

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 945**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/28** (2015.01)

**A61P 25/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2009 PCT/IL2009/000525**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2009 WO09144718**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2009 E 09754337 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2285951**

54 Título: **Células madre mesenquimales para el tratamiento de enfermedades del SNC**

30 Prioridad:

**28.05.2008 US 71970 P**

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

**07.11.2018**

73 Titular/es:

**RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD. (50.0%)  
P.O. Box 39296  
61392 Tel Aviv, IL y  
BRAINSTORM CELL THERAPEUTICS INC.  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**KADOURI, AVINOAM;  
BAR-ILAN, AVIHAY;  
MELAMED, ELDAD;  
OFFEN, DANIEL;  
SADAN, OFER y  
BAHAT-STROMZA, MERAV**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones:**

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

ES 2 688 945 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 mesenquimales para el tratamiento de enfermedades del SNC

5 La presente invención se refiere a una célula humana aislada para uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica de acuerdo con la reivindicación 1.

10 La enfermedad de Parkinson es un trastorno relacionado con la edad caracterizado por la pérdida progresiva de neuronas productoras de dopamina en la substantia nigra del mesencéfalo, que a su vez conduce a la pérdida progresiva de las funciones motoras, manifestada a través de síntomas tales como temblor, rigidez y ataxia.

15 Se ha sugerido el uso de células madre como fuente celular en la terapia de reemplazo celular para la enfermedad de Parkinson. Las células madre tienen la capacidad de existir in vivo en un estado indiferenciado y de autorrenovarse. No están restringidas a tipos celulares específicos del tejido de origen, por lo que son capaces de diferenciarse en respuesta a señales ambientales locales de otros tejidos. Esta capacidad de autorrenovación y diferenciación tiene un gran potencial terapéutico para curar enfermedades.

20 La Solicitud de Patente de los Estados Unidos 20050265983 de los presentes inventores enseña MSC que sintetizan dopamina humana que expresan marcadores neuronales y factores de transcripción que caracterizan las neuronas DA del cerebro medio después de la inducción de la diferenciación neuronal.

25 Como alternativa a una estrategia de reemplazo de dopamina, la terapia celular puede estar dirigida a restaurar o restablecer la anatomía (conectividad) normal y la fisiología (contactos y funcionamiento sináptico apropiados) del cuerpo estriado. En este caso, las células injertadas deben sobrevivir y poseer propiedades dopaminérgicas morfológicas electrofisiológicas y funcionales.

30 Los factores neurotróficos (NTF) son proteínas secretadas que regulan la supervivencia, el mantenimiento funcional y el desarrollo fenotípico de células neuronales. Las alteraciones en los niveles de NTF están involucradas en el desencadenamiento de la muerte celular programada en las neuronas y, por lo tanto, contribuyen a la patogénesis del Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas.

35 Una de las NTF más potentes para las neuronas dopaminérgicas se denomina factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF). Se sabe que promueve la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en la substantia nigra, promueve el crecimiento de neuritas, aumenta el tamaño del cuerpo celular y también eleva los niveles de TH. La GDNF pertenece a una familia de proteínas, relacionadas con la superfamilia TGF- $\beta$ , que actualmente consta de cuatro factores neurotróficos: GDNF, neurturina (NTN), persefina y artemina/neublastina. Se sabe que estos factores sirven como reguladores de la proliferación y diferenciación celular.

40 Diversos tipos de células producen GDNF incluyendo células gliales (oligodendrocitos y astrocitos), neuroblastoma y líneas celulares de glioblastoma. Recientemente se ha demostrado que las BMSC de rata cultivadas en DMEM suplementado con un 20% de suero bovino fetal, en el paso 6 expresan GDNF y NGF [Garcia R, et al., Biochem Biophys Res Commun. 316(3): 753-4, 2004].

45 Se ha demostrado que la administración de GDNF directamente en el cerebro es efectiva en diversos modelos animales de enfermedad de Parkinson. Además, la exposición de las células al GDNF antes del trasplante ha demostrado ser beneficiosa. Por ejemplo, el injerto de 400000 neuronas dopaminérgicas fetales antes del trasplante mejoró significativamente el comportamiento rotacional de las ratas lesionadas [Mehta V, et al., J. Neurosurg. 1999 Apr; 90(4): 804-6].

50 Se han usado diversos métodos para ayudar a la administración de GDNF en el cerebro que incluyen bombas osmóticas, cápsulas y microesferas. Otro enfoque para la administración de GDNF es la terapia génica in vivo. Las células mesenquimatosas de la médula ósea modificadas genéticamente para expresar GDNF, trasplantadas a ratones lesionados con MPTP, pudieron proteger tanto a las neuronas nigrales como a las fibras estriatales [Park, K., Neurosci. Res. 40: 315-323, 2001].

55 El glutamato es el principal neurotransmisor excitador de aminoácidos en el sistema nervioso central (SNC) humano. Desempeña un papel importante en la plasticidad sináptica, el aprendizaje, el desarrollo, las funciones cognitivas y el comportamiento humano. Sin embargo, si no se controla adecuadamente, el glutamato puede conducir a resultados perjudiciales. La exposición prolongada al glutamato conduce a sobreestimulación de los receptores excitadores a.a, un proceso que culmina en la muerte celular neuronal.

60 La regulación de los niveles de glutamato cerca y dentro de la hendidura sináptica se realiza principalmente por los astrocitos. Cuando los niveles de glutamato extracelular son altos, los astrocitos pueden eliminarlo del espacio sináptico. La captación de glutamato es facilitada principalmente por transportadores excitadores a.a de alta afinidad, que insertan Na<sup>+</sup> y H<sup>+</sup> en la célula, a la vez que eliminan K<sup>+</sup> de la célula, permitiendo así la transferencia de

glutamato a la célula contra su gradiente electroquímico. Aun así, también se produce la forma menos común de transporte independiente de Na<sup>+</sup>.

5 La acumulación de evidencia implica la toxicidad del glutamato en la fisiopatología de varios procesos neurodegenerativos agudos, principalmente isquemia cerebral y lesiones cerebrales traumáticas. Además, parece que la toxicidad del glutamato participa en trastornos neurodegenerativos crónicos tales como enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson (PD), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), epilepsia y enfermedad de Alzheimer (EA).

10 La reducción de los niveles de glutamato extracelular alrededor de las neuronas susceptibles afectadas por la toxicidad del glutamato en los diferentes módulos de enfermedad puede detener la progresión neurodegenerativa. Un posible enfoque para proporcionar dicha protección neuronal es mediante el trasplante de células capaces de realizar la captación de glutamato adyacente a las neuronas en peligro de extinción. Las células madre mesenquimales adultas (hMSC) obtenidas a partir de la médula ósea, pueden variar y demostrar ser una fuente viable para tales trasplantes.

Varios estudios han demostrado que las MSC después de la exposición a diferentes factores in vitro, cambian su fenotipo y demuestran marcadores neuronales y gliales [Kopen, G.C., et al., Proc Natl Acad USA. 96(19): 10711-6, 1999; Sánchez-Ramos, et al. Exp Neurol. 164(2): 247-56. 2000; Woodbury, D., J Neurosci Res. 61(4): 364-70, 2000; Woodbury, D., et al., J Neurosci Res. 69(6): 908-17, 2002; Black, I.B., Woodbury, D. Blood Cells Mol Dis. 27(3): 632-6, 2001; Kohyama, J., et al. Diferenciación. 68(4-5): 235-44, 2001; Levy, Y.S. J Mol Neurosci. 21(2): 121-32, 2003].

20 El documento WO2006/134602 enseña protocolos de diferenciación para la generación de células secretoras de factores neurotróficos.

25 El documento WO2007/066338 enseña protocolos de diferenciación para la generación de células de tipo oligodendrocítico.

30 El documento WO2004/046348 enseña protocolos de diferenciación para la generación de células de tipo neuronal.

BLONDHEIM N R ET AL, enseña en "Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition", STEM CELLS AND DEVELOPMENT, (200604), vol. 15, no. 2, PAGE 141-164.

35 DOUCET C ET AL, enseña en "Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications", JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, (200511), vol. 205, no. 2, PAGE 228-236.

40 BERNARDO M E ET AL, enseña en "Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute", JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, (200704), vol. 211, no. 1, PAGE 121-130.

REINISCH A ET AL, enseña en "Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application.", REGENERATIVE MEDICINE, (200707), vol. 2, no. 4, PAGE 371-382.

45 SCHALLMOSER K ET AL, enseña en "Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells.", TRANSFUSION, (200708), vol. 47, no. 8, PAGE 1436-1446.

50 CAPELLI C ET AL, enseña en "Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts.", BONE MARROW TRANSPLANTATION, (200710), vol. 40, no. 8, PAGE 785-791.

55 LANGE C ET AL, enseña en "Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine.", JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, (200710), vol. 213, no. 1, PAGE 18-26.

SADAN O ET AL, enseña en "Migration of neurotrophic factors-secreting mesenchymal stem cells toward a quinolinic acid lesion as viewed by magnetic resonance imaging.", STEM CELLS, (200810), vol. 26, no. 10, PAGE 2542-2551.

60 SADAN O ET AL, enseña en "Adult neurotrophic factor-secreting stem cells: a potential novel therapy for neurodegenerative diseases", THE ISRAEL MEDICAL ASSOCIATION JOURNAL, (200904), vol. 11, no. 4, PAGE 201-204.

65 WAGNER W & HO A H, enseña en "Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges.", STEM CELL REVIEWS, (200712), vol. 3, no. 4.

## Resumen de la invención

La presente invención se refiere a una célula humana aislada para uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica, en donde la célula humana segrega factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y no secreta factor de crecimiento nervioso (NGF), en donde una secreción basal de dicho BDNF es al menos cinco veces mayor que una secreción basal de una célula madre mesenquimal no diferenciada que expresa CD73, CD90 y CD105 y no expresa CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR, en donde dicha secreción basal de MSC no diferenciadas ocurre en el ausencia de estimulantes.

Preferiblemente, la célula humana aislada toma al menos diez veces más glutamato de su entorno que una célula derivada de médula ósea que expresa CD73, CD90 y CD105 y que no expresa CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR.

Preferiblemente, la célula humana aislada no está siendo manipulada genéticamente.

Preferiblemente, la célula humana aislada expresa adicionalmente al menos un marcador astrocítico.

## Breve descripción de los dibujos

La invención se describe aquí, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica a los dibujos en detalle ahora, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención solamente, y se presentan con la finalidad de proporcionar lo que se considera como la descripción más útil y comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se intenta mostrar los detalles estructurales de la invención con más detalle que el necesario para una comprensión fundamental de la invención, haciendo evidente la descripción tomada con los dibujos, para los expertos en la técnica, cómo las diversas formas de la invención pueden ser incorporadas en la práctica.

En los dibujos:

La figura 1 es un gráfico que ilustra el potencial de crecimiento de MSC en un medio que contiene 5% de lisado de plaquetas (PM) en comparación con MSC cultivado en un medio que contiene 15% de FCS (FCS).

Las figuras 2A-I son gráficos que ilustran los resultados de los análisis FACS de MSC adherentes al plástico en cultivo en lisado de plaquetas al 5% durante aproximadamente 4 semanas. Las células fueron negativas para los marcadores de superficie hematopoyéticos: (CD3, receptor de células T; monocitos/macrófagos CD14; CD19, marcador de células B; progenitores hematopoyéticos CD34; marcador de leucocitos CD45, y HLA-DR) y tinción positiva para marcadores de superficie mesenquimatosos CD73, CD105 y CD90.

Las figuras 3A-J son fotomicrografías que ilustran que las MSC derivadas de médula ósea humana expresan y secretan factores neurotróficos. MSC y NTF-SC se tiñeron con anticuerpos contra factores neurotróficos, incluido el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (A-B), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) (C-D) y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1) (E-F) y con anticuerpos contra los marcadores de proteína ácida fibrilar glial astrocítica (GFAP) (G-H) y glutamina sintetasa (GS) (I-J). Todos los anticuerpos secundarios utilizados se conjugaron con Alexa-488 (verde). Los núcleos se visualizaron con DAPI (azul). Barra de escala=50µm.

Las figuras 3K-L son gráficos de barras que ilustran la cantidad de factores neurotróficos secretados por las NTF-SC de la presente invención. La secreción del factor neurotrófico se midió a partir de MSCs humanas antes y después de la inducción de la diferenciación en células secretoras de NTF, a partir de 3 (BDNF) y 5 (GDNF) donantes diferentes analizados mediante ensayo ELISA. \* $p < 0.05$  para el MSC frente a las células secretoras de NTF (prueba t de Student).

Para BDNF (Figura 3K): Donante 1: antes de la diferenciación = 2666 pg/10<sup>6</sup> células, después de la diferenciación = 9527 pg/10<sup>6</sup> células; Donante 2: antes de la diferenciación = 520 pg/10<sup>6</sup> células, después de la diferenciación = 6903 pg/10<sup>6</sup> células; Donante 3: antes de la diferenciación = 463 pg/10<sup>6</sup> células, después de la diferenciación = 4919 pg/10<sup>6</sup> células.

La figura 4 es un gráfico que ilustra que los medios humanos de MSC y NTF-SC atenuaron la muerte de las células de neuroblastoma inducidas por 6-OHDA. En el rango de 32-160 µM, el tratamiento con 6-OHDA dio como resultado una tasa de supervivencia de menos del 35% en comparación con las células de neuroblastoma SH-SY5Y no tratadas. Los medios de ambos tipos celulares de células atenuaron la muerte celular inducida por 6-OHDA de una manera estadísticamente significativa en comparación con las células de neuroblastoma tratadas solo con 6-OHDA ( $p < 0.05$  para el rango de 32-72 µM). Un tratamiento con 160 µM de 6-OHDA dio como resultado un aumento más pequeño, pero estadísticamente significativo en la viabilidad celular solo por los medios de NTF-SC y no por los medios de MSC.

Las figuras 5A-B son gráficos que ilustran que el trasplante estriatal de NTF-SC humanas atenúa los cambios de comportamiento inducidos por 6-OHDA. (Figura 5A). En el ensayo de rotaciones inducidas con anfetamina, solo el tratamiento con NTF-SC (n=20) fue beneficioso en comparación con el control (n=10) en dos momentos (día 28 y día 42). No se mostró diferencia estadísticamente significativa para el grupo tratado con MSC (n=20) en comparación con el grupo de control o el grupo tratado con NTF-SC. Por el contrario, para los grupos NTF-SC, se observó una marcada disminución del 25% y 45% después de 14 y 28 días después del trasplante (Figura 5B). 6-OHDA indujo un patrón de comportamiento motor hipoactivo en una prueba de campo abierto a los 7 días tratamiento. El tratamiento con NTF-SC mostró un efecto positivo en la movilidad voluntaria en comparación con los grupos tratados con MSC y PBS (ANOVA,  $p=0.054$ ).

Las figuras 6A-E son ilustraciones y fotografías que ilustran la metodología de la cuantificación estereológica del área estriatal TH-positiva en las ratas lesionadas. Como se muestra en la Figura 6C, las secciones de corona del cuerpo se hicieron en secciones de 40  $\mu\text{m}$ , y cada 8<sup>a</sup> sección se tiñó para la tiroxina hidroxilasa (TH). Cada sección fue capturada por un aumento X40 y dividida en 2-3 imágenes de cada lado de forma simétrica (Figuras 6B, D). Usando el software ImagePro, se determinó un corte basado en el histograma y se creó una máscara (Figuras 6A, E). La cuantificación final se realizó calculando el área roja total en las imágenes enmascaradas.

Las figuras 7A-E son fotografías y gráficos que ilustran el tratamiento con terminales NTF-SC humanos estriatales asilvestrados positivos para TH dañados por 6-OHDA. (Figuras 7A-C), una macrovista de la tinción de TH en cuerpo estriado con un corte representativo para cada grupo de ratas (A-PBS, B-MS, C-NTF-SC). (Figura 7D), Cuantificación digital del área positiva a TH en todo el cuerpo estriado lesionado como porcentaje del cuerpo estriado no tratado, lo que demuestra el efecto protector beneficioso del tratamiento con NTF-SC (n=4 de cada grupo,  $|P<0.05$  en comparación con PBS). (Figura 7E), cuantificación del área positiva a TH del lado lesionado en comparación con el lado no tratado -una comparación en segmentos-. Todo el cuerpo estriado se dividió en cinco segmentos de anterior a posterior (cada grupo representa aproximadamente 1 mm de grosor del cuerpo estriado,  $*-p<0.05$  en comparación con PBS).

Las figuras 8A-G son imágenes positivas siguiendo el trazado de NTF-SC humanas mediante resonancia magnética in vivo y la histología correspondiente. (Figura 8A) Exploración de T2\* MRI realizada 35 días después del tratamiento de un animal de control SPIOs (sin células) que demuestra el sitio de inyección de SPIO (círculo azul) y el sitio de inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado (círculo rojo). No se detectaron otras señales hipointensas en el cuerpo estriado. (Figura 8B). La ruta migratoria demostrada por una imagen axial ponderada en T2\*. Una señal hipointensa marcada es visible desde el sitio de trasplante celular (sitio azul) al sitio de la lesión de 6-OHDA (flecha roja). Se encontró una buena correlación con la tinción con azul de Prusia (Figura 8D) a lo largo de CC en el cuerpo estriado anterior. El mismo trazado (flecha roja) incluso se puede ver en la imagen ponderada en T2 (Figura 8C) que es menos sensible a la inhomogeneidad inducida por los SPIO (Figura 8D). Tinción de azul de Prusia para detectar células marcadas con SPIO en una sección axial (50 días después del tratamiento en el animal que se sometió a una exploración de MRI mostrada en las Figuras 8B-C) que demuestra una ruta migratoria desde el sitio de trasplante celular (flecha blanca), a lo largo del cuerpo calloso (CC, flechas negras huecas) y en el cuerpo estriado anterior (STR, LV-ventrículo lateral, barra de escala - 500  $\mu\text{m}$ ). (Figuras 8E-G) Inmunotinción con anticuerpo anti-núcleo humano de los cajones blancos marcados en la Figura 8D en secciones adyacentes (barra de escala 100  $\mu\text{m}$ ).

