

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 557**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/079** (2010.01)

**C12N 5/0775** (2010.01)

**A61K 35/28** (2015.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2009 E 13164650 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2620493**

54 Título: **Células madre mesenquimatosas 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:

**04.11.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones:**

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

ES 2 729 557 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 mesenquimatosas para el tratamiento de enfermedades del SNC

- 5 La presente divulgación se refiere a células y poblaciones de las mismas que pueden usarse para tratar enfermedades del SNC.

10 La enfermedad de Parkinson es un trastorno relacionado con la edad caracterizado por la pérdida progresiva de neuronas productoras de dopamina en la sustancia negra del mesencéfalo, que a su vez conduce a una 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 *en vivo* en un estado indiferenciado y de autorrenovarse. No están restringidas a tipos celulares específicos del tejido de origen, por lo que pueden 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 CMM sintetizadoras de dopamina humana que expresan marcadores neuronales y factores de transcripción que caracterizan la neurona DA del mesencéfalo después de la inducción de 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) y fisiología (contactos sinápticos y funcionamiento apropiados) normales del cuerpo estriado. En este caso, las células injertadas tienen que sobrevivir y poseer propiedades morfológicas electrofisiológicas y dopaminérgicas funcionales.

30 Los factores neurotróficos (NTF) son proteínas segregadas que regulan la supervivencia, el mantenimiento funcional y el desarrollo fenotípico de células neuronales. Las alteraciones en los niveles de NTF están implicadas en la activación de la muerte celular programada en neuronas y por tanto contribuyen a la patología de la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas.

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

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

45 Se ha mostrado que la administración de GDNF directamente en el cerebro es eficaz en diversos modelos animales de EP. Además, la exposición de células al GDNF antes del trasplante ha demostrado ser beneficiosa. Por ejemplo, el injerto de 400.000 neuronas dopaminérgicas fetales antes del trasplante mejoró significativamente el comportamiento de rotación de ratas lesionadas [Mehta V, *et al.*, J Neurosurg. abril de 1999; 90(4):804-6].

50 Se han utilizado diversos métodos para ayudar a la administración de GDNF en el cerebro, incluyendo bombas osmóticas, cápsulas y microesferas. Otro enfoque para el suministro de GDNF es terapia génica *in vivo*. Células mesenquimatosas de la médula ósea modificadas por ingeniería genética para expresar GDNF, trasplantadas en ratones lesionados por MPTP, fueron capaces de proteger neuronas nigricas, así como fibras estriatales [Park, K., Neurosci. Res. 40: 315-323, 2001].

55 El glutamato es el principal neurotransmisor de aminoácidos excitadores 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 una sobreestimulación de los receptores aa excitadores, un proceso que culmina en la muerte celular neuronal.

60 La regulación de los niveles de glutamato cerca y dentro de la hendidura sináptica es realizada principalmente por 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 aa excitadores de alta afinidad, que insertan Na<sup>+</sup> y H<sup>+</sup> en la célula, mientras que eliminan K<sup>+</sup> de la célula, permitiendo así la transferencia de glutamato a la célula contra su gradiente electroquímico. No obstante, también se produce la forma menos común de transporte independiente de Na<sup>+</sup>.

5 Cada vez más pruebas implican la toxicidad del glutamato en la fisiopatología de varios procesos neurodegenerativos agudos, sobre todo isquemia cerebral y traumatismos craneoencefálicos. Asimismo, parece que la toxicidad del glutamato participa en trastornos neurodegenerativos crónicos tales como la enfermedad de Huntington (EH), enfermedad de Parkinson (EP), 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 la enfermedad puede detener la progresión neurodegenerativa. Un posible enfoque para proporcionar dicha protección neuronal es mediante el trasplante de células capaces de realizar captación de glutamato adyacente a las neuronas en peligro. Puede que las células madre mesenquimatosas humanas adultas (hMSC) obtenidas de la médula ósea resulten ser una fuente viable para dichos trasplantes.

15 Varios estudios han mostrado que CMM después de 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.* Differentiation. 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 oligodendrocito.

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

### 30 Sumario de la divulgación

La presente invención se refiere a una célula humana no manipulada genéticamente, aislada que puede obtenerse mediante la diferenciación de una célula madre mesenquimatosa indiferenciada que se ha incubado en un medio que comprende lisado plaquetario, en donde la célula segrega factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y no segrega factor de crecimiento nervioso (NGF) en donde una secreción basal de dicho BDNF es al menos cinco veces mayor que una secreción basal de dicho BDNF en una célula madre mesenquimatosa indiferenciada, expresando dicha célula madre mesenquimatosa indiferenciada CD73, CD90 y CD105 y no expresando CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR, en donde dicha secreción basal de dicha CMM indiferenciada se produce en ausencia de estimulantes.

40 Preferentemente, capta al menos 10 veces más glutamato de su entorno que una célula madre mesenquimatosa indiferenciada que expresa CD73, CD90 y CD105 y no expresa CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR.

45 Preferentemente, dicha diferenciación se efectúa usando un agente de diferenciación seleccionado del grupo que consiste en factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), neuregulina 1-β1 humana, FGF2, EGF, N2, IBMX y AMPc.

Preferentemente, dicho agente de diferenciación comprende cada uno de los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), neuregulina 1-β1 humana, FGF2, EGF, N2, IBMX y AMPc.

50 Preferentemente, dicha célula madre mesenquimatosa se ha incubado en dicho medio que comprende lisado plaquetario durante al menos cuatro semanas.

Preferentemente, dicho medio carece de suero.

55 Preferentemente, dicha diferenciación se efectúa incubando dichas células madre mesenquimatosas en un primer medio de diferenciación que comprende factor de crecimiento epidérmico hEGF y/o factor de crecimiento de fibroblastos básico; e incubando posteriormente dichas células madre mesenquimatosas en un segundo medio que comprende factor de crecimiento derivado de plaquetas y neuregulina humana 1-β1.

60 La célula de la presente invención es para su uso en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno del SNC.

65 Preferentemente, la enfermedad o trastorno del SNC se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, epilepsia, esclerosis lateral amiotrófica, ictus, encefalomiелitis autoinmunitaria, neuropatía diabética, neuropatía glaucomatosa, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington.

### Breve descripción de los dibujos

La divulgación se describe en el presente documento, únicamente a modo de ejemplo, en referencia a los dibujos adjuntos. En referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que las particularidades mostradas son solamente a modo de ejemplo y para fines de análisis ilustrativo de los aspectos preferidos de la presente divulgación y se presentan para proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la presente divulgación. En este sentido, no se realiza intento alguno de mostrar detalles estructurales de la divulgación con más detalle de lo que es necesario para una comprensión fundamental de la divulgación, haciendo la descripción tomada con los dibujos evidente para los expertos en la materia la manera en la que las varias formas de la divulgación se pueden implementar en la práctica. En los dibujos:

La FIG. 1 es un gráfico que ilustra el potencial de crecimiento de CMM en un medio que contiene lisado plaquetario (PM) al 5 % en comparación con CMM cultivada en un medio que contiene FCS (FCS) al 15 %.

Las FIG. 2A-I son gráficos que ilustran los resultados de análisis de FACS de CMM adherentes a plástico cultivadas en lisado plaquetario al 5 % durante aproximadamente 4 semanas. Las células fueron negativas para marcadores de superficie hematopoyéticos: (CD3, receptor de linfocitos T; monocitos/macrófagos CD14; CD19, marcador de linfocitos B; progenitores hematopoyéticos CD34; marcador pan-leucocítico CD45 y HLA-DR) y teñidos positivos para marcadores de superficie mesenquimatosos CD73, CD105 y CD90.

Las FIG. 3A-J son microfotografías que ilustran que las CMM derivadas de la médula ósea humana expresan y segregan factores neurotróficos. Se tiñeron CMM y NTF-SC con anticuerpos contra factores neurotróficos, incluyendo el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (A-B), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) (C-D) y factor de crecimiento de tipo insulínico 1 (IGF1) (E-F) y con anticuerpos contra los marcadores astrocíticos proteína ácida fibrilar de la glía (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=50  $\mu$ m.

Las FIG. 3K-L son gráficos de barras que ilustran la cantidad de factores neurotróficos segregados por las NTF-SC de la presente divulgación. La secreción de factores neurotróficos se midió a partir de CMM humanas antes y después de la inducción de la diferenciación en células secretoras de NTF, de 3 (BDNF) y 5 (GDNF) donantes diferentes analizados por ensayo ELISA. \*  $p < 0,05$  para las CMM 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 FIG. 4 es un gráfico que ilustra que los medios humanos de CMM y NTF-SC atenuaron la muerte de las células de neuroblastoma inducida por 6-OHDA. En el intervalo de 32-160  $\mu$ M, el tratamiento con 6-OHDA dio como resultado una tasa de supervivencia inferior al 35 % en comparación con las células de neuroblastoma SH-SY5Y no tratadas. Los medios de ambos tipos celulares de medios celulares 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 intervalo de 32-72  $\mu$ M). Un tratamiento con 160  $\mu$ M de 6-OHDA dio como resultado un aumento más pequeño pero estadísticamente significativo en la viabilidad celular solo por el medio de NTF-SC y no por el medio de CMM.

Las FIG. 5A-B son gráficos que ilustran que el trasplante de cuerpo estriado de NTF-SC humanas atenúa los cambios de comportamiento inducidos por 6-OHDA. (Figura 5A) En la prueba de rotaciones inducidas por amfetamina, solo el tratamiento con NTF-SC ( $n=20$ ) fue beneficioso en comparación con el control ( $n=10$ ) en dos puntos temporales (día 28 y día 42). No se mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa para el grupo tratado con CMM ( $n=20$ ) en comparación con el grupo de control o el grupo tratado con NTF-SC. Por el contrario, para los grupos de NTF-SC, se observó una disminución notable del 25 % y 45 % después de 14 y 28 días tras el trasplante (Figura 5B). 6-OHDA indujo un patrón de comportamiento motor hipoactivo en una prueba de campo abierto a los 7 días después del tratamiento. El tratamiento con NTF-SC mostró un efecto positivo en la movilidad voluntaria en comparación con los grupos tratados con CMM y PBS (ANOVA,  $p=0,054$ ).

Las FIG. 6A-E son ilustraciones y fotografías que ilustran la metodología de la cuantificación estereológica del área estriatal positiva para TH en las ratas lesionadas. Como se representa en la Figura 6C, se realizaron secciones coronales estriatales en secciones de 40  $\mu$ m y cada 8<sup>a</sup> sección se tiñó para tirosina-hidroxilasa (TH). Cada sección se capturó con un aumento X40 y se dividió en 2-3 imágenes de cada lado de forma simétrica (Figuras 6B, D). Utilizando el software ImagePro, se determinó un punto de corte basado en histograma y se creó una máscara (Figuras 6A, E). La cuantificación final se realizó calculando el área roja total en las imágenes enmascaradas.

Las FIG. 7A-E son fotografías y gráficos que ilustran que el tratamiento con NTF-SC humano rescató los terminales estriatales positivos para TH dañados por 6-OHDA. (Figuras 7A-C) una macro-vista de la tinción con TH en el cuerpo estriado con un corte representativo para cada grupo de ratas (A-PBS, B-CMM, C-NTF-SC). (Figura 7D) Cuantificación digital del área positiva para TH en el cuerpo estriado lesionado completo como un porcentaje del cuerpo estriado no tratado, que demuestra el efecto protector beneficioso del tratamiento con NTFSC ( $n=4$  de cada grupo, | -  $P < 0,05$  en comparación con PBS). (Figura 7E) Cuantificación del área positiva para TH del lado lesionado en comparación con el lado no tratado, una comparación segmentaria. Todo el cuerpo estriado se dividió en cinco segmentos desde la parte anterior a la posterior (cada grupo representa

aproximadamente 1 mm de grosor del cuerpo estriado, \* -  $p < 0,05$  en comparación con PBS).

Las FIG. 8A-G son imágenes obtenidas después del seguimiento de NTF-SC humanas mediante IRM *in vivo* e histología correspondiente. (Figura 8A) Exploración por IRM T2\* realizada 35 días después del tratamiento de un animal de control tratado con SPIO (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 pudieron detectar otras señales hipointensas en el cuerpo estriado. (Figura 8B) La ruta migratoria como se demuestra mediante una imagen ponderada axial T2\*. Una señal hipointensa marcada es visible desde el sitio de trasplante celular (círculo azul) hasta el sitio de lesión 6-OHDA (flecha roja). Se encontró una buena correlación con la tinción con azul de Prusia (Figura 8D) a lo largo del CC en el cuerpo estriado anterior. La misma pista (flecha roja) se puede ver también en la imagen ponderada T2 (Figura 8C), que es menos sensible a la falta de homogeneidad 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 exploración de IRM presentada 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, VL-ventrículo lateral, barra de escala - 500  $\mu$ m). (Figuras 8E-G) Inmunotinción con anticuerpos de anti-núcleos humanos de las cajas blancas marcadas en la Figura 8D en secciones adyacentes (barra de escala 100  $\mu$ m).

La FIG. 9 es un gráfico de barras que ilustra que la inducción de CMM en NTF-SC aumenta la captación de glutamato. La captación de  $^3\text{H}$ -D-aspartato (50 nM) se midió en hCMM y en NTF-SC. Se realizó captación en presencia de  $\text{Na}^+$  a menos que se indique otra cosa. La captación dependiente de  $\text{Na}^+$  se calculó restando los resultados obtenidos de las pruebas sin  $\text{Na}^+$  de los resultados del grupo de control. La inhibición competitiva con D-metil-aspartato (50 nM) se realizó en presencia de  $^3\text{H}$ -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 realizan la captación de glutamato significativamente mejor que CMM ( $P < 0,0001$ ). Los inhibidores disminuyen significativamente la captación de glutamato en NTF-SC en comparación con el control de NTF-SC (inhibición competitiva  $P < 0,0005$ , t-PDC  $P < 0,0001$ ).

Las FIG. 10A-C son gráficos y microfotografías que ilustran la expresión de GFAP en las células diferenciadas de la presente divulgación, medido por RT-PCR en tiempo real (Figura 10A) e inmunocitoquímica (Figuras 10B-C).

Las FIG. 11A-C son microfotografías que comparan la expresión de S100 en células indiferenciadas (Figura 11A) y diferenciadas (Figuras 11B-C) de la presente divulgación.

### Descripción de los aspectos preferidos

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

Los principios y la operación de la presente divulgación pueden entenderse mejor en referencia a los dibujos y las descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos un aspecto de la divulgación en detalle, debe entenderse que la divulgación no está limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificada por los Ejemplos. La divulgación tiene capacidad para otros aspectos o puede practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y terminología empleadas en la presente memoria son para el fin de describir y no deberían interpretarse como limitantes.

Los factores neurotróficos (NTF) son proteínas segregadas que regulan la supervivencia, el mantenimiento funcional y el desarrollo fenotípico de células neuronales. Las alteraciones en los niveles de NTF están implicadas en la activación de la muerte celular programada en neuronas y por tanto contribuyen a la patogenia de la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas.

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

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

Los protocolos para diferenciar células madre mesenquimatosas humanas en células secretoras de factores neurotróficos son conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, el documento WO 2006/134602.

Mientras se busca una forma de aumentar la cantidad de factores neurotróficos segregados por células madre mesenquimatosas, los presentes inventores han descubierto que la propagación de células madre mesenquimatosas en el lisado plaquetario antes de la diferenciación incrementó la secreción de factores neurotróficos de las mismas.

Los presentes inventores han mostrado que las CMM diferenciadas después de la incubación en el lisado plaquetario representan una forma similar a astrocitos acompañada por la presencia de marcadores de astrocitos. Se mostró que estas células expresan y segregan niveles significativos de GDNF y BDNF. De hecho, utilizando procedimientos de inmunocitoquímica, los presentes inventores han mostrado que aproximadamente el 90 % de las células generadas expresan GDNF, BDNF, S100, GFAP y glutamina sintetasa (Figuras 3A-J, 10A-C y 11A-C).

Después del trasplante en el cuerpo estriado de la rata lesionada con 6-OHDA (un modelo de roedor para la enfermedad de Parkinson), las células sobrevivieron durante tres meses (según lo medido por IRM) y mejoraron los déficits conductuales examinados por una prueba de campo abierto, y el comportamiento rotacional inducido por apomorfina. Además, se mostró que las células reducen el agotamiento de dopamina y causan la reinervación de los terminales dopaminérgicos. Se descubrió que la eficacia de NTF-SC fue superior a la de CMM en términos de comportamiento, índices 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 pista de migración. Además, los presentes inventores mostraron que las CMM diferenciadas según los protocolos de aspectos de la presente divulgación son capaces de captar glutamato.

