

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 475**

51 Int. Cl.:

A61K 35/48 (2015.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2007 PCT/IB2007/002292**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2007 WO07141657**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2007 E 07789615 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 1993575**

54 Título: **Composiciones que comprenden células madre embrionarias humanas y sus derivados, procedimientos de uso y procedimientos de preparación**

30 Prioridad:

07.03.2006 IN DE05822006

26.06.2006 IN DE15002006

14.09.2006 US 844350 P

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

16.03.2020

73 Titular/es:

SHROFF, GEETA (100.0%)

H8 Green Park Extension

New Delhi, 110016, IN

72 Inventor/es:

SHROFF, GEETA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 748 475 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

Composiciones que comprenden células madre embrionarias humanas y sus derivados, procedimientos de uso y procedimientos de preparación

5 El presente documento se desvelan composiciones farmacéuticas que comprenden células madre embrionarias humanas (hES) o sus derivados, estando dichas células madre libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones minerales suplementarias, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, para su uso en el tratamiento de enfermedades, afecciones o trastornos médicos terminales e incurables actualmente. También se desvelan en el presente documento procedimientos de tratamiento de trastornos clínicos y afecciones terminales o actualmente incurables usando células hES mediante un protocolo de trasplante. La invención se refiere a nuevos procedimientos de preparación de nuevas líneas de células madre que están libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones minerales suplementarias, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados. La presente invención se refiere además al aislamiento, cultivo, el mantenimiento, expansión, diferenciación, almacenamiento y preservación de tales células madre.

20 Una gran cantidad de trastornos médicos humanos, afecciones y enfermedades son actualmente incurables a través de las terapias farmacológicas existentes, procedimientos de cirugía o trasplante o son terminales.

25 Las células madre tienen la capacidad de dividirse para generar células "hijas" que retienen las propiedades de las células madre o para producir hijas que comienzan a diferenciarse en un tipo celular más especializado, o para producir una célula hija de cada tipo. Las células madre son, por lo tanto, fundamentales para el crecimiento y desarrollo humano normal, y por sus características intrínsecas también son fuentes potenciales de nuevas células para la regeneración de tejido enfermo o dañado. Las células madre están presentes en todas las etapas de desarrollo, y en muchos, (posiblemente la mayoría), tejidos del adulto. Las células madre de diferentes tejidos y de diferentes etapas de desarrollo, varían en términos de la cantidad y tipos de células a las que normalmente dan lugar. Las principales clases de células madre según esta clasificación son las células madre embrionarias, células madre somáticas y células germinales embrionarias.

35 En las primeras etapas después de la fertilización (hasta la etapa de ocho células), todas las células del embrión son totipotenciales (es decir, tienen la capacidad de convertirse en cada tipo de célula necesaria para el desarrollo completo, incluidos tejidos extraembrionarios, tales como la placenta y el cordón umbilical). Después de aproximadamente dos a cinco días se alcanza la etapa de blastocisto. Dentro de esta bola de 50-100 células se encuentra la masa celular interna, que se convertirá en el embrión propiamente dicho. La masa celular interna comprende aproximadamente una cuarta parte de todas las células en esta etapa de desarrollo y una clase única de células madre; las células madre embrionarias. Las células madre embrionarias tienen la capacidad innata o el potencial de diferenciarse en cada uno de los aproximadamente 200 tipos de células del cuerpo y se describen como pluripotenciales. La capacidad de las células hES para contribuir a todos los tipos de tejidos en desarrollo aún no se ha establecido completamente, pero pueden cultivarse durante largos períodos de tiempo en cultivo y expandirse en número sin cambiar sus genotipos o fenotipos celulares, y mantener su estado pluripotencial en estas condiciones.

45 Más allá de la etapa de blastocisto, las células madre comprenden una proporción decreciente de células en el embrión, el feto y el cuerpo adulto. Muchos, si no la mayoría, de los tejidos en el feto y el adulto contienen células madre, que, en su ubicación normal, tienen el potencial de diferenciarse en un número limitado de tipos de células específicas para regenerar el tejido en el que normalmente residen. Estas células madre (células madre somáticas) son multipotenciales y pueden tener un potencial más restringido que las células madre embrionarias, ya que normalmente dan lugar a algunos, pero no a todos, los tipos de células del cuerpo humano. Las principales fuentes de células madre somáticas son el feto y la médula ósea y la sangre del cordón umbilical del adulto.

55 Las células madre embrionarias sirven como un excelente sistema *in vitro* para estudiar eventos de diferenciación celular, detección de drogas y como fuente primaria de células especializadas diferenciadas para futuras aplicaciones terapéuticas regenerativas.

60 Las células madre embrionarias, siendo pluripotenciales, tienen el potencial de desarrollo para dar lugar a cualquier tipo de célula diferenciada. Así, una enfermedad que resulta del fracaso o alteración de regulación, ya sea genético o adquirido, de tipos celulares específicos es potencialmente tratable mediante el trasplante de células hES o sus derivados mediante el reemplazo de las células defectuosas y la regeneración del órgano o tejido afectado y también mediante la estimulación del tejido latente y el tejido moribundo.

65 Se ha sugerido que el trasplante de células hES o sus derivados en el cuerpo humano tiene el potencial como un medio para abordar las necesidades médicas no satisfechas.

Se ha considerado ampliamente que el trasplante de células hES revolucionará el tratamiento de una amplia

- variedad de enfermedades, afecciones y trastornos pero, hasta la fecha, los estudios se han restringido a estudios preclínicos en ratones y primates. Es cuestionable si los resultados observados en modelos animales son realmente representativos de los eventos que ocurrirían al trasplantar tales células al humano. Adicionalmente, sin uso clínico del concepto, las composiciones farmacéuticas, protocolos, vías de administración y dosis para la administración de las células madre permanecen indefinidas y sin probar. Adicionalmente, aunque se han usado células madre humanas derivadas de fuentes distintas de un embrión o xenotrasplante de células, tejidos y órganos de otras especies en la clínica; Estos intentos no han tenido éxito o presentan varios efectos secundarios debilitantes.
- En el presente documento se desvela el trasplante de una composición farmacéutica que comprende células hES y/o sus derivados en seres humanos que padecen varias afecciones enfermedades o trastornos actualmente incurables o terminales.
- La Patente de los Estados Unidos N.º 5.453.457 desvela una composición que comprende células pluripotenciales de mamíferos no murinos derivadas de una célula germinal primordial e incluye factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble y factor inhibidor de la leucemia.
- La Patente de Estados Unidos n.º 6.800.480 reivindica una composición que comprende células hES indiferenciadas que proliferan en una matriz extracelular.
- La solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0017587 desvela la expansión *in vitro* de células madre embrionarias indiferenciadas obtenidas de un feto abortado o blastocistos en etapa de escisión fresca o congelada utilizando un medio de cultivo que no requiere células alimentadoras. Una vez aisladas, las células madre embrionarias se introducen en un medio de cultivo celular complementado con factores de crecimiento, suero bovino fetal, factor de crecimiento neuronal, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble o medios acondicionados que no son deseables en vista de los posibles efectos secundarios tras el trasplante a un paciente. Asimismo, dicha solicitud de patente no menciona el protocolo que se utilizará para el tratamiento de trastornos genéticos o clínicos, excepto que el paciente requiere una dosis de cada tipo de célula.
- La solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2004/0071665 proporciona un procedimiento terapéutico que emplea células madre de mamífero para el tratamiento de la cardiopatología. El ejemplo proporciona células madre embrionarias diferenciadas para formar un grupo cardiomiogénico, cultivadas en células alimentadoras y, después, se inyectaron en tres sitios del corazón de un ratón con infarto de miocardio.
- La solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2004/0107453 desvela un procedimiento para obtener, mantener y diferenciar células madre adultas y su uso en el tratamiento terapéutico.
- La solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2005/0124003 desvela un procedimiento para obtener, mantener y diferenciar células madre fetales y su uso en el tratamiento terapéutico.
- En particular, y de particular relevancia para la presente divulgación, el trasplante de células madre embrionarias en modelos de ratón de lesión de la médula espinal (LME) ha demostrado claramente su potencial futuro como primera línea de tratamiento de la LME aguda (McDonald et al., (1999) *Nature Med.* 5:1410; Kerr y col., (2003) *J. Neurosci.* 23:5131; Roy y col., (2004) *Nature Biotechnology*, 22:297; Hori y col., (2003) *Stem Cells*, 21:405; Harper, (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:7123). A pesar de la eficacia demostrada en modelos animales, el escepticismo con respecto a los problemas de rechazo de injerto contra huésped, la posible necesidad de administración de inmunosupresores de por vida y la formación de tumores y teratomas han retrasado las autorizaciones para reproducir la seguridad y eficacia preclínicas en ensayos experimentales en humanos. Otro problema que enfrenta el diseño de estudios clínicos y de particular relevancia para la presente divulgación es que, todavía, no hay protocolos establecidos o pautas de administración, no hay estudios de lo que sería una dosis terapéuticamente efectiva o composición farmacéutica activa, o qué tipos de células o combinaciones de células deberían usarse.
- Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es desarrollar composiciones farmacéuticas que comprendan células hES que estén libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones minerales suplementarias, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados suspendidos en una solución biocompatible, portador o matriz, por lo tanto adecuado para su uso humano.
- Otro objetivo más de la presente divulgación es desarrollar un protocolo para el tratamiento de trastornos actualmente incurables o terminales.
- Otro objetivo adicional de la presente divulgación es desarrollar un protocolo para el tratamiento de LME (lesión de la médula espinal).
- Las composiciones de la presente divulgación son simples de preparar, seguras, económicas, eficientes, fácilmente transportables, escalables, tienen una buena vida útil y están libres de efectos secundarios como reacciones de