La figura 9 es un gráfico de barras que ilustra que la inducción de MSC en NTF-SC aumenta la captación de glutamato. La captación de [<sup>3</sup>H]-D-aspartato (50 nM) se midió en hMSC y en NTF-SC. La captación se realizó en presencia de Na<sup>+</sup> a menos que se indique lo contrario. La captación dependiente de Na<sup>+</sup> se calculó restando los resultados obtenidos de las pruebas gratuitas de Na<sup>+</sup> de los resultados del grupo de control. La inhibición competitiva con D-metil-aspartato (50 nM) se realizó en presencia de [<sup>3</sup>H]-D-aspartato a la misma concentración que las otras pruebas (50 nM). Inhibición con t-PDC, las células se preincubaron con t-PDC durante 15 minutos. NTF-SC realiza la captación de glutamato significativamente mejor que MSC ( $P<0.0001$ ). Los inhibidores disminuyen significativamente la captación de glutamato en NTF-SC en comparación con el control NTF-SC (inhibición competitiva  $P<0.0005$ , t-PDC  $P<0.0001$ ).

Las figuras 10A-C son gráficos y fotomicrografías que ilustran la expresión de GFAP en las células diferenciadas de la presente invención, tal como se mide por RT-PCR en tiempo real (figura 10A) e inmunocitoquímica (figuras 10B-C).

Las figuras 11A-C son fotomicrografías que comparan la expresión de S100 en células no diferenciadas (Figura 11A) y diferenciadas (Figuras 11B-C) de la presente invención.

Descripción de las realizaciones preferidas

La presente divulgación se refiere a células y poblaciones de las mismas que pueden trasplantarse en un paciente con el fin de tratar una gran cantidad de enfermedades neurodegenerativas.

Los principios y el funcionamiento de la presente invención se pueden entender mejor con referencia a los dibujos y descripciones adjuntos.

5 Antes de explicar al menos un aspecto de la divulgación en detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y la terminología empleadas aquí son para el propósito de descripción y no deben considerarse como limitantes.

10 Los factores neurotróficos (NTF) son proteínas secretadas que regulan la supervivencia, el mantenimiento funcional y el desarrollo fenotípico de células neuronales. Las alteraciones en los niveles de NTF están involucradas en el desencadenamiento de la muerte celular programada en las neuronas y, por lo tanto, contribuyen a la patogénesis de la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas.

15 Uno de los NTF más potentes para las neuronas dopaminérgicas se llama factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF). Se sabe que promueve la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en la substantia nigra, promueve el crecimiento de neuritas, aumenta el tamaño del cuerpo celular y también eleva los niveles de TH. Otro NTF potente para las neuronas dopaminérgicas es el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Este NTF tiene efectos potentes sobre la supervivencia y la morfología de las neuronas dopaminérgicas y se ha postulado que  
20 su pérdida contribuye a la muerte de estas células en la enfermedad de Parkinson (EP).

Sin embargo, se prohíbe el uso directo de neurotróficos ya que no pasan la barrera hematoencefálica y no se distribuyen adecuadamente después de la inyección sistémica. Por lo tanto, se deben desarrollar otras estrategias para aprovechar sus propiedades terapéuticas.

25 En la técnica se conocen protocolos para diferenciar células madre mesenquimales humanas en células secretoras de factores neurotróficos; véase, por ejemplo, el documento WO 2006/134602.

30 Mientras que buscaban una manera de aumentar la cantidad de factores neurotróficos secretados por las células madre mesenquimáticas, los presentes inventores han encontrado que la propagación de células madre mesenquimales en el lisado de plaquetas antes de la diferenciación incrementó la secreción de factores neurotróficos de las mismas.

35 Los presentes inventores han demostrado que las MSC diferenciadas después de la incubación en el lisado de plaquetas representan una forma de tipo astrocito acompañada por la presencia de marcadores de astrocitos. Estas células mostraron expresar y secretar niveles significativos de GDNF y BDNF. De hecho, usando procedimientos de inmunocitoquímica, los presentes inventores han demostrado que aproximadamente el 90% de las células generadas expresan GDNF, BDNF, S100, GFAP y glutamina sintetasa (Figuras 3A-J, 10A-C y 11A-C).

40 Después del trasplante al cuerpo estriado de rata lesionada 6-OHDA (un modelo de roedor para Parkinson) las células sobrevivieron durante tres meses (según se midió mediante MRI) y los déficits conductuales mejorados se examinaron mediante una prueba de campo abierto, y el comportamiento rotacional inducido por apomorfina. Además, se demostró que las células reducen el agotamiento de la dopamina y provocan la reinervación de los terminales dopaminérgicos. Se encontró que la eficacia de NTF-SC era superior a la de MSC en términos de índices  
45 conductuales, bioquímicos e histológicos. Además, los presentes inventores demostraron que las células supervivientes migraron hacia la lesión y tuvieron el efecto más significativo al final de la trayectoria de migración. Además, los presentes inventores demostraron que las MSC diferenciadas según los protocolos de las realizaciones de la presente invención son capaces de absorber glutamato.

50 Dado que la nueva tecnología presentada en este documento es clínicamente compatible y segura, los presentes inventores proponen que el trasplante de NTF-SC derivado de MSC humanas autólogas debería convertirse en una opción importante en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

55 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para generar células útiles para tratar un trastorno neurodegenerativo, comprendiendo el método:

(a) incubar células madre mesenquimales en un medio de cultivo que comprende lisado de plaquetas para generar células madre mesenquimales propagadas; y  
60 (b) incubar las células madre mesenquimales propagadas en un medio de diferenciación, generando células útiles para tratar el trastorno neurodegenerativo.

El término "célula madre mesenquimal" o "MSC" se usa indistintamente para células adultas que no están diferenciadas terminalmente, que pueden dividirse para producir células que son células madre o que, irreversiblemente, se diferencian para dar lugar a células de un linaje celular mesenquimal. Las células madre mesenquimales de la presente invención pueden ser de una fuente singénica o alogénica, aunque se prefiere la primera.

De acuerdo con una realización preferida de este aspecto de la presente invención, las células madre mesenquimales no se manipulan genéticamente (es decir, transformadas con un constructo de expresión) para generar las células y poblaciones de células descritas en este documento.

5 Se apreciará que las células de la presente invención pueden derivarse de cualquier célula madre, aunque preferiblemente no de células ES.

10 Las células madre mesenquimales se pueden aislar a partir de diversos tejidos que incluyen, pero no se limitan a, médula ósea, sangre periférica, sangre, placenta y tejido adiposo. Un método para aislar células madre mesenquimales a partir de sangre periférica es descrito por Kassis et al. [Bone Marrow Transplant. 2006 de mayo; 37(10): 967-76]. Un método para aislar células madre mesenquimales del tejido placentario está descrito por Zhang et al [Chinese Medical Journal, 2004, 117(6): 882-887]. Los métodos para aislar y cultivar células madre mesenquimales de tejido adiposo, placentario y de sangre del cordón umbilical están descritos por Kern et al. [Stem Cells, 2006; 24: 1294-1301].

15 De acuerdo con una realización preferida de este aspecto de la presente invención, las células madre mesenquimales son humanas.

20 La médula ósea se puede aislar de la cresta ilíaca de un individuo mediante aspiración. Las células mononucleares BM de baja densidad (BMMNC) pueden separarse mediante un gradiente de densidad FICOL-PAGUE. Con el fin de obtener células madre mesenquimales, se puede cultivar una población celular que comprende las células madre mesenquimales (por ejemplo, BMMNC) en un medio proliferante capaz de mantener y/o expandir las células en presencia de lisado de plaquetas. De acuerdo con una realización, las poblaciones se siembran sobre superficies plásticas de poliestireno (por ejemplo, en un matraz) y las células madre mesenquimales se aíslan mediante la eliminación de células no adherentes. Alternativamente, las células madre mesenquimales pueden aislarse mediante FACS usando marcadores de células madre mesenquimales.

25 Después del aislamiento, las células se expanden típicamente cultivando en un medio de proliferación capaz de mantener y/o expandir las células aisladas *ex vivo* en presencia de lisado de plaquetas. El medio de proliferación puede ser DMEM, alfa-MEM o DMEM/F12.

30 Se apreciará que preferiblemente cuando las células madre mesenquimales son humanas, el lisado de plaquetas también se obtiene de células humanas.

35 De acuerdo con una realización, el medio está desprovisto de xenocontaminantes, es decir, libre de componentes derivados de animales.

A continuación, se presenta un protocolo de ejemplo de aislamiento y propagación de células madre mesenquimales.

40 Aislamiento de BM-MSc humano

45 Se recogieron muestras de médula ósea (3-30 ml) en tubos que contenían EDTA de la cresta ilíaca posterior de donantes humanos adultos sometidos a aspiración de médula ósea en el transcurso de procedimientos de diagnóstico. Los aspirados de médula ósea se diluyeron 1:1 con HBSS y las células mononucleares se separaron mediante centrifugación por densidad (1000xG durante 20 min), sobre tubos que contenían UNI-SEP MAXI (polisacarosa-metrisoato de sodio). La fracción de células mononucleares se recogió y se lavó en HBSS. Las células se resuspendieron en medio de crecimiento que contenía un 10% de lisado de plaquetas (PM1), se contaron con el colorante de exclusión de azul de tripano y se sembraron a una concentración de 250000-350000 células/cm<sup>2</sup> en matraces de cultivo tisular de 75 cm<sup>2</sup>. Los matraces se incubaron en una incubadora humidificada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

50 El medio de crecimiento de PM1 consistía en medio Eagle bajo en glucosa modificado por Dulbecco (Sigma, Aldrich), suplementado con 0.05 mg/ml de gentamicina (Sigma, Aldrich), 2 IU/ml de heparina (TRIMA), 0.001% de 2-mercaptoetanol (Sigma, Aldrich), solución de aminoácidos no esenciales al 1% (Sigma, Aldrich) y lisado de plaquetas al 10%. El medio PM1 se aspiró 24 horas más tarde para eliminar las células no adherentes del matraz, se lavaron las células adherentes suavemente con 10 ml de DMEM, y se añadieron 10 ml de PM1 fresco al matraz. Se permitió que las células hMSC proliferaran durante 12-18 días en medio PM1, que se reemplazó dos veces por semana. Después de 12-18 días o cuando el matraz alcanzó la confluencia. Las células se recolectaron mediante la eliminación de todo el medio de crecimiento y la incubación en solución TrypLE™ (Invitrogen) durante 5 min en una incubadora a 37°C. Después, las células se lavan en DMEM, se cuentan, se resuspenden en medio PM y se siembran en CellStacks a una densidad de 500-3000 células/cm<sup>2</sup>.

65 El medio de crecimiento PM consiste en medio Eagle bajo en glucosa modificado por Dulbecco suplementado con 0.05 mg/ml de gentamicina, 2 IU/ml de heparina y 5% de lisado de plaquetas. Los cultivos de MSC se pasaron aproximadamente cada dos semanas mediante el desprendimiento de la capa de células subfluenciadas con la

solución TrypLE™ (Invitrogen). Los experimentos con las células se realizaron después de 2-7 pases. Por consiguiente, las células se pasaron durante un mínimo de dos semanas en medio que contenía lisado de plaquetas.

5 El lisado de plaquetas se puede preparar usando cualquier método conocido en la técnica. Un protocolo de ejemplo de congelación-descongelación se proporciona a continuación en el presente documento.

#### Preparación del lisado de plaquetas

10 El plasma rico en plaquetas (PRP) puede ser de donaciones de Banco de Sangre determinadas como libres de agentes infecciosos (es decir, VIH, HTLV, HCV, HBsAg). Las bolsas que contenían PRP se almacenaron a -80°C y se descongelaron en un baño de agua a 37°C. Después de la descongelación, el plasma rico en plaquetas de múltiples donantes se reunió, se mezcló y se centrifugó a 14000 x G durante 10 minutos para eliminar las partículas de plaquetas y las membranas. El sobrenadante del lisado de plaquetas se recogió luego y se congeló a -80°C hasta su uso. El lisado de plaquetas se analizó para endotoxina, hemoglobina, pH, proteína total, albúmina, esterilidad por osmolalidad y micoplasma.

15 La verificación de que la población celular aislada (y opcionalmente propagada) comprende células madre mesenquimales puede efectuarse mediante la identificación de criterios fenotípicos y funcionales. Los criterios fenotípicos incluyen la expresión de antígenos de superficie específicos: CD73, CD90 y CD105 ( $\geq 95\%$  positivos) y la ausencia (<2%) de (células T), CD14 (marcador de superficie de monocitos), CD19 (células B), CD34 (células madre hematopoyéticas), CD45 (células hematopoyéticas) y HLA-DR (antígeno de histocompatibilidad de clase II humana). La expresión de la superficie de estas células se puede analizar utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante citometría de flujo.

25 Ejemplos de anticuerpos que se pueden usar para verificar la presencia de células madre mesenquimales incluyen CD73 PE conjugado (BD Pharmingen), CD90 PE-Cy5 conjugado (eBioscience), CD105 PE conjugado (Beckman Coulter), CD14 FITC conjugado (eBioscience), CD19 PE-Cy5 conjugado (eBioscience), CD34 FITC conjugado (Beckman Coulter), CD45 PE conjugado (eBioscience) y HLA-DR PE-Cy5 conjugado (BD Pharmingen).

30 Otro método para verificar la presencia de células madre mesenquimales es mostrar que las células son capaces de diferenciarse en multilíneas tales como, por ejemplo, adipocitos, osteocitos y condrocitos. Esto puede efectuarse, por ejemplo, utilizando el kit de identificación funcional de células madre mesenquimales humanas (R&D Systems).

35 Como se mencionó, después de la propagación de células madre mesenquimales en un medio que contiene lisado de plaquetas, las células pueden diferenciarse en un medio diferenciador para generar células útiles para tratar un trastorno neurodegenerativo.

40 Se apreciará que los componentes del medio de diferenciación se seleccionan de acuerdo con el fenotipo celular requerido.

Por lo tanto, de acuerdo con una realización, el fenotipo puede ser células de tipo astrocito.

45 Como se usa en este documento, la frase "células similares a astrocitos" se refiere a células que comprenden al menos un fenotipo astrocítico que permite que las mismas medien in vivo una actividad astrocítica, es decir, soporte de neuronas.

Tales fenotipos se describen adicionalmente a continuación.

50 La diferenciación a células similares a astrocitos puede efectuarse incubando las MSC en medios de diferenciación tales como los descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 6,528,245 y por Sánchez-Ramos et al. (2000); Woodbury et al. (2000); Woodbury et al. (J. Neurosci. Res. 96: 908-917, 2001); Black and Woodbury (Blood Cells Mol. Dis. 27: 632-635, 2001); Deng et al. (2001), Kohyama et al. (2001), Reyes and Verfatile (Ann., N. Y. Acad. Sci. 938: 231-235, 2001) y Jiang et al. (Nature 418: 47-49, 2002).

55 El documento WO2006/134602, enseña protocolos de diferenciación para la generación de células secretoras de factores neurotróficos.

60 De acuerdo con una realización para generar células de tipo astrocito, las MSC se incuban inicialmente en un medio que comprende factor de crecimiento epidérmico hEGF (por ejemplo, 20 ng/ml) y/o factor de crecimiento de fibroblastos básico (por ejemplo, 20 ng/ml) en presencia o ausencia de suplemento de N2 (insulina, progesterona, putrescina, selenio y transferrina). A continuación, las BMScs se pueden diferenciar en un segundo medio que comprende factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, 5 ng/ml) y neuregulina 1- $\beta 1$  humana (por ejemplo, 50 ng/ml). Este "medio diferenciador" también puede incluir agentes diferenciadores tales como IL-1 $\beta$  y/o dbcAMP.

65

## ES 2 688 945 T3

Según una realización, las MSC se incuban en cada medio de diferenciación durante al menos 24 horas. Se apreciará que se contemplan tiempos de cultivo más largos, tales como dos días, tres días, cuatro días o más.

- 5 De acuerdo con otra realización, los componentes del medio de diferenciación se seleccionan para generar células que comprenden un fenotipo de oligodendrocito. Los medios de diferenciación pueden ser DMEM o DMEM/F12, o cualquier otro medio que soporte el crecimiento neuronal. De acuerdo con una realización preferida de este aspecto de la presente invención, el medio es medio Neurobasal (por ejemplo, Cat. No. 21103049, Invitrogen, Ca, Estados Unidos).
- 10 La Tabla 1 a continuación, resume diversos protocolos de diferenciación para la generación de oligodendrocitos.

