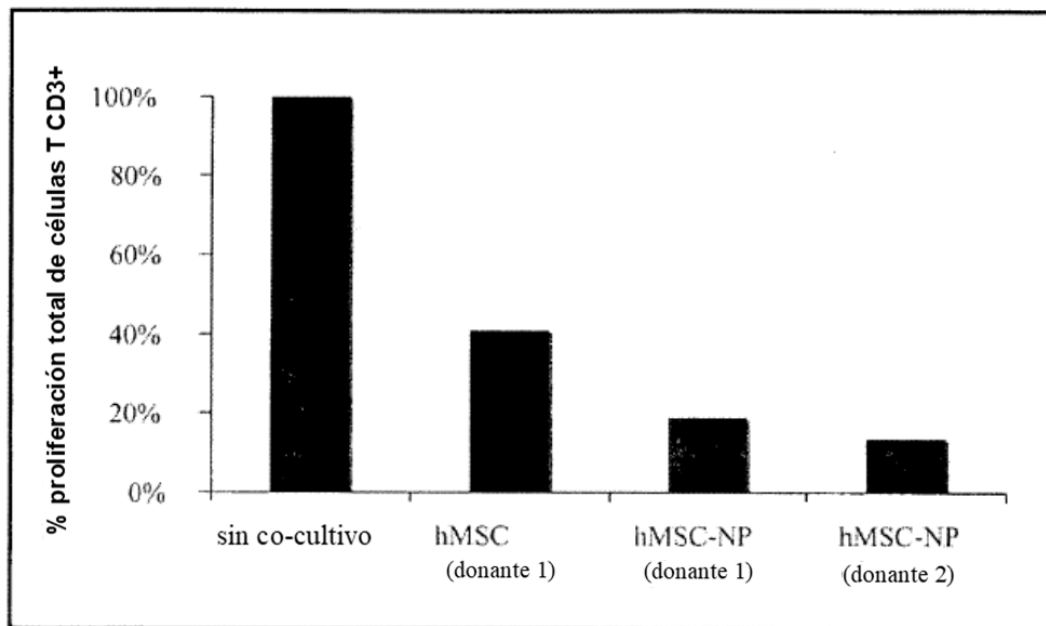


FIG. 3

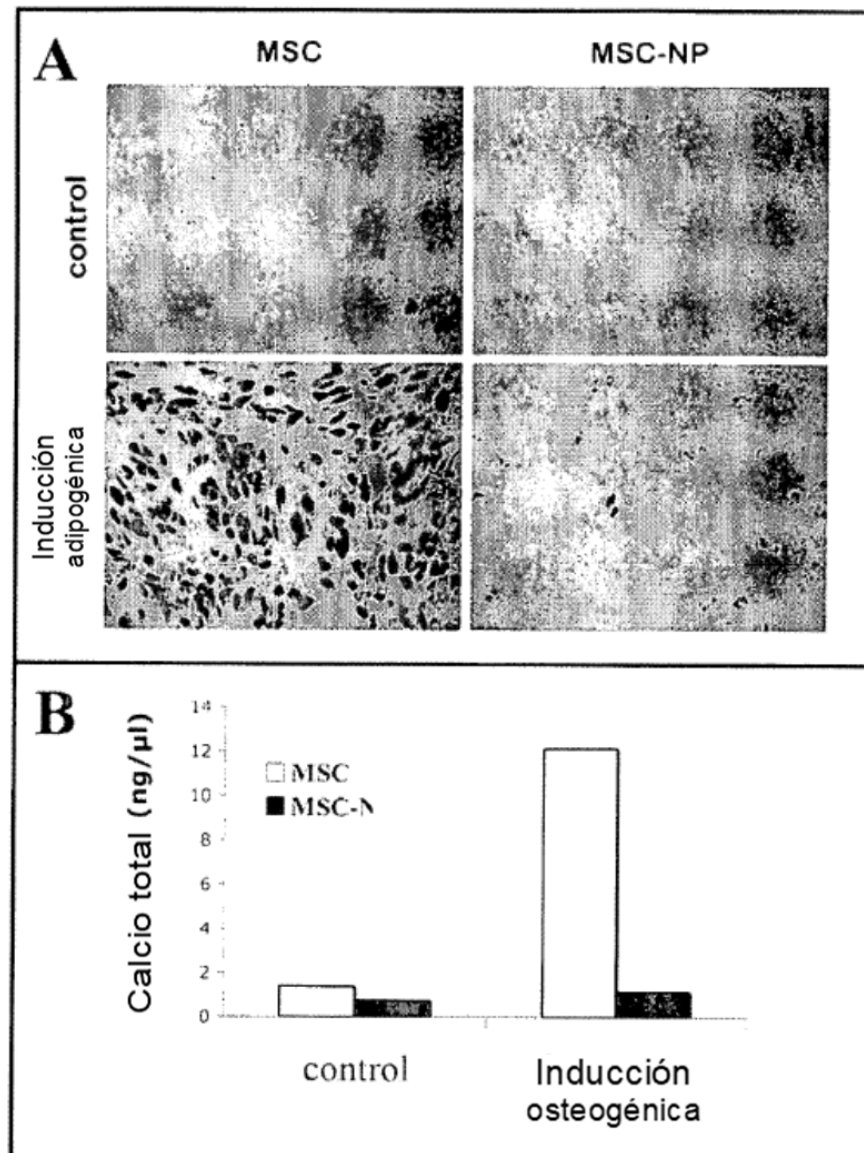