5 antígeno-anticuerpo, invasión aberrantes, tumorigenicidad, formación de teratoma o rechazo del huésped del injerto. Asimismo, la presente divulgación requiere solo un embrión y, por lo tanto, no se requiere el suministro continuo de embriones humanos. Asimismo, el protocolo para el tratamiento desvelado en el presente documento no requiere el uso de inmunosupresores, y no depende de la tipificación de HLA, no depende de la raza, el sexo o la edad del sujeto tratado para el tratamiento efectivo de las enfermedades, afecciones o trastornos, no tiene regresión y no necesita entrenamiento previo en el técnica de la administración. Por lo tanto, el tratamiento de sujetos con las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento es posible en cualquier instalación clínica adecuadamente equipada en todo el mundo.

10 Para trasplantar células madre embrionarias humanas en humanos con fines terapéuticos, es importante que dichas células estén libres de contaminación, tales como bacterias, virus, priones o viroides. La adopción de prácticas operativas estándar de laboratorio, como una buena fabricación y buenas prácticas clínicas, reduce el riesgo de tales contaminaciones a un nivel aceptable.

15 Existen riesgos para el paciente, sin embargo, a través de metodologías de cultivo celular existentes.

20 Un riesgo importante es que los componentes del medio de cultivo celular, retenidos en el producto farmacéutico para la administración a sujetos humanos se administran y, por lo tanto, representan un riesgo para el paciente a través de efectos secundarios aún no anticipados que no podrían haberse anticipado a través de estudios de "seguridad" en ensayos con animales.

La eliminación de tal riesgo es, por lo tanto, deseable.

25 Se ha identificado que las características de una fuente de cultivo de células madre embrionarias para la administración a sujetos humanos tienen el siguiente diseño: es capaz de proliferar por un período prolongado de tiempo sin diferenciación, mantiene un cariotipo en el que todas las características del donante se conservan fielmente durante el cultivo, mantiene el potencial de diferenciarse en derivados del endodermo, el mesodermo y el ectodermo en todo el cultivo, no se diferenciará cuando se cultive en ausencia de factores exógenos, no dará lugar a teratomas, no será inmunogénico, no formará conexiones aberrantes y tejido ectópico, actuará sobre el tejido dañado y no se dividirá continuamente *in vivo* sino como está programado para hacerlo en un ciclo de vida natural. No debe haber contaminantes presentes en la metodología de cultivo y la línea celular desvelada en el presente documento.

35 El principal objetivo de la investigación hasta ahora ha sido desarrollar condiciones de cultivo que cumplan con estos requisitos, pero hasta la fecha, tales condiciones no han sido comunicadas o validadas a través de ensayos clínicos. En particular, la investigación hasta la fecha se ha centrado en la eliminación del requisito de células alimentadoras de ratones como matriz para el crecimiento y la desdiferenciación de un cultivo de células madre embrionarias humanas. El remedio parcial de proporcionar factores de crecimiento desconocidos mediante la eliminación de células alimentadoras y la suplementación de "medios acondicionados" también ha revelado un riesgo inaceptable en el medio de cultivo ideal. Las células madre embrionarias humanas cultivadas en presencia de medios alimentadores condicionados aún conservan un riesgo inherente de contaminación y, por lo tanto, un riesgo inaceptable durante el trasplante a seres humanos.

45 Un factor adicional en el diseño de condiciones de cultivo de células madre embrionarias humanas destinadas a la administración a humanos es la cuestión de los suplementos exógenos residuales en los medios que pueden estar presentes en la composición farmacéutica administrada pero que son esenciales durante la fase de expansión celular.

50 Estos incluyen el factor básico de crecimiento de fibroblastos, factor inhibidor de la leucemia, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble, suero, albúminas o suplementos de albúmina, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, transferrinas o suplementos de transferrina, antioxidantes, insulina o sustitutos de insulina, precursores de colágeno o sustitutos de precursores de colágeno, oligoelementos, residuos de "medios acondicionados", productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, combinaciones minerales suplementarias, suplementos de aminoácidos y suplementos vitamínicos.

55 Los residuos de tales suplementos adicionales se consideran riesgos innecesarios para la seguridad de los pacientes durante el trasplante de células madre embrionarias humanas en dichos sujetos. Además, la suplementación de tales factores en el medio de cultivo aumenta el riesgo de contaminación del medio ambiente y aumenta el coste futuro de la terapia con células madre y, por lo tanto, limita su aplicabilidad en una amplia gama de enfermedades médicas, afecciones o trastornos.

60 Se han adoptado varios enfoques para reducir estos riesgos, que incluyen: las patentes y solicitudes de Estados Unidos N.º 5,843,780; 5,690,926; 6,642,048; 6,800,480; 5,166,065; 6,200,806; 5,453,357; 6,090,622; 6,562,619; 6,921,632, 2006/0073587 y 2002/076747.

65 Sin embargo, ninguno de estos enfoques ofrece un sistema para la producción de un producto farmacéutico que

contenga células madre embrionarias humanas y sus derivados, que esté libre de factores potencialmente contaminantes que puedan afectar la eficacia y seguridad de las células madre embrionarias humanas y sus derivados tras la administración a seres humanos.

5 Por lo tanto, otro objetivo de la invención es desarrollar un sistema de cultivo celular simplificado para la expansión de células hES en un estado sustancialmente indiferenciado para producir un producto farmacéutico que esté listo para usar.

10 Más particularmente, es un objetivo de la invención proporcionar una técnica de cultivo que produzca una línea de células madre sin productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones minerales suplementarias, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados.

15 En el presente documento se desvelan composiciones farmacéuticas que comprenden células hES y/o sus derivados, y para el uso de células hES y sus derivados en el tratamiento de una amplia variedad de afecciones, enfermedades y trastornos en los que las células madre se introducen en el cuerpo humano por varias vías de administración, aplicaciones tópicas o inserción intralesional.

20 En el presente documento se desvela un procedimiento para tratar a un sujeto que padece una enfermedad, trastorno o afección terminal o actualmente incurable, que comprende una pauta de administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES o sus derivados por vía intramuscular, intravenosa, caudal, intravítrea, intraestriatal, intraparenquimatosa, intratecal, epidural, retrobulbar, subcutánea, intracardíaca, intraquística, inyección intraarticular o intratecal, infusión con catéter epidural, infusión con catéter en bloque subaracnoideo, infusión intravenosa, a través de nebulizador, a través de pulverizador, por vías intravaginales, mediante gotas locales para
25 los ojos y los oídos, y un programa para la administración de las células hES y sus derivados por vía tópica o intralesional.

30 Es preferible usar células hES o sus derivados que estén libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones minerales suplementarias, suplementos vitamínicos, suplementos de aminoácidos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, para evitar cualquier posibilidad de contaminación y posibilidad de efectos secundarios negativos. Las células hES y sus derivados se pueden obtener a través de cualquier metodología de cultivo celular conocida y aprobada, que está libre de células alimentadoras, y libre de contaminación de cualquier fuente y seguro para trasplante humano. Los derivados de hES incluyen células
35 diferenciadas adicionales del cuerpo humano.

40 En el presente documento se desvelan composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones terminales o actualmente incurables, que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en las que dichas células hES o sus derivados están libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones minerales suplementarias, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, suspendido en una solución biocompatible farmacéuticamente aceptable o en cualquier otro vehículo de transporte.

45 En el presente documento se desvelan células hES y/o sus derivados libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones minerales suplementarias, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, atrapado en un material biocompatible o matriz. El material o matriz biocompatible puede seleccionarse de biopolímeros, incluidos polipéptidos o proteínas, polisacáridos, incluyendo fibronectina, varios tipos de colágeno, laminina, queratina, fibrina, fibrinógeno, ácido
50 hialurónico, sulfato de heparina, sulfato de condroitina, agarosa o gelatina.