Dado que la nueva tecnología presentada en el presente documento es clínicamente compatible y segura, los presentes inventores proponen que el trasplante de NTF-SC derivado de CMM humana autóloga debería convertirse en una opción importante en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

Por tanto, según 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 mesenquimatosas en un medio de cultivo que comprende lisado plaquetario para generar células madre mesenquimatosas propagadas; y
- (b) incubar las células madre mesenquimatosas propagadas en un medio de diferenciación, generando de este modo células útiles para tratar el trastorno neurodegenerativo.

La expresión "células madre mesenquimatosas" o "CMM" se usa indistintamente para células adultas que no están diferenciadas terminalmente, que se puede dividir para producir células que son células madre o que se diferencian irreversiblemente para dar lugar a células de un linaje de células mesenquimatosas. Las células madre mesenquimatosas de la presente divulgación pueden ser de origen singénico o alogénico, aunque se prefiere el primero.

Según un aspecto preferido de este aspecto de la presente divulgación, las células madre mesenquimatosas no se manipulan genéticamente (es decir, se transforman con una construcción de expresión) para generar las células y poblaciones celulares descritas en el presente documento.

Se apreciará que las células de la presente divulgación pueden proceder de cualquier célula madre, aunque preferentemente no células ES.

Las células madre mesenquimatosas se pueden aislar de diversos tejidos, incluyendo, pero sin limitación, médula ósea, sangre periférica, sangre, placenta y tejido adiposo. Un método para aislar células madre mesenquimatosas de sangre periférica se describe en Kassis *et al* [Bone Marrow Transplant. mayo de 2006;37(10):967-76]. Un método para aislar células madre mesenquimatosas de tejido placentario se describe en Zhang *et al* [Chinese Medical Journal, 2004, 117 (6):882-887]. Se describen métodos de aislamiento y cultivo del tejido adiposo, células madre mesenquimatosas de la placenta y del cordón umbilical en Kern *et al*. [Stem Cells, 2006;24:1294-1301].

Según un aspecto preferido de este aspecto de la presente divulgación, las células madre mesenquimatosas son humanas.

Se puede aislar médula ósea de la cresta ilíaca de un individuo por aspiración. Pueden separarse células mononucleares de MO (CMNMO) de baja densidad mediante un gradiente de densidad FICOL-PAGUE. Para obtener células madre mesenquimatosas, una población celular que comprende las células madre mesenquimatosas (por ejemplo, CMNMO) puede cultivarse en un medio de proliferación capaz de mantener y/o expandir las células en presencia de lisado plaquetario. Según un aspecto, las poblaciones se siembran sobre superficies de plástico de poliestireno (por ejemplo, en un matraz) y se aíslan células madre mesenquimatosas mediante la eliminación de células no adherentes. Como alternativa, las células madre mesenquimatosas se pueden aislar mediante FACS utilizando marcadores de células madre mesenquimatosas.

Después del aislamiento, las células se expanden normalmente mediante el cultivo en un medio de proliferación capaz de mantener y/o expandir las células aisladas *ex vivo* en presencia de lisado plaquetario. El medio de proliferación puede ser DMEM, alfa-MEM o DMEM/F12.

Se apreciará que, preferentemente, cuando las células madre mesenquimatosas son humanas, el lisado plaquetario también se obtiene de células humanas.

Según un aspecto, el medio carece de xenocontaminantes, es decir, está libre de componentes derivados de animales.

5 A continuación se presenta en el presente documento un protocolo de aislamiento y propagación de células madre mesenquimatosas ilustrativo.

#### **Aislamiento de MO-CMM humanas**

10 Se recogieron muestras de médula ósea (3-30 ml) en tubos que contenían EDTA de la cresta ilíaca posterior de donantes humanos adultos que se sometieron a aspiración de médula ósea en el curso de los procedimientos de diagnóstico. Los aspirados de médula ósea se diluyeron 1:1 con HBSS y se separaron células mononucleares por centrifugación de densidad (1000xG durante 20 min), en tubos que contenían UNI-SEP MAXI (Polisacarosa - Metrizoato de Sodio). La fracción de células mononucleares se recogió y se lavó en HBSS. Las células se resuspendieron en medio de cultivo que contenía un lisado plaquetario al (PM1) 10 %, se contaron con el colorante de exclusión de azul de tripano y se sembraron a una concentración de 250.000-350.000 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 CO<sub>2</sub> al 5 %.

20 El medio de cultivo de PM1 consistía en medio de Eagle modificado por Dulbecco bajo en glucosa (Sigma, Aldrich), complementado con gentamicina 0,05 mg/ml (Sigma, Aldrich), heparina 2 UI/ml (TRIMA), 2-mercaptoetanol al 0,001 % (Sigma, Aldrich), solución de aminoácidos no esenciales al 1 % (Sigma, Aldrich) y lisado plaquetario al 10 %. 24 horas después, se aspiró medio PM1 para eliminar células no adherentes del matraz, las células adherentes se lavaron suavemente con 10 ml de DMEM y se añadieron 10 ml de PM1 nuevo al matraz. Se dejó que las células hCMM proliferaran durante 12-18 días en medio PM1, que fue reemplazado dos veces por semana. Después de 12-18 días o cuando el matraz alcanzó la confluencia, las células se recogieron retirando todo el medio de cultivo e incubando en solución TrypLE™ (Invitrogen) durante 5 min en una incubadora a 37 °C. Las células se lavan después 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>.

30 El medio de cultivo de PM consiste en medio de Eagle modificado por Dulbecco bajo en glucosa complementado con gentamicina 0,05 mg/ml, heparina 2 UI/ml y lisado plaquetario al 5 %. Los cultivos de CMM se pasaron aproximadamente cada dos semanas mediante el desprendimiento de la capa celular subconfluyente con solución TrypLE™ (Invitrogen). Se realizaron experimentos con las células después de 2-7 pases. En consecuencia, las células se pasaron durante un mínimo de dos semanas en medio que contenía lisado plaquetario.

35 El lisado plaquetario se puede preparar usando cualquier método conocido en la técnica. A continuación se proporciona un protocolo de congelación-descongelación ilustrativo.

#### **Preparación de lisado plaquetario**

40 El plasma rico en plaquetas (PRP) puede provenir de donaciones del banco de sangre que se ha determinado que están exentas de agentes infecciosos (es decir, VIH, HTLV, VHC, 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 agrupó, se mezcló y se centrifugó a 14000 x G durante 10 minutos para eliminar las partículas y membranas de las plaquetas. Después el sobrenadante del lisado plaquetario se recogió y se congeló a -80 °C hasta su uso. El lisado plaquetario se ensayó para determinar la endotoxina, hemoglobina, pH, proteína total, albúmina, osmolalidad, esterilidad y micoplasma.

50 La verificación de que la población celular aislada (y opcionalmente propagada) comprende células madre mesenquimatosas 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 (>=95 % positivo) y la ausencia (<2 %) de (linfocitos T), CD14 (marcador de superficie de monocitos), CD19 (linfocitos B), CD34 (células madre hematopoyéticas), CD45 (células hematopoyéticas) y HLA-DR (antígeno de histocompatibilidad de clase II humana). La expresión en la superficie de estas células se puede analizar utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante citometría de flujo.

55 Los anticuerpos ejemplares que pueden usarse para verificar la presencia de células madre mesenquimatosas incluyen CD73 conjugado con PE (BD Pharmingen), CD90 conjugado con PE-Cy5 (eBioscience) CD105 conjugado con PE (Beckman Coulter) CD14 conjugado con FITC (eBioscience) CD19 conjugado con PE-Cy5 (eBioscience) CD34 conjugado con FITC (Beckman Coulter), CD45 conjugado con PE (eBioscience) y HLA-DR conjugado con PE-Cy5 (BD Pharmingen).

65 Otro método para verificar la presencia de células madre mesenquimatosas es mostrar que las células son capaces de diferenciarse en linajes múltiples tales como, por ejemplo, adipocitos, osteocitos y condrocitos. Esto puede efectuarse, por ejemplo, mediante el uso del kit de identificación funcional de células madre mesenquimatosas humanas (R&D Systems).

Como se ha mencionado, tras la propagación de células madre mesenquimatosas en un medio que contiene lisado plaquetario, las células pueden diferenciarse en un medio de diferenciación para generar células útiles para tratar un trastorno neurodegenerativo.

5 Se apreciará que los componentes del medio de diferenciación se seleccionan según el fenotipo celular requerido.

Por tanto, según un aspecto, el fenotipo puede ser de células tipo astrocito.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "células de tipo astrocito" se refiere a células que comprenden al menos un fenotipo astrocítico que permite que las mismas medien *in vivo* en una actividad astrocítica, es decir, apoyo de las neuronas.

Dichos fenotipos se describen adicionalmente a continuación en el presente documento.

15 La diferenciación a células de tipo astrocito puede efectuarse incubando las CMM en medios de diferenciación tales como los descritos en la patente de los Estados Unidos N.º 6.528.245 y por Sánchez-Ramos *et al.* (2000); Woodburry *et al.* (2000); Woodburry *et al.* (J. Neurisci. Res. 96:908-917, 2001); Black y Woodbury (Blood Cells Mol. Dis. 27:632-635, 2001); Deng *et al.* (2001), Kohyama *et al.* (2001), Reyes y Verfatile (Ann. NY Acad. Sci. 938: 231-235, 2001) y Jiang *et al.* (Nature 418: 47-49, 2002).

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

25 Según un aspecto para generar células de tipo astrocito, se incuban CMM inicialmente en un medio que comprende factor de crecimiento epidérmico hEGF (por ejemplo, 20 ng/ml) y/o factor de crecimiento básico de fibroblastos (por ejemplo, 20 ng/ml) en presencia o ausencia de complemento de N2 (insulina, progesterona, putrescina, selenio y transferrina). Después de esto, los CMMO se pueden diferenciar en un segundo medio que comprende factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, 5 ng/ml) y neuregulina 1-β1 humana (por ejemplo, 50 ng/ml). Este "medio de diferenciación" también puede incluir agentes de diferenciación tales como IL-1β y/o dbAMPc.

30 Según un aspecto, las CMM 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.

35 Según otro aspecto, los componentes del medio de diferenciación se seleccionan para generar células que comprenden un fenotipo oligodendrocítico.

Los medios de diferenciación pueden ser DMEM o DMEM/F12 o cualquier otro medio que apoye el crecimiento neuronal. Según un aspecto preferido de este aspecto de la presente divulgación, el medio es medio neurobasal (por ejemplo, cat. N.º 21103049, Invitrogen, Ca, Estados Unidos).

40 La Tabla 1, a continuación en el presente documento, resume diversos protocolos de diferenciación para la generación de oligodendrocitos.

**Tabla 1**

<b>Etapa</b>	<b>Medio<sup>a</sup></b>	<b>Días</b>
<b>Control</b>		
	Medio de cultivo regular: α-MEM FCS 15 % L-glutamina 2 mM Penicilina 100 U/ml Estreptomicina 100 µg/ml Nistatina 12,5 U/ml	13
<b>Protocolo A</b>		
Medio de diferenciación (A)	Medio neurobasal Complemento de N2 Complemento de B27 bFGF 10 ng/ml GGF 50 ng/ml db-AMPc 1 nM	13
<b>Protocolo B</b>		
Medio adicional (B)	Medio neurobasal PDGF 20 ng/ml NT-3 10 ng/ml IL-1β 20 ng/ml	5

(continuación)

<b>Etapa</b>	<b>Medio<sup>a</sup></b>	<b>Días</b>
Medio de diferenciación (B)	Medio neurobasal Complemento de N2 NT-3 10 ng/ml IL-1 $\beta$ 20 ng/ml	8
<b>Protocolo C</b>		
Medio adicional (C)	Medio neurobasal TH 30 ng/ml (reserva de 20 ug/ml) RA 1 $\mu$ M GGF 50 ng/ml	5
Medio de diferenciación (C)	Medio neurobasal TH 30 ng/ml (reserva de 20 ug/ml) RA 1 $\mu$ M NT-3 10 ng/ml	8
<b>Protocolo D</b>		
Medio adicional (D)	Medio neurobasal PDGF 20 ng/ml GGF 50 ng/ml	5
Medio de diferenciación (D)	Medio neurobasal Shh 300 ng/ml NT-3 10 ng/ml db-AMPC 1 nM Forskolina 5 $\mu$ M	8

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

5 Según otro aspecto, los componentes del medio de diferenciación se seleccionan para generar células que segregan dopamina.

10 En la Tabla 2 se detalla un método ejemplar para diferenciar células madre mesenquimatosas en células secretoras de neurotransmisores (por ejemplo, dopamina), 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; Factor de crecimiento de fibroblastos básicos humanos (bFGF) 10 ng/ml; EGF 10 ng/ml; *Complemento de N2; ácido araquidónico 40 $\mu$ M; ácido docosahexaenoico (DHA) 10-40 $\mu$ M; Vit-E 40 $\mu$ M; Factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF8) 10 ng/ml; sonic hedgehog 200 ng/ml (Shh)
Etapa 2: Medio de diferenciación dopaminérgico (12-96 h)	DMEM/F12; L-glutamina 2 mM; SPN; *Complemento de N2; ácido ascórbico 200 $\mu$ M; dibutilil AMP cíclico 1 mM; isobutilmetilxantina 0,5 mM; ácido retinoico 1 $\mu$ M; hidroxianisol butilado 200 $\mu$ M (BHA); factor de crecimiento transformante humano $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3), 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: (hNT3), 20 ng/ml; interleucina-1 $\beta$ humana (hIL-1 $\beta$ ), 100 pg/ml;

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

15 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- $\beta$ 3, TGF- $\alpha$ , FGF-8 y bFGF), vitaminas, hormonas, por ejemplo, insulina, progesterona y otros factores tales como sonic hedgehog, proteínas morfogenéticas óseas, forskolina, ácido retinoico, ácido ascórbico, putrescina, selenio y transferrina.

20 Como se ha mencionado, los presentes inventores mostraron que la propagación de células madre mesenquimatosas en el lisado plaquetario antes de la incubación con un agente diferenciador que dirige la célula madre mesenquimatosas hacia un fenotipo astrocítico (por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)), neuregulina 1- $\beta$ 1 humana, FGF2, EGF, N2, IBMX y AMPc), células generadas capaces de segregar grandes cantidades de factores neurotróficos.

Por tanto, según otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona una célula humana aislada que comprende al menos un fenotipo de células madre mesenquimatosas y que segrega 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 mesenquimatosa.

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). Preferentemente, la célula aislada está sustancialmente exenta de otras sustancias (por ejemplo, otros tipos celulares) que están presentes en su localización *in vivo*.

10 Los fenotipos de células madre mesenquimatosas que están comprendidos en las células de la presente divulgación son normalmente estructurales. Por ejemplo, Las células de la presente divulgación pueden mostrar una morfología similar a la de las células madre mesenquimatosas (una morfología fusiforme). De forma alternativa o adicional, las células de la presente divulgación pueden expresar un marcador (por ejemplo, un marcador de superficie) típico de las células madre mesenquimatosas pero atípico de las células astrocíticas nativas. Los ejemplos de marcadores de superficie de células madre mesenquimatosas incluyen, pero sin limitación, CD105+, CD29+, CD44+, CD90+, CD34-, CD45-, CD19-, CD5, CD20-, CD11B- y FMC7-. Otros marcadores de células madre mesenquimatosas incluyen, pero sin limitación, tirosina hidroxilasa, nestina y H-NF.

20 Como se ha mencionado, la secreción basal de BDNF de células según este aspecto de la presente divulgación es al menos cinco veces mayor que la secreción basal de BDNF en una célula madre mesenquimatosa indiferenciada.

Se apreciará que la secreción basal de BDNF puede ser aún 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 Según un aspecto, 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 BDNF.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "secreción basal" se refiere a una secreción que no implica la adición de estimulantes. La célula madre mesenquimatosa indiferenciada se obtiene normalmente de la misma fuente que la célula madre mesenquimatosa diferenciada y es idéntica a la misma, aparte de haberse diferenciado según los protocolos descritos en el presente documento. Por tanto, normalmente, las células madre mesenquimatosas indiferenciadas están en un medio idéntico a las células madre mesenquimatosas diferenciadas, pero sin la adición de agentes de diferenciación.

35 Según un aspecto, las células de la presente divulgación son capaces de captar glutamato de su medio circundante (por ejemplo, medio de cultivo). Por ejemplo, las células de la presente divulgación pueden ser capaces de captar 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 mesenquimatosa indiferenciada.