Tabla 1

Etapa	Medio <sup>a</sup>	Días
Control		
	Medio de crecimiento regular:	13
	α-MEM	
	FCS 15%	
	L-glutamina 2mM	
	Penicilina 100U/ml	
	Estreptomicina 100ug/ml	
	Nistatina 12.5U/ml	
Protocolo A		
Medio diferenciador (A)	Medio neurobasal	13
	Suplemento N2	
	Suplemento B27	
	bFGF 10 ng/ml	
	GGF 50 ng/ml	
	db-cAMP 1nM	
Protocolo B		
Medio adicional (B)	Medio neurobasal	5
	PDGF 20 ng/ml	
	NT-3 10 ng/ml	
	II-1β 20 ng/ml	
Medio diferenciador (B)	Medio neurobasal	8
	Suplemento N2	
	NT-3 10 ng/ml	
	II-1β 20 ng/ml	
Protocolo C		
Medio adicional (C)	Medio neurobasal	5
	TH 30 ng/ml (valor madre 20 ug/ml)	
	RA 1μM	
	GGF 50 ng/ml	

Medio diferenciador (C)	Medio neurobasal	8
	TH 30 ng/ml (valor madre 20 ug/ml)	
	RA 1µM	
	NT-3 10 ng/ml	
Protocolo D		
Medio adicional (D)	Medio neurobasal	5
	PDGF 20ng/ml	
	GGF 50ng/ml	
Medio diferenciador (D)	Medio neurobasal	8
	Shh 300ng/ml	
	NT-3 10ng/ml	
	db-cAMP 1nM	
	Forscolina 5µM	

El documento WO2007/066338, enseña protocolos de diferenciación para la generación de células de tipo oligodendrocítico.

5 De acuerdo con otra realización, los componentes del medio de diferenciación se seleccionan para generar células que secretan dopamina.

10 Un método de ejemplo para diferenciar células madre mesenquimales en células secretoras de neurotransmisores (por ejemplo, dopamina) se detalla en la Tabla 2, a continuación, en el presente documento.

Tabla 2

Etapa 1: Medio de diferenciación adicional (24-72 h)	DMEM/F12 (sin HEPES); L-glutamina 2 mM; SPN; 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico humano (bFGF); 10 ng/ml de EGF; *Suplemento N2; Ácido araquidónico 40 µM; Ácido docosahexaenoico 10-40 µM (DHA); Vit-E40 µM; Factor de crecimiento de fibroblastos 10 ng/ml 8 (FGF8); 200 ng/ml de Hedgehog sometido a sonicación (Shh)
Etapa 2: Medio de diferenciación dopaminérgico (12-96 h)	DMEM/F12; L-glutamina 2 mM; SPN; *Suplemento N2; Ácido ascórbico 200 µM; AMP dibutilil cíclico 1 mM; Isobutilmetilxantina 0.5 mM; ácido retinoico 1 µM; hidroxianisol butilado 200 µM (BHA); factor de crecimiento transformante humano β3 (TGF-β3), 2 ng/ml; factor neurotrófico derivado de glía humana: (GDNF), 2 ng/ml; neurturina humana: (hNTN), 20 ng/ml; factor neurotrófico derivado del cerebro humano: (BDNF), (10 ng/ml; neurotrofina humana: (hNT-3), 20 ng/ml; interleucina-1β humana (hIL-1β), 100 pg/ml;

15 El documento WO2004/046348, enseña protocolos de diferenciación para la generación de células de tipo neuronal.

20 Se apreciará que cualquiera de los medios de diferenciación puede comprender otros agentes tales como factores neurotróficos (por ejemplo, BDNF, CNTF, GDNF, NTN, NT3 o LIF), hormonas, factores de crecimiento (por ejemplo, GGF2, TGF-β3, TGF-α, FGF-8 y bFGF), vitaminas, hormonas, por ejemplo, insulina, progesterona y otros factores tales como Hedgehog sometido a sonicación, proteínas morfogenéticas óseas, forskolina, ácido retinoico, ácido ascórbico, putrescina, selenio y transferrina.

25 Como se mencionó, los presentes inventores demostraron que la propagación de células madre mesenquimales en lisado de plaquetas antes de la incubación con un agente diferenciador que dirige la célula madre mesenquimal hacia un fenotipo astrocítico (por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), neuregulina humana 1-β1, FGF2, EGF, N2, IBMX y cAMP), generaron células capaces de secretar grandes cantidades de factores neurotróficos.

30 Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona una célula humana aislada que comprende al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal y la secreción de un factor neurotrófico derivado del

cerebro (BDNF), en donde una secreción basal del BDNF es al menos cinco veces mayor que una secreción basal del BDNF en una célula madre mesenquimal.

5 El término "aislado", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que se ha eliminado de su localización *in vivo* (por ejemplo, médula ósea, tejido neural). Preferiblemente, la célula aislada está sustancialmente libre de otras sustancias (por ejemplo, otros tipos de células) que están presentes en su ubicación *in vivo*.

10 Los fenotipos de células madre mesenquimales que están comprendidos en las células de la presente invención son típicamente estructurales. Por ejemplo, las células de la presente invención pueden mostrar una morfología similar a la de las células madre mesenquimales (una morfología similar a un huso). Alternativa o adicionalmente, las células de la presente invención pueden expresar un marcador (por ejemplo, marcador de superficie) típico de las células madre mesenquimales pero atípico a las células astrocíticas nativas. Ejemplos de marcadores de superficie de células madre mesenquimales incluyen, pero sin limitación, CD105+, CD29+, CD44+, CD90+, CD34-, CD45-, CD19-, CD5-, CD20-, CD11B- y FMC7-. Otros marcadores de células madre mesenquimales incluyen, pero sin limitación, 15 tirosina hidroxilasa, nestina y H-NF.

20 Como se menciona, la secreción basal de BDNF a partir de las células de acuerdo con este aspecto de la presente descripción es al menos cinco veces mayor que una secreción basal del BDNF en una célula madre mesenquimal no diferenciada.

Se apreciará que la secreción basal de BDNF puede ser incluso mayor, tal como al menos seis veces mayor, al menos siete veces mayor, al menos ocho veces mayor, al menos nueve veces mayor o incluso al menos diez veces mayor.

25 De acuerdo con una realización, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o más de una población de las células diferenciadas de la presente invención expresan BDNF.

30 Como se usa en este documento, el término "secreción basal" se refiere a una secreción que no implica la adición de estimulantes. La célula madre mesenquimal no diferenciada se obtiene típicamente de la misma fuente que la célula madre mesenquimal diferenciada y es idéntica a ella aparte de haberse diferenciado de acuerdo con los protocolos descritos en este documento. Por lo tanto, típicamente, la célula madre mesenquimal no diferenciada se encuentra en un medio idéntico a las células madre mesenquimales diferenciadas pero sin la adición de agentes diferenciadores.

35 De acuerdo con una realización, las células de la presente divulgación son capaces de absorber glutamato de su medio circundante (por ejemplo, medio de cultivo). Por ejemplo, las células de la presente descripción pueden ser capaces de tomar al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces o incluso al menos 50 veces más glutamato de su entorno que una célula madre mesenquimal no diferenciada.

40 Las células de la presente descripción también pueden comprender un fenotipo astrocítico.

45 Como se usa en este documento, la expresión "fenotipo astrocítico" se refiere a un parámetro estructural y/o funcional típico (por ejemplo, único) de un astrocito que puede usarse para distinguir entre las MSC diferenciadas de la presente divulgación y las MSC no diferenciadas. El fenotipo astrocítico puede comprender una única o una serie de características que pueden usarse para distinguir entre las MSC diferenciadas de la presente divulgación y las MSC no diferenciadas.

50 Se apreciará que los parámetros funcionales pueden superponerse con el parámetro estructural, por ejemplo, la presencia de vesículas secretoras.

De acuerdo con una realización, el fenotipo astrocítico funcional comprende la capacidad de expresar un factor neurotrófico adicional.

55 Como se usa en este documento, el término "expresar" se refiere a la síntesis y/o secreción del factor neurotrófico mencionado anteriormente.

60 Como se usa en este documento, la frase "factor neurotrófico" se refiere a un factor celular que actúa sobre el sistema nervioso cerebral que comprende crecimiento, diferenciación, mantenimiento funcional y/o efectos de supervivencia sobre las neuronas. Ejemplos de factores neurotróficos incluyen, pero no se limitan a, factor neurotrófico derivado de glia (GDNF), números de acceso GenBank L19063, L15306; factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), número de acceso GenBank CAA62632; neurotrofina-3 (NT-3), número de acceso GenBank M37763; neurotrofina-4/5; Neurturina (NTN), número de acceso GenBank NP\_004549; Neurotrophin-4, número de acceso GenBank M86528; Persefina, número de acceso GenBank. AAC39640; factor neurotrófico derivado del cerebro, (BDNF), número de acceso GenBank CAA42761; artemina (ART), número de acceso GenBank AAD13110; 65 factor neurotrófico ciliar (CNTF), número de acceso GenBank NP\_000605; factor de crecimiento de insulina-I (IGF-1), número de acceso GenBank. NP\_000609; y Neublastina, número de acceso GenBank AAD21075.

De acuerdo con una realización, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o más de una población de las células diferenciadas de la presente divulgación expresa GDNF.

5 Típicamente, las células de la presente descripción no secretan el factor de crecimiento nervioso (NGF), número de acceso GenBank CAA37703.

10 Ejemplos de fenotipos astrocíticos estructurales incluyen un tamaño de célula, una forma de célula, un tamaño de organelo y un número de organelo. Por lo tanto, los fenotipos estructurales astrocíticos incluyen un núcleo redondo, un cuerpo "en forma de estrella" y muchos procesos largos que terminan como placas vasculares en los vasos sanguíneos pequeños del SNC. Se pueden encontrar ejemplos adicionales de fenotipos astrocíticos estructurales en el siguiente material: Reynolds and Weiss, Science (1992) 255: 1707-1710; Reynolds, Tetzlaff and Weiss, J. Neurosci (1992) 12: 4565-4574; y Kandel, et al., Principles of Neuroscience, tercera ed. (1991), Appleton & Lange, Norwalk, Conn. Estos fenotipos estructurales se pueden analizar utilizando técnicas microscópicas (por ejemplo, microscopía electrónica de barrido). Pueden usarse anticuerpos o colorantes para resaltar características distintivas para ayudar en el análisis.

Un fenotipo astrocítico estructural también puede comprender la expresión de un marcador astrocítico.

20 Como se usa en este documento, la expresión "marcador de astrocitos" se refiere a un polipéptido que se expresa de forma selectiva o no selectiva en un astrocito. El marcador de astrocitos se puede expresar en la superficie de la célula o internamente. Ejemplos de marcadores de astrocitos incluyen S100 beta, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), glutamina sintetasa (GS), GLAST y GLT1.

25 De acuerdo con una realización, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o más de una población de las células diferenciadas de la presente divulgación expresan al menos uno o más marcadores de astrocitos, incluidos, entre otros, S100 beta, GFAP y GS.

30 Se apreciará que las poblaciones de células obtenidas de acuerdo con los métodos descritos en este documento son típicamente no homogéneas.

De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona una población celular aislada que comprende células humanas en donde:

35 i) al menos N% de las células humanas secretan factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), en donde una secreción basal del BDNF es al menos cinco veces mayor que una secreción basal del BDNF en una célula madre mesenquimal;

(ii) al menos M% de las células humanas comprende al menos un fenotipo de células madre mesenquimales; y

(iii) al menos una de las células humanas secreta el BDNF y el al menos un fenotipo de célula madre mesenquimal;

40 donde M y N se seleccionan cada uno independientemente entre 1 y 99.

45 M% puede ser cualquier porcentaje de 1% a 99%, por ejemplo 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31%, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81%, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y 99%.

50 N% puede ser cualquier porcentaje de 1% a 99%, por ejemplo 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31%, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81%, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y 99%.

55 El porcentaje de células que secretan BDNF puede aumentarse o reducirse de acuerdo con las necesidades previstas. Esto puede ser efectuado por FACS usando un anticuerpo específico para un marcador de células astrocíticas. Ejemplos de tales marcadores astrocíticos se describen anteriormente. Si el marcador celular es un marcador interno, preferiblemente el análisis FACS comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos que pueden penetrar fácilmente en una célula y pueden eliminarse fácilmente por lavado de la célula después de la detección. El proceso FACS puede repetirse varias veces usando los mismos o diferentes marcadores dependiendo del grado de enriquecimiento y el fenotipo celular requerido como producto final.

65 De acuerdo con otra realización de este aspecto de la presente divulgación, las poblaciones celulares pueden enriquecerse para células que comprenden tanto un fenotipo astrocítico como un fenotipo de células madre mesenquimatosas de modo que se genere una población homogénea de células.

Una vez diferenciadas y opcionalmente aisladas, las células pueden analizarse (en cultivo) para determinar su capacidad de secretar un BDNF. Un método de ejemplo para analizar la secreción de BDNF (y otros factores neurotróficos (NTF)) se describe a continuación en el presente documento.

5 ELISA para NTF secretados

10 Para el análisis de NTF secretadas, el sobrenadante se recoge de cultivos de MSC o de células secretoras de NTF al final del procedimiento de diferenciación descrito anteriormente, y las células se recolectan y se cuentan. La cantidad de NTF tales como factor neurotrófico derivado de glial (GDNF) o Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en los sobrenadantes de cultivo de la célula se cuantificó usando un ensayo GDNF o BDNF ELISA (GDNF DuoSet DY212; BDNF DuoSet DY248; R&D Systems) según al protocolo del fabricante.

15 Como se menciona de acuerdo con el fenotipo, las células y poblaciones celulares de la presente divulgación se pueden usar para tratar una enfermedad o trastorno particular. Las poblaciones celulares pueden usarse directamente después de la diferenciación o pueden enriquecerse para un fenotipo particular como se describió anteriormente. Como se resume en la Tabla 3 a continuación, ciertos factores neurotróficos o un conjunto de factores neurotróficos han demostrado ser particularmente beneficiosos para tratar una enfermedad particular. Por ejemplo, las células de la presente divulgación que secretan BDNF y GDNF serían particularmente adecuadas para tratar Parkinson.

20

Tabla 3

Enfermedad	Fenotipo astrocítico	REF
Parkinson	BDNF, FGF, GDNF	Walker DG, et al. Brain Res 1998; 794: 181-7.
		Lorigados L, et al. Rev Neurol 1998; 26: 744-8.
		Mogi M, et al. Neurosci Lett 1994; 180: 147-50.
		Howells DW, et al. Exp Neurol 2000; 166: 127-35.
		Beck KD, et al. Nature 1995; 373: 339-41.
		Tomac A, et al. Nature 1995; 373: 335-9.
		Gash DM, et al. Nature 1996; 380: 252-5.
		Choi-Lundberg DL, Science 1997; 275: 838-41.
		Bozzi Y, Borrelli E. Eur J Neurosci 1999; 11: 1275-84.
		Chauhan NB, et al Soc Neurosci Abstr 1998; 24: 1465.
		Chauhan NB, et al, Neurology 1999; 52:A212-213.
Epilepsia	BDNF, NT-3, transportador de glutamato	G.W. Mathern, Mol. Chem. Neuropathol. 30 1-2 (1997), pp. 53-76.
		Lucia Tapia-Arancibia et al. Frontiers in Neuroendocrinology 2004 Jul;25(2):77-107.
		RYUTA KOYAMA and YUJI IKEGAYA;NEUROSCIENCE UPDATE 2005 Aug;11(4):282-7.
		Gerald Seifert, et al., Nature Reviews Neuroscience 7, 194-206 (March 2006).
ALS	NT3, IGF1, BDNF, transportador de glutamato	Luis H. Et al., Brain Research Reviews 2004 Dec;47(1-3):263-74.
		Bradley WG. Ann Neurol 1995; 38: 971.
		Haase G, et al. Nat Med 1997; 3:429-36.
		Arakawa Y, J Neurosci 1990; 10: 3507-15.
Adicción a drogas y alcohol	GDNF	Ron D, Janak PH. Rev Neurosci. 2005;16(4):277-85.
Daño cerebral	Capacidad de las células para responder a IL-1	Nancy Rothwell; Brain, Behavior, and Immunity. 2003 Jun;17(3):152-7.

Enfermedad	Fenotipo astrocítico	REF
Alzheimer	BDNF	Crutcher KA, et al. J Neurosci 1993; 6: 2540-50. Scott SA, et al. Nerve growth factor in Alzheimer's disease: increased levels throughout the brain coupled with declines in nucleus basalis.. J Neurosci 1995; 15: 6213-21. Peng S, et al. J Neuropathol Exp Neurol 2004; 63: 641-9. Murer MG, et al. Neuroscience 1999; 88: 1015-32.
Huntington	BDNF, NT-3, o NT-4/5	Martinez-Serrano A, Bjorklund A. Trends Neurosci 1997; 20: 530-8.
		Perez-Navarro E, et al. J Neurochem 2000; 75: 2190-9.
		Perez-Navarro E, et al. Neuroscience 1999; 91: 1257-64.
Esquizofrenia	NT-3, BDNF	Gal Shoval, Abraham Weizmana; Eur Neuropsychopharmacol. 2005 May;15(3):319-29.
		Levi-Montalcini, R., 1987. Biosci. Rep. 7, 681-699.
		Hattori, M., Nanko, S., 1995. Biochem. Biophys. Res. Commun. 209, 513-518.
		Virgos, C., 2001, Schizophr. Res. 49, 65-71.
Nervio óptico	CNTF	Paul A. Sieving, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2006 Mar 7;103(10):3896-901.
Apoplejía	FGF, BDNF	Wu D; Neuro Rx. 2005 Jan;2(1):120-8.

5 Se ha propuesto que las células astrocíticas pueden reducir el estrés oxidativo en las neuronas al metabolizar la dopamina, ya que expresan monoamina oxidasa-B y catecol-O-metil-transferasa. Además, se ha propuesto que las células astrocíticas pueden ser capaces de prevenir la neurotoxicidad generada por NO mediante un mecanismo dependiente del glutatión (Chen et al., 2004, Curr Drug Targets, 2005 Nov; 6(7): 821-33). Por consiguiente, las células de la presente divulgación que comprenden una función de eliminación y/o expresan enzimas de metabolización de dopamina también pueden ser adecuadas para tratar el Parkinson.

10 Debido a una eliminación o disminución insuficiente de los transportadores de glutamato, se ha sugerido la excitotoxicidad del glutamato como un factor causante de ALS [Bendotti 2001, et al., J Neurochem, 79(4): 737-746, 2001]. Por lo tanto, las células de la presente descripción que muestran una actividad transportadora de glutamato elevada también pueden ser adecuadas para tratar ALS.