55 Las composiciones de la presente descripción pueden estar en una forma de fármaco lista para usar en la que las células madre tienen viabilidad adecuada, es decir, tienen una viabilidad lo suficientemente alta como para ser útil en uno o más procedimientos de la presente invención. En una realización, las células madre tienen una viabilidad de más de aproximadamente el 40 %, por ejemplo, superior a aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 % u 80 %. Las composiciones pueden incluir además un agente antimicrobiano, agente antibacteriano, producto hormonal u otro agente farmacéutico.

60 Para preparar las composiciones, de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o uno o más de sus derivados, como los progenitores de células madre hematopoyéticas, progenitores de células madre neuronales, progenitores de células madre mesenquimales, progenitores de células madre productoras de insulina, progenitores de células madre de hepatocitos, progenitores de células madre cardíacas, progenitores de células madre epiteliales o mezclas de los mismos se suspenden en aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente
65 100 ml de un vehículo transportador. En una realización, de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 80 millones de células hES se suspenden en aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 10 ml del vehículo

transportador. El enriquecimiento de tipos específicos de progenitores de células madre diferenciadas en una población es una prioridad, aunque una proporción de células madre indiferenciadas permanecerá en la composición. En una realización, la porción de células madre indiferenciadas no será más del 80 % de la población total de células. En otra realización, la porción de células madre indiferenciadas no será más del 40 % de la población total de células.

Las enfermedades terminales y otros trastornos o afecciones que se pueden tratar o mejorar de acuerdo con la presente divulgación incluyen, sin limitación, cáncer, trastornos hepáticos y renales, trastornos del sistema nervioso, trastornos de la piel, trastornos autoinmunitarios, trastornos genéticos, trastornos oculares, trastornos musculoesqueléticos, trastornos de fertilidad y reproducción, y trastornos cardiovasculares y sin limitación incluyen leucemia mieloide aguda, adenocarcinoma, artritis, astrocitoma, atrofia del nervio auditivo, autismo, trastornos autoinmunes, enfermedad de Alzheimer, espondilitis anquilosante, distrofia muscular de Becker, daño cerebral, quemaduras, agresión cerebrovascular, parálisis cerebral, coma, úlceras corneales, rechazo de injerto de córnea, degeneración cortico-basal del sistema nervioso, arteriopatía coronaria, diabetes, demencia, síndrome de Down, distrofia muscular de Duchenne, enfermedad renal terminal, parálisis de Erb, distrofia muscular escapular fascio, trastornos de la fertilidad, ataxia de Friedereich, insuficiencia cardíaca, carcinoma hepatocelular, enfermedad de neurona motora espino hereditaria, corea de Huntington, enfermedad de Krabbe, distrofia de la faja del miembro, cirrosis hepática, degeneración macular, retraso mental, esclerosis múltiple, enfermedad de la neuronas motoras, infarto de miocardio, síndrome nefrótico, enfermedad de Niemann Pick, ulceración no curativa de la piel, atrofia olivo-pontocerebelosa, atrofia del nervio óptico, enfermedad de Parkinson, encefalopatía posterior a una descarga eléctrica, encefalopatía por vacuna post-rabia, úlceras de decúbito, parálisis supranuclear progresiva, psoriasis, Pthysis Bulbi, miocardiopatía restrictiva, retinitis pigmentosa, bloqueo de rama derecha del haz, sarcoidosis, bradicardia sinusal, distrofia muscular espinal, ataxia espinocerebelosa, síndrome de Steven Johnson, lupus eritematoso sistémico, trombocitopenia, talasemia, colitis ulcerosa, estado vegetativo, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial, azoospermia, insuficiencia ovárica primaria, úlceras aftosas, desequilibrio hormonal, artrosis, síndrome de Horner e imperfecta osteogénica, junto con canalopatía e hipogammaglobulinemia.

En el presente documento se desvela un procedimiento de tratamiento de la LME de un sujeto que comprende:

- a) administrar de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 80 millones de células hES y/o sus derivados mediante inyección subcutánea;
- b) repetir la etapa (a) después de un período predeterminado y luego administrar células hES y/o sus derivados mediante inyección intramuscular;
- c) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas, por inyección intravenosa o infusión;
- d) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección epidural y repetir dicha dosis después de un período predeterminado dependiendo de la afección del sujeto según lo evaluado por examen clínico y/o neurológico;
- e) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales, por inyección caudal;
- f) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección intratecal o catéter de bloqueo subaracnoideo;
- g) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección epidural o catéter epidural;
- h) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados mediante inyección espinal profunda a cada lado de la columna vertebral; y
- i) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células hES y/o sus derivados mediante infusión intravenosa;

en el que las etapas (a) y (b) se llevan a cabo primero y las etapas restantes pueden llevarse a cabo en cualquier orden. En una práctica desvelada en el presente documento, la etapa (f) se repite seguida de la etapa (g), al menos una vez, hasta que el sujeto exhiba signos clínicos de recuperación de dicha LME.

En el presente documento se divulga un procedimiento para tratar a un sujeto con una enfermedad, trastorno o afección que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados cultivados en medios libres de productos animales, células alimentadoras, medios condicionados, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a la membrana o factor Steel soluble, mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa o inyección epidural o catéter epidural o inyección retrobulbar o inyección subcutánea o inyección intracardíaca o inyección intraquística o inyección intratecal o mediante aplicación tópica o aplicación intralesional. En una práctica desvelada en el presente documento, la enfermedad, trastorno o afección es una enfermedad, trastorno o afección terminal o actualmente incurable.

5 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento del desarrollo, degenerativo, trastornos del sistema nervioso familiar y traumático y ataque cerebrovascular que comprende la administración de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas solos o en combinación, por inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intratecal, infusión por catéter epidural e infusión por catéter de bloqueo subaracnoideo.

10 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de trastornos de la piel, que comprende la administración de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, por inyección subcutánea o intravenosa.

15 También se desvela en el presente documento un procedimiento de tratamiento de úlceras de decúbito que comprende la administración de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados mediante aplicación local o tópica y mediante inyección intramuscular.

20 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de trastornos autoinmunes, que comprende la administración de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa o inyección subcutánea, o inyección intraarticular o infusión intravenosa o combinaciones de los mismos.

25 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de trastornos genéticos, que comprende la administración de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas solos o en combinación, por inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intratecal, infusión por catéter epidural o infusión por catéter de bloqueo subaracnoideo o combinaciones de los mismos.

30 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de la gangrena que comprende la administración de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular o aplicación local en la unión de tejido viable y muerto o combinaciones de los mismos.

35 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de afecciones asociadas con el envejecimiento, que comprende la administración de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular o aplicación local en suspensión o mezclada en un vehículo biocompatible, tal como gel, pomada, matriz, pasta o pulverizador de aerosol.

40 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de la diabetes mellitus, que comprende la administración de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden células progenitoras productoras de insulina, mediante inyección intravenosa o intramuscular o combinaciones de los mismos.

45 También se desvela en el presente documento un procedimiento para tratar trastornos cardiovasculares, que comprende la administración de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, por inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intracardíaca, angiografía o inyección directa durante la cirugía.

50 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de trastornos hepáticos y renales, que comprende la administración de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, progenitores de células madre productoras de albúmina y progenitores de células madre productoras de bilirrubina, por inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, infusión intravenosa o inyección local.

60 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de trastornos de la fertilidad y reproductivos, que comprende la administración de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, mediante inyección intramuscular local, inyección intratesticular o por inyección en la piel subcutánea cerca del epidídimo.

65 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de trastornos musculoesqueléticos, que comprende la administración de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre

neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas solos o en combinación, por inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular o infusión intravenosa por catéter.

5 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de trastornos oculares, que comprende la administración de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales, progenitores de células madre hematopoyéticas y progenitores de células madre mesenquimales solos o en combinación, mediante inyección intravenosa local, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección retrobulbar, inyección intravítrea o aplicación tópica. En una práctica desvelada en el presente documento, de aproximadamente 750.000 a 10 aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados que comprenden progenitores de células madre neuronales se administran mediante inyección retrobulbar. En otra práctica desvelada en el presente documento, de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados que comprenden progenitores de células madre neuronales se administran mediante inyección intravítrea. En otra práctica desvelada en el presente documento, de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, que comprenden progenitores de células madre mesenquimales se aplican a las lentes de contacto para 15 colocarlas en el ojo para el tratamiento de la abrasión corneal (por ejemplo, la lente de contacto se cultiva con las células hES y/o sus derivados para recubrir la lente de contacto con células y luego la lente se coloca en el ojo durante aproximadamente 24 horas).