FIG. 4

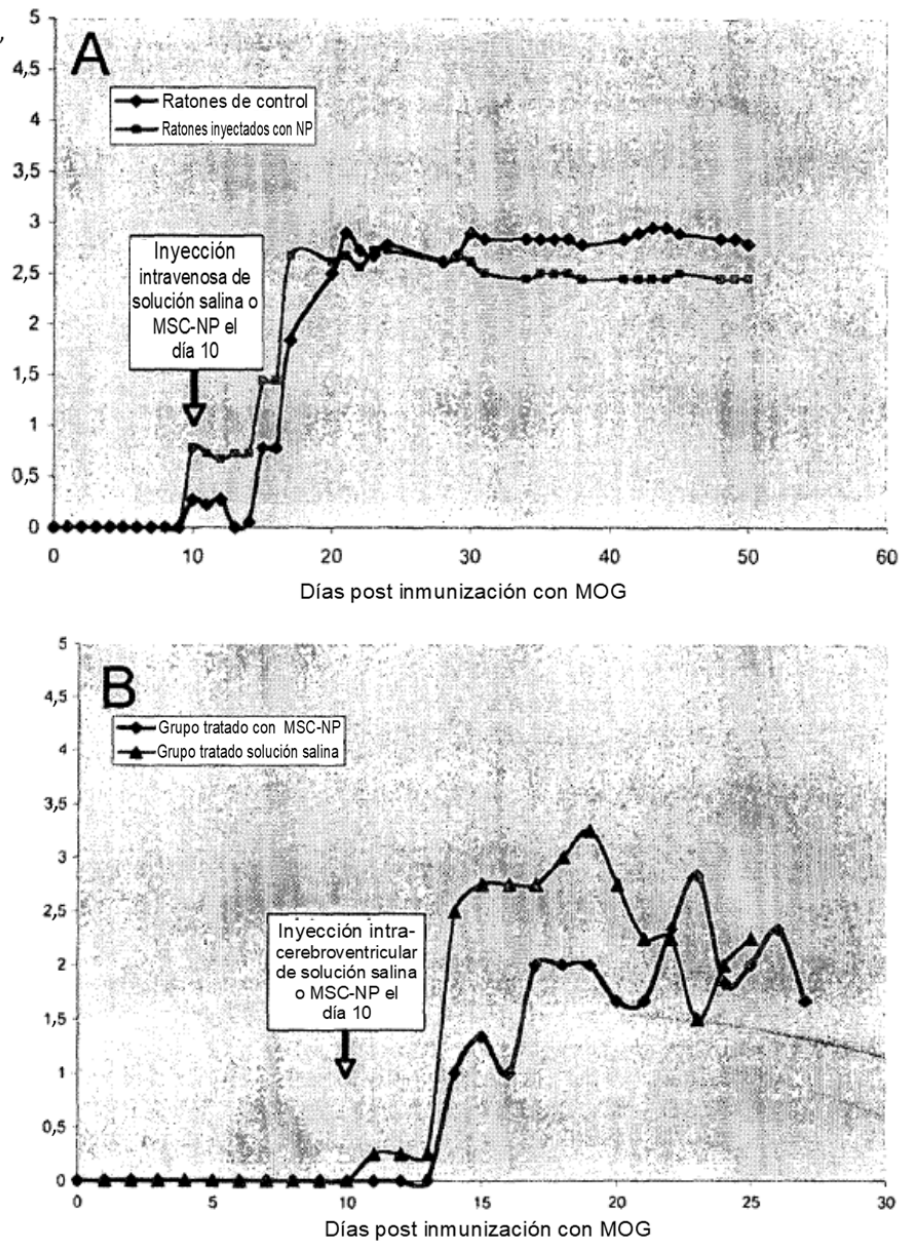


FIG. 5