15 Se apreciará que las células capaces de secretar neurotransmisores tales como dopamina serían particularmente adecuadas para tratar la enfermedad de Parkinson.

20 Además, las células que comprenden un fenotipo de oligodendrocitos serían particularmente adecuadas para enfermedades y afecciones del sistema nervioso que resultan del deterioro o daño del revestimiento de mielina generado por células productoras de mielina. La mielina se puede perder como un evento primario debido al daño directo a la mielina o como un evento secundario como resultado del daño a los axones y las neuronas. Los eventos primarios incluyen enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis múltiple (EM), mielopatía asociada a EM por inmunodeficiencia humana, mielopatía transversa/mielitis, leucoencefalopatía multifocal progresiva, mielinólisis central pontina y lesiones en el revestimiento de mielina (como se describe a continuación para eventos secundarios). Los eventos secundarios incluyen una gran variedad de lesiones en los axones o neuronas causadas por lesiones físicas en el cerebro o la médula espinal, enfermedades de la isquemia, enfermedades malignas, enfermedades infecciosas (como el VIH, enfermedad de Lyme, tuberculosis, sífilis o herpes), enfermedades degenerativas (como Parkinson, Alzheimer, Huntington, ALS, neuritis óptica, encefalomielitis posinfecciosa, adrenoleucodistrofia y adrenomieloneuropatía), esquizofrenia, enfermedades/trastornos nutricionales (como ácido fólico y deficiencia de vitamina B12, enfermedad de Wemicke), enfermedades sistémicas (como diabetes, eritematosis sistémica por lupus, carcinoma) y sustancias tóxicas (como alcohol, plomo, bromuro de etidio); y procesos iatrogénicos como interacciones medicamentosas, radioterapia o neurocirugía.

35 Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno del SNC.

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad del SNC" se refiere a cualquier trastorno, enfermedad o afección del sistema nervioso central que puede tratarse con las células de la presente divulgación.

Por consiguiente, estas células pueden usarse para preparar un medicamento (de forma intercambiable se hace referencia a composición farmacéutica), por lo que dicho medicamento se formula para tratar una enfermedad o trastorno del SNC.

5 Ejemplos representativos de enfermedades o trastornos del SNC que se pueden tratar beneficiosamente con las células descritas en este documento incluyen, pero no se limitan a, un trastorno del dolor, un trastorno del movimiento, un trastorno disociativo, un trastorno del estado de ánimo, un trastorno afectivo, una enfermedad o un trastorno neurodegenerativo y un trastorno convulsivo.

10 Ejemplos más específicos de tales afecciones incluyen, entre otros, Parkinson, ALS, esclerosis múltiple, enfermedad de Huntington, encefalomiелitis autoinmune, neuropatía diabética, neuropatía glaucomatosa, degeneración macular, temblores de acción y disquinesia tardía, pánico, ansiedad y depresión, alcoholismo, insomnio, comportamiento maniaco, Alzheimer y epilepsia.

15 En cualquiera de los métodos descritos en este documento, las células se pueden obtener de cualquier donante humano autólogo o no autólogo (es decir, alogénico o xenogénico). Por ejemplo, las células pueden aislarse de un cadáver humano o un sujeto donante.

20 Las células de la presente divulgación se pueden administrar al individuo tratado usando una variedad de enfoques de trasplante, cuya naturaleza depende del sitio de implantación.

25 El término o expresión "trasplante", "reemplazo celular" o "injerto" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a la introducción de las células de la presente divulgación en el tejido diana. Las células se pueden derivar del receptor o de un donante alogénico o xenogénico.

30 Las células pueden injertarse en el sistema nervioso central o en las cavidades ventriculares o subduralmente en la superficie de un cerebro huésped. Las condiciones para un trasplante exitoso incluyen: (i) viabilidad del implante; (ii) retención del injerto en el sitio del trasplante; y (iii) cantidad mínima de reacción patológica en el sitio del trasplante. Los métodos para trasplantar varios tejidos nerviosos, por ejemplo, tejido cerebral embrionario, en cerebros hospedadores se han descrito en: "Neural grafting in the mammalian CNS", Bjorklund y Stenevi, eds. (1985); Freed et al., 2001; Olanow et al., 2003). Estos procedimientos incluyen el trasplante intraparenquimatoso, es decir, dentro del cerebro del huésped (en comparación con fuera del cerebro o trasplante extraparenquimatoso) logrado mediante inyección o deposición de tejido dentro del cerebro del huésped para oponerse al parénquima cerebral en el momento del trasplante.

35 El trasplante intraparenquimatoso puede realizarse usando dos enfoques: (i) inyección de células en el parénquima cerebral del huésped o (ii) preparación de una cavidad por medios quirúrgicos para exponer el parénquima cerebral del huésped y luego depositar el injerto en la cavidad. Ambos métodos proporcionan la deposición del parénquima entre el injerto y el tejido cerebral del huésped en el momento del injerto, y ambos facilitan la integración anatómica entre el injerto y el tejido cerebral del huésped. Esto es importante si se requiere que el injerto se convierta en una parte integral del cerebro anfitrión y sobreviva durante la vida del huésped.

40 Alternativamente, el injerto puede colocarse en un ventrículo, por ejemplo, un ventrículo cerebral o subduralmente, es decir, en la superficie del cerebro del anfitrión donde se separa del parénquima cerebral del anfitrión por la piamadre o aracnoides y la piamadre interpuestos. El injerto al ventrículo puede lograrse mediante la inyección de las células del donante o haciendo crecer las células en un sustrato tal como colágeno al 3% para formar un tapón de tejido sólido que luego puede implantarse en el ventrículo para evitar la dislocación del injerto. Para el injerto subdural, las células se pueden inyectar alrededor de la superficie del cerebro después de hacer una hendidura en la duramadre. Las inyecciones en regiones seleccionadas del cerebro del huésped se pueden hacer taladrando un orificio y perforando la duramadre para permitir que se inserte la aguja de una microjeringa. La microjeringa está montada preferiblemente en un marco estereotáxico y se seleccionan coordenadas estereotáxicas tridimensionales para colocar la aguja en la ubicación deseada del cerebro o la médula espinal. Las células también se pueden introducir en el putamen, el núcleo basal, la corteza del hipocampo, el cuerpo estriado, la substantia nigra o las regiones caudadas del cerebro, así como en la médula espinal.

55 Las células también pueden trasplantarse a una región sana del tejido. En algunos casos, la ubicación exacta del área del tejido dañado puede ser desconocida y las células pueden trasplantarse inadvertidamente a una región sana. En otros casos, puede ser preferible administrar las células a una región sana, evitando así cualquier daño adicional a esa región. En cualquier caso, después del trasplante, las células preferiblemente migran al área dañada.

60 Para el trasplante, la suspensión celular se extrae en la jeringa y se administra a receptores de trasplantes anestesiados. Se pueden realizar inyecciones múltiples usando este procedimiento.

65 El procedimiento de suspensión celular permite el injerto de las células a cualquier sitio predeterminado en el cerebro o la médula espinal, es relativamente no traumático, permite múltiples injertos simultáneamente en varios sitios diferentes o en el mismo sitio usando la misma suspensión celular, y permite mezclas de células de diferentes

regiones anatómicas. Los injertos múltiples pueden consistir en una mezcla de tipos de células y/o una mezcla de transgenes insertados en las células. Preferiblemente, se introducen de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^8$  células por injerto.

5 Para trasplante en cavidades, que pueden preferirse para injerto de médula espinal, el tejido se elimina de regiones cercanas a la superficie externa del sistema nervioso central (SNC) para formar una cavidad de trasplante, por ejemplo, como lo describe Stenevi et al. (Brain Res. 114: 1-20., 1976), eliminando el hueso que recubre el cerebro y deteniendo la hemorragia con un material como espuma de gel. Se puede usar succión para crear la cavidad. El injerto se coloca luego en la cavidad. Se puede colocar más de un trasplante en la misma cavidad mediante la  
10 inyección de células o implantes de tejido sólido. Preferiblemente, el sitio de implantación está dictado por el trastorno del SNC que se está tratando y el fenotipo astrocítico comprendido en la célula (por ejemplo, un factor neurotrófico particular que se secreta) por las células de la presente divulgación. Por ejemplo, las células que secretan GDNF se implantan preferiblemente en la sustantia nigra de un paciente con Parkinson.

15 Dado que es probable que las células no autólogas induzcan una reacción inmune cuando se administran al cuerpo, se han desarrollado varias metodologías para reducir la probabilidad de rechazo de células no autólogas. Incluyen suprimir el sistema inmune del receptor o encapsular las células no autólogas en membranas inmunoaislantes y semipermeables antes del trasplante.

20 Las técnicas de encapsulación generalmente se clasifican como microencapsulación, que implican pequeños vehículos esféricos y macroencapsulación, que implica membranas de fibra plana y de fibra hueca más grandes (Uludag, H. et al., Technology of mammalian cell encapsulation. Adv Drug Deliv Rev. 2000; 42: 29-64).

25 Los métodos para preparar microcápsulas son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los descritos por Lu MZ, et al., Cell encapsulation with alginate and alpha-phenoxycinnamylidene-acetylated poly(allylamine). Biotechnol Bioeng. 2000, 70: 479-83, Chang TM and Prakash S. Procedures for microencapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms. Mol Biotechnol. 2001, 17: 249-60, y Lu MZ, et al., A novel cell encapsulation method using photosensitive poly(allylamine alpha-cyanocinnamylideneacetate) J Microencapsul. 2000, 17: 245-51.

30 Por ejemplo, las microcápsulas se preparan por complejación de colágeno modificado con una cubierta de terpolímero de 2-hidroxietilo acrilato de metilo (HEMA), ácido metacrílico (MAA) y metacrilato de metilo (MMA), resultando en un grosor de la cápsula de 2-5  $\mu\text{m}$ . Tales microcápsulas se pueden encapsular además con cubiertas adicionales de terpolímero de 2-5  $\mu\text{m}$  con el fin de impartir una superficie lisa con carga negativa y para minimizar la captación de proteína de plasma (Chia, SM et al Multi-layered microcapsules for cell encapsulation. Biomaterials  
35 2002 23: 849-56).

Otras microcápsulas se basan en alginato, un polisacárido marino (Sambanis, A. Encapsulated islets in diabetes treatment. Diabetes Technol. Diabetes Technol. Ther. 2003, 5: 665-8) o sus derivados. Por ejemplo, las microcápsulas pueden prepararse mediante la complejación de polielectrolitos entre los polianiones alginato de sodio y sulfato de celulosa sódica con el polication de hidrocioruro de poli(metilen-co-guanidina) en presencia de cloruro de calcio.

40 Se apreciará que la encapsulación celular se mejora cuando se usan cápsulas más pequeñas. Por lo tanto, el control de calidad, la estabilidad mecánica, las propiedades de difusión y las actividades *in vitro* de las células encapsuladas mejoraron cuando el tamaño de la cápsula se redujo de 1 mm a 400  $\mu\text{m}$  (Canaple L. et al. Improving cell encapsulation through size control. J Biomater Sci Polym Ed. 2002; 13: 783-96). Por otra parte, se encontró que biocápsulas nanoporosas con tamaño de poro tan pequeño como 7 nm bien controlado, químicas de superficie adaptadas y microarquitecturas precisas inmunoaislaban con éxito microambientes para células (Williams D. Small is beautiful: microparticle and nanoparticle technology in medical devices. Technol Med de dispositivos. 1999, 10: 6-9; Desai, T. A. Microfabrication technology for pancreatic cell encapsulation. Expert Opin Biol Ther. 2002, 2: 633-46).

45 Ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen, pero sin limitación, metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, ciclosporina A, cloroquina, hidroxicloloroquina, sulfasalazina (sulfasalazopirina), sales de oro, D-penicilamina, leflunomida, azatioprina, anakinra, infliximab (REMICADE<sup>®</sup>R), etanercept, bloqueadores de TNF-alfa, un agente biológico que se dirige a una citoquina inflamatoria y un medicamento antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Ejemplos de AINE incluyen, entre otros, ácido acetilsalicílico, salicilato de magnesio y colina, diflunisal, salicilato de magnesio, salsalato, salicilato de sodio, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, meclofenamato, naproxeno, nabumetona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tolmetina, paracetamol, ibuprofeno, inhibidores de Cox-2 y tramadol.

60 En cualquiera de los métodos descritos en este documento, las células pueden administrarse por sí mismas o, preferiblemente, como parte de una composición farmacéutica que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

65 Tal como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los conjugados químicos descritos en el presente documento, con otros componentes químicos tales como

vehículos y excipientes farmacéuticamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un sujeto.

5 En lo sucesivo, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o un diluyente que no causa irritación significativa a un sujeto y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Ejemplos, sin limitaciones, de vehículos, son propilenglicol, solución salina, emulsiones y mezclas de disolventes orgánicos con agua.

10 Aquí el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

15 De acuerdo con una realización preferida de la presente divulgación, el vehículo farmacéutico es una solución acuosa de solución salina.

Las técnicas para formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

20 Las vías de administración adecuadas incluyen administración directa en el tejido u órgano de interés. Por lo tanto, por ejemplo, las células pueden administrarse directamente en el cerebro como se describe anteriormente en el presente documento o directamente en el músculo como se describe en el Ejemplo 3 a continuación.

25 Para cualquier preparación usada en los métodos de la divulgación, la cantidad o dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular e *in vitro*. Preferiblemente, se formula una dosis en un modelo animal para lograr una concentración o título deseado. Tal información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos.

30 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en el presente documento pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. Por ejemplo, pueden usarse ratones lesionados con 6-OHDA como modelos animales de Parkinson. Además, se puede usar una prueba de girasol para probar la mejora en la función motora delicada al desafiar a los animales a abrir semillas de girasol durante un periodo de tiempo particular.

35 Se pueden usar ratones transgénicos como modelo para la enfermedad de Huntington que comprenden números aumentados de repeticiones CAG que tienen inclusiones intranucleares de huntingtina y ubiquitina en neuronas del cuerpo estriado y la corteza cerebral pero no en el tallo cerebral, el tálamo o la médula espinal, que coinciden de cerca con los sitios de pérdida de células neuronales en la enfermedad.

40 Se pueden usar ratones transgénicos como un modelo para la enfermedad de ALS que comprende mutaciones de SOD-1.

45 La vía septohipocámpica, seccionada transversalmente de forma unilateral cortando la fimbria, imita el déficit colinérgico de la pérdida de la ruta septohipocámpica en la enfermedad de Alzheimer. Por consiguiente, pueden usarse modelos animales que comprenden esta lesión para analizar las células de la presente descripción para tratar la enfermedad de Alzheimer.

50 La supervivencia y el comportamiento rotacional (por ejemplo, en un Rotarod) de los animales se pueden analizar después de la administración de las células de la presente divulgación.

55 Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosificación para uso en humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual en vista del estado del paciente (véase, por ejemplo, Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1). Por ejemplo, el paciente con Parkinson puede controlarse sintomáticamente para detectar funciones motoras mejoradas que indiquen una respuesta positiva al tratamiento.

60 Para la inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en reguladores fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o regulador salino fisiológico.

65 La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente a niveles del ingrediente activo que sean suficientes para regular eficazmente la síntesis del neurotransmisor por las células implantadas. Las dosis necesarias para lograr el efecto deseado dependerán de las características individuales y la vía de administración. Los ensayos de detección se pueden usar para determinar las concentraciones en plasma.

Dependiendo de la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección por tratar, la dosificación puede ser de una sola o una pluralidad de administraciones, con un curso de tratamiento que dura de varios días a varias semanas, o se logra una disminución del estado de la enfermedad.

5 La cantidad de una composición para administrar dependerá, por supuesto, del individuo que se está tratando, la gravedad de la afección, la forma de administración, el juicio del médico que prescribe, etc. La dosificación y el momento de la administración responderá a una monitorización cuidadosa y continua de la condición cambiante individual. Por ejemplo, a un paciente de Parkinson tratado se le administrará una cantidad de células que es suficiente para aliviar los síntomas de la enfermedad, de acuerdo con las indicaciones de monitorización.

10 Las células de la presente divulgación se pueden administrar conjuntamente con agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, tales como gangliósidos; antibióticos, neurotransmisores, neurohormonas, toxinas, moléculas promotoras de neuritas; y antimetabolitos y precursores de moléculas de neurotransmisores tales como L-DOPA. Adicionalmente, las células de la presente divulgación se pueden  
15 coadministrar con otras células capaces de sintetizar un neurotransmisor. Tales células se describen en la Patente de los Estados Unidos. Solicitud No. 20050265983 de los presentes inventores.

Después del trasplante, las células de la presente divulgación preferiblemente sobreviven en el área enferma durante un período de tiempo (por ejemplo, al menos 3 meses), de modo que se observa un efecto terapéutico.

20 Como se usa en este documento, el término "aproximadamente" se refiere a  $\pm 10\%$ .

Objetos, ventajas y características novedosos adicionales de la presente divulgación resultarán evidentes para un experto habitual en la técnica tras el examen de los siguientes ejemplos, que no están destinados a ser limitantes.

## 25 Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que, junto con las descripciones anteriores, ilustran la divulgación de una manera no limitativa.

30 Generalmente, la nomenclatura usada en este documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente descripción incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican minuciosamente en la literatura. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual", Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se expone en la Patente de los Estados Unidos Nos. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J.E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton and Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los  
40 inmoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 y 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984); "Methods in Enzymology" vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual", CSHL Press (1996) and Parfitt et al. (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Miner Res 2(6), 595-610. Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Se considera que los procedimientos en el mismo son bien conocidos en la técnica y se  
55 proporcionan para la comodidad del lector.