20 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de trastornos pulmonares, que comprende la administración de 750.000 a 160 millones de células hES y/o sus derivados en el que dichas células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas solos o en combinación con progenitores de células madre neuronales mediante inyección intramuscular, inyección intravenosa, pulverizador o nebulizador. En una práctica desvelada en el presente documento, se administran de 750.000 a 160 millones de progenitores de células madre hematopoyéticas a través de un nebulizador en el que se añaden 2 ml de solución salina normal. En otra 25 práctica desvelada en el presente documento, se administran de 750.000 a 160 millones de progenitores de células madre hematopoyéticas mediante pulverización (inhalación).

30 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de trastornos hormonales, que comprende la administración de 750.000 a 160 millones de células hES y/o sus derivados en el que dichas células comprenden células madre hematopoyéticas y neuronales a través de las vías intramuscular e intravenosa.

35 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de úlceras aftosas y otras úlceras, que comprende la administración de 750.000 a 160 millones de células hES y/o sus derivados en el que dichas células comprenden células madre hematopoyéticas y neuronales en combinación o solo por vía intramuscular e intravenosa.

40 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de la artrosis de la articulación de la rodilla y la cadera, que comprende la administración de 750.000 a 160 millones de células hES y/o sus derivados por vía intramuscular, inyección intravenosa o intraarticular. En una práctica desvelada en el presente documento, se administran de forma intraarticular de 750.000 a 160 millones de progenitores de células madre hematopoyéticas.

45 En el presente documento se desvela una metodología de cultivo celular que es aplicable al cultivo de células hES y sus derivados que se pueden usar para trasplantes en humanos sin ningún efecto secundario como la formación de teratomas, formación de tumores, problemas de antigenicidad o rechazo de injerto contra huésped.

50 El diseño de la metodología de cultivo es específicamente para la producción de células hES y sus derivados de viabilidad suficiente y de características apropiadas para una actividad terapéuticamente óptima después del trasplante en seres humanos.

55 En una realización preferida, la metodología de cultivo celular se utiliza para el crecimiento, expansión, diferenciación y almacenamiento de células hES. Además, la divulgación se refiere a composiciones listas para inyectar que comprenden células hES y/o sus derivados que se almacenan en condiciones de almacenamiento que son adecuadas para el trasplante directo al descongelar.

60 A diferencia de las metodologías de cultivo celular existentes para el mantenimiento de células hES en un estado sustancialmente indiferenciado, el medio de cultivo no contiene suplementos como el factor básico de crecimiento de fibroblastos, factor inhibidor de la leucemia, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble, suero, albúminas o suplementos de albúmina, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, transferrinas o suplementos de transferrina, antioxidantes, insulina o sustitutos de insulina, precursores de colágeno o sustitutos de precursores de colágeno, oligoelementos, residuos de "medios acondicionados", productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, combinaciones minerales suplementarias, suplementos de aminoácidos y 65 suplementos vitamínicos.

En contraste con otras metodologías de cultivo celular para la expansión de células hES, la práctica desvelada en el

presente documento no conduce a la formación de cuerpos embrioides, evitando así la necesidad de disección quirúrgica. Vale la pena señalar en este punto que el producto desvelado en el presente documento es un producto totalmente humano, el xenotrasplante (por ejemplo, pruebas en animales) puede no ser necesario. El ejemplo de la primera gestación de fertilización *in vitro* (FIV) es un ejemplo de corolario.

5 A diferencia de otras metodologías de cultivo celular, las técnicas de cultivo celular de la presente divulgación permiten una expansión casi ilimitada de células hES sin diferenciación significativa. Una ventaja principal de la presente descripción es que un solo embrión es suficiente para proporcionar cantidades terapéuticamente efectivas de células hES y/o sus derivados para tratar multitudes de pacientes. Así, no es necesario realizar adquisiciones repetidas de embriones humanos, y se pueden evitar muchas de las cuestiones éticas asociadas con el uso de embriones humanos.

15 Una ventaja adicional de los procedimientos desvelados en el presente documento es que las células hES y sus derivados son productos universalmente aceptables en términos inmunológicos, por lo tanto, no se requiere una comparación cruzada de pacientes y células y no se necesita inmunosupresión.

En el presente documento se desvelan procedimientos para aislar células hES, que comprenden:

- 20 (a) recolectar un embrión de 2 a 7 días en un medio esencial mínimo,
(b) aislar células hES del embrión por medios mecánicos.

25 Un aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para expandir células madre embrionarias humanas libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones minerales suplementarias, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, que comprende las etapas de:

- 30 (a) introducir células madre embrionarias humanas en un medio celular que consiste en un medio esencial mínimo, una progestina y un agonista de la gonadotropina coriónica β -humana (β hCG); e
(b) incubar las células madre a una temperatura de aproximadamente 34 °C a aproximadamente 38 °C en un entorno de aproximadamente 3,5% a aproximadamente 6% de dióxido de carbono durante aproximadamente 12 horas a aproximadamente 48 horas.

35 Otro aspecto de la invención se refiere a procedimientos para cultivar células hES de modo que estén en una etapa anterior a la etapa parcialmente diferenciada y estén libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones minerales suplementarias, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, que comprende las etapas de:

- 40 (a) introducir células hES en un medio de cultivo celular que consiste en medio esencial mínimo; e
(b) incubar las células madre a una temperatura de aproximadamente 34 °C a aproximadamente 38 °C en un entorno de aproximadamente 3,5% a aproximadamente 6% de dióxido de carbono durante aproximadamente 12 horas a aproximadamente 48 horas.

45 Otro aspecto de la invención se refiere a un proceso de preparación de una preparación de células madre embrionarias humanas lista para usar para trasplante humano que comprende:

- 50 (a) obtener células madre embrionarias humanas libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones minerales suplementarias, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados,
(b) centrifugar dichas células madre para obtener un gránulo, y
(c) suspender el sedimento en una solución biocompatible.

55 Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para almacenar una célula madre embrionaria humana en una condición viable según la reivindicación 25, que comprende

- 60 (a) tomar células madre preparadas por los procedimientos de la presente invención,
(b) añadir un agente de criopreservación, y
(c) congelar las células a una temperatura de -4 a -80 °C.

65 El fin de cultivar células hES de acuerdo con la práctica de la presente invención en ausencia de tales suplementos es reducir el riesgo de introducción de bacterias, hongos, contaminaciones virales u otras en el cultivo. Esto reduce el riesgo de infección y la variabilidad en las características de las células.

Un fin adicional de la presente invención es proporcionar procedimientos simples, rentables y escalables para la

producción y expansión de células hES y sus derivados en una forma libre de residuos contaminantes y segura para su uso en seres humanos.

5 Por lo tanto, el fin de esta invención es proporcionar productos farmacéuticos en los que se reduce el riesgo de administración de toda la contaminación conjunta, y en los que se elimina la contaminación residual de factores suplementarios.

10 Un fin adicional de la presente invención es proporcionar una metodología de cultivo celular que reduzca el riesgo de aberraciones cromosómicas o inestabilidad genética.

Un fin adicional de la presente invención es proporcionar una metodología de cultivo celular que reduzca el riesgo de formación de teratoma en pacientes en los que se trasplanta dicho cultivo.

15 Un fin adicional de la presente invención es proporcionar una metodología de cultivo celular que reduzca el riesgo de formación de tumores en pacientes en los que se trasplanta dicho cultivo.

20 Un fin adicional de la presente invención es proporcionar una metodología de cultivo celular que reduzca el riesgo de problemas de antigenicidad o problemas de rechazo de injerto contra huésped en pacientes en los que se trasplanta dicho cultivo.

En el presente documento se desvelan composiciones que comprenden células hES y sus derivados y un medio biocompatible que están en una forma que cumple con los estándares regulatorios internacionales de seguridad y calidad, y por lo tanto en una forma que está lista para inyectarse en pacientes humanos con fines terapéuticos.

25 En el presente documento se desvela un producto de fabricación que comprende una suspensión de células hES y/o sus derivados suspendidos en una solución biocompatible y contenidos en un recipiente para almacenamiento, transporte o trasplante directamente a un ser humano.

30 La presente invención también proporciona un procedimiento para la expansión de células hES.

También se desvela en el presente documento un procedimiento para la expansión de células hES y sus derivados y la inhibición de su diferenciación.

35 También se desvela en el presente documento un procedimiento para el crecimiento de células hES y sus derivados que las hace terapéuticamente efectivas tras el trasplante a un ser humano que padece una enfermedad, afección o trastorno.