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

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "fenotipo astrocítico" se refiere a un parámetro estructural y/o funcional típico (por ejemplo, único) para un astrocito que se puede usar para distinguir entre las CMM diferenciadas de la presente divulgación y las CMM indiferenciadas. El fenotipo astrocítico puede comprender una o varias características que pueden usarse para distinguir entre las CMM diferenciadas de la presente divulgación y las CMM indiferenciadas.

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

Según un aspecto, el fenotipo astrocítico funcional comprende la capacidad de expresar un factor neurotrófico adicional.

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

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "factor neurotrófico" se refiere a un factor celular que actúa sobre el sistema nervioso cerebral que comprende el crecimiento, la diferenciación, el mantenimiento funcional y/o efectos de supervivencia en neuronas. Los ejemplos de factores neurotróficos incluyen, pero sin limitación, factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), n.º de referencia de GenBank L19063, L15306; factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), n.º de referencia de GenBank CAA62632; neurotrofina-3 (NT-3), n.º de referencia de GenBank M37763; neurotrofina-4/5; neurturina (NTN), n.º de referencia de GenBank NP\_004549; neurotrofina-4, n.º de referencia de GenBank M86528; persefina, n.º de referencia de GenBank AAC39640; factor neurotrófico derivado del cerebro, (BDNF), n.º de referencia de GenBank CAA42761; artemina (ART), n.º de referencia de GenBank AAD13110; factor neurotrófico ciliar (CNTF), n.º de referencia de GenBank NP\_000605; factor de crecimiento de tipo

insulínico I (IGF-1), n.º de referencia de GenBank NP\_000609; y Neublastina, n.º de referencia de GenBank AAD21075.

5 Según un aspecto, 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.

Normalmente, las células de la presente divulgación no segregan factor de crecimiento nervioso (NGF), n.º de referencia de GenBank CAA37703.

10 Los ejemplos de fenotipos astrocíticos estructurales incluyen un tamaño de célula, una forma de célula, un tamaño de orgánulo y un número de orgánulos. Por tanto, los fenotipos estructurales astrocíticos incluyen un núcleo redondo, un cuerpo "en forma de estrella" y muchas prolongaciones largas que terminan como plataformas vasculares en los vasos sanguíneos pequeños del SNC. Se pueden encontrar otros ejemplos de fenotipos astrocíticos estructurales en los siguientes materiales: Reynolds y Weiss, *Science* (1992) 255:1707-1710; Reynolds, Tetzlaff y Weiss, *J. Neurosci* (1992) 12:4565-4574; y Kandel, *et al.*, *Principles of Neuroscience*, tercera ed. (1991), Appleton y Lange, Norwalk, Conn. Estos fenotipos estructurales pueden analizarse usando técnicas microscópicas (por ejemplo, microscopía electrónica de barrido). Se pueden usar anticuerpos o colorantes para destacar las características distintivas para ayudar en el análisis.

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

Como se usa en el presente 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 celular o internamente. Los ejemplos de marcadores de astrocitos incluyen S100 beta, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), glutamina sintetasa (GS), GLAST y GLT1.

25 Según un aspecto, 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 incluyendo, pero sin limitación S100 beta, GFAP y GS.

30 Se apreciará que las poblaciones celulares obtenidas según los métodos descritos en el presente documento normalmente no son homogéneas.

35 Por tanto, según otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona una población celular aislada que comprende células humanas en donde:

- (i) al menos N % de las células humanas segregan 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 mesenquimatosas;
- 40 (ii) al menos M % de las células humanas comprende al menos un fenotipo de células madre mesenquimatosas;
- y
- (iii) al menos una de las células humanas segrega el BDNF y el al menos un fenotipo de células madre mesenquimatosas;

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

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 segregan BDNF se puede aumentar o reducir según las necesidades previstas. Esto puede efectuarse mediante FACS utilizando un anticuerpo específico para un marcador celular de astrocitos. Se han descrito ejemplos de tales marcadores astrocíticos anteriormente en el presente documento. Si el marcador celular es un marcador interno, preferentemente, el análisis FACS comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos que pueden penetrar fácilmente en una célula y pueden retirarse por lavado fácilmente de la célula después de la detección. El proceso de FACS puede repetirse varias veces utilizando los mismos marcadores o marcadores

60 El porcentaje de células que segregan BDNF se puede aumentar o reducir según las necesidades previstas. Esto puede efectuarse mediante FACS utilizando un anticuerpo específico para un marcador celular de astrocitos. Se han descrito ejemplos de tales marcadores astrocíticos anteriormente en el presente documento. Si el marcador celular es un marcador interno, preferentemente, el análisis FACS comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos que pueden penetrar fácilmente en una célula y pueden retirarse por lavado fácilmente de la célula después de la detección. El proceso de FACS puede repetirse varias veces utilizando los mismos marcadores o marcadores

diferentes, según el grado de enriquecimiento y el fenotipo celular necesario como el producto final.

Según otro aspecto 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 manera que se genere una población homogénea de células.

Una vez diferenciadas y opcionalmente aisladas, las células pueden ensayarse (en cultivo) para determinar su capacidad para segregar un BDNF. Se describe posteriormente en el presente documento un método ilustrativo para analizar la secreción de BDNF (y otros factores neurotróficos (NTF)).

**ELISA para NTF segregados**

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

Como se ha mencionado según el fenotipo, las células y poblaciones celulares de la presente divulgación pueden usarse 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 ha descrito anteriormente en el presente documento. Como se resume en la Tabla 3 a continuación en el presente documento, se ha mostrado que determinados factores neurotróficos o un conjunto de factores neurotróficos son particularmente beneficiosos para tratar una enfermedad particular. Por ejemplo, las células de la presente divulgación que segregan BDNF y GDNF serían particularmente adecuadas para tratar la enfermedad de Parkinson.

**Tabla 3**

<b>Enfermedad</b>	<b>Fenotipo astrocítico</b>	<b>REF</b>
Enfermedad de Parkinson	BDNF, FGF, GDNF	Walker DG, <i>et al.</i> Brain Res 1998; 794: 181-7. Lorigados L, <i>et al.</i> Rev Neurol 1998; 26: 744-8. Mogi M, <i>et al.</i> Neurosci Lett 1994; 180: 147-50. Howells DW, <i>et al.</i> Exp Neurol 2000; 166: 127-35. Beck KD, <i>et al.</i> Nature 1995; 373: 339-41. Tomac A, <i>et al.</i> Nature 1995; 373: 335-9. Gash DM, <i>et al.</i> 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, <i>et al.</i> Soc Neurosci Abstr 1998; 24: 1465. Chauhan NB, <i>et al.</i> Neurology 1999; 52:A212-213.
Epilepsia	BDNF, NT-3, transportador de glutamato	G.W. Mathern, Mol. Chem. Neuropathol. 30 1-2 (1997), pág. 53-76. Lucia Tapia-Arancibia <i>et al.</i> Frontiers in Neuroendocrinology 2004 Jul; 25(2):77-107. RYUTA KOYAMA y YUJI IKEGAYA; NEUROSCIENCE UPDATE agosto de 2005; 11 (4):282-7. Gerald Seifert, <i>et al.</i> , Nature Reviews Neuroscience 7, 194-206 (marzo de 2006).
ALS	NT3, IGF1, BDNF, transportador de glutamato	Luis H. <i>Et al.</i> , Brain Research Reviews diciembre de 2004; 47 (1-3): 263-74. Bradley WG. Ann Neurol 1995; 38: 971. Haase G, <i>et al.</i> 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.
Lesión cerebral	Capacidad de las células para responder a IL-1	Nancy Rothwell; Brain, Behavior, and Immunity. Junio de 2003; 17 (3): 152-7.
Enfermedad de Alzheimer	BDNF	Crutcher KA, <i>et al.</i> J Neurosci 1993; 6: 2540-50. Scott SA, <i>et al.</i> 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, <i>et al.</i> J Neuropathol Exp Neurol 2004; 63: 641-9. Murer MG, <i>et al.</i> Neuroscience 1999; 88: 1015-32.

(continuación)

<b>Enfermedad</b>	<b>Fenotipo astrocítico</b>	<b>REF</b>
Huntingdon	BDNF, NT-3 o NT-4/5	Martínez-Serrano A, Bjorklund A. Trends Neurosci 1997; 20: 530-8. Pérez-Navarro E, <i>et al.</i> J Neurochem 2000; 75: 2190-9. Pérez-Navarro E, <i>et al.</i> Neuroscience 1999; 91: 1257-64.
Esquizofrenia	NT-3, BDNF	Gal Shoval, Abraham Weizmana; Eur Neuropsychopharmacol. Mayo de 2005;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, <i>et al.</i> , Proc Natl Acad Sci U S A. 7 de marzo de 2006;103(10):3896-901.
Ictus	FGF, BDNF	Wu D; Neuro Rx. enero de 2005;2(1):120-8.

- Se ha propuesto que las células astrocíticas pueden reducir la tensión oxidativa en neuronas metabolizando la dopamina, ya que expresan monoamina oxidasa-B y catecol-O-metil-transferasa. Adicionalmente, se ha propuesto que las células astrocíticas pueden ser capaces de prevenir la neurotoxicidad generada por NO mediante un mecanismo dependiente de glutatión (Chen *et al.* 2004, Curr Drug Targets. noviembre de 2005; 6(7):821-33). En consecuencia, las células de la presente divulgación que comprenden una función de eliminación y/o expresan enzimas metabolizadoras de dopamina también pueden ser adecuadas para tratar la enfermedad de Parkinson.
- Debido a la eliminación o disminución insuficientes de los transportadores de glutamato, se ha sugerido que la excitotoxicidad del glutamato es un factor causante de la ELA [Bendotti 2001, *et al.*, J Neurochem, 79(4):737-746, 2001]. Por tanto, las células de la presente divulgación que muestran una actividad elevada del transportador de glutamato también pueden ser adecuadas para tratar la ELA.
- Se apreciará que las células capaces de segregar neurotransmisores como la dopamina serían particularmente adecuadas para tratar la enfermedad de Parkinson.
- Además, las células que comprenden un fenotipo de oligodendrocito que serían particularmente adecuadas para enfermedades y afecciones del sistema nervioso que resulten del deterioro o daño de la vaina de mielina generada por células productoras de mielina son numerosas. La mielina puede perderse como un acontecimiento primario debido al daño directo a la mielina o como un acontecimiento secundario como resultado del daño a axones y neuronas. Los acontecimientos primarios incluyen enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis múltiple (EM), mielopatía asociada a EM de inmunodeficiencia humana, mielopatía transversa/mielitis, leucoencefalopatía multifocal progresiva, mielínolisis central del puente y lesiones en el revestimiento de mielina (como se describe a continuación para acontecimientos secundarios). Los acontecimientos secundarios incluyen una gran diversidad de lesiones a los axones o neuronas causadas por lesiones físicas en el cerebro o la médula espinal, enfermedades de la isquemia, enfermedades malignas, enfermedades infecciosas (tales como VIH, enfermedad de Lyme, tuberculosis, sífilis o herpes), enfermedades degenerativas (tales como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, ELA, neuritis óptica, encefalomiелitis postinfecciosa, adrenoleucodistrofia y adrenomiелoneuropatía), esquizofrenia, enfermedades/trastornos nutricionales (tales como deficiencia en ácido fólico y vitamina B12, enfermedad de Wernicke), enfermedades sistémicas (tales como diabetes, lupus eritematoso sistémico, carcinoma) y sustancias tóxicas (tales como alcohol, plomo, bromuro de etidio); y procesos iatrogénicos tales como interacciones farmacológicas, radioterapia o neurocirugía.
- Por tanto, según 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.
- En consecuencia, estas células se pueden usar para preparar un medicamento (denominado indistintamente composición farmacéutica), por lo que dicho medicamento se formula para tratar una enfermedad o trastorno del SNC.
- Los ejemplos representativos de enfermedades o trastornos del SNC que pueden tratarse beneficiosamente con las células descritas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, un trastorno del dolor, un trastorno del movimiento, un trastorno disociativo, un trastorno del estado de ánimo, un trastorno afectivo, una enfermedad o trastorno neurodegenerativo y un trastorno convulsivo.
- Los ejemplos más específicos de dichas afecciones incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Parkinson, ELA, esclerosis múltiple, enfermedad de Huntington, encefalomiелitis autoinmunitaria, neuropatía diabética, neuropatía glaucomatosa, degeneración macular, temblores intencionales y discinesia tardía, pánico, ansiedad, depresión,

alcoholismo, insomnio, comportamiento maníaco, enfermedad de Alzheimer y epilepsia.

5 En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, las células pueden obtenerse 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.

Las células de la presente divulgación pueden administrarse al individuo tratado usando una diversidad de enfoques de trasplante, la naturaleza de los cuales depende del sitio de implantación.

10 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 al tejido diana. Las células pueden obtenerse del receptor o de un donante alogénico o xenogénico.

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

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

30 Como alternativa, el injerto se puede colocar en un ventrículo, por ejemplo, un ventrículo cerebral o subduralmente, es decir, en la superficie del cerebro del hospedador, donde se separa del parénquima cerebral del hospedador por la piamadre o el aracnoides y la piamadre intermedios. El injerto en el ventrículo se puede realizar mediante inyección de las células donantes o cultivando las células en un sustrato tal como colágeno al 3 % para formar un tapón de tejido sólido que después se puede implantar en el ventrículo para evitar el desplazamiento del injerto. Para injertos subdurales, las células pueden inyectarse alrededor de la superficie del cerebro después de realizar un corte en la duramadre. Pueden realizarse inyecciones en regiones seleccionadas del cerebro del hospedador perforando un agujero y perforando la duramadre para permitir que se inserte la aguja de una microjeringa. La microjeringa se monta preferentemente en un marco estereotáctico y se seleccionan coordenadas estereotácticas tridimensionales para colocar la aguja en la ubicación deseada del cerebro o la médula espinal. Las células también pueden introducirse en el putamen, núcleo basal, corteza del hipocampo, cuerpo estriado, sustancia negra o regiones caudadas del cerebro, así como la médula espinal.

45 Las células también pueden trasplantarse a una región sana del tejido. En algunos casos, la ubicación exacta del área tisular dañada puede ser desconocida y las células se pueden trasplantar inadvertidamente a una región sana. En otros casos, puede ser preferible administrar las células a una región sana, evitando de este modo cualquier daño adicional a esa región. En cualquier caso, tras el trasplante, las células migran preferentemente al área dañada.

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

55 El procedimiento de suspensión celular permite de este modo el injerto de las células en 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. Múltiples injertos pueden consistir en una mezcla de tipos celulares y/o una mezcla de transgenes insertados en las células. Preferentemente se introducen de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^8$  células por injerto.

60 Para el trasplante en cavidades, que puede preferirse para injerto de médula espinal, se retira tejido de regiones cercanas a la superficie externa del sistema nervioso central (SNC) para formar una cavidad de trasplante, por ejemplo, como se describe en Stenevi *et al.* (Brain Res. 114: 1-20., 1976), retirando hueso que recubre el cerebro y deteniendo la hemorragia con un material tal como un gelfoam. Se puede usar succión para crear la cavidad. Después se coloca el injerto en la cavidad. Se puede colocar más de un trasplante en la misma cavidad usando inyección de células o implantes de tejido sólido. Preferentemente, 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, el factor neurotrófico particular que se segrega) por las células de la presente divulgación. Por ejemplo, las células que segregan GDNF se implantan preferentemente en la sustancia negra de un paciente con enfermedad de Parkinson.

5 Ya que es probable que las células no autólogas induzcan una reacción inmunitaria cuando se administran al cuerpo, se han desarrollado varios enfoques para reducir la probabilidad de rechazo de células no autólogas. Estos incluyen suprimir el sistema inmunitario del receptor o encapsular las células no autólogas en membranas semipermeables inmunoaislantes antes del trasplante.

10 Las técnicas de encapsulación se clasifican en general como microencapsulación, que implica vehículos esféricos pequeños y macroencapsulación, que implica membranas de lámina plana y de fibra hueca mayores (Uludag, H. *et al.* Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000; 42: 29-64).

15 Se conocen en la técnica métodos para preparar microcápsulas e incluyen, por ejemplo, los desvelados en Lu MZ, *et al.*, Cell encapsulation with alginate and alpha-phenoxycinnamylidene-acetylated poly(allylamine). *Biotechnol Bioeng.* 2000, 70: 479-83, Chang TM y 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.