### Ejemplo 1

60 Generación y caracterización de células secretoras de factor neurotrófico (NTF-SC)

Materiales y métodos

Preparación del lisado de plaquetas

65 Se preparó lisado de plaquetas usando un protocolo de congelación-descongelación. El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo a partir de donaciones de Blood Bank determinadas como libres de agentes infecciosos (es decir,

HIV, HTLV, HCV, HBsAg). Las bolsas que contenían PRP se almacenaron a -80°C y se descongelaron en un baño de agua a 37°C. Después de descongelar, el plasma rico en plaquetas de múltiples donantes se reunió, se mezcló y se centrifugó a 14000 x G durante 10 minutos para eliminar las partículas y membranas de plaquetas. El sobrenadante del lisado de plaquetas se recogió luego y se congeló a -80°C hasta su uso. El lisado de plaquetas se analizó en busca de endotoxina, hemoglobina, pH, proteína total, albúmina, osmolalidad, esterilidad y micoplasma.

Aislamiento y proliferación de MSC humanas:

Se recolectaron muestras de médula ósea humana adulta de la cresta ilíaca posterior de donantes humanos adultos, sometidos a aspiración de médula ósea, después de obtener el consentimiento informado. Los aspirados de médula ósea se diluyeron 1:1 con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS, Biological Industries, Beit-Haemek, Israel) y las células mononucleares se separaron por centrifugación por densidad, sobre tubos que contenían UNI-SEP<sub>MAXI</sub>/UNI-SEP+(Polisucrosa-Metrisoato sódico, NovaMed, Jerusalem, Israel). La fracción de células mononucleares se recolectó, se lavó en HBSS y se centrifugó. Las células se resuspendieron en medio de crecimiento 1, se contaron y se sembraron a una concentración de 250000-350000 células/cm<sup>2</sup> en matraces de cultivo de tejidos de 75 cm<sup>2</sup> (Corning, NY, Estados Unidos). Los matraces se incubaron en una incubadora humidificada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

El medio de crecimiento 1 consistía en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Biological Industries), suplementado con 100 µg/ml de estreptomina, 100 U/ml de penicilina, 12.5 unidades/ml de nistatina (SPN, Biological Industries), 2 mM de L-glutamina (Biological Industries), 2 UI/ml de heparina (Trima, Kibutz Maabarot, Israel), 0.001% de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), solución al 1% de aminoácidos no esenciales MEM (Biological Industries) y 10% de lisado de plaquetas. El lisado de plaquetas se procesó a partir de plasma rico en plaquetas humanas (PRP) descongelado y congelado como se describió aquí anteriormente. 24 horas más tarde, se aspiró el medio de crecimiento 1 para eliminar las células no adherentes del matraz. Se permitió la proliferación de MSC humano en medio de crecimiento 1, que se reemplazó dos veces por semana. Después de 12-18 días las células se tripsinizaron (tripsina de Biological Industries), se centrifugaron, se contaron, se resuspendieron en medio de crecimiento 2 y se sembraron en CellStacks (Corning) a una densidad de 500-3000 células/cm<sup>2</sup>. El medio de crecimiento 2 consiste en DMEM suplementado con SPN, glutamina y heparina como en el medio de crecimiento 1 y 5% de PRP. Los cultivos de MSC se pasaron aproximadamente cada dos semanas. Los experimentos en las células se realizaron después de 2-7 pasajes.

Inducción de MSC humanas en NTF-SC

Se colocaron primero MSC humanas (12.000 células/cm<sup>2</sup>) en DMEM complementado con SPN, L-glutamina 2 mM (Biological Industries), 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), 20 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos humanos básicos (hbFGF) (R&D Systems) y suplemento de N2 (Invitrogen). Después de 72 horas, el medio se reemplazó con DMEM suplementado con AMP cíclico dibutirilico 1 mM (dbcAMP), isobutilmetilxantina (IBMX) 0.5 mM (Sigma-Aldrich), factor de crecimiento derivado de plaquetas humanas (PDGF) de 5 ng/ml, 50 ng/ml dominio 1-β1/HRG1-β1 EGF de neuregulina humana y 20 ng/ml de hbFGF (todos de R&D Systems) durante 3 días más.

Inmunocitoquímica

Se fijaron MSC y NTF-SC humanas con paraformaldehído al 4% y se tiñeron con proteína ácida fibrilar anti-glial de conejo (GFAP; 1:200, DAKO), anti-glutamina sintetasa de conejo (GS; 1:100; Sigma), anti-GDNF de conejo (1:100, Santa Cruz), anti-BDNF de conejo (1:100, Santa Cruz), anti-IGF-1 de conejo (1:100, Santa Cruz). Los anticuerpos secundarios fueron Alexa-488 anti-conejo de cabra (1:200, Molecular Probes). Para la tinción con GDNF, los anticuerpos secundarios fueron de cabra anti-conejo (1:200; Jackson Laboratories) y estreptavidina-Alexa-488 (1:200, Molecular Probes) biotinilados. El ADN nuclear se tiñó con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (1:1000, Sigma).

Ensayo de neuroprotección *in vitro*

Se cultivaron células SH-SY5Y de la línea celular de neuroblastoma (ATCC, Manassas, VA, Estados Unidos) En medios basales que consisten en DMEM con suero de ternera fetal al 10% (FCS), L-glutamina 2 mM y SPN (Biological Industries). Las células SH-SY5Y se sembraron en placas de 96 pozos. Cada pozo recibió la aplicación de medio condicionado para MSC o NTF-SC humanas o con medio libre de suero (DMEM, glutamina y SPN), y se expuso inmediatamente a la agresión oxidante por 6-OHDA (Sigma-Aldrich) durante 24 horas. La viabilidad celular después del tratamiento se analizó añadiendo solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a cada pozo seguido de incubación a 37°C durante 3 horas. La absorbancia se determinó a 564 nm en un lector de microplacas. La viabilidad celular se evaluó en sextupletes para cada tratamiento y se comparó con las células tratadas sin suero.

Mediciones basadas en ELISA de la secreción de NTF

Al final del proceso de inducción de NTF-SC, se midió el sobrenadante del cultivo celular para las concentraciones de GDNF y BDNF humano mediante un procedimiento ELISA tipo sándwich de acuerdo con las instrucciones del fabricante (DuoSet, R&D System para BDNF y GDNF humanos). La absorbancia a 450 nm y 570 nm se registró en un lector de microplacas (Labsystems Multiscan MS). Los resultados se calcularon para un millón de células.

Resultados

10 Análisis de MSC en medio que contiene 5% de lisado de plaquetas

En la Figura 1 se muestra el potencial de crecimiento de MSC en medio que contiene 5% de lisado de plaquetas (PM) en comparación con MSC cultivadas en medio que contiene 15% de FCS (FCS).

15 En las Figuras 2A-I se muestra el análisis de FACS de MSC adherentes al plástico cultivadas en lisado de plaquetas al 5% durante aproximadamente 4 semanas. Las células fueron negativas para los marcadores de superficie Hematopoyética: (CD3, receptor de células T; monocitos/macrófagos CD14; CD19, marcador de células B; progenitores hematopoyéticos CD34; marcador de leucocitos CD45, y HLA-DR) y tinción positiva para marcadores de superficie mesenquimatosos CD73, CD105 y CD90.

20 NTF-SC humanas inducidas expresan factores neurotróficos

El análisis *in vitro* de NTF-SC reveló su perfil de expresión de NTF. Expresaron marcadores de astrocitos como GFAP y GS. Además, las NTF-SC expresaron altamente las proteínas GDNF, BDNF e IGF-1 como se indica por inmunocitoquímica (Figuras 3A-J). El análisis ELISA mostró que las NTF-SC diferenciadas secretan los factores neurotróficos en el sobrenadante del cultivo. Mientras que las MSC no tratadas secretaban niveles bajos de BDNF y GDNF ( $1216 \pm 725$  pg/ $10^6$  células y  $337 \pm 27$  pg/ $10^6$  células, respectivamente), después de seis días de inducción, las NTF-SC secretaban más de cinco veces más BDNF ( $7117 \pm 1335$  pg/ $10^6$  células), y más del doble de la cantidad de GDNF ( $787 \pm 206$  pg/ $10^6$  células) (Figuras 3K-L).

30 Se encontró que el NGF era negativo cuando se probó en sobrenadantes de 7 donantes diferentes de MSC propagadas en PM y en 6 sobrenadantes diferentes de células secretoras de NTF, usando el kit ELISA para bNGF humano (DuoSet R&D, límite de detección - 2 pg/ml, lineal entre 4 y 250 pg/ml).

35 Los medios acondicionados de NTF-SC humanas protegen la línea celular de neuroblastoma contra la toxicidad de 6-OHDA:

El efecto protector de las MSC inducidas *in vitro* se examinó utilizando una línea celular de neuroblastoma, SH-SY5Y, expuesta a dosis crecientes de 6-OHDA (32-160  $\mu$ M). Para el ensayo de neuroprotección, se indujeron MSC humanas, después de lo cual se eliminó el medio de inducción. Las células inducidas se incubaron a continuación con medio libre de suero fresco durante 24 horas adicionales para permitir la secreción de NTF. Para los controles, se usaron los sobrenadantes de MSC no tratadas incubadas en medio libre de suero durante 24 h. Las células SH-SY5Y se incubaron con los sobrenadantes y una hora más tarde, se añadió neurotoxina 6-OHDA a los cultivos. La viabilidad celular se midió 24 horas después, usando MTT. Se observó una reducción constante en la viabilidad de las células SH-SY5Y incubadas con DMEM y 32, 48 y 72  $\mu$ M de 6-OHDA ( $31.7 \pm 6.9\%$ ,  $10.1 \pm 0.2\%$  y  $12.3 \pm 0.4\%$ , respectivamente, Figura 4). Por el contrario, las células SH-SY5Y que se incubaron con sobrenadantes, recolectadas de medios para MSC o NTF-SC no tratadas, demostraron un porcentaje de viabilidad estadísticamente más elevado en presencia de 32, 48 y 72  $\mu$ M de 6-OHDA. El medio NTF-SC demostró un valor protector adicional sobre la supervivencia de las células SH-SY5Y, aunque no se demostró una diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento con medio inducido NTF-SC y el tratamiento con medio MSC no tratado ( $90.2 \pm 7.4\%$ ,  $73.2 \pm 9.6\%$  y  $55.4 \pm 15.9\%$ , respectivamente para el grupo MSC,  $p < 0.05$  y  $92.4 \pm 5.0\%$ ,  $93.4 \pm 12.9\%$  y  $80.3 \pm 12\%$  para el grupo NTF-SC,  $p < 0.005$ , Figura 4). A 160  $\mu$ M 6-OHDA, la viabilidad celular disminuyó a  $15.0 \pm 0.6\%$  en el grupo control y de manera similar en el grupo MSC ( $11.7 \pm 0.2\%$ ), mientras que el medio NTF-SC se mantuvo ligeramente beneficioso ( $17.9 \pm 0.6\%$ ,  $P < 0.05$  comparado con ambos grupos).

55 Ejemplo 2

Estudios *in vivo* con los NTF-SC de la presente invención

60 Materiales y métodos

6-OHDA indujo lesión estriatal

Se usaron en este experimento un total de 63 ratas macho Sprague-Dawley que pesaban 260-300 gr (Harlan, Jerusalem, Israel). Se colocaron en condiciones de 12 horas luz/12 horas de oscuridad y se cultivaron en jaulas ventiladas individuales (IVC) con acceso ad libitum a alimentos y agua.

Se inyectaron 7 µg/2.5 µl/sitio de 6-hidroxi dopamina (6-OHDA, Sigma-Aldrich) en dos sitios (total de 14 µg de 6-OHDA) en el cuerpo estriado derecho de acuerdo con el atlas de cerebro de rata (43) en 56 animales. Bajo anestesia con hidrato de cloral, las ratas se colocaron en un marco estereotáxico digital (Stoelting, Wood Dale, IL, Estados Unidos) y se inyectó 6-OHDA en las siguientes coordenadas (relativas al bregma y la duramadre): AP +0.5 ML 2.5 DV -6.0 & AP -0.5 ML 4.2 DV -6.0 a una velocidad de 1 µl/minuto usando una jeringa Hamilton 701N. La aguja insertada se extrajo de cada ubicación después de 5 minutos.

#### Trasplante de células madre

Se usaron MSC humanas cultivadas en condiciones sin suero durante 6 días o con inducción de NTF-SC. El día del tratamiento, las células se tripsinizaron, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se contaron. Se inyectaron dos concentraciones de células (50000 células/µl o 150000 células/µl en PBS). Se inyectó un total de 150000 o 450000 células/3µl por sitio a una tasa de 1 µl/minuto, y las células se trasplantaron en dos sitios a lo largo del mismo eje DV: AP -1.8, ML 4.6, DV -5 y -7. La viabilidad de las células se evaluó mediante azul de tripano (Sigma-Aldrich) después de cada sesión de trasplante.

#### Diseño del estudio

El experimento *in vivo* se realizó en el modelo de lesión estriatal inducida por 6-OHDA. Las células, o PBS como control, se trasplantaron el mismo día de las inyecciones de 6-OHDA, 50 minutos más tarde, posteriormente a la lesión dentro del cuerpo estriado tratado. El experimento consistió en los siguientes grupos: el grupo control se trató con 6-OHDA y con PBS en lugar de tratamiento celular (n=10); Los grupos tratados con MSC se trataron con una dosis alta (450000 células, n=10) o una dosis baja (150000 células, n=11) de MSC tratadas con medio sin suero; El grupo NTF-SC se trató con una dosis alta (450000 células, n=10) o una dosis baja (150.000 células, n=11) de NTF-SC inducidas. Otro grupo de animales no tratados (n=7) se usaron como controles para la prueba de campo abierto.

Para propósitos de seguimiento celular, se analizaron tres puntos de tiempo diferentes mediante el uso de un estudio basado en histología o MRI *in vivo*. En el primer punto temporal, 7 días después del tratamiento celular, se sacrificaron 4 animales que fueron tratados con dosis altas de NTF-SC para evaluación histológica solamente. Para el segundo punto de tiempo, el día 35, se realizó un estudio de resonancia magnética *in vivo* en animales seleccionados. Estos animales (n=3 del grupo de control y n=3 del grupo tratado con dosis bajas de NTF-SC) fueron tratados con células que fueron premarcadas con partículas de óxido de hierro superparamagnéticas (SPIOs, 5µg/ml, Feridex, Advanced Magnetic, Cambridge, MA, Estados Unidos). Las SPIO se incubaron con poli-L-lisina (medio 1 µg/ml, 70-150 KD, Sigma-Aldrich) durante una hora antes de añadirse al medio el último día del tratamiento con medio de la etapa 1. Los cultivos se lavaron con medio de inducción de la etapa 2 después de 24 horas. El grupo control se trató con 1 µg de SPIO en 6 µl de PBS (el mismo volumen de la suspensión celular). El último punto de tiempo para el seguimiento celular fue al final del experimento, a los 50 días después del día de tratamiento.

Se indujo la inmunosupresión mediante la administración subcutánea diaria de 15 mg/kg de ciclosporina A (Novartis, Basilea, Suiza), comenzando un día antes del tratamiento celular y continuó durante todo el experimento. Los animales recibieron tratamiento antibiótico profiláctico con enrofloxacin (50 mg/kg, Bayer, Alemania) durante cinco días desde el primer día del experimento.

#### Pruebas de comportamiento

Se midió el comportamiento rotacional inducido por D-Anfetamina durante 90 minutos después de i.p. administración i.p. de 2.5 mg/Kg (Sigma-Aldrich) usando un dispositivo automatizado de rotámetro (San Diego Instruments, San Diego, CA, Estados Unidos). Las rotaciones ipsilaterales netas se midieron a los 14, 28 y 42 días después del trasplante celular.

Se llevó a cabo la prueba de campo abierto a los 7 días después del tratamiento introduciendo los animales en una arena de 50 cm<sup>2</sup> y filmando el comportamiento espontáneo de las ratas durante 30 minutos. Las imágenes fueron analizadas por el software EthoVision 3 (Noldus, Países Bajos).

#### MRI

La anestesia se indujo con 4% de isoflurano en 95% de O<sub>2</sub>, y se mantuvo con ~1-2% de isoflurano (Vetmarket Ltd., Petah-Tikva, Israel) a una tasa de flujo de ~1 litro/minuto. La frecuencia respiratoria se controló a lo largo de todos los experimentos. La temperatura corporal se mantuvo haciendo circular agua a 37°C. Las imágenes por resonancia magnética se realizaron en un Bruker Biospec de 7.0 T/30 cm equipado con un sistema de gradiente capaz de producir pulsos de gradiente de hasta 400 mT/m (Bruker Biospin, Karlsruhe, Alemania). Se utilizó una bobina de cuerpo como bobina de transmisión, y se utilizó una bobina de cuadratura para ratas como la bobina receptora. Los experimentos de MRI se realizaron en el día 35 después del trasplante y la inyección de 6-OHDA. Escaneos incluidos: imágenes ponderadas T<sub>2</sub> (WI) RARE8 (TR/TE = 3500/75 ms). El campo de visión (FOV) fue de 2.56x2.56, el tamaño de la matriz fue de 256x128 cero lleno a 256x256, y se eligió un grosor de corte de 700 µm, recolectándose 15 cortes. Además, se recolectaron imágenes tridimensionales (3D) de eco de gradiente (GE)

(FLASH, TR/TE = 150/14 ms, ángulo de inversión = 15°) con un FOV de 2.56x2.56x0.48 y un tamaño de matriz de 128x96x24 (cero lleno a 128x128x32), lo que da como resultado una resolución espacial de 200x200x150 ( $\mu\text{m}$ )<sup>3</sup>. Las imágenes se presentan como datos brutos sin ningún procesamiento de imagen.