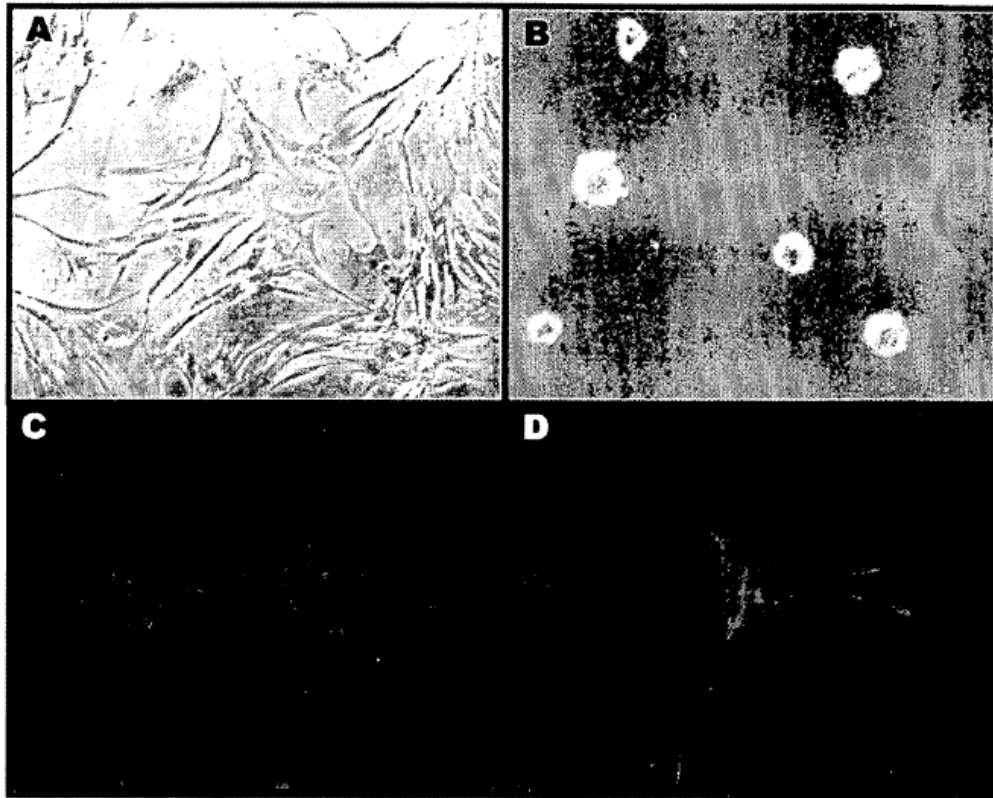


FIG. 6

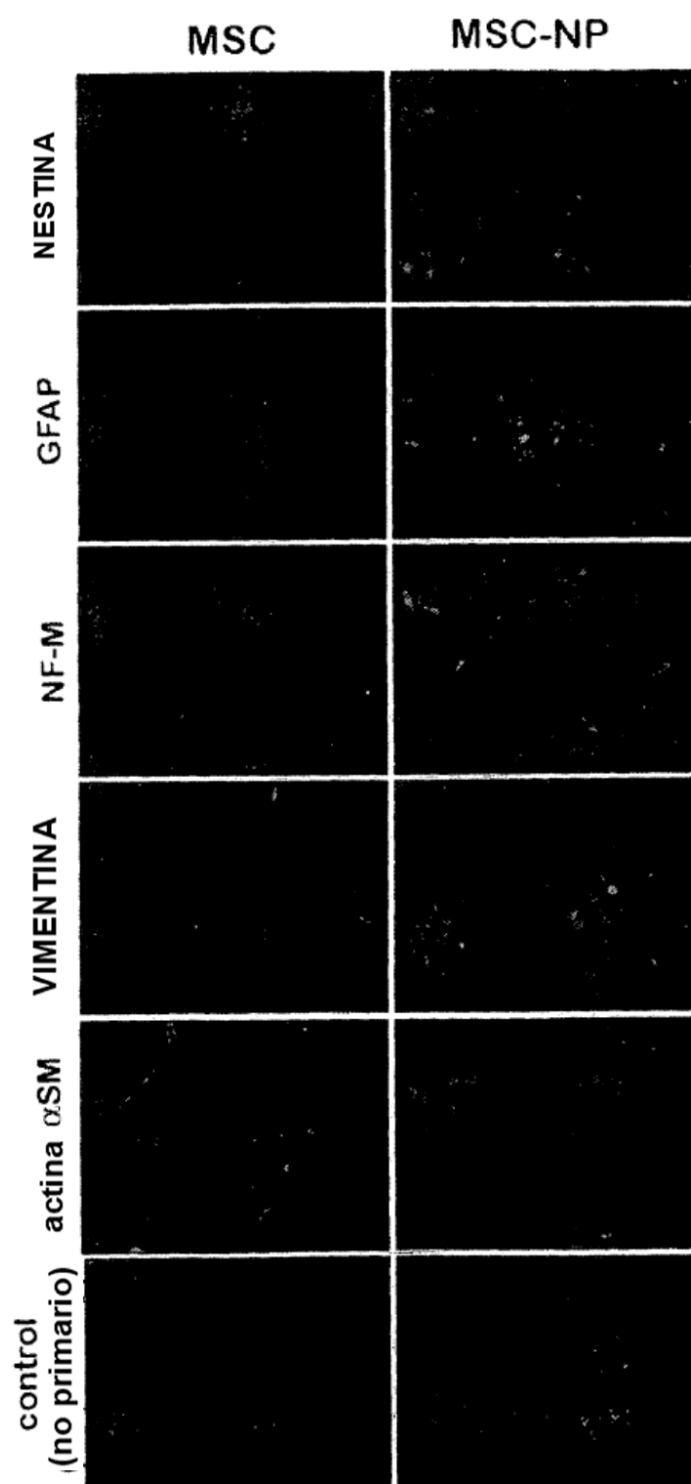