20 Por ejemplo, se preparan microcápsulas formando complejos de colágeno modificado con una cubierta de terpolímero de 2-hidroxietil metilacrilato (HEMA), ácido metacrílico (MAA) y metacrilato de metilo (MMA), dando como resultado un espesor de la cápsula de 2-5  $\mu\text{m}$ . Dichas microcápsulas se pueden encapsular adicionalmente con cubiertas de terpolímero adicionales de 2-5  $\mu\text{m}$  para aportar una superficie lisa con carga negativa y para minimizar la absorción de proteínas plasmáticas (Chia, S.M. *et al.* Multi-layered microcapsules for cell encapsulation *Biomaterials.* 2002 23: 849-56).

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

30 Se apreciará que la encapsulación celular mejora cuando se usan cápsulas más pequeñas. Por tanto, el control de calidad, estabilidad mecánica, propiedades de difusión y actividades *in vitro* de 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 descubrió que biocápsulas nanoporosas con un tamaño de poro bien controlado tan pequeño como 7 nm, químicas de superficie adaptadas y microarquitecturas precisas inmunoaislan con éxito microentornos para las células (Williams D. Small is beautiful: microparticle and nanoparticle technology in medical devices. *Med Device Technol.* 1999, 10: 6-9; Desai, T.A. Microfabrication technology for pancreatic cell encapsulation. *Expert Opin Biol Ther.* 2002, 2: 633-46).

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

40 En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, las células se pueden administrar ya sea por sí solas o, preferentemente, como parte de una composición farmacéutica que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 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 fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un sujeto.

50 En lo sucesivo en el presente documento, la expresión "vehículo fisiológicamente aceptable" se refiere a un vehículo o diluyente que no produce irritación significativa a un sujeto y no anula la actividad y las propiedades biológicas del compuesto administrado. Son ejemplos, sin limitación, de vehículos propilenglicol, solución salina, emulsiones y mezclas de disolventes orgánicos con agua.

55 En el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Los 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.

Según un aspecto preferido de la presente divulgación, el vehículo farmacéutico es una solución acuosa de solución salina.

5 Pueden encontrarse técnicas para formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

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

15 Para cualquier preparación usada en los métodos de la divulgación, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular e *in vitro*. Preferentemente, se formula una dosis en un modelo animal para lograr una concentración o título deseado. Dicha información se puede usar para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos.

20 La toxicidad y eficacia terapéutica de los principios activos descritos en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. Por ejemplo, pueden usarse ratones lesionados con 6-OHDA como modelos animales de enfermedad de Parkinson. Además, se puede usar un ensayo de girasol para ensayar la mejora en la función motora delicada exponiendo los animales a semillas de girasol abiertas durante un periodo de tiempo particular.

25 Se pueden usar ratones transgénicos como un modelo para enfermedad de Huntington que comprende mayores números de repeticiones de CAG que tienen inclusiones intranucleares de huntingtina y ubiquitina en neuronas del cuerpo estriado y la corteza cerebral, pero no en el tronco encefálico, tálamo o médula espinal, que se asemejan estrechamente a los sitios de pérdida de células neuronales en la enfermedad.

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

35 La ruta septohipocámpica, transectada unilateralmente cortando la fimbria, imita el déficit colinérgico de la pérdida de ruta septohipocámpica en enfermedad de Alzheimer. En consecuencia, pueden usarse modelos animales que comprenden esta lesión para ensayar las células de la presente divulgación para tratar la enfermedad de Alzheimer.

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

40 Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivo celular y estudios animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en el ser humano. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración y dosificación pueden ser elegidas por el médico individual a la vista de la condición del paciente, (véase, por ejemplo, Fingl *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", C. 1 p. 1). Por ejemplo, el  
45 paciente con enfermedad de Parkinson puede supervisarse sintómicamente para detectar funciones motoras mejoradas que indican respuesta positiva al tratamiento.

50 Para inyección, los principios activos de la composición farmacéutica pueden formularse en soluciones acuosas. Preferentemente, en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico.

55 La cantidad de dosificación y el intervalo pueden ajustarse individualmente a niveles del principio activo que son suficientes para regular de manera eficaz la síntesis de neurotransmisores por las células implantadas. Las dosificaciones necesarias para lograr el efecto deseado dependerán de características individuales y la vía de administración. Pueden usarse ensayos de detección para determinar las concentraciones en plasma.

60 Dependiendo de la gravedad y sensibilidad de la afección que se va a tratar, la dosificación puede ser una única administración o una pluralidad de administraciones, durando el ciclo de tratamiento de varios días a varias semanas o hasta que se logra disminución de la patología.

65 La cantidad de una composición para administrar dependerá, por supuesto, del individuo que se trate, la gravedad de la afección, la forma de administración, el criterio del médico prescriptor, etc. La dosificación y el momento de administración responderán a una supervisión cuidadosa y continua de la condición de cambio individual. Por ejemplo, a un paciente con enfermedad de Parkinson tratado se le administrará una cantidad de células que es suficiente para aliviar los síntomas de la enfermedad, basándose en las indicaciones de supervisión.

Las células de la presente divulgación pueden administrarse 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 pueden administrarse con otras células capaces de sintetizar un neurotransmisor. Dichas células se describen en la solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 20050265983 de los presentes inventores.

Tras el trasplante, las células de la presente divulgación preferentemente sobreviven en el área enferma durante un periodo de tiempo (por ejemplo, al menos 3 meses), de manera que se observa un efecto terapéutico.

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

Objetos, ventajas, y características novedosas adicionales de la presente divulgación serán evidentes para un experto en la materia al examinar los siguientes ejemplos, que no se pretende que sean limitantes.

### Ejemplos

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la divulgación de una manera no limitante.

En general, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente divulgación incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. 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", Vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se exponen en las patentes de los Estados Unidos n.º 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 y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); se describen exhaustivamente inmunoensayos disponibles en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, patentes de los Estados Unidos N.º 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. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y 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) y 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. Se proporcionan otras referencias generales a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos en las mismas son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

### EJEMPLO 1

#### **Generación y caracterización de células secretoras de factor neurotrófico (NTF-SC) MATERIALES Y MÉTODOS Preparación de lisado plaquetario**

El lisado plaquetario se preparó utilizando un protocolo de congelación y descongelación. Se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP) de donaciones del banco de sangre que se ha determinado que están exentas de agentes infecciosos (es decir, VIH, HTLV, VHC, HBsAg). Las bolsas que contenían PRP se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se descongelaron en un baño de agua a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Después de descongelar, el plasma rico en plaquetas de múltiples donantes se agrupó, se mezcló y se centrifugó a  $14000 \times G$  durante 10 minutos para eliminar las partículas y membranas de las plaquetas. Después el sobrenadante del lisado plaquetario se recogió y se congeló a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El lisado plaquetario se ensayó para determinar la endotoxina, hemoglobina, pH, proteína total, albúmina, osmolalidad, esterilidad y micoplasma.

#### **Aislamiento y proliferación de CMM humanas:**

Se recogieron muestras de médula ósea humana adulta de la cresta ilíaca posterior de donantes humanos adultos, que se sometieron a aspiración de médula ósea, tras 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 de densidad, sobre tubos que contenían UNI-SEP<sub>MAXI</sub>/

UNI-SEP+ (Polisacarosa - Metrizoato de Sodio, NovaMed, Jerusalén, Israel). La fracción de células mononucleares se recogió, se lavó en HBSS y se centrifugó. Las células se resuspendieron en el medio de cultivo 1, se contaron y se sembraron a una concentración de 250.000-350.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces de cultivo tisular de 75 cm<sup>2</sup> (Corning, NY, Estados Unidos). Los matraces se incubaron en una incubadora humidificada a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %.

5 El medio de cultivo 1 consistió en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Biological Industries), complementado con estreptomina 100 µg/ml, penicilina 100 U/ml, nistatina 12,5 unidades/ml (SPN, Biological Industries), L-glutamina 2 mM (Biological Industries), heparina 2 UI/ml (Trima, Kibutz Maabarot, Israel), 2-mercaptoetanol 0,001 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), solución de aminoácidos no esenciales MEM al 1 % (Biological Industries) y lisado plaquetario al 10%. El lisado plaquetario se procesó a partir de plasma rico en plaquetas humano congelado y descongelado (PRP) como se ha descrito anteriormente en el presente documento. 24 h después, el medio de cultivo 1 se aspiró para retirar células no adherentes del matraz. Se permitió que los CMM humanos proliferaran en el medio de cultivo 1, que fue reemplazado 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 cultivo 2 y se sembraron en CellStacks a una densidad de 500-3000 células/cm<sup>2</sup>. El medio de cultivo 2 consiste en DMEM complementado con SPN, glutamina y heparina como en medio de cultivo 1 y PRP 5 %. Los cultivos de CMM se pasaron aproximadamente cada dos semanas. Se realizaron experimentos en las células después de 2-7 pases.

### 20 **Inducción de CMM humano en NTF-SC**

Se colocaron en primer lugar CMM humanas (12.000 células/cm<sup>2</sup>) en DMEM complementado con SPN, L-glutamina 2 mM (Biological Industries), factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) 20 ng/ml, factor de crecimiento de fibroblastos básicos humanos (hbFGF) 20 ng/ml (R&D Systems) y complemento de N2 (Invitrogen). Después de 72 horas, el medio se reemplazó con DMEM complementado con dibutilil AMP cíclico 1 mM (dbAMPc), isobutilmetilxantina (IBMX) 0,5 mM (Sigma-Aldrich), factor de crecimiento derivado de plaquetas humano (PDGF) 5 ng/ml, dominio EGF de neuregulina humana 1-β1/HRG1-β1 50 ng/ml y hbFGF 20 ng/ml (todos de R&D Systems) durante 3 días más.

### 30 **Inmunocitoquímica**

Las CMM y NTF-SC humanas se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se tiñeron con proteína ácida fibrilar antigial 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 de cabra anti-conejo (1:200, Molecular Probes). Para tinción de GDNF, los anticuerpos secundarios fueron anti-conejo de cabra biotinilado (1:200; Jackson Laboratories) y estreptavidina-Alexa-488 (1:200, Molecular Probes). El ADN nuclear se tiñó con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (1:1000, Sigma).

### 40 **Ensayo de neuroprotección in vitro**

Se cultivaron células de la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y (ATCC, Manassas, VA, Estados Unidos) en medios basales que consistían en DMEM con suero de ternero fetal (FCS) al 10 %, L-glutamina 2 mM y SPN (Biological Industries). Las células SH-SY5Y se sembraron en placas de 96 pocillos. Se aplicó a cada pocillo medio acondicionado para CMM o NTF-SC humanas o con medio sin suero (DMEM, Glutamina y SPN) y se expuso inmediatamente a un ataque oxidativo por 6-OHDA (Sigma-Aldrich) durante 24 horas. La viabilidad celular después de los tratamientos se analizó añadiendo solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a cada pocillo, 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 por sextuplicado para cada tratamiento y se comparó con las células tratadas sin suero.

### 50 **Mediciones basadas en ELISA de la secreción de NTF**

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

## 60 **RESULTADOS**

### **Análisis de CMM en medio que contiene lisado plaquetario al 5 %**

El potencial de crecimiento de CMM en un medio que contiene lisado plaquetario (PM) al 5 % en comparación con CMM cultivadas en un medio que contiene FCS (FCS) al 15 % se demuestra en la Figura 1.

Se demuestran análisis de FACS de CMM adherentes a plástico cultivadas en lisado plaquetario al 5 % durante

aproximadamente 4 semanas en las Figuras 2A-I. Las células fueron negativas para marcadores de superficie hematopoyéticos: (CD3, receptor de linfocitos T; monocitos/macrófagos CD14; CD19, marcador de linfocitos B; progenitores hematopoyéticos CD34; marcador pan-leucocítico CD45 y HLA-DR) y teñidos positivos para marcadores de superficie mesenquimatosos CD73, CD105 y CD90.

5

#### **NTF-SC humanas inducidas expresan factores neurotróficos**

El análisis *in vitro* de las NTF-SC reveló su perfil de expresión de NTF. Expresaron marcadores de astrocitos como GFAP y GS. Por otra parte, las NTF-SC expresaron en gran medida las proteínas de GDNF, Proteínas BDNF e IGF-1 según lo indicado por la inmunocitoquímica (Figuras 3A-J). El análisis ELISA mostró que las NTF-SC diferenciadas segregan los factores neurotróficos en el sobrenadante de cultivo. Mientras que las CMM no tratadas secretaron niveles bajos de BDNF y GDNF ( $1216 \pm 725$  pg/10<sup>6</sup> células y  $337 \pm 27$  pg/10<sup>6</sup> células, respectivamente), después de seis días de inducción, las NTF-SC segregaron más de cinco veces más BDNF ( $7117 \pm 1335$  pg/10<sup>6</sup> células) y más del doble de la cantidad de GDNF ( $787 \pm 206$  pg/10<sup>6</sup> células) (Figuras 3K-L).

10

15

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

20

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

El efecto protector de las CMM inducidas *in vitro*, se examinó usando 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 CMM humanas, después de lo cual se eliminó el medio de inducción. Las células inducidas se incubaron después con medio sin suero nuevo durante 24 horas adicionales para permitir la secreción de NTF. Para controles, se utilizaron sobrenadantes de CMM sin tratar incubados en medio sin suero durante 24 h. Las células SH-SY5Y se incubaron con los sobrenadantes y, una hora después, se añadió neurotoxina 6-OHDA a los cultivos. La viabilidad celular se midió 24 horas después, utilizando 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, recogidos de medios de CMM o NTF-SC no tratados, demostraron un mayor porcentaje de viabilidad estadísticamente significativo en presencia de 6-OHDA 32, 48 y 72  $\mu$ M. El medio de NTF-SC demostró un valor protector añadido sobre la supervivencia de las células SH-SY5Y, aunque no se demostró una diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento con medios de NTF-SC inducidos y el tratamiento con medios de CMM sin tratar ( $90,2 \pm 7,4$  %,  $73,2 \pm 9,6$  % y  $55,4 \pm 15,9$  %, respectivamente para el grupo de CMM,  $p < 0,05$  y  $92,4 \pm 5,0$  %,  $93,4 \pm 12,9$  % y  $80,3 \pm 12$  % para el grupo de NTF-SC,  $p < 0,005$ , Figura 4). A 6-OHDA 160  $\mu$ M, la viabilidad celular disminuyó hasta  $15,0 \pm 0,6$  % en el grupo de control y de manera similar en el grupo de CMM ( $11,7 \pm 0,2$  %), mientras que el medio de NTF-SC siguió siendo ligeramente beneficioso ( $17,9 \pm 0,6$  %,  $P < 0,05$  en comparación con ambos grupos).

25

30

35

40

## **EJEMPLO 2**

### **Estudios *in vivo* con las NTF-SC de la presente divulgación MATERIALES Y MÉTODOS**

45

#### **Lesión estriatal inducida por 6-OHDA**

Se usó un total de 63 ratas Sprague-Dawley macho que pesaban 260-300 g (Harlan, Jerusalén, Israel) en este experimento. Se colocaron en condiciones de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad y se cultivaron en jaulas ventiladas individuales (IVC) con acceso a comida y agua a voluntad.

50

Se inyectaron 7  $\mu$ g/2,5  $\mu$ l/sitio de 6-hidroxi dopamina (6-OHDA, Sigma-Aldrich) en dos sitios (total de 14  $\mu$ g de 6-OHDA) en el cuerpo estriado derecho según el atlas de cerebro de rata (43) en 56 animales. Con anestesia con hidrato de cloral, las ratas se colocaron en un marco estereotáctico digital (Stoelting, Wood Dale, IL, Estados Unidos) y se inyectó 6-OHDA en las siguientes coordenadas (en relación con el bregma y duramadre): AP +0,5 ML 2,5 DV -6,0 y AP -0,5 ML 4,2 DV -6,0 a una velocidad de 1  $\mu$ l/minuto con una jeringa Hamilton 701N. La aguja insertada se retiró de cada ubicación después de 5 minutos.

55

#### **Trasplante de células madre**

Se usaron CMM humanas cultivadas en condiciones sin suero durante 6 días o NTF-SC inducidas. 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 (50.000 células/ $\mu$ l o 150.000 células/ $\mu$ l en PBS). Se inyectó un total de 150.000 o 450.000 células/3  $\mu$ l por sitio a una velocidad de 1  $\mu$ l/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 tripano (Sigma-Aldrich) después de cada sesión de trasplante.