40 En la descripción y ejemplos que siguen, en el presente documento se utilizan varios términos. Para proporcionar una comprensión clara y coherente de la especificación y las declaraciones, incluyendo el alcance para recibir tales términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

Se puede observar que los términos usados para describir generalmente la presente invención se usan de una manera acorde con su significado común tal como lo entiende un experto en la materia.

45 "Célula madre embrionaria" se refiere a células pluripotenciales de seres humanos (es decir, células hES). Las células hES pueden aislarse de un embrión en etapa pre-blastocisto. En otra realización, las células hES se preparan mediante desdiferenciación de células diferenciadas al menos parcialmente diferenciadas (por ejemplo, células multipotenciales) y son totipotenciales en la práctica. Los procedimientos para preparar células hES son bien conocidos y enseñados, en las patentes de Estados Unidos n.º, por ejemplo, 5.843.780, 6.200.806, 7.029.913,
50 5.453.357, 5.690.926, 6.642.048, 6.800.480, 5.166.065, 6.090.622, 6.562.619, 6.921.632 y 5.914.268, la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2005/0176707 y la solicitud internacional n.º WO2001085917.

"Células madre fetales" se refiere a las células madre derivadas del tejido fetal, es decir, tejidos de un ser humano en desarrollo después de la implantación del embrión en el útero.

55 "Multipotencial" se refiere a células madre que pueden producir solo células de una familia de células estrechamente relacionadas.

60 "Pluripotencial" se refiere a células madre que son descendientes de células totipotentes y pueden crecer en cualquier tipo de célula, excepto las células madre totipotenciales.

"Totipotencial" se refiere a las células madre que se producen a partir de la fusión de un óvulo y un espermatozoide. Las células producidas por las primeras divisiones de los óvulos fertilizados también son totipotenciales. Estas células pueden crecer en cualquier tipo de célula sin excepción.

65 La "cantidad terapéuticamente efectiva" se usa en la especificación para describir concentraciones o cantidades de

componentes tales como células madre embrionarias, células neuroprogenitoras, células neuronales, progenitores de células madre hematopoyéticas, progenitores de células madre cardíacas, o cualquier otro derivado de células madre, u otros agentes y mezclas de los mismos que sean efectivos para producir un resultado deseado dentro del contexto de practicar uno o más aspectos de la presente invención.

5 Los términos "trasplantar" y "trasplante" se usan en toda la especificación como sinónimos para describir el proceso por el cual las células madre embrionarias y/o sus derivados de acuerdo con la presente invención se entregan en el sitio dentro del cuerpo humano donde se pretende que las células exhiban un efecto favorable en relación con el tratamiento o la mejora de una enfermedad, trastorno o afección desvelada en el presente documento, incluyendo, sin limitación, para reparar el daño al sistema nervioso central de un sujeto, tratar una enfermedad neurodegenerativa o tratar los efectos del daño nervioso causado por un derrame cerebral, enfermedad cardiovascular, un ataque cardíaco o lesión física o traumatismo o daño genético o insulto ambiental al cerebro y/o la médula espinal u otros órganos, causadas por, por ejemplo, un accidente u otra actividad, daño hepático, trastorno autoinmunitario, disfunción sexual o reproductiva, degeneración de varias partes del ojo, daño renal, etc.

15 La "solución biocompatible" se usa en la especificación para referirse a soluciones en las que las células hES y/o sus derivados están suspendidas para su uso en el protocolo de trasplante o para cualquier otro uso posterior. Tales soluciones biocompatibles incluyen solución salina y pueden comprender además otros ingredientes tales como conservantes, antimicrobianos, y similares y otros agentes farmacéuticos.

20 "Vehículo biocompatible" se utiliza en la especificación para hacer referencia a vehículos sólidos, soluciones y mezclas en las que las células hES y/o sus derivados están suspendidas para su uso en el protocolo de tratamiento tópico, trasplante o para cualquier otro uso posterior. Dichos vehículos biocompatibles incluyen geles, pomadas, pastas y aerosoles.

25 El "recipiente biocompatible" se usa en la especificación para referirse a los contenedores (por ejemplo, cultivos celulares o contenedores de almacenamiento) en los que se colocan las células hES y/o sus derivados y que no impiden que las células se usen en el trasplante, es decir, no contaminen las células con compuestos que no puedan administrarse a los sujetos. Los ejemplos de materiales de recipientes biocompatibles incluyen, entre otros, vidrio, Steel inoxidable y poliestireno.

30 Una "progesterona" es cualquier hormona natural o sintética que tiene actividad similar a la progesterona, es decir, que tiene al menos el 25 % de la actividad de la progesterona en uno de los ensayos conocidos de actividad biológica. Los ejemplos incluyen, sin limitación, progesterona, didrogesterona, medroxiprogesterona, noretisterona, levonorgestrel, norgesterel, gestodeno y drospirenona. Los ejemplos de otras progestinas se desvelan en las patentes de Estados Unidos n.º 7.091.234, 7.084.151, 7.081.457, 7.071.205, 6.562.857, 6.319.911, 6.245.757, 6.043.235 y 6.028.064.

40 Los "agonistas de la gonadotropina coriónica humana β (β hCG)" se definen como cualquier β hCG natural o sintético o fragmento o derivado del mismo que tiene al menos el 25 % de la actividad de la β hCG natural en uno de los ensayos conocidos de actividad biológica. Los ejemplos de agonistas de β hCG incluyen, sin limitación, β hCG y los desvelados en las patentes de Estados Unidos N.º 6.635.445, 6.585.982, 6.583.109, 6.469.139 y 5.997.871.

45 "Medio esencial mínimo" se usa en la especificación para referirse a un medio de cultivo celular que comprende aminoácidos, sales, glucosa y vitaminas. Los ejemplos incluyen RPMI, DMEM, EMEM y GMEM.

"Nebulización" significa la administración de un medicamento o sustancia a los pulmones a través del nebulizador.

50 Intraarticular significa administración en el espacio intraarticular.

Retrobulbar significa administración en el espacio retrobulbar.

55 Infusión intravenosa significa administración en la vena mediante el uso de un líquido iv que comprende el producto o fármaco.

Inyección "epidural" o la infusión con catéter significa la administración en la región fuera de la duramadre de las meninges.

60 Inyección "intratecal" o la infusión con catéter significa la administración en la capa más interna de las meninges, es decir, la materia aracnoidea en el líquido cefalorraquídeo, que está en continuo con el cerebro.

Inyección "caudal" significa la administración a través de la membrana sacra, que está aproximadamente a tres centímetros por encima de la punta del cóccix que está en continuo con el espacio epidural.

65 "Inyección espinal profunda" significa inyección en los músculos vertebrales erectores a ambos lados de la columna vertebral.

Inyección "intramuscular" significa la administración entre las láminas musculares.

Inyección "intravenosa" significa la administración dentro de una vena.

5

"LIC aguda" significa hasta tres meses después de la fecha de la LME.

"LME subaguda" significa desde tres meses después de la fecha de la LME hasta nueve meses después de la fecha de la lesión.

10

"LME crónica" más de nueve meses después de la fecha de la LME.

Los "derivados" de las células hES incluyen células madre multipotenciales, células madre pluripotenciales, células madre adultas y células madre específicas de tejido y no incluyen células completamente diferenciadas. Se pueden encontrar ejemplos de células madre específicas de tejido en la siguiente tabla.

15

Tipo de célula	Número de patente
Células madre derivadas de tejido adiposo	6.777.231
Células madre epiteliales de mama	5.814.511
Células madre endoteliales	6.852.533
Células progenitoras ganglionares de la raíz dorsal	6.835.567
Células progenitoras hematopoyéticas CD34 ⁺ , CD7 ⁺ , Lin ⁻ , Lin ⁻ , CD45RA ⁺ ,	6.537.807
Células madre hematopoyéticas Thy-1 ⁺	5.061.620
Células madre hematopoyéticas Thy-1 ⁺ , CD34 ⁺	5.750.397
Células madre hematopoyéticas CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , HLA-DR ⁺	5.840.580
Células dendríticas y linfoides hematopoyéticas CD34 ⁺ , CD45RA ⁺ , CD10 ⁺ ; Células dendríticas hematopoyéticas CD34 ⁺ , CD45RA ⁺ , CD10 ⁺ ,	5.972.627
Células madre hematopoyéticas c-kit, Thy-1 ⁻	5.876.956
Células madre hematopoyéticas CD34 ⁺	5.681.559
Células madre hematopoyéticas HCC-1 ⁺	5.677.136
Células progenitoras hematopoyéticas CD34 ⁺ , Lectina específica de galactosa ⁺	5.858.782
Células madre hematopoyéticas (quiescentes) CD34 ⁺	5.807.686
Células madre de queratinocitos	6.485.971
Células madre del hígado No expresan OC2	6.129.911 6.872.389
Células madre progenitoras linfohematopoyéticas My10 ⁻	5.256.560
Células progenitoras linfoides	6.908.763
Células progenitoras neurales del mesencéfalo	6.913.925
Células madre mesenquimales CD45 ⁺	6.387.367
células madre mesenquimatosas	5.486.359
células madre mesenquimatosas	5.827.735
células madre mesenquimatosas	5.908.782
células madre mesenquimatosas	6.936.281
células madre mesenquimatosas	6.908.764
Células epiteliales pluripotenciales derivadas del conducto de Muller	6.416.999
Células progenitoras mieloides c-kit ^{hi} , IL-7R α ⁻	6.465.247