## 5 Inmunohistoquímica

Al final del experimento (7 o 50 días después del tratamiento) los animales se perfundieron transcárdicamente con PBS enfriado con hielo siguiendo a continuación una solución de paraformaldehído al 4% y sacarosa al 4% en regulador de fosfato (PB) según un protocolo conocido (NeuroScience Labs, NSA, Knoxville, TN). Los cerebros se sumergieron en la solución de perfusión durante 24 horas a 4°C después de la crioprotección en sacarosa al 30% durante 48 horas adicionales antes de la congelación. Se procesaron 12 muestras por NSA (4 del grupo PBS, 4 del grupo alto de MSC, 4 del grupo alto de NTF-SC y 4 animales tratados con dosis altas de células NTF-SC que se sacrificaron después de una semana). Estas muestras se seccionaron en serie en secciones en corona de 40  $\mu\text{m}$  y cada 8ª sección a lo largo del cuerpo estriado se tiñó para detectar el antígeno de los núcleos humanos y la sección adyacente para la tirosina hidroxilasa (TH).

Los cerebros de los animales tratados con células marcadas con SPIO se seccionaron axialmente (8  $\mu\text{m}$ ) y se tiñeron con tinción de azul de Prusia (Sigma-Aldrich, de acuerdo con las instrucciones del fabricante) para la detección de partículas de Fe. Las secciones adyacentes se inmunotiñeron con anticuerpo nuclear antihumano. En resumen, las secciones llevadas a ebullición en microondas en un regulador de citrato para desenmascarar el antígeno, y luego se sumergieron en una solución de bloqueo y permeabilidad (10% de suero de ternera fetal, 2% de albúmina de suero bovino, 1% de glicina y 0.05% de Triton). Después del bloqueo, las muestras se incubaron durante la noche con anticuerpo nuclear antihumano (1:200) a 4°C. Las secciones se tiñeron con IgG anti-ratón conjugada con Alexa Fluor 568 (Invitrogen, 1:500). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (1:500, Sigma-Aldrich). La tinción con CD68 (1:500, Serotec, Oxford, Reino Unido) se realizó de manera similar excepto el proceso de desenmascaramiento del antígeno y el uso de IgG anti-ratón biotinilada (lista para usar, Zymed-Invitrogen) seguida de estreptavidina Alexa Fluor 568 (1:500, Invitrogen).

## 30 Estudio estereológico

Todas las secciones teñidas para TH (n=4 animales de cada grupo) se cuantificaron en cuanto al área con una tinción positiva en el cuerpo estriado. Utilizando una cámara Olympus DP71 (Japón) con un aumento de X40, se fotografiaron 2-3 imágenes para cubrir la totalidad o casi todo el cuerpo estriado de cada lado y cada animal. Las imágenes fueron luego cuantificadas por el software ImagePro 5.1 que midió el área total de tinción positiva, de acuerdo con un punto de corte unificado. El operador del software desconocía el origen de las imágenes. El daño se calculó como el porcentaje del área TH positiva en el cuerpo estriado lesionado dividido por el área TH positiva del lado contralateral no tratado.

## 40 Mediciones de dopamina por HPLC

Los animales (n=5 de cada uno de los siguientes grupos: PBS, dosis altas de MSC y altas dosis de NTF-SC) se sacrificaron con CO<sub>2</sub> y sus cerebros se extrajeron rápidamente y se colocaron en hielo. Los estriatos se disecaron y se pesaron. Cada muestra se sometió a sonicación en 1 ml de ácido perclórico 0.1 M enfriado con hielo hasta que se logró la homogeneidad. Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos (12.000 rpm, 4°C) y los sobrenadantes se recogieron y transfirieron a tubos de filtro de nylon de 0.2  $\mu\text{m}$  (Corning). Las muestras se centrifugaron de nuevo (6.000 rpm, 5 minutos, 4°C) y los filtrados se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Se inyectó una alícuota del filtrado en el sistema de HPLC (Waters, Milford, MA, Estados Unidos) equipado con una columna LUNA de 3  $\mu\text{m}$  de fase reversa C18 (100 mm x 2 mm, Phenomenex, Torrance, CA, Estados Unidos). La muestra se eluyó mediante una fase móvil hecha de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, citrato de Na 50 mM, EDTA 0.03 mM, dietilamina HCl 10 mM y octil sulfato de sodio 2.2 (pH 3.2), 30 ml/L de metanol y 22 ml/L de dimetilacetamida a una rata de flujo de 0.4 ml/min. El pico de dopamina se determinó por detección electroquímica a un potencial de 0.6 V. El contenido de dopamina en la muestra se calculó extrapolando el área del pico a partir de una curva estándar (rango 1-200 pg de dopamina) construida en las mismas condiciones durante cada paso por la Maxima Workstation (Waters). Los resultados fueron normalizados al peso de la muestra.

## 55 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como medias  $\pm$  error estándar. La prueba t de Student se usó para comparar medias de dos grupos. Las comparaciones entre varios grupos se realizaron mediante ANOVA con el análisis post-hoc de Scheffe. Las pruebas repetidas (rotaciones inducidas por anfetamina) también se analizaron mediante una prueba ANOVA repetida. Los cálculos estadísticos se realizaron usando SPSS v. 13.

## Resultados

65 El NTF-SC humano trasplantado atenúa el comportamiento rotacional inducido por 6-OHDA en ratas

En general, los animales tratados de todos los grupos toleraron bien las diversas terapias, incluida la inmunosupresión. De 56 animales, 2 murieron en el seguimiento experimental, uno de peritonitis y el otro de causa desconocida. Los animales no aumentaron de peso durante 14 días después del tratamiento, independientemente del grupo analizado (con exclusión de los controles sanos para la prueba de campo abierto), y desde ese momento, casi todos los animales ganaron peso de manera similar.

El grupo de control (PBS) demostró un aumento estadísticamente significativo de las rotaciones ipsilaterales inducidas por anfetamina en el día 14 post-lesión ( $2.71 \pm 0.79$  rotaciones ipsilaterales netas por minuto) y el día 28 ( $4.11 \pm 0.86$ ), alcanzando una meseta en la medición del día 42 ( $4.74 \pm 1.07$ ) sugiriendo que el proceso patológico de muerte de las terminaciones nerviosas dopaminérgicas nigroestriatales era de naturaleza progresiva durante al menos 28 días.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes dosis de células, independientemente del tipo de tratamiento y el día de la medición. En el grupo de dosis baja de MSC no tratado se encontró que los animales rotaban a una tasa de  $3.54 \pm 0.63$ ,  $2.61 \pm 0.55$  y  $3.25 \pm 0.75$  vueltas ipsilaterales netas por minuto los días 14, 28 y 42 después del tratamiento respectivamente, mientras que la dosis alta de MSC el grupo tratado mostró medidas más bajas, pero no estadísticamente significativas:  $2.05 \pm 0.41$ ,  $2.22 \pm 0.52$  y  $2.30 \pm 0.78$  en los mismos intervalos de tiempo. El grupo tratado con NTF-SC había mostrado el mismo rasgo entre las dosis:  $1.19 \pm 0.6$ ,  $1.29 \pm 0.44$  y  $2.07 \pm 0.81$  en el grupo tratado con dosis baja en comparación con  $2.12 \pm 0.42$ ,  $1.49 \pm 0.32$  y  $1.67 \pm 0.52$  en grupo tratado con la dosis alta. Por lo tanto, los grupos de dosis alta y baja se combinaron para otro análisis estadístico. Se encontró que ambos tipos de tratamiento celular producían un efecto no progresivo en el comportamiento rotacional. El grupo NTF-SC demostró un resultado más bajo en la primera medición catorce días después del tratamiento, aunque no fue estadísticamente significativo diferente de los otros grupos. Tuvo un resultado mejor estadísticamente significativo que el grupo de control en las dos mediciones posteriores ( $2.45 \pm 0.54$  y  $2.86 \pm 0.54$  para el grupo tratado con MSC combinado los días 28 y 42 después del tratamiento, respectivamente, en comparación con  $1.46 \pm 0.37$  y  $2.16 \pm 0.37$  para el grupo tratado con NTF-SC combinado en los mismos intervalos de tiempo,  $p < 0.05$  en comparación con el grupo de PBS). En resumen, el grupo tratado con MSC no demostró una mejora estadísticamente significativa en comparación con el grupo de control (PBS). Por el contrario, para las células sometidas al nuevo tratamiento basado en la inducción, los grupos NTF-SC, se observó una marcada disminución del 25% y del 45% después de 14 y 28 días después del trasplante (Figura 5A).

Todos los animales tratados con 6-OHDA demostraron hipoactividad motora general en la prueba de campo abierto en el séptimo día después del tratamiento. Los índices de actividad del grupo de control fueron similares a los del grupo tratado con MSC. La distancia total recorrida por los animales tratados NTF-SC combinados en dosis bajas y altas fue de 3667 cm en promedio, lo que fue 22% mayor en comparación con el grupo control (2989 cm) y 17% mayor que el grupo combinado de dosis baja y alta MSC (3119 cm) de media. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p = 0.054$ ) (Figura 5B).

El trasplante de NTF-SC humano resultó en una mayor preservación del área TH-positiva en el cuerpo estriado lesionado por 6-OHDA

La metodología del estudio estereológico se ilustra en las Figuras 6A-E. Se encontró que las lesiones inducidas por 6-OHDA con este protocolo específico disminuyeron el área de TH-estriatal en más de 5 veces en comparación con el hemisferio de control ( $15.26 \pm 2.95\%$  del cuerpo estriado contralateral). Ambos tipos de tratamiento celular, MSC y NTF-SC, demostraron un efecto protector. Sin embargo, solo las NTF-SC arrojaron un área TH positiva más alta estadísticamente significativa como porcentaje del lado no tratado ( $31.15 \pm 6.27\%$ ), incrementándola más de dos veces en comparación con el grupo de control, mientras que el tratamiento con MSC no indujo una diferencia estadísticamente significativa ( $23.11 \pm 3.5\%$ , Figuras 7A-D).

De manera interesante, cuando se subdividieron las diferentes áreas del cuerpo estriado en secciones de aproximadamente 1 mm de grosor, se descubrió que las NTF-SC eran beneficiosas en el área anterior, en lugar del área posterior del cuerpo estriado, la región del trasplante (figura 7E).

El trasplante celular inhibió la caída de dopamina inducida por 6-OHDA en los estriatos lesionados

Se descubrió que ambos tipos de tratamientos celulares, es decir, MSC y NTF-SC, evitaban las caídas de los niveles de dopamina estriatal inducidos por la inyección de neurotoxina en más de 2.5 veces en comparación con el grupo control (medición por HPLC de los niveles de dopamina en todo el cuerpo estriado lesionado, se definió como un porcentaje del lado no tratado). Mientras que el grupo de control ( $n=5$ ) de estriatos lesionados contenía solo  $21.3 \pm 3.8\%$  de dopamina medido en comparación con el lado no tratado, los animales tratados con MSC ( $n=5$ ) tenían un promedio de  $68.7 \pm 8.6\%$  y el grupo tratado con NTF-SC ( $n=5$ ) tenían  $72.4 \pm 16.4\%$  niveles de dopamina estriatal en comparación con el cuerpo estriado contralateral intacto. Solo las mediciones del grupo tratado con NTF-SC alcanzaron una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo de control ( $p < 0.05$ ).

Seguimiento de células trasplantadas por histología y MRI *in vivo*

El rastreo de células se realizó en tres puntos de tiempo diferentes, aplicando MRI *in vivo* y tres evaluaciones histológicas diferentes. La MRI *in vivo* se realizó en animales seleccionados tratados con células marcadas con partículas de hierro (o SPIO solo como controles, n=3 cada uno) el día 35 después del tratamiento. Las imágenes ponderadas 3D T<sub>2</sub>\* demostraron dos regiones hipointensas distintas para el grupo tratado con PBS: el sitio de inyección de PBS/SPIO y los sitios de inyección de 6-OHDA (Figura 8A). Este último probablemente resultó de una hemorragia en el sitio de la inyección de 6-OHDA. No se pudieron ver otras hipointensidades en el área entre las dos inyecciones. Por el contrario, las imágenes ponderadas 3D T<sub>2</sub>\* del grupo tratado con células demostraron una ruta de migración desde el sitio de inyección de NTF-SC al cuerpo estriado (Figura 8B-C). La imagen 2D ponderada en T<sub>2</sub> se muestra en la Figura 8G para referencia anatómica. La tinción histológica con azul de Prusia para las partículas de hierro estuvo en excelente concordancia con las hipointensidades en las imágenes de RM (Figura 8D).

Estudios histológicos adicionales se dirigieron a la búsqueda de antígeno nuclear humano. Cuatro animales seleccionados aleatoriamente tratados con la dosis más alta de NTF-SC humanas se sacrificaron para estudios histológicos en el primer momento, es decir, 7 días después de que se trataron con 6-OHDA. Los cerebros de los animales se seccionaron en serie como se describe. Usando los métodos NSA, se observó un gran grupo de células alrededor del sitio de inyección en cada uno de estos animales. En tres de las cuatro muestras, se encontraron células a lo largo de 620-1920 μm del sitio del trasplante en secciones adyacentes, lo que indica el comienzo de la migración celular. Para cuantificar la tasa de supervivencia de las células, todas las células con morfología normal se contaron manualmente (es decir, aquellas que tenían un aspecto liso y no comprendían núcleos codificados con un colorante positivo). Esta medición reveló que solo 0.34±0.1% de las células sobrevivieron una semana después del trasplante.

En el último día del experimento, es decir, 50 días después del tratamiento, se usaron métodos de NSA en 4 animales seleccionados al azar del grupo de control PBS, el grupo tratado con MSC altas y el grupo tratado con NTF-SC. Este examen no reveló casi ninguna célula. De hecho, alrededor del sitio de trasplante, solo se encontraron restos de células y signos de sangrado anterior. Después de seccionar otros cerebros en secciones de 8 μm y usar una tinción fluorescente más sensible, se observó una pequeña minoría de las células humanas trasplantadas después de 50 días. La tinción se realizó en secciones axiales adyacentes a aquellas en las que se encontró un colorante azul de Prusia positivo, y se demostraron todas las células positivas para el antígeno nuclear humano a lo largo de la ruta de migración. Sin embargo, usando el método de fluorescencia, los presentes inventores no pudieron encontrar células a lo largo de toda la ruta de migración indicada por la tinción de azul de Prusia, indicando que los depósitos de hierro no indicaban necesariamente células vivas el último día del experimento (Figuras 8E-G). La tinción con CD68 para la identificación de macrófagos en la ruta de las células fue negativa (datos no mostrados). En resumen, la migración de células humanas dentro del cuerpo estriado de rata lesionado se observó mediante MRI *in vivo* y mediante análisis histológico; se encontró que una pequeña minoría de las células sobrevivió durante al menos 50 días.

## Conclusiones

En este informe, se describe un protocolo de inducción robusto de MSC derivadas de médula ósea humana adulta en NTF-SC. Tales células producen y liberan varios NTF, incluidos BDNF y GDNF. Estas células acondicionadas rescataron células de neuroblastoma tratadas con 6-OHDA. En ratas ciclosporinizadas con lesiones estriatales unilaterales 6-OHDA, el trasplante ipsilateral de NTF-SC humanas fue beneficioso y parcialmente atenuó rotaciones inducidas por anfetamina y otros comportamientos anormales, reducción de los niveles de dopamina estriatal, así como la pérdida de la red terminal nerviosa TH-inmunoactiva. También se encontró que las NTF-SC migraron a lo largo del cuerpo calloso alrededor de la lesión estriatal 6-OHDA hacia el cuerpo estriado anterior, en lugar de migrar directamente al área de la lesión.

Se descubrió que las NTF-SC secretan niveles significativamente más altos de NTF en comparación con las MSC no tratadas. Este protocolo aumentó los niveles de BDNF y GDNF 2.3 y 5.8 veces, respectivamente, en comparación con el control de MSC humana. Los estudios inmunocitoquímicos revelaron que el proceso de inducción es robusto, ya que casi todas las células son positivas para el NTF probado.

La administración celular de NTF puede ser potencialmente superior a la infusión directa de NTF ya que no requiere instrumentos de trasplante como catéteres permanentes, en lugar de un solo procedimiento quirúrgico. La inducción de base media actualmente propuesta también puede ser superior a la administración de vectores virales para lograr la sobreexpresión genética, ya que elude los problemas de seguridad. Además, los presentes inventores usaron medios no xeno, tanto para la producción del cultivo de MSC como para su procedimiento de inducción hasta el trasplante, lo que hace que el presente método sea más práctico y aceptable para uso clínico. El medio de crecimiento basado en plaquetas no alteró las características mesenquimatosas básicas de las MSC en términos de marcadores de CD y diferenciación de linaje mesenquimal.

Las células de neuroblastoma humano expuestas a 6-OHDA se usan como un modelo *in vitro* para PD, debido a procesos celulares similares que se producen en las neuronas dopaminérgicas degenerativas, tales como el estrés

oxidativo y la apoptosis. Los medios condicionados de MSC y NTF-SC protegieron la línea celular de neuroblastoma de una muerte celular inducida por 6-OHDA. Aunque tanto MSC como NTF-SC demostraron efectos beneficiosos, el tratamiento basado en NTF-SC fue más potente en la protección ante la 6-OHDA, específicamente en concentraciones de agresiones más altas. El medio acondicionado usado en este experimento consistió en un medio libre de suero colocado sobre las células 24 horas después de la inducción. Por lo tanto, consistía únicamente en los factores secretados por las células y no en los medios de inducción. Esto implica fuertemente que el mecanismo subyacente a la protección observada es la presencia de NTF secretado.