65

**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 después, posterior a la lesión dentro del cuerpo estriado tratado. El experimento consistió en los siguientes grupos: el grupo de control se trató con 6-OHDA y con PBS en lugar de tratamiento celular (n=10); los grupos tratados con CMM se trataron con una dosis alta (450.000 células, n=10) o una dosis baja (150.000 células, n=11) de CMM tratadas con medio sin suero; el grupo de NTF-SC se trató con dosis alta (450.000 células, n=10) o dosis baja (150.000 células, n = 11) de NTF-SC inducidas. Otro grupo de animales sin tratar (n=7) se utilizó como controles para el ensayo de campo abierto.

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

Se indujo 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 a partir del primer día del experimento.

**Ensayos conductuales**

El comportamiento rotacional inducido por D-anfetamina se midió durante 90 minutos después de la administración i.p. de 2,5 mg/kg (Sigma-Aldrich) utilizando un dispositivo de rotámetro automático (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 realizó ensayo de campo abierto a los 7 días después del tratamiento introduciendo los animales en un espacio de 50 cm<sup>2</sup> y grabando en vídeo el comportamiento espontáneo de las ratas durante 30 minutos. Las imágenes fueron analizadas por el software EthoVision 3 (Noldus, Países Bajos).

**IRM**

Se indujo anestesia con isoflurano al 4 % en O<sub>2</sub> al 95 % y se mantuvo con isoflurano ~1-2 % (Vetmarket Ltd., Petah-Tikva, Israel) a un caudal de ~1 litro/minuto. La frecuencia respiratoria se supervisó a lo largo de todos los experimentos. La temperatura corporal se mantuvo mediante agua en circulación a 37 °C. Se realizaron exploraciones de IRM en un Bruker Biospec de 7,0T/30 cm equipado con un sistema de gradiente capaz de producir pulsos de gradiente de hasta 400 mT/m (Bruker Biospin, Karlsruhe, Alemania). Se usó una bobina de cuerpo como la bobina de transmisión y se usó una bobina de cuadratura de rata como la bobina de recepción. Se realizaron experimentos de IRM el día 35 después del trasplante e inyección de 6-OHDA. Las exploraciones incluyeron: Imágenes ponderadas de T<sub>2</sub> (IP) RARE8 (TR/TE=3500/75 ms). El campo de visión (FOV) fue de 2,56x2,56, el tamaño de la matriz fue 256x128 rellenado con ceros hasta 256x256 y se eligió un grosor de corte de 700 µm, se recogieron 15 cortes. Adicionalmente, se recogieron imágenes tridimensionales (3D) de gradiente de eco (GE) (FLASH, TR/TE=150/14 ms, ángulo de giro =15 °) con un FOV de 2,56x2,56x0,48 y un tamaño de matriz de 128x96x24 (rellenado con ceros hasta 128x128x32), lo que da como resultado una resolución espacial de 200x200x150 (µm)<sup>3</sup>. Las imágenes se presentan como datos sin procesar sin ningún procesamiento de imágenes.

**Inmunohistoquímica**

Al final del experimento (7 o 50 días después del tratamiento), los animales se perfundieron por vía transcardiaca con PBS helado después de una solución de paraformaldehído al 4 % y sacarosa al 4 % en tampón 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 crioprotección en sacarosa al 30 % durante 48 horas adicionales antes de congelar. Se procesaron 12 muestras mediante NSA (4 del grupo de PBS, 4 del grupo de CMM altas, 4 del grupo de NTF-SC altas y 4 animales tratados con dosis alta de células NTF-SC que se sacrificaron después de una semana). Estas muestras se cortaron en serie en cortes frontales de 40 µm y cada 8° corte a lo largo del cuerpo estriado se tiñó para detectar el antígeno de núcleos humanos y la sección adyacente para tirosina hidroxilasa (TH).

Los cerebros de animales tratados con células marcadas con SPIO se cortaron en sentido transversal (8 µm) y se

5 tiñeron con tinción de azul de Prusia (Sigma-Aldrich, según las instrucciones del fabricante) para la detección de partículas de Fe. Se inmunotiñeron cortes adyacentes con anticuerpo antinuclear humano. En resumen, los cortes se hirvieron en microondas en un tampón de citrato para desenmascaramiento de antígeno y después se sumergieron en una solución de bloqueo y permeabilidad (suero de ternero fetal al 10 %, albúmina de suero bovino al 2 %, glicina al 1 % y Triton al 0,05 %). Después del bloqueo, las muestras se incubaron durante una noche con un anticuerpo antinuclear humano (1:200) a 4 °C. Los cortes se tiñeron con IgG anti-ratón conjugada con Alexa Fluor 568 (Invitrogen, 1:500). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (1:500, Sigma-Aldrich). Se realizó tinción de CD68 (1:500, Serotec, Oxford, Reino Unido) de manera similar, excepto por el proceso de desenmascaramiento de antígeno y el uso de IgG anti-ratón biotinilada (lista para usar, Zymed-Invitrogen) seguido de estreptavidina Alexa Fluor 568 (1:500, Invitrogen).

### **Estudio estereológico**

15 Todas las secciones teñidas para TH (n = 4 animales de cada grupo) se cuantificaron para el 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 todo o casi todo el cuerpo estriado de cada lado y cada animal. Las imágenes fueron cuantificadas después por el software ImagePro 5.1 que midió el área total de tinción positiva, según un punto de corte unificado. El operador del software desconocía el origen de las imágenes. El daño se calculó como el porcentaje del área positiva para TH en el cuerpo estriado lesionado dividida por el área positiva para TH del lado contralateral sin tratar.

### **Mediciones de dopamina por HPLC**

25 Los animales (n=5 cada uno de los siguientes grupos: PBS, dosis alta de CMM y dosis alta de NTF-SC) se sacrificaron con CO<sub>2</sub> y sus cerebros se retiraron rápidamente y se colocaron en hielo. Los cuerpos estriados se disecaron y se pesaron. Cada muestra se sonicó en 1 ml de ácido perclórico 0,1 M helado hasta que se logró la homogeneidad. Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos (12.000 rpm, 4 °C) y los sobrenadantes se recogieron y se transfirieron a tubos de filtro de nailon de 0,2 µm (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 fase inversa de C18, Columna LUNA de 3 µ (100 mmx2 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 sodio 50 mM, EDTA 0,03 mM, dietilamina HCl 10 mM y octil sulfato de sodio 2,2 mM (pH 3,2), metanol 30 ml/l y dimetilacetamida 22 ml/l a un caudal de 0,4 ml/min. El máximo de dopamina se determinó mediante detección electroquímica a un potencial de 0,6 V. El contenido de dopamina en la muestra se calculó extrapolando el área máxima a partir de una curva patrón (intervalo 1-200 pg de dopamina) construida en las mismas condiciones durante cada ciclo por la estación de trabajo Maxima (Waters). Los resultados se normalizaron con respecto al peso de la muestra.

### **Análisis estadístico**

40 Los resultados se expresan como medias ± error típico. El ensayo de t de Student se utilizó para comparar las medias de dos grupos. Se realizaron comparaciones entre varios grupos mediante ANOVA con análisis post hoc de Scheffe. También se analizaron ensayos repetidos (rotaciones inducidas por anfetamina) mediante el ensayo de ANOVA repetido. Los cálculos estadísticos se realizaron usando SPSS v. 13.

## **RESULTADOS**

### **Las NTF-SC humana trasplantadas atenúan el comportamiento rotacional inducido por 6-OHDA en ratas**

50 En general, los animales tratados de todos los grupos toleraron bien las diversas terapias, incluyendo inmunosupresión. De 56 animales, 2 murieron dentro del 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 ensayado (excluyendo controles sanos para el ensayo de campo abierto) y desde ese momento en adelante, casi todos los animales aumentaron de peso de manera similar.

55 El grupo de control (PBS) demostró un aumento estadísticamente significativo de rotaciones ipsilaterales inducidas por anfetamina el día 14 después de la lesión (2,71±0,79 rotaciones ipsilaterales netas por minuto) y el día 28 (4,11±0,86), alcanzando un nivel estable en la medición del día 42 (4,74±1,07) lo que sugiere que el proceso patológico de muerte de las terminales nerviosas dopaminérgicas nigroestriatales fue de naturaleza progresiva durante al menos 28 días.

65 No hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes dosis celulares, independientemente del tipo de tratamiento y el día de medición. En el grupo de dosis baja de CMM sin tratar, se descubrió que los animales rotaban a una velocidad de 3,54±0,63, 2,61±0,55 y 3,25±0,75 vueltas ipsilaterales netas por minuto los días 14, 28 y 42 después del tratamiento, respectivamente, mientras que el grupo tratado con dosis altas de CMM mostró medidas menores pero no estadísticamente significativas: 2,05±0,41, 2,22±0,52 y 2,30±0,78 en los mismos

intervalos temporales. 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 bajas en comparación con  $2,12 \pm 0,42$ ,  $1,49 \pm 0,32$  y  $1,67 \pm 0,52$  en el grupo tratado con dosis altas. Por lo tanto, los grupos de dosis altas y bajas se combinaron para otro análisis estadístico. Se descubrió que ambos tipos de tratamiento celular produjeron un efecto no progresivo en el comportamiento de rotación. El grupo de NTF-SC demostró un resultado menor en la primera medición catorce días después del tratamiento, aunque no es diferente de los otros grupos de forma estadísticamente significativa. 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 CMM 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 temporales,  $p < 0,05$  en comparación con el grupo de PBS). En resumen, el grupo tratado con CMM no demostró una mejora estadísticamente significativa en comparación con el grupo de control (PBS). Por el contrario, para las células que experimentan el tratamiento basado en inducción novedoso, los grupos de NTF-SC, se observó una disminución notable de 25 % y 45 % después de 14 y 28 días tras el trasplante (Figura 5A).

Todos los animales tratados con 6-OHDA demostraron hipoactividad motora general en el ensayo de campo abierto el día 7 después del tratamiento. Los índices de actividad del grupo de control fueron similares a los del grupo tratado con CMM. La distancia total recorrida por los animales tratados con NTF-SC en dosis bajas y altas combinadas fue de 3667 cm en promedio, que fue un 22 % mayor en comparación con el grupo de control (2989 cm) y 17 % mayor que el grupo tratado con CMM en dosis bajas y altas combinadas (3119 cm) en promedio. Sin embargo, no hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ( $p = 0,054$ ) (Figura 5B).

***El trasplante de NTF-SC humanas dio como resultado una mayor conservación del área positiva para TH en el cuerpo estriado lesionado con 6-OHDA***

La metodología del estudio estereológico se ilustra en las Figuras 6A-E. Se descubrió que las lesiones inducidas por 6-OHDA con este protocolo específico disminuyeron el área estriatal positiva para TH 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, CMM y NTF-SC, demostraron un efecto protector. Sin embargo, solamente las NTF-SC produjeron un área positiva para TH mayor estadísticamente significativa como porcentaje del lado no tratado ( $31,15 \pm 6,27$  %), aumentándola más de dos veces en comparación con el grupo de control, mientras que el tratamiento con CMM no logró inducir una diferencia estadísticamente significativa ( $23,11 \pm 3,5$  %, Figuras 7A-D).

Resulta interesante que, al subdividir las diferentes áreas del cuerpo estriado en secciones de aproximadamente 1 mm de espesor, se descubrió que las NTF-SC eran beneficiosas en el área anterior, en lugar de la posterior, del cuerpo estriado, la región de trasplante (Figura 7E).

***El trasplante celular inhibió el agotamiento de dopamina inducido por 6-OHDA en los cuerpos estriados lesionados***

Se descubrió que ambos tipos de tratamientos celulares, es decir, CMM y NTF-SC, evitaban las caídas de los niveles de dopamina estriatal inducidas por la inyección de neurotoxina en más de 2,5 veces en comparación con el grupo de 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 los cuerpos estriados lesionados contenía solamente  $21,3 \pm 3,8$  % de dopamina medida en comparación con el lado no tratado, los animales tratados con CMM ( $n = 5$ ) tuvieron un promedio de  $68,7 \pm 8,6$  % y el grupo tratado con NTF-SC ( $n = 5$ ) tenía niveles de dopamina estriatal de  $72,4 \pm 16,4$  % 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 mediante histología e IRM in vivo***

Se realizó seguimiento celular en tres puntos temporales diferentes, aplicando IRM *in vivo* y tres evaluaciones histológicas diferentes. Se realizó IRM *in vivo* 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 tridimensionales ponderadas para  $T_2^*$  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). Esto último probablemente resultó de hemorragia en el sitio de inyección de 6-OHDA. No se pudieron ver otras hipointensidades en el área entre las dos inyecciones. Por el contrario, Las imágenes tridimensionales ponderadas para  $T_2^*$  del grupo tratado con células demostraron una ruta de migración desde el sitio de la inyección de NTF-SC al cuerpo estriado (Figura 8B-C). La imagen bidimensional ponderada para  $T_2^*$  se muestra en la Figura 8G para referencia anatómica. La tinción histológica con azul de Prusia para las partículas de hierro estuvo en excelente acuerdo con las hipointensidades en las imágenes de RM (Figura 8D).

Estudios histológicos adicionales dirigidos a la búsqueda de antígenos nucleares humanos. Se sacrificaron cuatro animales seleccionados al azar tratados con la dosis mayor de NTF-SC humana para estudios histológicos en el primer punto temporal, es decir, 7 días después de haber sido tratados con 6-OHDA. Los cerebros de los animales

se cortaron en serie como se ha descrito. Usando los métodos de 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 de ensayo, se descubrió que estaban presentes células a lo largo de 620-1920  $\mu\text{m}$  desde el sitio de trasplante en secciones adyacentes, lo que indica el inicio de la migración celular. Para cuantificar la tasa de supervivencia de las células, todas las células con morfología normal se contaron manualmente, (es decir, las que tenían un aspecto suave y no comprendían núcleos segmentados con un colorante positivo. Esta medida reveló que solamente 0,34 $\pm$ 0,1 % de las células sobrevivieron una semana después del trasplante.

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 de PBS, el grupo tratado con CMM alto y el grupo tratado con NTF-SC. Este examen no reveló casi células. De hecho, alrededor del sitio de trasplante, solo se encontraron restos de células y signos de hemorragia antigua. Después de cortar otros cerebros en secciones de 8  $\mu\text{m}$  y usar una tinción con base fluorescente más sensible, se observó una pequeña minoría de las células humanas trasplantadas después de 50 días. La tinción se realizó en cortes transversales adyacentes a aquellos en los que se encontró un colorante azul de Prusia positivo y todas las células positivas para el antígeno nuclear humano se demostraron a lo largo de la ruta de migración. Sin embargo, utilizando 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, lo que indica que los depósitos de hierro no indican necesariamente células vivas en el último día del experimento (Figuras 8E-G). La tinción de CD68 para la identificación de macrófagos en la ruta de las células fue negativa (datos no mostrados). En resumen, se observó migración de células humanas dentro del cuerpo estriado de rata lesionado mediante IRM *in vivo* y mediante análisis histológico; se descubrió 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 CMM derivadas de médula ósea humana adulta en NTF-SC. Dichas células producen y liberan varios NTF, incluyendo BDNF y GDNF. Estos medios acondicionados a células rescataron células de neuroblastoma tratadas con 6-OHDA. En ratas ciclosporinizadas con lesiones de 6-OHDA estriatales unilaterales, el trasplante ipsilateral de NTF-SC humano fue beneficioso y atenuó parcialmente las rotaciones inducidas por anfetamina y otras conductas anómalas, reducción de los niveles de dopamina estriatal, así como la pérdida de la red de terminales nerviosos inmunorreactivos para TH. También se descubrió que las NTF-SC migraron a lo largo del cuerpo calloso alrededor de la lesión de 6-OHDA del cuerpo estriado hacia el cuerpo estriado anterior, en lugar de migrar directamente al área de la lesión.

Se descubrió que las NTF-SC segregan niveles significativamente mayores de NTF en comparación con las CMM sin tratar. Este protocolo aumentó los niveles de BDNF y GDNF 2,3 y 5,8 veces, respectivamente, en comparación con CMM humanas de control. Los estudios inmunocitoquímicos revelaron que el proceso de inducción es robusto, ya que casi todas las células son positivas para el NTF ensayado.

El suministro de NTF basado en células puede ser potencialmente superior a la infusión directa de NTF, ya que no requiere instrumentos de trasplante, tales como catéteres permanentes, en lugar de un solo procedimiento quirúrgico. La inducción basada en el medio actualmente propuesta también puede ser superior a la administración de vectores víricos para lograr la sobreexpresión genética, ya que evita problemas de seguridad. Por otra parte, los presentes inventores usaron medios exentos de xeno tanto para la producción del cultivo de CMM como para su procedimiento de inducción hasta el trasplante, haciendo el presente método más práctico y aceptable para uso clínico. El medio de cultivo a base de plaquetas no alteró las características mesenquimatosas básicas de las CMM con respecto a marcadores de CD y diferenciación del linaje mesenquimatoso.