(continuación)

Tipo de célula	Número de patente
Células progenitoras mieloides Thy-1 ⁻ , IL-7R α ⁻	6.761.883
células progenitoras neurales	5.753.505
células madre neurales	5.851.832
Células progenitoras neuronales	6.251.669
células madre neuronales	6.969.608
Células progenitoras neuronales que no expresan una proteína Hu	6.852.532
Células precursoras neuronales restringidas al linaje E-NCAM ⁺	6.734.015
Células madre neuroepiteliales	7.037.702
Células madre neurales del sistema nervioso central	5.968.829
Células progenitoras neuronales	6.812.027
células progenitoras neurales	6.913.925
Células precursoras restringidas a las neuronas del sistema nervioso central	6.787.353
Células progenitoras de la neurona mesencéfalo ventral	5.411.883
Células madre de la cresta neural	5.589.376
Células multipotenciales de la cresta neural que contienen proteína RET	6.890.724
Células precursoras de neutrófilos	5.955.357
Células progenitoras pancreáticas	6.436.704
Células progenitoras de los islotes pancreáticos Expresan ErbB2	6.753.153
Células pluripotenciales	5.914.268
Células pluripotenciales transformadas con un gen HOX11	5.874.301
células progenitoras de sangre periférica	5.541.103
Células madre renales	6.410.320
Células madre renales	6.458.588
Células madre de la retina	6.117.675
Células progenitoras esqueléticas	6.517.872
células madre FGFR ⁺ , no células ES	6.767.737
Células madre que dan lugar a células sanguíneas CD34 ⁻ , MHC-I ⁻ , MHC-II ⁻	5.744.347
Células progenitoras de linaje T CD8 ^{int} , CD4 ^{int} , c-kit ^{hi} , bcl-2 alto; CD8 ^{lo} , CD4 ^{lo} , c-kit ^{hi} , bcl-2 alto	5.821.108
Células precursoras de linfocitos T CD34 ⁺ , CD7 ⁺ , Leu 8 ⁺	5.622.853

En el presente documento se desvelan composiciones farmacéuticas que comprenden células hES y/o sus derivados, estando dichas células madre libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones minerales suplementarias, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, para su uso en el tratamiento clínico de enfermedades, afecciones o trastornos médicos terminales e incurables actualmente. También se desvela en el presente documento un procedimiento de tratamiento de afecciones actualmente incurables o terminales usando células hES y/o sus derivados mediante un protocolo de trasplante.

La frase "libre de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones minerales suplementarias, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble y los medios condicionados "no excluyen las cantidades traza de progesterona y agonista de β hCG que pueden estar presentes en la composición farmacéutica como resultado de los procedimientos de cultivo de la presente invención. La expresión "productos animales" se refiere a cualquier producto no humano.

El proceso desvelado en el presente documento proporciona un procedimiento simple, seguro, ampliamente aplicable, reproducible y eficiente para el trasplante de una composición farmacéutica que comprende células hES y/o sus derivados en una forma lista para usar y sin células alimentadoras ni ninguna otra contaminación. Estas células pueden derivarse de cualquier metodología de cultivo y trasplantarse al cuerpo humano independientemente

del origen genético del paciente, la edad, la raza y el sexo, y sin reacción antígeno-anticuerpo o rechazo del injerto-huésped, sin la formación de teratomas o tumores, u otros efectos secundarios debilitantes, sin el resultado de invenciones aberrantes y sin la necesidad de administrar inmunosupresores para el tratamiento de diversas enfermedades, afecciones y trastornos.

5 A diferencia de otros procedimientos conocidos, las células hES utilizadas en la preparación de las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se cultivan en un medio de cultivo que está libre de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones minerales suplementarias, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, y por lo tanto no tienen ningún tipo de contaminación que pueda interferir con la seguridad o la eficacia del uso clínico previsto.

15 Después de la divulgación en el presente documento, las células hES y/o sus derivados se introducen en el cuerpo humano por vía intramuscular, intravenosa, caudal, intravítrea, intraestriatal, intraparenquimatosa, intratecal, epidural, retrobulbar, subcutánea, oral, intracardiaca, intraquística, inyección intraarticular o intratecal o catéter epidural, catéter de bloqueo subaracnoideo, infusión intravenosa, a través de nebulizador, a través de pulverizador, por vía intravaginal y/o por gotas oculares y óticas locales. En otra práctica desvelada en el presente documento, las células hES y/o sus derivados se administran tópicamente o intralesionalmente.

20 Cada vía de administración utiliza un volumen particular para inyección y, por lo tanto, un rango específico de células de las soluciones madre de células hES y/o sus derivados como se indica en la Tabla 1. Donde se indican los tipos de células (por ejemplo, en las tablas de programación de inyección a continuación), el tipo celular indicado es el tipo que está predominantemente presente en la población celular.

25

TABLA 1

Vía de administración	Volumen	Numero celular
intramuscular	0,25 ml	750.000 + -1,5 Millones
intravenosa	0,25 ml	750.000 + -1,5 Millones
subcutánea	0,25 ml	750.000 + -1,5 Millones
caudal	2 ml	6-16 millones
epidural	2 ml	6-16 millones
intratecal	2 ml	6-16 millones
intraarticular	2 ml	6-16 millones
retrobulbar	2 ml	6-16 millones
catéter epidural	4-5 ml	12-40 millones
infusión intravenosa	0,75 ml	2,25-4,5 millones
nebulizador	2 ml	6-16 millones
intravaginal	2 ml	6-16 millones

Entre el laboratorio y el punto final de uso, ya sea una clínica o en otro lugar, las composiciones farmacéuticas deben mantenerse en almacenamiento en frío. En una realización, las composiciones farmacéuticas se almacenan a aproximadamente +4 a aproximadamente -160 °C. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se almacenan a aproximadamente -15 a aproximadamente -72 °C, por ejemplo, de aproximadamente -20 a aproximadamente -40 °C.

35 En un ejemplo de referencia, las células hES utilizadas como se desvela en el presente documento están aisladas de un embrión de reserva, se descartan de un ciclo natural de fertilización *in vitro* y se donan a través de consentimiento informado. Como alternativa, las células madre fetales pluripotenciales, como las descritas en la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2005/0124003 aisladas de vellosidades coriónicas, líquido amniótico y/o placenta, se usan en la presente invención.

40 En el presente documento se desvelan procedimientos para el tratamiento de diversas enfermedades, afecciones y trastornos, que incluyen, pero sin limitación, cáncer, ictus, trastornos genéticos, trastornos hepáticos, trastornos del sistema nervioso, trastornos vasculares, enfermedades y trastornos de la piel, trastornos autoinmunitarios, trastornos oculares, trastornos renales, trastornos cardíacos, trastornos musculoesqueléticos, trastornos reproductivos y de la fertilidad, y artritis usando células hES y/o sus derivados.

45 Los ejemplos no limitantes de cánceres que pueden tratarse de acuerdo con la divulgación en el presente documento incluyen tumor de médula espinal, cáncer de mama, cáncer de próstata, linfoma, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer de colon, melanoma, melanoma maligno, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, carcinoma primario de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, glioma, glioblastoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de

pulmón no microcítico, carcinoma de cabeza o cuello, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, cáncer de cuello uterino, lesiones metastásicas, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, tumor de Wilms, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de testículo, carcinoma de vejiga, carcinoma pancreático, carcinoma de estómago, carcinoma de colon, carcinoma de próstata, carcinoma genitourinario, carcinoma de tiroides, carcinoma esofágico, mieloma, mieloma múltiple, carcinoma suprarrenal, carcinoma de células renales, carcinoma de endometrio, carcinoma de la corteza suprarrenal, insulinoma pancreático maligno, carcinoma carcinoide maligno, coriocarcinoma, hipercalcemia maligna, hiperplasia cervical, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia granulocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, la leucemia de células pilosas, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Kaposi, policitemia vera, trombocitosis esencial, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, sarcoma de partes blandas, sarcoma osteogénico, macroglobulinemia primaria y retinoblastoma.