Con el fin de realizar pruebas *in vivo* para la suposición de que el tratamiento basado en NTF-SC es beneficioso en un modelo animal PD, los presentes inventores calibraron primero el modelo bien establecido de rata hemiparkinsoniana inducida por 6-OHDA inyectando la dosis específica de 6-OHDA en dos ubicaciones estriatales. A diferencia de las inyecciones en el haz prosencefálico medio, los presentes inventores usaron un modelo relativamente ligero y progresivo de DP, que probablemente representa una fase temprana de PD en sujetos humanos. El tratamiento de trasplante celular se administró el día de la inyección de 6-OHDA, por lo tanto, apuntando a la neuroprotección, en lugar de a la regeneración de los terminales dopaminérgicos ya perdidos. Los animales fueron examinados por dos pruebas de comportamiento bien documentadas: rotaciones inducidas por anfetaminas y actividad motora espontánea en un campo abierto.

El efecto del tratamiento con NTF-SC en términos de rotaciones inducidas por anfetamina fue comparable al encontrado por algunas investigaciones que utilizaron células productoras de dopamina en el mismo modelo animal. El presente hallazgo de que el trasplante de NTF-SC reduce las rotaciones inducidas por anfetamina en un 40% en comparación con el grupo control indica que la presente estrategia terapéutica, de emplear células madre como inductores de neuroprotección, es eficiente y comparable a las estrategias de reemplazo celular dopaminérgico. El grupo tratado con NTF-SC también demostró una tendencia positiva en la prueba de campo abierto, mientras que las MSC no alteraron el comportamiento hipoactivo en comparación con el grupo tratado con PBS.

Después de la lesión de 6-OHDA, el área de fibra inmunorreactiva de TH estriatal del grupo tratado con MSC era más grande que en los animales tratados con PBS. Sin embargo, solo el grupo tratado con NTF-SC demostró una destrucción menor estadísticamente significativa de los terminales del nervio DA confirmada por un área TH-positiva marcadamente mayor en comparación con el grupo tratado con PBS. Como se indicó, solo la parte más anterior del cuerpo estriado se benefició del tratamiento con NTF-SC, a una distancia del sitio del trasplante. Es interesante notar que, en esa área del cuerpo estriado, el daño no fue tan severo como en la sección posterior. Por lo tanto, las NTF-SC pueden resultar más beneficiosas en un tejido lesionado moderadamente, pero no en un estado de pérdida completa o casi completa de los terminales nerviosos dopaminérgicos. La ruta migratoria de las células trasplantadas se observó a través del cuerpo calloso a las partes anteriores del cuerpo estriado y no directamente desde el sitio de trasplante a la lesión. Esto podría ser una indicación de que las células supervivientes afectaron al cuerpo estriado anterior, en lugar del posterior.

Aunque las MSC rescataron parcialmente los niveles de dopamina, solo el grupo tratado con NTF-SC demostró una reducción menor estadísticamente significativa de los niveles de dopamina estriatal, lo que hace que este tratamiento sea superior a la terapia convencional no inducida basada en MSC.

Una cuestión importante en la investigación con células madre es la supervivencia de las células trasplantadas *in vivo*. En este trabajo, los presentes inventores emplearon diferentes métodos en varios puntos de tiempo para abordar este tema. Usando la MRI *in vivo*, los presentes inventores pudieron demostrar la capacidad de migración de otras células, que estaba altamente correlacionada con la tinción histológica con Fe. Se observó una ruta migratoria que circunvalaba el sitio de la lesión a lo largo del cuerpo calloso y conducía al cuerpo estriado anterior. Tal migración celular demuestra dos puntos principales: en primer lugar, que las células migradas sobrevivieron en el SNC; y en segundo lugar, que las células se movieron hacia una señal específica que viaja a lo largo de una ruta específica.

En un intento de cuantificar el número de células supervivientes, se usó un método estereológico a los 7 y 50 días después del tratamiento. Al aplicar este método relativamente insensible pero reproducible, se descubrió que la gran mayoría de las células trasplantadas se rechazaron una semana después del trasplante, y que no se encontraron células en el cuerpo estriado tratado después de 50 días, aunque se administró terapia inmunosupresora. Esta baja tasa de supervivencia probablemente se deba al rechazo inmunológico y, en cierta medida, a la muerte celular inmediata debido a las fuerzas de cizallamiento cuando se pasa a través de una jeringa delgada al tejido. Cuando se utilizó un método más sensible, con una relación señal/ruido más alta, se destacaron las células supervivientes, ya que el tejido se cortó en secciones delgadas de 8  $\mu\text{m}$  y se utilizó un colorante fluorescente. Además, la supervivencia de las células en la ubicación específica en donde se encontraron fue respaldada por su alta correlación con las imágenes de RM y la tinción con azul de Prusia para las partículas de hierro en las muestras específicas en las que se utilizaron células marcadas con SPIO. La ausencia de macrófagos (células que expresan CD68) a lo largo de la ruta de migración es una evidencia adicional de la supervivencia de las células trasplantadas migratorias. Por lo tanto, se da a entender que, aunque solo una minoría de las células sobrevivió durante todo el experimento, fueron suficientes para inducir el efecto beneficioso descrito en el cuerpo estriado lesionado. Otra

posibilidad fuerte es que las células trasplantadas ejercieron su eficacia beneficiosa completa poco después de su colocación en el cuerpo estriado y que ya no hubo necesidad de su presencia completa más adelante.

Ejemplo 3

Células madre mesenquimales humanas diferenciadas en células que secretan factores neurotróficos realizan la captación de glutamato

El presente estudio se realizó con el fin de determinar si la inducción hMSC adultas en NTF-SC aumenta su capacidad para llevar a cabo la captación de glutamato y además para determinar si esta captación se redujo significativamente por los inhibidores de captación de glutamato.

Materiales y métodos

Diferenciación *in vitro*: las MSC de donantes se cultivaron y se diferenciaron como se detalla en el Ejemplo 1 anterior.

Captación de glutamato: se evaluó la captación de glutamato usando [<sup>3</sup>H] D-aspartato (Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, Holanda), un análogo transportable de L-glutamato, que no interacciona con los receptores de glutamato y no se metaboliza. Las MSC diferenciadas y no diferenciadas se sembraron en placas de 24 pozos revestidas con poli-L-lisina, a una concentración de 2.5X10<sup>4</sup> células por pozo. Las células en placa se mantuvieron en medio libre de suero (DMEM suplementado con SPN y L-Glutamina como se especifica para las plaquetas en el medio anterior) durante 24 horas. Las células se enjuagaron dos veces con 0.5 ml de regulador de Krebs (HEPES 25 mM pH 7.4, KCl 4.8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.3 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, glucosa 6 mM y NaCl 140 mM) precalentado a 37°C. Las células se incubaron en 0.5 ml de regulador de Krebs precalentado y [<sup>3</sup>H] D-aspartato a una concentración final de 50 nM. La captación se detuvo después de 20 minutos mediante tres enjuagues con regulador de Krebs frío libre de Na<sup>+</sup> (HEPES 25 mM, pH 7.4, KCl 4.8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.3 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, glucosa 6 mM y cloruro de colina 120 mM, se reemplazó NaCl con cloruro de colina a la misma osmolaridad). Las células se sometieron a lisis con 0.5 ml de NaOH 1M. La radioactividad de 350 µL se determinó por recuento de centelleo en líquido. Se eliminaron 150 µL de lisado para ensayos de concentración de proteína realizados usando el ensayo de Bradford (Bio-Rad Laboratories Ltd.). Se realizaron pruebas libres de Na<sup>+</sup> en 0.5 ml de regulador de Krebs libre de Na<sup>+</sup> precalentado a 37°C. La inhibición de la captación de glutamato se realizó usando 0.314 µM de ácido L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxílico (t-PDC, Sigma-Aldrich St. Louis), se agregó después del segundo enjuague y se incubó durante 15 minutos antes de la adición de [<sup>3</sup>H] D-aspartato. La inhibición competitiva se logró usando D-metil-aspartato frío (no marcado radiactivamente) a una concentración final de 50 nM en la parte superior del [3H] D-aspartato marcado.

Resultados

El transporte funcional de glutamato en MSC y NTF-SC cultivadas se evaluó midiendo la cantidad de [<sup>3</sup>H] D-aspartato captado por las células. El [<sup>3</sup>H] D-aspartato es un análogo de glutamato transportable que no interactúa con los receptores de glutamato y no se metaboliza. Por lo tanto, este ensayo proporciona una fuerte indicación de la capacidad de las células para llevar a cabo la captación de glutamato.

Las NTF-SC realizan una captación considerable de [<sup>3</sup>H] D-aspartato como se muestra en la Figura 9. La captación de [<sup>3</sup>H] D-aspartato se incrementó significativamente cuando se indujeron MSC en NTF-SC (P<0.0001). Cuando el ensayo se realizó en un regulador libre de Na<sup>+</sup>, la captación se redujo en un 57.5%. Además, la inhibición competitiva por D-metil-aspartato redujo la captación en un 86.76%, mientras que la inhibición por t-PDC, un inhibidor no específico de la captación de glutamato redujo la captación de glutamato en más del 90%.

Estos resultados sugieren que la inducción de MSC en NTF-SC aumenta la captación de glutamato, que NTF-SC realiza una captación de glutamato significativa y que esta captación implica tanto transporte independiente como dependiente de Na<sup>+</sup>.

Conclusión

Este estudio indica la capacidad de las células madre derivadas de médula ósea para captar glutamato. Esta capacidad mejora drásticamente después de la inducción de hMSC en NTF-SC. El glutamato es extremadamente ubicuo en el SNC humano, sin embargo, la sobreexposición al glutamato es altamente tóxica. Desde hace tiempo se sabe que la neurotoxicidad del glutamato contribuye a la patogénesis de trastornos neurológicos tales como isquemia cerebral, AD, PD, HD, epilepsia y ELA.

El trasplante de células NTF-SC cercanas al punto de agresión podrían permitir la protección neuronal de la toxicidad del glutamato regulando los niveles de glutamato extracelular sin interferir con la transmisión neuronal de glutamato adecuada. Los inhibidores de la liberación de glutamato y los antagonistas de los receptores ya se están usando para tratar varias afecciones neurológicas. El riluzol, un fármaco utilizado en el tratamiento de la ELA y el

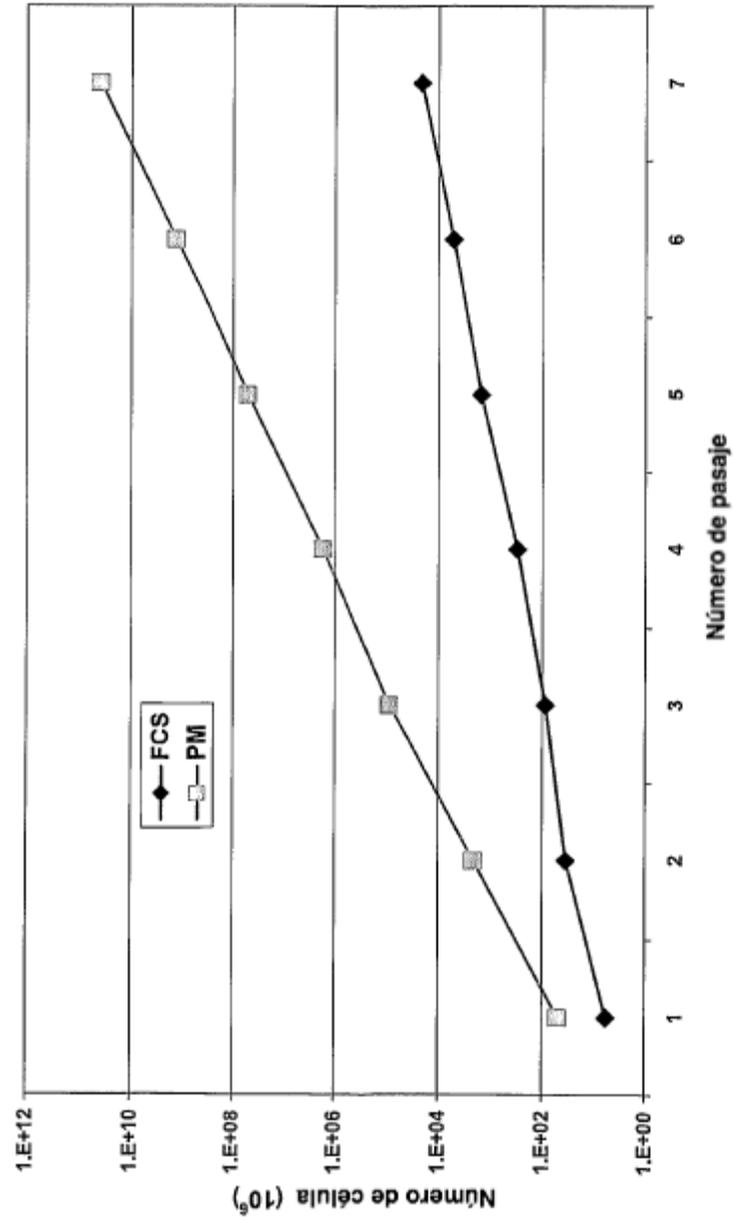
5 trastorno obsesivo compulsivo (TOC) reduce la liberación de glutamato. Los antagonistas del glutamato se están probando en accidente cerebrovascular con la esperanza de limitar el tamaño y la gravedad de la lesión isquémica y ya se emplean en varios fármacos antiepilépticos. Antagonistas específicos del receptor de glutamato se encuentran actualmente en ensayos clínicos en el tratamiento de la EA. Sin embargo, esta solución interfiere con las funciones naturales del glutamato, aumentando la verosimilitud de los efectos secundarios graves, reducidos por el uso de NTF-SC.

10 El efecto terapéutico combinado de los factores neurotróficos y la captación de glutamato proporciona las mejores posibilidades de supervivencia de las neuronas propensas a la degeneración en todos y cada uno de los diferentes trastornos neurológicos.

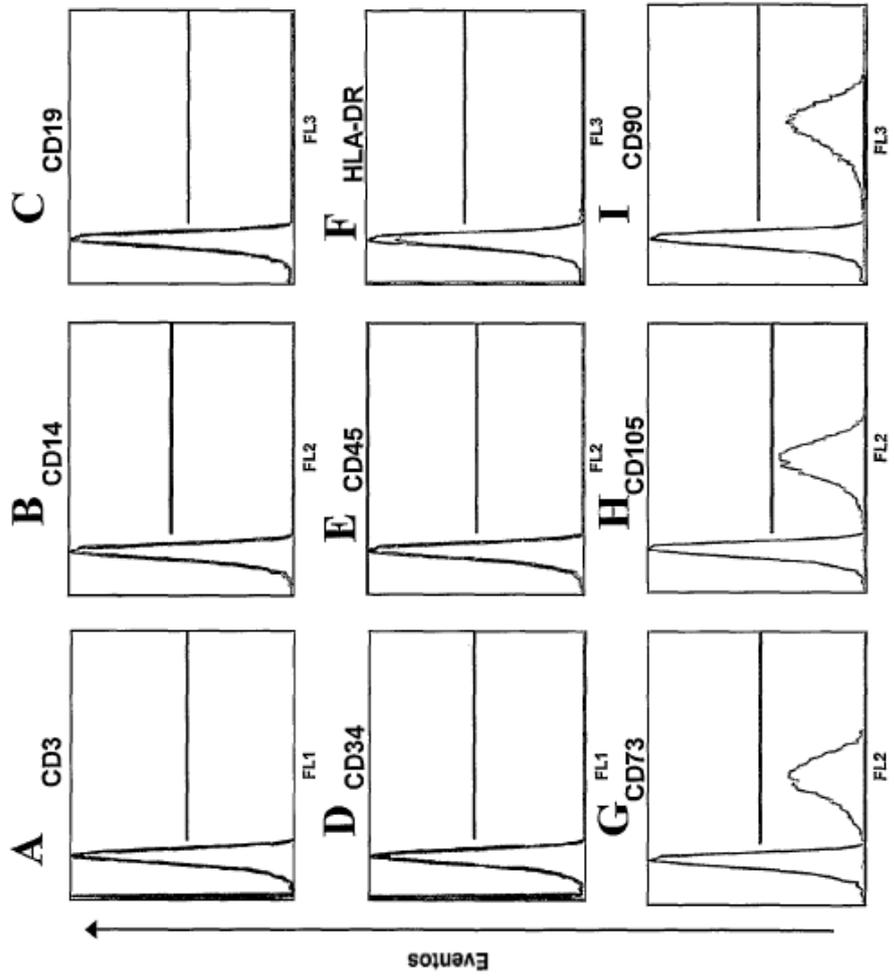
**REIVINDICACIONES**

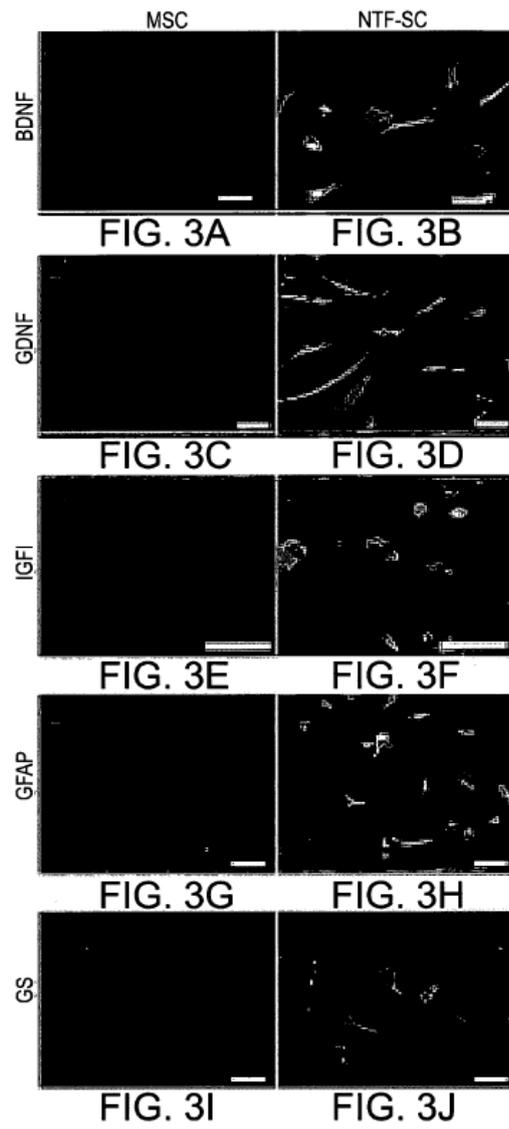
- 5 1. Una célula humana aislada para uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica, en donde la célula humana segrega factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y no secreta factor de crecimiento nervioso (NGF), en donde una secreción basal de dicho BDNF es de al menos cinco veces mayor que una secreción basal de una célula madre mesenquimal no diferenciada que expresa CD73, CD90 y CD105 y no expresa CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR, en donde dicha secreción basal de MSC no diferenciadas ocurre en ausencia de estimulantes.
- 10 2. La célula humana aislada para el uso de la reivindicación 1, que capta al menos diez veces más glutamato de su entorno que una célula derivada de médula ósea que expresa CD73, CD90 y CD105 y que no expresa CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR.
3. La célula humana aislada para el uso de la reivindicación 1, que no está genéticamente manipulada.
- 15 4. La célula humana aislada para uso de la reivindicación 1, que expresa adicionalmente al menos un marcador astrocítico.