Se usan células de neuroblastoma humano expuestas a 6-OHDA como modelo *in vitro* modelo para EP, debido a procesos celulares similares que se producen en las neuronas dopaminérgicas degenerativas, tales como tensión oxidativa y apoptosis. Los medios acondicionados de CMM y NTF-SC protegieron la línea celular de neuroblastoma de una muerte celular inducida por 6-OHDA. Aunque tanto CMM como NTF-SC demostraron efectos beneficiosos, el tratamiento basado en NTF-SC fue más potente en la protección del 6-OHDA, específicamente en mayores concentraciones de lesiones. El medio acondicionado utilizado en este experimento consistió en un medio sin suero colocado en las células 24 horas después de la inducción. Por lo tanto, consistía solo en los factores segregados por las células y no medios de inducción. Esto implica fuertemente que el mecanismo subyacente a la protección observada es la presencia de NTF segregados.

Para realizar ensayos *in vivo* para la suposición de que el tratamiento basado en NTF-SC es beneficioso en un modelo animal de EP, los presentes inventores calibraron en primer lugar el modelo de rata hemiparkinsoniana inducido por 6-OHDA bien establecido inyectando la dosis específica de 6-OHDA en dos localizaciones estriatales. A diferencia de las inyecciones en el haz prosencefálico mediano, los presentes inventores utilizaron un modelo de EP relativamente suave y progresivo, probablemente representando una fase temprana de la EP en sujetos humanos. El tratamiento de trasplante celular se administró el día de la inyección de 6-OHDA, apuntando de este modo a la neuroprotección, en lugar de a la regeneración de terminales dopaminérgicos ya perdidos. Los animales fueron examinados por dos pruebas conductuales bien documentadas: rotaciones inducidas por anfetaminas y actividad

motora espontánea en campo abierto.

El efecto del tratamiento con NTF-SC con respecto a rotaciones inducidas por anfetaminas fue comparable al observado 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 40 % en comparación con el grupo de control indica que la presente estrategia terapéutica, de emplear células madre como inductores de neuroprotección, es eficaz y comparable a las estrategias de reemplazo de células dopaminérgicas. El grupo tratado con NTF-SC también demostró una tendencia positiva en el ensayo de campo abierto, mientras que las CMM no alteraron el comportamiento hipoactivo en comparación con el grupo tratado con PBS.

Tras la lesión de 6-OHDA, el área de fibras inmunorreactivas de TH estriatales del grupo tratado con CMM era mayor que en los animales tratados con PBS. Sin embargo, solo el grupo tratado con NTF-SC demostró una destrucción menor estadísticamente significativa de las terminales nerviosas DA confirmada por un área notablemente mayor positiva para TH en comparación con el grupo tratado con PBS. Como se ha indicado, solo la parte más anterior del cuerpo estriado se benefició del tratamiento con NTF-SC, a una distancia del sitio de trasplante. Es interesante indicar que en esa área del cuerpo estriado, el daño no fue tan grave como en la sección posterior. Por lo tanto, NTF-SC puede resultar más beneficiosa en un tejido moderadamente lesionado, pero no en un estado de pérdida completa o casi completa de terminales nerviosas dopaminérgicas. La ruta migratoria de las células trasplantadas se observó a través del cuerpo caloso hacia las partes anteriores del cuerpo estriado y no directamente desde el sitio de trasplante hasta la lesión. Esto podría ser una indicación de que las células supervivientes afectaron al cuerpo estriado anterior, en lugar del posterior.

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

Un problema 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 temporales para abordar este tema. Utilizando IRM *in vivo* los presentes inventores pudieron demostrar la capacidad de migración de otras células, que estuvo altamente correlacionada con la tinción histológica de Fe. Se observó una ruta migratoria que evitaba el sitio de lesión a lo largo del cuerpo caloso y conducía al cuerpo estriado anterior. Dicha migración celular prueba dos temas 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 viajaba a lo largo de una ruta específica.

En un intento de cuantificar el número de células supervivientes, se utilizó 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 fueron rechazadas una semana después del trasplante y que no se encontraron células en el cuerpo estriado tratado después de 50 días, aunque se proporcionó terapia inmunosupresora. Esta baja tasa de supervivencia probablemente se deba al rechazo inmunitario y, en cierta medida, a la muerte celular inmediata debida a fuerzas de corte al pasar a través de una jeringa delgada al tejido. Cuando se utilizó un método más sensible, con una mayor relación de señal con respecto a ruido, se destacaron las células supervivientes, a medida que el tejido se cortaba en secciones delgadas de 8 µm y se usó un colorante fluorescente. Por otra parte, la supervivencia de las células en la ubicación específica en la que se encontraron se vio respaldada por su alta correlación con las imágenes de RM y la tinción de azul de Prusia para partículas de hierro en las muestras de ensayo 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 prueba adicional de la supervivencia de las células trasplantadas migratorias. Por lo tanto, está implícito que aunque solo una minoría de las células sobrevivió a lo largo del experimento, fueron suficientes para inducir el efecto beneficioso descrito en el cuerpo estriado lesionado. Otra posibilidad importante es que las células trasplantadas ejercen su plena eficacia beneficiosa poco después de su colocación en el cuerpo estriado y que no hubo necesidad adicional de su presencia completa más adelante.

### EJEMPLO 3

#### ***Células madre mesenquimatosas humanas diferenciadas en factores neurotróficos que segregan células realizan captación de glutamato***

El presente estudio se realizó para determinar si la inducción de hCMM en adultos en NTF-SC aumenta su capacidad para realizar captación de glutamato y además para determinar si esta captación se redujo significativamente mediante inhibidores de la captación de glutamato.

### MATERIALES Y MÉTODOS

***Diferenciación in vitro:*** Se cultivaron CMM de donantes y se diferenciaron como se ha detallado en el Ejemplo 1 anteriormente en el presente documento.

***Captación de glutamato:*** La captación de glutamato se evaluó usando [<sup>3</sup>H] D-aspartato (Amersham Pharmacia

Biotech, Roosendaal, Países Bajos), un análogo transportable de L-glutamato, que no interactúa con receptores de glutamato y no se metaboliza. Se sembraron CMM diferenciadas e indiferenciadas en placas de 24 pocillos recubiertas con poli-L-lisina, a una concentración de  $2,5 \times 10^4$  células por pocillo. Las células sembradas en placas se mantuvieron en medio sin suero (DMEM complementado con SPN y L-glutamina como se ha especificado para el medio plaquetario anterior) durante 24 horas. Las células se aclararon dos veces con 0,5 ml de tampón de Krebs (HEPES 25 mM pH 7,4, KCl 4,8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 mM,  $\text{CaCl}_2$  1,3 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,2 mM, glucosa 6 mM y NaCl 140 mM) precalentado hasta 37 °C. Las células se incubaron en 0,5 ml de tampón de Krebs precalentado y [ $^3\text{H}$ ] D-aspartato a una concentración final de 50 nM. La captación se detuvo después de 20 minutos mediante tres aclarados con tampón de Krebs sin  $\text{Na}^+$  frío (HEPES 25 mM, pH 7,4, KCl 4,8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 mM,  $\text{CaCl}_2$  1,3 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,2 mM, glucosa 6 mM y cloruro de colina 120 mM-NaCl se reemplazaron por cloruro de colina a la misma osmolaridad). Las células se lisaron con 0,5 ml de NaOH 1 M. La radioactividad de 350  $\mu\text{l}$  se determinó por recuento de centelleo líquido. Se retiraron 150  $\mu\text{l}$  de lisado para los ensayos de concentración de proteínas realizados usando ensayo de Bradford (Bio-Rad Laboratories Ltd.). Se realizaron ensayos sin  $\text{Na}^+$  en 0,5 ml de tampón de Krebs sin  $\text{Na}^+$  precalentado hasta 37 °C. Se realizó inhibición de la captación de glutamato utilizando ácido L-trans-pirrolidina-2,4-dicarboxílico 0,314  $\mu\text{M}$  (t-PDC, Sigma-Aldrich St. Louis), se añadió después del segundo aclarado y se incubó durante 15 minutos antes de la adición de [ $^3\text{H}$ ] D-aspartato. Se logró inhibición competitiva usando D-metil-aspartato frío (no marcado radioactivamente) a una concentración final de 50 nM sobre el [ $^3\text{H}$ ] D-aspartato marcado.

## RESULTADOS

El transporte de glutamato funcional en CMM y NTF-SC cultivadas se evaluó midiendo la cantidad de [ $^3\text{H}$ ] D-aspartato captado por las células. [ $^3\text{H}$ ] D-aspartato es un análogo de glutamato transportable que no interactúa con los receptores de glutamato y no se metaboliza. Por tanto, este ensayo proporciona una fuerte indicación de la capacidad de las células para realizar captación de glutamato.

NTF-SC realizan considerable captación de [ $^3\text{H}$ ] D-aspartato como se muestra en la Figura 9. La captación de [ $^3\text{H}$ ] D-aspartato aumentó significativamente cuando se indujeron CMM en NTF-SC ( $P < 0,0001$ ). Cuando el ensayo se realizó en un tampón sin  $\text{Na}^+$ , la captación se redujo en un 57,5 %. Asimismo, 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 CMM a NTF-SC aumenta la captación de glutamato, que NTF-SC realiza captación significativa de glutamato y que esta captación implica transporte tanto independiente como dependiente de  $\text{Na}^+$ .

## CONCLUSIÓN

Este estudio indica la capacidad de las células madre derivadas de la médula ósea para captar glutamato. Esta capacidad mejora drásticamente después de la inducción de hCMM a NTF-SC. El glutamato es extremadamente ubicuo en el SNC humano, sin embargo, la sobreexposición al glutamato es muy tóxica. Se sabe desde hace mucho tiempo que la neurotoxicidad del glutamato contribuye a la patogenia de trastornos neurológicos tales como isquemia cerebral, EA, EP, EH, epilepsia y ELA.

El trasplante de células NTF-SC cerca del sitio de lesión podría proporcionar protección neuronal de la toxicidad del glutamato al regular los niveles de glutamato extracelular sin interferir con la transmisión neuronal del glutamato adecuada. Los inhibidores de la liberación de glutamato y antagonistas de receptores ya se están usando para tratar varias afecciones neurológicas. Riluzole, un fármaco utilizado en el tratamiento de la ELA y el trastorno obsesivo compulsivo (TOC) reduce la liberación de glutamato. Se están ensayando antagonistas del glutamato en el ictus con la esperanza de limitar el tamaño y la gravedad de la lesión isquémica y ya se emplean en varios fármacos antiepilépticos. En la actualidad, se están sometiendo a ensayos clínicos antagonistas específicos del receptor de glutamato en el tratamiento de la EA. No obstante, esta solución interfiere con las funciones naturales del glutamato, aumentando la probabilidad de efectos secundarios graves, reducido por el uso de NTF-SC.

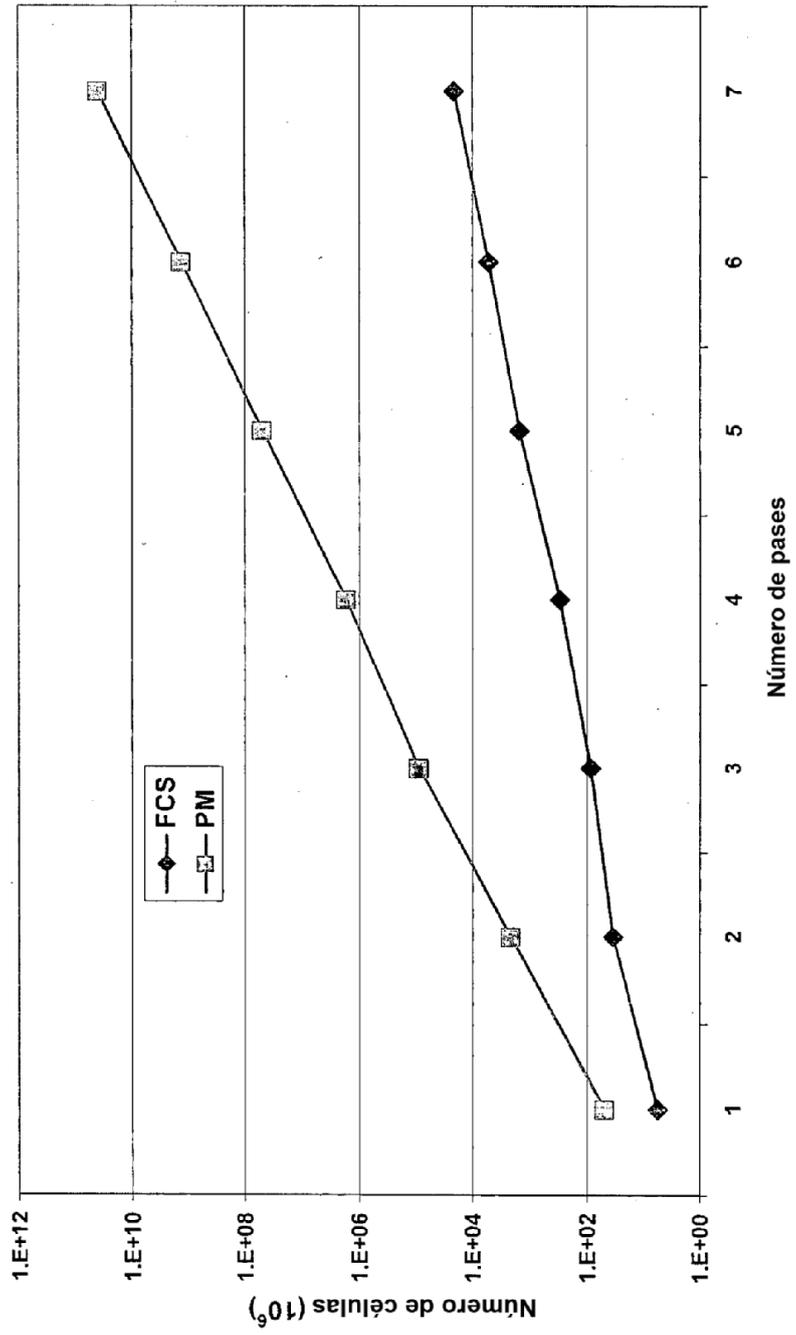
El efecto terapéutico combinado de los factores neurotróficos y la captación de glutamato proporciona las mejores probabilidades de supervivencia de neuronas propensas a la degeneración en todos y cada uno de los diferentes trastornos neurológicos.