FIG. 7

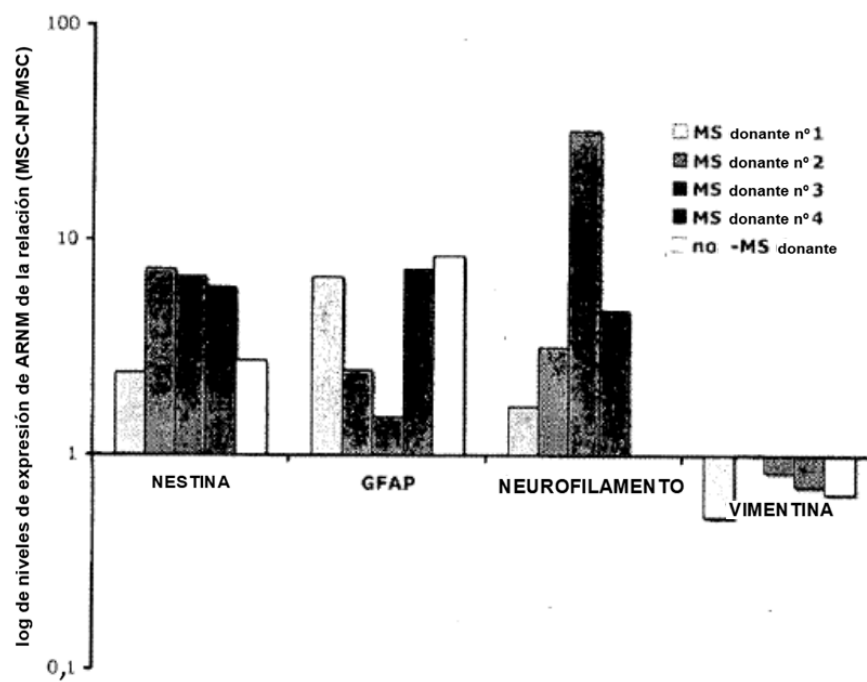


FIG. 8