En una práctica desvelada en el presente documento, las células hES no se tratan con un agente diferenciador ya que, siendo embrionarias, las células se programan, y una vez administradas al sujeto, las células migran al sitio de la lesión. En ese sitio, las células se diferencian en respuesta a señales de diferenciación *in vivo*. En el sitio de la lesión, las células hES y sus derivados no proliferan indefinidamente, por lo tanto, necesitan un programa de inyecciones repetidas. El hecho de que las células hES y sus derivados no proliferen indefinidamente elimina la posibilidad de tumorigenicidad y formación de teratoma.

Después del tratamiento con células hES y/o sus derivados de acuerdo con la práctica en el presente documento desvelada, el paciente debe descansar y adoptar un régimen estricto de abstinencia de la ingesta de cualquier sustancia como el alcohol o el tabaco que pueda afectar la función celular e impedir los procesos de regeneración provocados por la migración de las células hES y sus derivados al sitio de la lesión. La paciente también debe evitar tomar cualquier medicamento que se sepa que es dañino durante el embarazo, ya que los medicamentos pueden tener efectos adversos en las células trasplantadas.

Uso de células hES y sus derivados en el tratamiento de LME

En la actualidad no existen curas efectivas para el tratamiento de LME, incluido el daño agudo de la médula espinal, el daño subagudo de la médula espinal o el daño crónico de la médula espinal, que frecuentemente resulta en paraplejía, tetraplejía y cuadriplejía. El trasplante de células hES para el tratamiento de la LME presenta una oportunidad única para abordar una necesidad médica no satisfecha y mejorar dramáticamente la vida de millones de personas en todo el mundo que sufren las consecuencias de LME. La recuperación de las funciones perdidas del sistema nervioso central y autónomo a través del trasplante de células hES y sus derivados en un estado sustancialmente progenitor permitirá la recuperación de las vías parasimpática, simpática, motora, autonómica y sensorial a través del reemplazo de la función celular perdida, regeneración de células neurales perdidas, eliminación de barreras físicas, tal como el tejido cicatricial, el bloqueo de vías de señalización inhibitorias y la liberación de factores neurotróficos de los progenitores de células hES trasplantadas.

Entre los beneficios de la restauración de la función neurológica a través del trasplante de células hES como se desvela en el presente documento se encuentran: una mejora en la función motora y sensorial, la calidad de vida general, reducción en el sistema de apoyo generalmente proporcionado por familiares, disminución de la dependencia de otras composiciones farmacéuticas y otros dispositivos y ayudas médicas, mejora en el estado mental y psicológico y también en la independencia económica. Hay una reducción en los costes de los equipos médicos y las ayudas para la discapacidad y la dependencia de los medicamentos a través de la recuperación de las funciones parasimpática, simpática, sensorial y motora. Hay una mejora en la autosuficiencia, mejora en el estado social, estado civil y capacidad para ejercer los derechos reproductivos, con solo un número limitado de visitas clínicas al año para tratamiento. El tratamiento mediante la administración de células hES y sus derivados de acuerdo con la divulgación en el presente documento no conduce a problemas de antigenicidad, formación de tumor, formación de teratoma o conexiones neuronales aberrantes.

Asimismo, la administración de células hES y sus derivados, especialmente para sujetos con LME, da como resultado la cura de las úlceras de decúbito, reducción en su necesidad de hipertensos o antidepresivos, restauración de la sensación y el control de la vejiga, restauración de la sensación intestinal y sensación de dolor y tacto; restauración de reflejos perdidos; reducción de los síntomas de sudores fríos; reducción en la sensación de vértigo; normalización de la presión sanguínea y normalización de la respiración con compromiso diafragmático completo.

A continuación se detalla un procedimiento para la administración de células hES a pacientes que sufren daño subagudo de la médula espinal o daño de la médula espinal crónica y para quienes los mecanismos de recuperación natural han fallado. Un procedimiento diferente para el tratamiento de la LME aguda como primera línea de tratamiento dentro de los tres meses posteriores a la lesión de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento también se proporciona con detalle a continuación.

La dosis terapéuticamente efectiva, el programa de administración y la vía de administración de las células hES a administrar depende principalmente de tres factores; a saber, el tipo de trastorno, el estado clínico del paciente y la

gravedad de los síntomas presentes. Durante la práctica desvelada en el presente documento, se ha encontrado que las dosis y los programas terapéuticamente efectivos no dependen de la edad, el sexo, el peso corporal o la raza. El protocolo para cada paciente se establece individualmente en función de un proceso continuo de evaluación del paciente.

5 En una práctica desvelada en el presente documento, una composición farmacéutica que contiene células hES y/o sus derivados se administra a un sujeto que padece un trastorno actualmente incurable o una condición terminal u otro trastorno clínico como se mencionó anteriormente a través de una serie de inyecciones para tratar el trastorno.

10 El tratamiento de diversos trastornos clínicos y afecciones terminales se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos.

El tratamiento, la dosificación, la pauta, las vías de administración, la evaluación y el seguimiento de pacientes con LME

15 En una práctica desvelada en el presente documento, las células hES y/o sus derivados se administran a un sujeto que ha sufrido una LME durante más de tres meses (LME subaguda y crónica) a través de una serie de inyecciones para tratar el trastorno. En otra realización, los derivados de hES son células madre progenitoras hematopoyéticas. En otra realización, los derivados de hES son células madre progenitoras neuronales.

20 **Dosis de prueba**

En una práctica desvelada en el presente documento, de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 80 millones de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden células madre progenitoras hematopoyéticas y células madre progenitoras neuronales, diluidas en solución salina normal estéril hasta un volumen final de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1,0 ml, se analizan para determinar la contaminación y la viabilidad y para el recuento utilizando protocolos estándar y posteriormente se administran mediante inyección subcutánea como una dosis de prueba en el antebrazo. Se hacen observaciones para verificar el shock anafiláctico, dolor o la inflamación en el sitio de la inyección, picor generalizado, rubor o fiebre después de cinco minutos, diez minutos, 25 quince minutos, treinta minutos, una hora y veinticuatro horas. En una realización, la proporción de células hES a células madre progenitoras hematopoyéticas y células madre progenitoras neuronales varía de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4. En otra realización, la proporción es de aproximadamente 1:1.

35 **Dosis de sensibilización**

El protocolo implica la administración de un subcutáneo, inyección de sensibilización intramuscular y/o intravenosa de una composición farmacéutica que contiene de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 80 millones de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden células madre progenitoras hematopoyéticas y células madre progenitoras neuronales, resuspendidas en un volumen de aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 1,0 ml de solución salina normal estéril. La inyección de sensibilización se administra a través de una inyección de una composición farmacéutica que contiene el mismo número de células hES y sus derivados diariamente durante una semana a 10 días.

45 **Inyección epidural y catéter epidural**

De aproximadamente 750.000 a 80 millones de células hES y/o sus derivados, en las que dichas células comprenden células madre progenitoras neuronales, suspendidas en un volumen de 2 ml de solución salina normal estéril y diluidas adicionalmente a 5 ml a 40 ml de solución salina normal estéril se administran mediante inyección epidural o catéter epidural por encima o por debajo del sitio de la lesión dos veces al día durante un período de tres días consecutivos, de siete a diez días después de la primera inyección de sensibilización. La administración por inyección epidural/catéter epidural se repite por encima o por debajo del sitio de la lesión de acuerdo con el progreso clínico en la mejora de los síntomas presentados por el paciente y la opinión del médico. También se ha observado que si se hace que el paciente se acueste boca arriba después de la inyección epidural, la mejora sensorial es sustancial, y si se le obliga a acostarse boca abajo, la mejora motora es sustancial. En ambos casos, el paciente debe mantener las piernas en una posición elevada.

60 **Intratecal**

De aproximadamente 750.000 a 11 millones de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales, suspendidas en 2 ml de solución salina normal estéril y diluido adicionalmente en 2 ml de solución salina normal estéril hasta un volumen total de 4 ml se administra mediante inyección intratecal por encima o por debajo del sitio de la lesión en períodos de dos, cinco, ocho, doce, diecisiete y veintidós meses después del inicio de las inyecciones de sensibilización.

65 En una práctica desvelada en el presente documento, el tratamiento de LME se continúa mediante la administración de células mediante inyección epidural a través de un catéter por encima o por debajo del sitio de la lesión, por

ejemplo, quince días después de la lesión. En una práctica desvelada en el presente documento, una suspensión de aproximadamente 750.000 a 80 millones de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales, en un volumen de 2 ml de solución salina normal estéril y luego se inyecta en 15 ml a 40 ml de solución salina normal estéril. Este tratamiento puede repetirse un mes y medio después.