**REIVINDICACIONES**

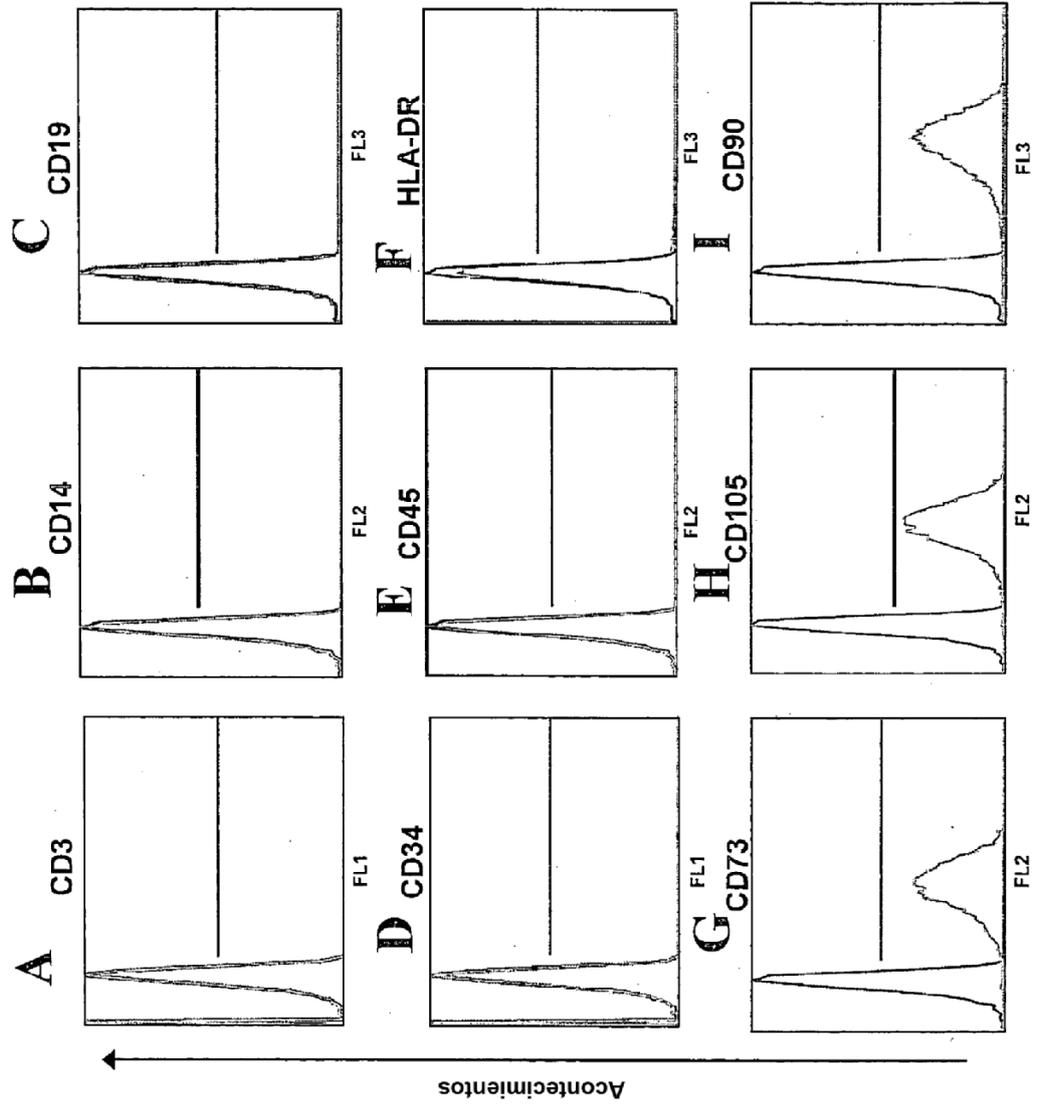
- 5 1. Una célula humana no manipulada genéticamente, aislada, que puede obtenerse mediante la diferenciación de una célula madre mesenquimatosa indiferenciada que se ha incubado en un medio que comprende lisado plaquetario, en donde la célula segrega factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y no segrega factor de crecimiento nervioso (NGF) en donde una secreción basal de dicho BDNF es al menos cinco veces mayor que una secreción basal de dicho BDNF en una célula madre mesenquimatosa indiferenciada, expresando dicha célula madre mesenquimatosa indiferenciada CD73, CD90 y CD105 y no expresando CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR, en donde dicha secreción basal de dicha CMM indiferenciada se produce en ausencia de estimulantes.
- 10 2. La célula humana aislada de la reivindicación 1, que capta al menos 10 veces más glutamato de su entorno que una célula madre mesenquimatosa indiferenciada que expresa CD73, CD90 y CD105 y no expresa CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR.
- 15 3. La célula de la reivindicación 1, en donde dicha diferenciación se efectúa usando un agente de diferenciación seleccionado del grupo que consiste en factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), neuregulina 1-β1 humana, FGF2, EGF, N2, IBMX y AMPc.
- 20 4. La célula de la reivindicación 1, en donde dicho agente de diferenciación comprende cada uno de los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), neuregulina 1-β1 humana, FGF2, EGF, N2, IBMX y AMPc.
5. La célula de la reivindicación 1, en donde dicha célula madre mesenquimatosa se ha incubado en dicho medio que comprende lisado plaquetario durante al menos cuatro semanas.
- 25 6. La célula de la reivindicación 1, en donde dicho medio carece de suero.
7. La célula de la reivindicación 1, en donde dicha diferenciación se efectúa incubando dichas células madre mesenquimatosas en un primer medio de diferenciación que comprende factor de crecimiento epidérmico hEGF y/o factor de crecimiento de fibroblastos básico; e incubando posteriormente dichas células madre mesenquimatosas en un segundo medio que comprende factor de crecimiento derivado de plaquetas y neuregulina humana 1-β1.
- 30 8. La célula de la reivindicación 1 para su uso en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno del SNC.
- 35 9. La célula para el uso de la reivindicación 8, en donde la enfermedad o trastorno del SNC se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, epilepsia, esclerosis lateral amiotrófica, ictus, encefalomiелitis autoinmunitaria, neuropatía diabética, neuropatía glaucomatosa, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington.