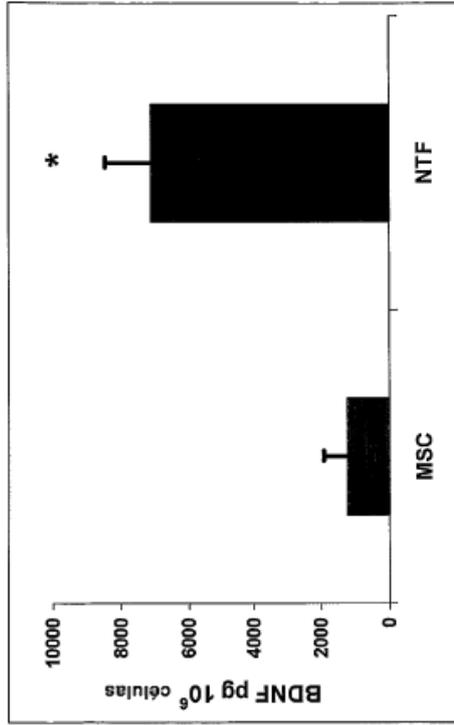
**FIG. 1**



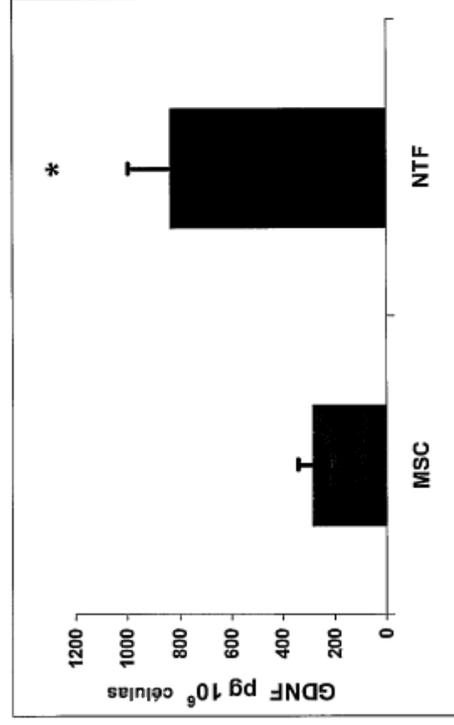
**FIGs. 2A-I**







**FIG. 3K**



**FIG. 3L**

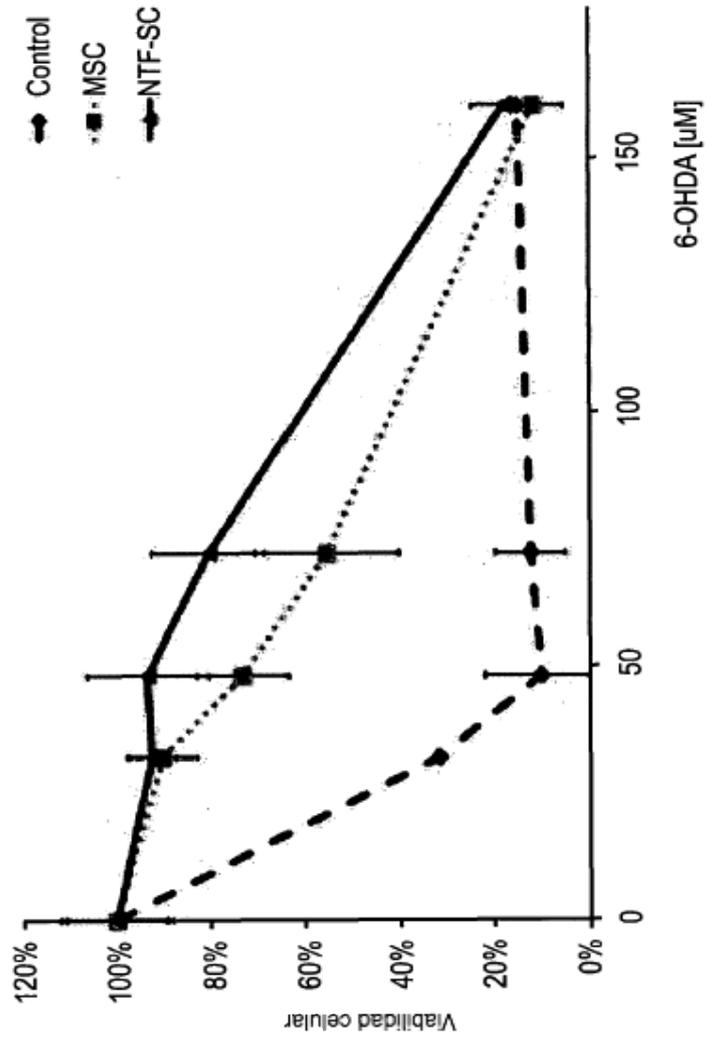
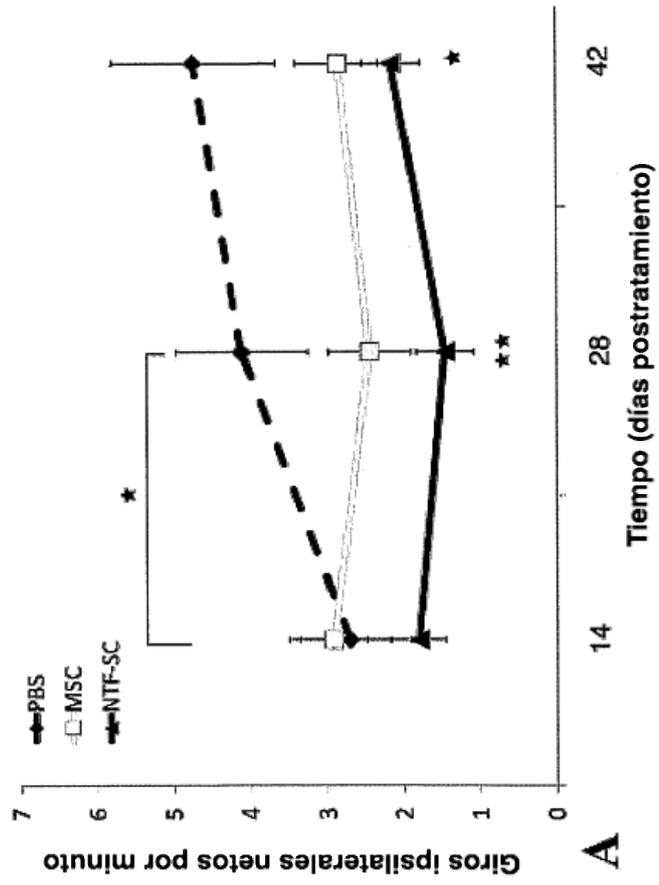
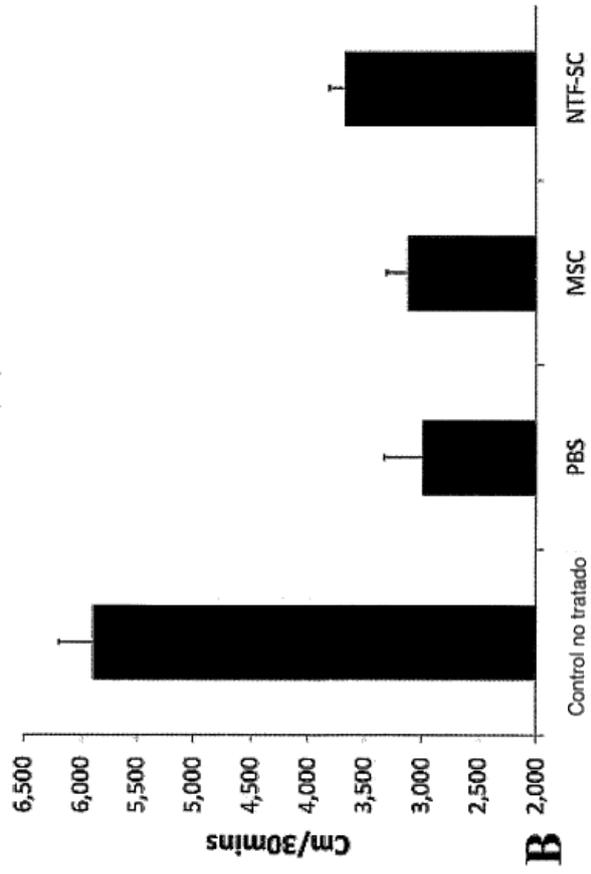


FIG. 4

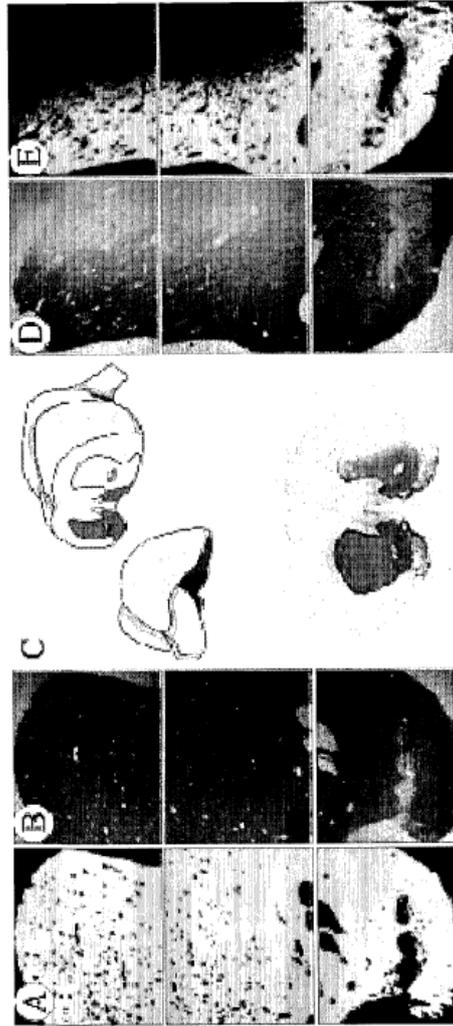
FIG. 5A

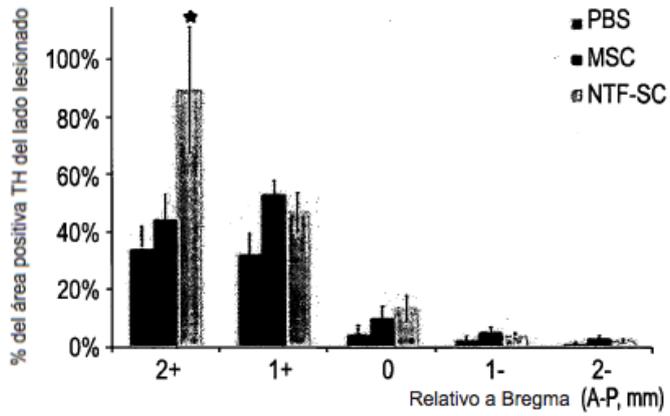
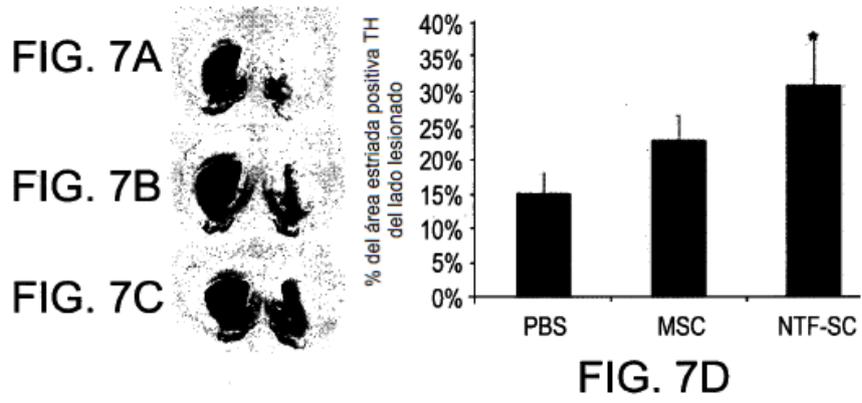


**FIG. 5B**



FIGs. 6A-E





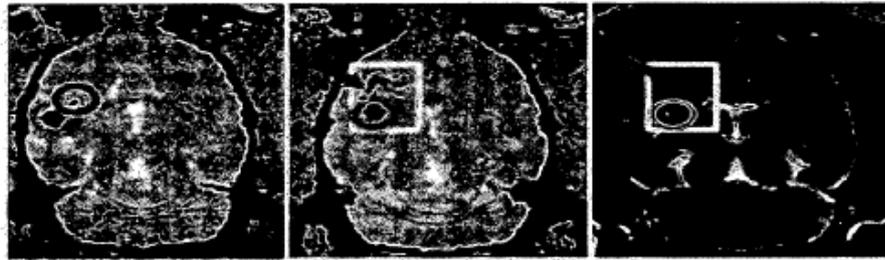


FIG. 8A

FIG. 8B

FIG. 8C

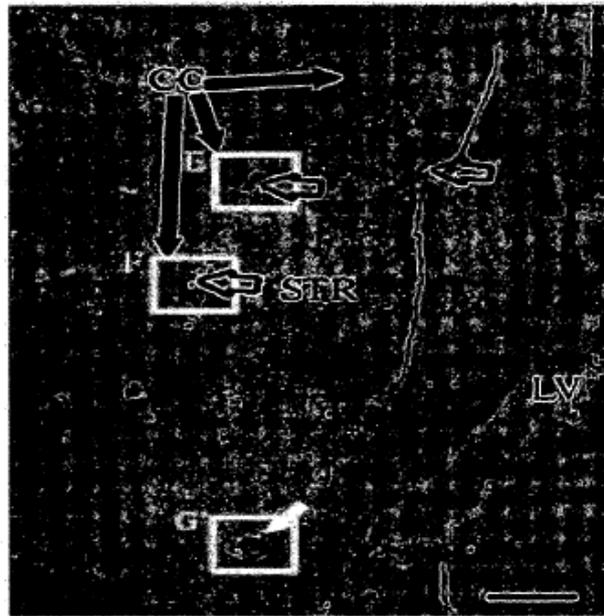


FIG. 8D



FIG. 8E



FIG. 8F



FIG. 8G

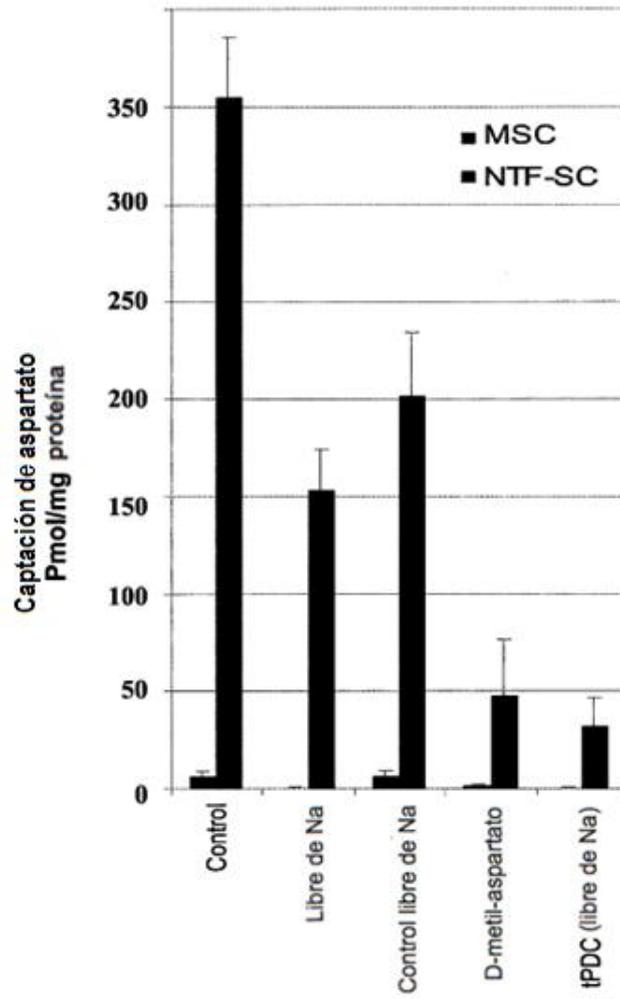


FIG. 9