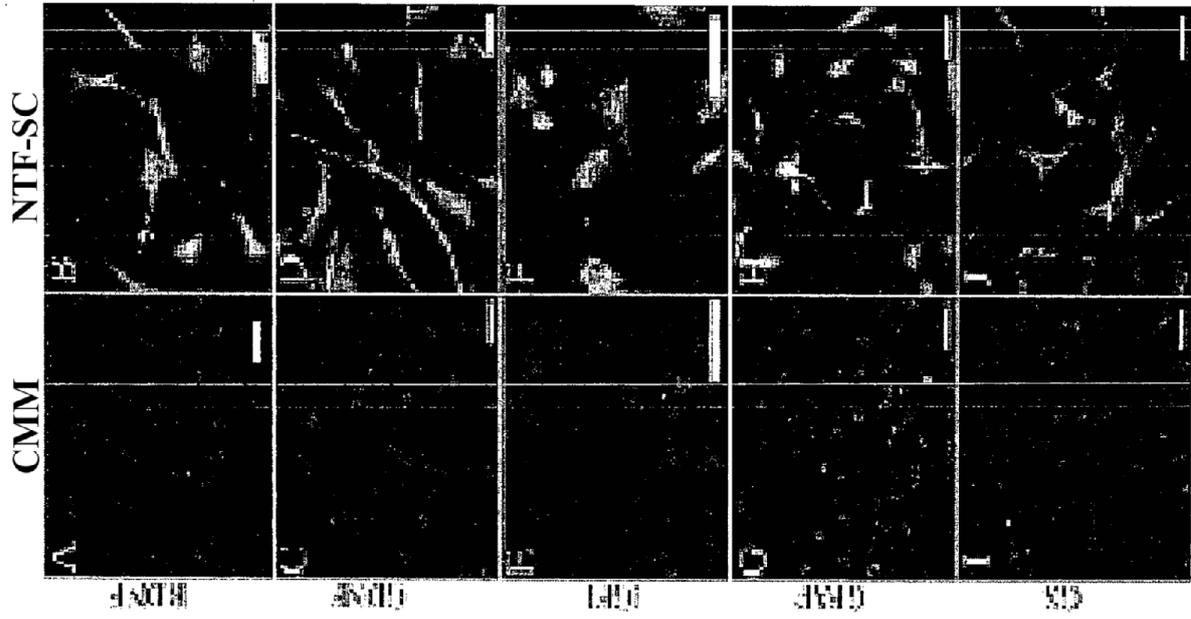
40

FIG. 1



**FIGs. 2A-I**





**FIGs. 3A-J**

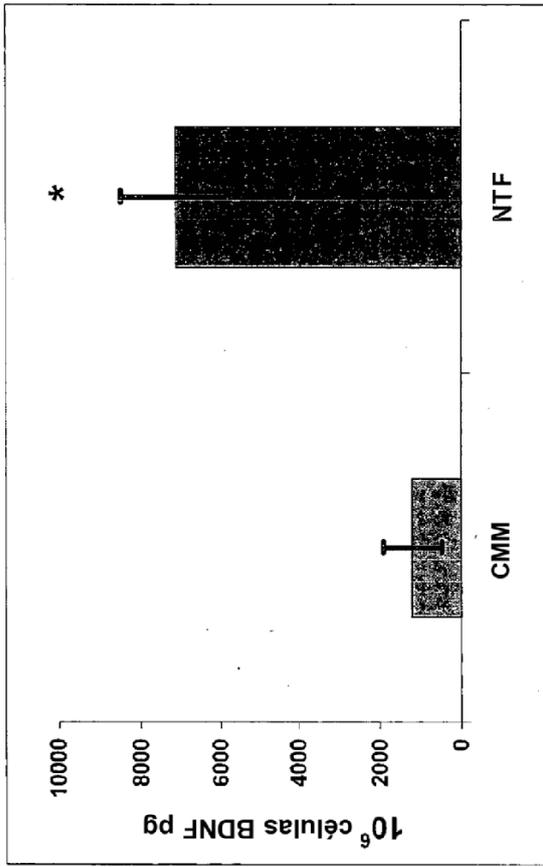


FIG. 3K

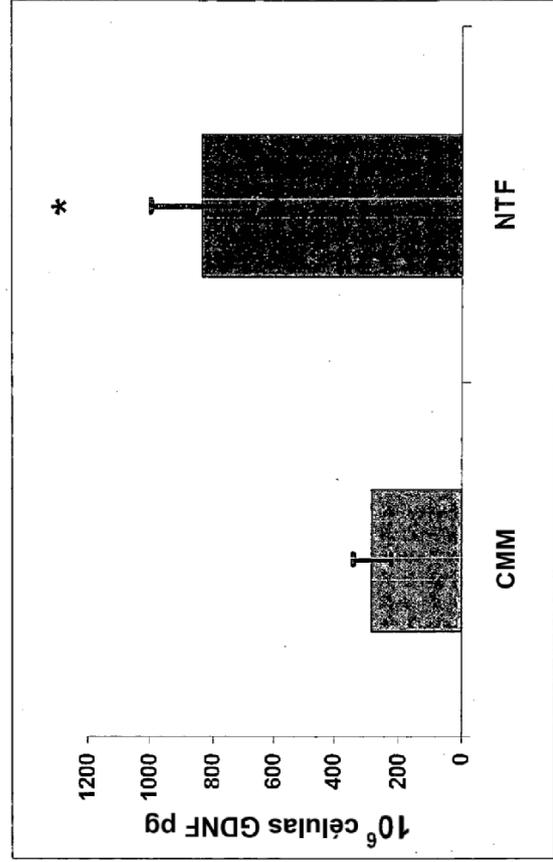


FIG. 3L

FIG. 4

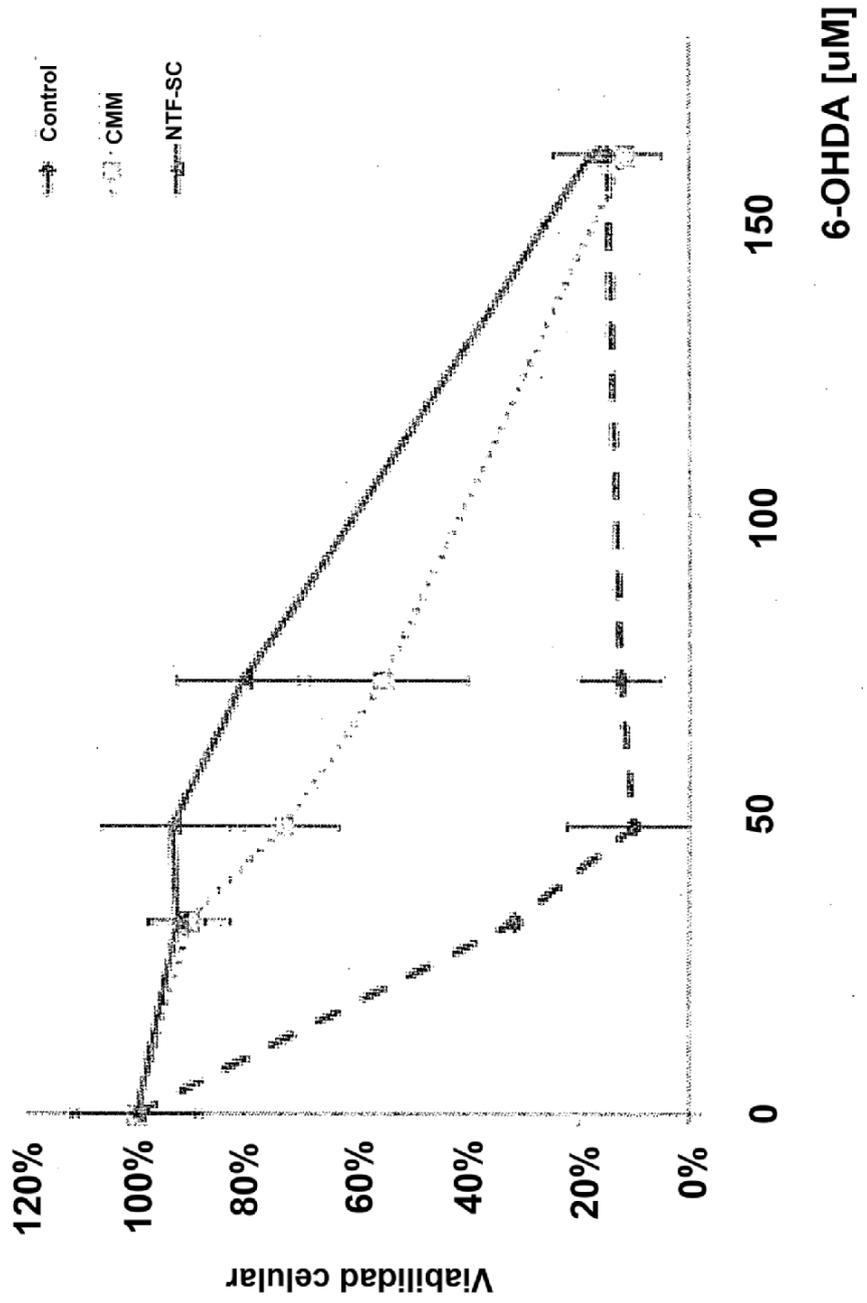


FIG. 5A

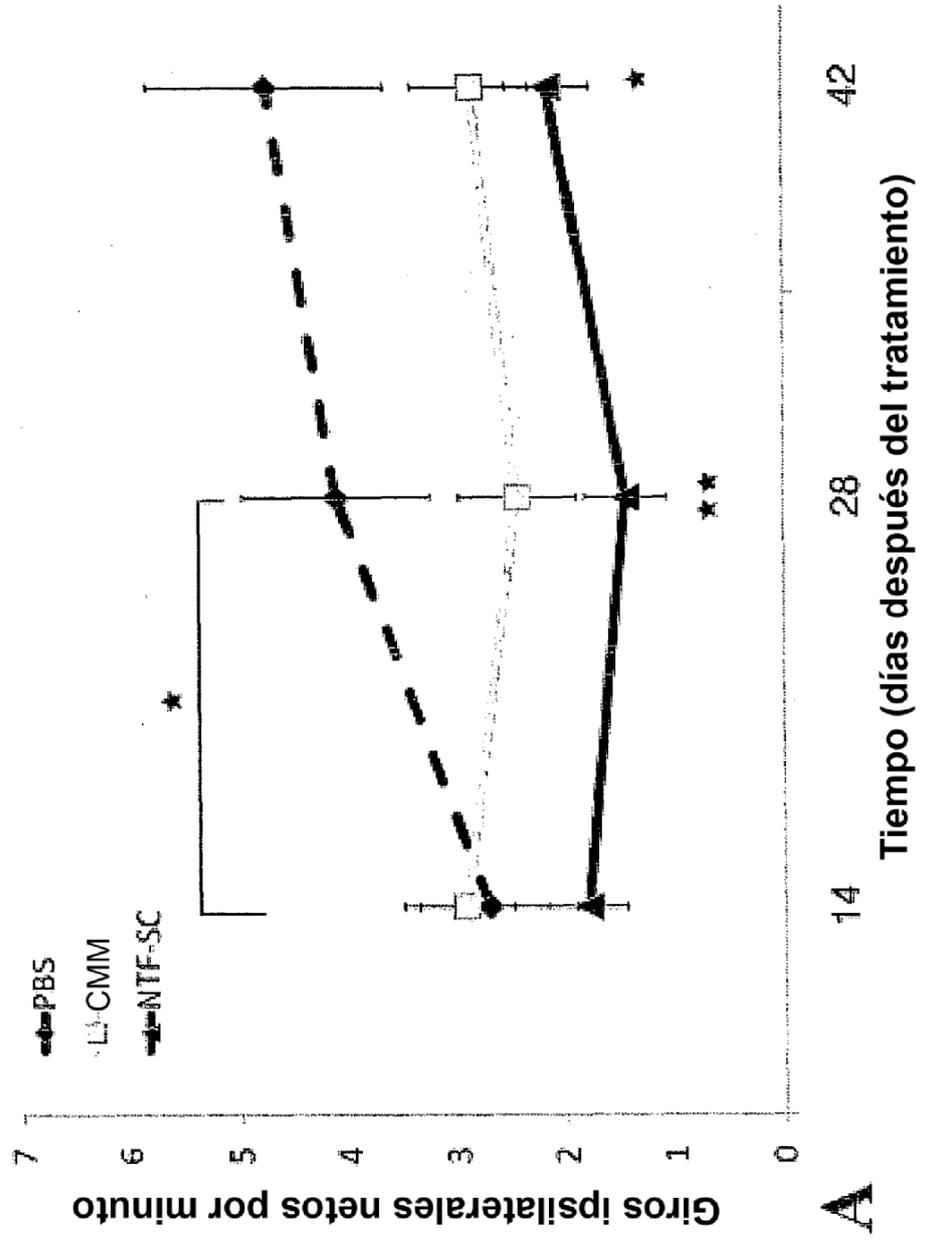
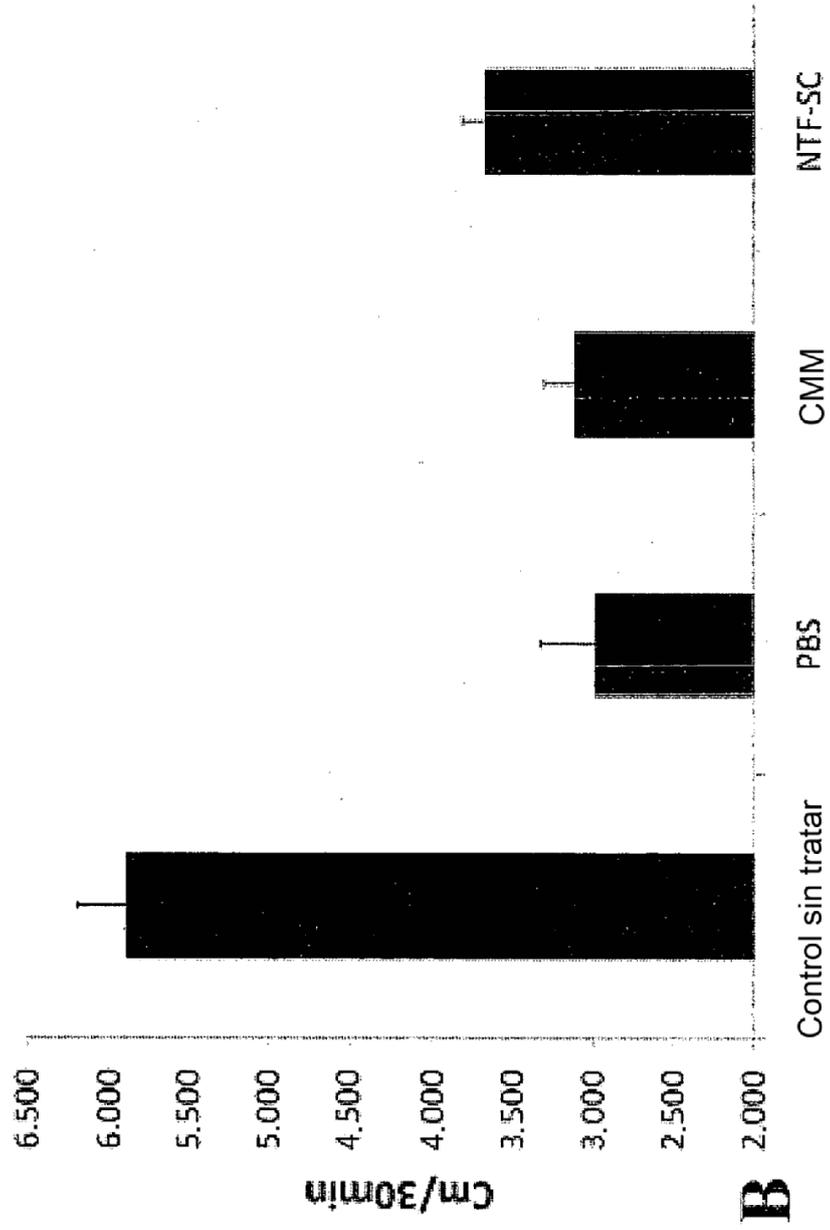
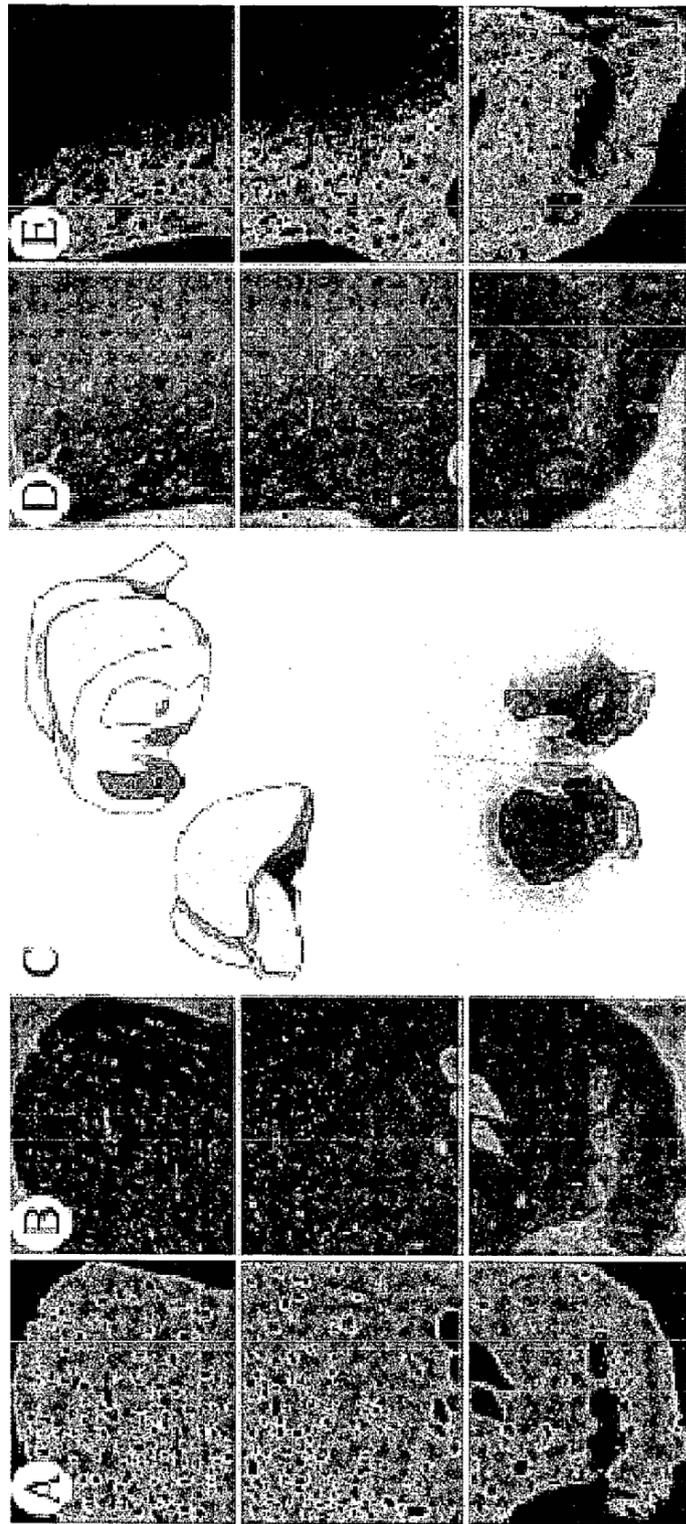


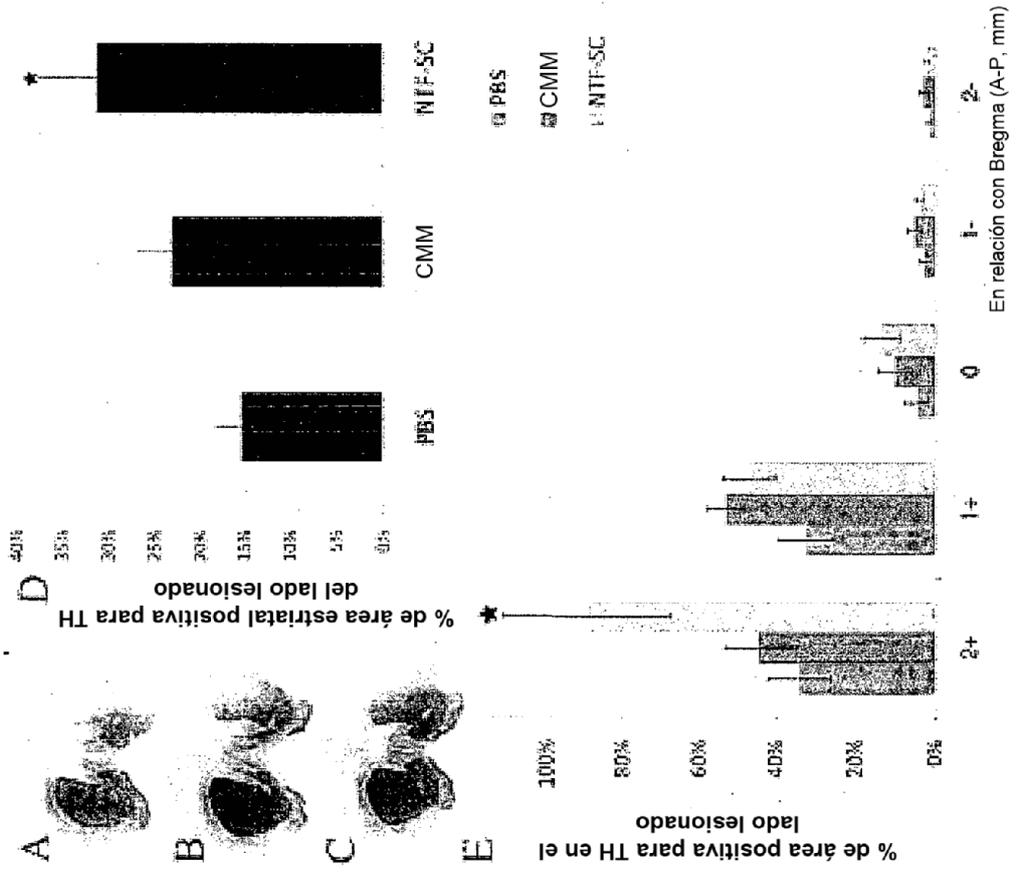
FIG. 5B



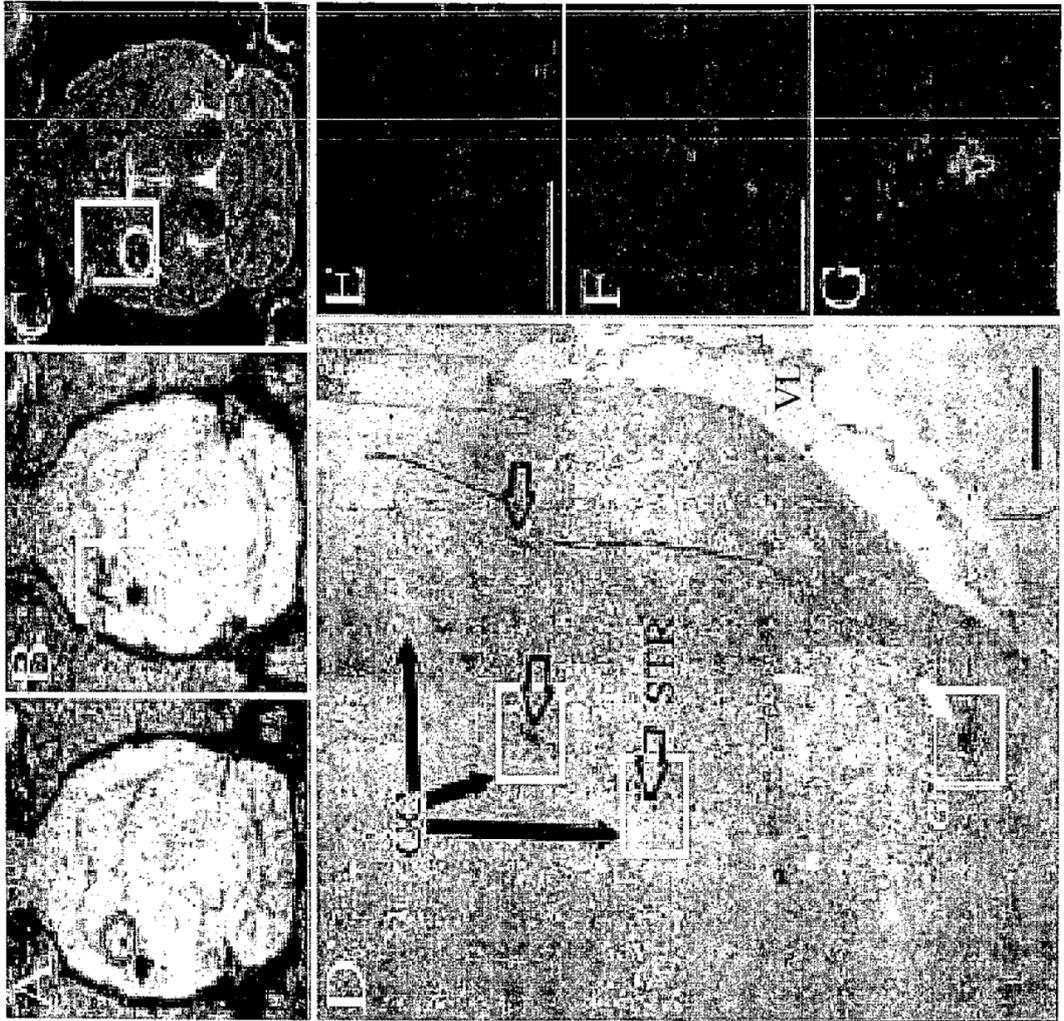
FIGS. 6A-E



**FIGs. 7A-E**



FIGS. 8A-G



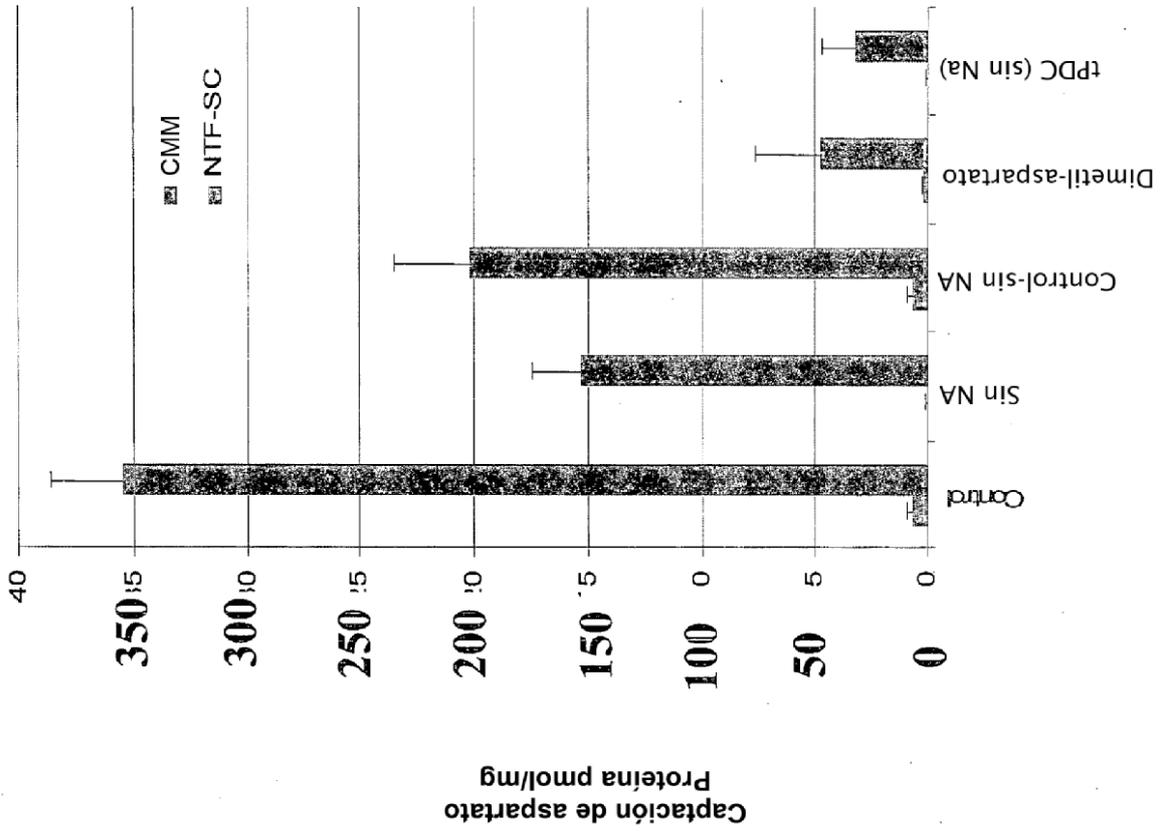


FIG. 9