Inyección espinal profunda

Según el progreso observado en la inversión de los síntomas, pueden administrarse inyecciones de refuerzo adicionales de la composición farmacéutica que comprenden de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 80 millones de células hES y/o sus derivados, en las que dichas células comprenden tanto células madre hematopoyéticas como células madre progenitoras neuronales, suspendidas en un volumen de 0,25 ml a 1,0 ml de solución salina normal estéril. En una práctica desvelada en el presente documento, la composición farmacéutica se administra mediante inyección espinal profunda en la parte posterior de la columna semanalmente o cada dos semanas. Este tratamiento fortalecerá los músculos de la espalda y mejorará la rehabilitación física una vez que el paciente haya recuperado la movilidad.

Inyección caudal

De acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento, una composición farmacéutica de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 80 millones de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales, resuspendidas en 2 ml de solución salina y diluidos en 10 ml solos o en combinación con hasta 20 ml de DEPOMEDROL (acetato de metilprednisolona) se administra mediante inyección caudal. Este tratamiento fortalecerá los músculos de la región lumbar y permitirá recuperar la potencia sensorial y motora en las áreas lumbar y sacra.

Además del trasplante en curso de las células hES, la recuperación del paciente se ve favorecida por la fisioterapia diaria y una reeducación en el uso de la función motora perdida y la instrucción para mantener un estilo de vida saludable que promueva la función celular y los procesos de regeneración celular.

Administración local

Además del tratamiento directo de la LME utilizando células hES y/o sus derivados de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento, las úlceras de decúbito que surgen como resultado de la inmovilización a largo plazo del paciente pueden tratarse rápida y eficazmente mediante la aplicación tópica de una composición farmacéutica que contiene células hES y/o sus derivados.

El tratamiento de las úlceras de decúbito se puede lograr mediante la aplicación tópica de una composición farmacéutica que contiene aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden células progenitoras hematopoyéticas. Las dosis de carga o sensibilización se administran por inyección intravenosa e intramuscular para permitir la curación interna y promover la neovascularización. Como alternativa, las células hES y sus derivados se resuspenden en 2 ml de solución salina, se diluyen con 2 a 4 ml de solución salina y se aplican intralesionalmente.

Infusión intravenosa

De acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento, una composición farmacéutica que comprende 750.000 a 80 millones de células hES y/o sus derivados, en la que dichas células comprenden células progenitoras hematopoyéticas y neuronales, se resuspenden en 100 ml de solución salina normal y se administran por vía intravenosa. Este tratamiento asegura un flujo continuo de células madre hacia el cuerpo y puede ser especialmente útil si las otras rutas directas no son accesibles por alguna razón, por ejemplo, una llaga en la cama en el sitio, paciente demasiado debilitado, etc.

Protocolo para el tratamiento de la LME aguda

La intervención rápida en el tratamiento de la LME aguda aumenta en gran medida las posibilidades de supervivencia del paciente. Adicionalmente, intervención rápida en el tratamiento de cualquier enfermedad incurable, condición o trastorno a través de la práctica desvelada en el presente documento aumenta las posibilidades de recuperación. Asimismo, Los pacientes que sufren de LME aguda durante menos de tres meses después de la lesión espinal pueden ser tratados con éxito como se describe con detalle a continuación. Una composición farmacéutica de células hES y/o sus derivados junto con una fisioterapia efectiva, programa de rehabilitación y reeducación de acuerdo con la práctica en el presente documento descrita es una primera línea de tratamiento eficaz para la LME aguda.

El tratamiento de las LME agudas comprende todas las etapas utilizadas para el tratamiento de las LME agudas y crónicas más dos etapas adicionales. Durante la intervención inicial para la LME inmediatamente después de que

ocurra la lesión (por ejemplo, cirugía), Las células hES y/o sus derivados se administran directamente al sitio de la lesión. El tratamiento de seguimiento comprende dos inyecciones intratecales y una inyección epidural dentro de los tres meses posteriores a la lesión.

5 Evaluación clínica y observaciones

10 Para pacientes que han perdido la función motora en sus piernas durante un período prolongado de tiempo, mientras se trata de acuerdo con la divulgación en el presente documento, los programas para su reeducación en caminar y otra terapia física deben implementarse a medida que la función motora vuelve a sus piernas. Como primera etapa en tales programas, el uso de estructuras móviles y pinzas para caminar ha demostrado ser efectivo en la reeducación. Se debe implementar un programa adicional de muscularización de los brazos y la parte superior del cuerpo para que el paciente pueda soportar su peso corporal sin ayuda al caminar. Los programas de reeducación pueden reducirse a medida que el tratamiento continúa y el estado del paciente mejora.

15 Además de la reducción en la necesidad de soporte de dispositivos médicos y fisioterapia, debido a las mejoras en los síntomas simpáticos y parasimpáticos del paciente, a través del tratamiento de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento, hay una reducción en el requerimiento de medicamentos, incluyendo medicamentos para la fluctuación de la presión arterial, medicación para la depresión, medicación para las llagas por encamado, medicación y dispositivos médicos para complicaciones intestinales y de vejiga, medicamentos antiespasticidad y bombas.

20 Además de una reducción en la necesidad de medicamentos para el tratamiento de síntomas asociados directa o indirectamente con la LME, Se observa que los diabéticos con LME y tratados de acuerdo con la divulgación en el presente documento muestran una reducción en la necesidad de sus medicamentos antidiabéticos.

25 La evaluación clínica de la progresión en la mejora de los síntomas presentados por el paciente que sufre de LME y tratada de acuerdo con la divulgación en el presente documento se controla regularmente durante el curso del tratamiento y después de la remisión. Una serie de parámetros fisiológicos, simpáticos, parasimpáticos, motores, autonómicos y psicológicos se evalúan para evaluar la eficacia de la técnica para revertir los síntomas de LME y estos se describen con detalle a continuación.

30 Se realiza un examen de los registros del clínico que lo deriva, incluyendo una descripción de síntomas, el sitio de categorización de la lesión, la progresión de los síntomas, la intervención clínica, los tratamientos y antecedentes generales de la lesión. Con base en este examen y un examen exhaustivo del paciente, incluyendo una resonancia magnética (MRI), electromiografía (EMG), exploración de la velocidad de conducción nerviosa (NCV) y otros exámenes e investigaciones neurológicas, incluido un examen neurológico para evaluar la extensión del daño y obtener un registro de la lesión antes del tratamiento, se realizan metodologías para la descripción semicuantitativa de la mejora después del trasplante de acuerdo con las prácticas desveladas en el presente documento y se describen con detalle a continuación.

40 Se indican los parámetros simpáticos y de bienestar neurológico, incluido el estado mental del paciente, ya sea deprimido o no, las características de comportamiento, la función del nervio craneal y el comportamiento general como parte de una evaluación psicológica.

45 Se realiza una evaluación de los signos y síntomas relacionados con el daño neurológico en el sitio de la lesión y el funcionamiento del sistema nervioso autónomo. Esto incluye un examen neurológico, análisis de la capacidad para sentir presión profunda, sentido del tacto, sensación, equilibrio, capacidad de sentir dolor, capacidad de detectar cambios de temperatura, movimientos involuntarios, presencia de sudores fríos, mareo, presión sanguínea, dificultad para respirar, postura anormal mientras está acostado y la capacidad de sentarse sin ayuda.

50 Se realiza una evaluación de la función de la vejiga y el intestino. Esto incluye el control de la vejiga, el flujo vesical y la sensación de plenitud en la vejiga, el control intestinal, el tiempo para la evacuación del intestino y la sensación en el intestino.

55 Se realiza una evaluación de la función motora de la parte superior del cuerpo para evaluar la extensión del daño al sistema nervioso central. Esto incluye el movimiento del hombro, el movimiento de la muñeca y los dedos, reflejos tendinosos y fuerza del movimiento de las extremidades, atrofia muscular y agarre de la mano.

60 Se realiza una evaluación de la función motora de la parte inferior del cuerpo para evaluar la extensión del daño al sistema nervioso central. Esto incluye el movimiento de la cadera, el movimiento de la rodilla, el movimiento del dedo del pie, los reflejos tendinosos y la fuerza de la extremidad, atrofia muscular y respuesta plantar. También se realiza un examen neurológico detallado a intervalos regulares durante el tratamiento para controlar el progreso de la inervación de las extremidades.

65 Para ayudar a la recuperación del paciente durante el curso de las visitas clínicas, se utilizan técnicas de fisioterapia estándar para tonificar al paciente a medida que vuelve la función motora, para que puedan recuperar el uso de sus

extremidades y articulaciones y volverse más móviles.

La demostración de la regeneración neural se demuestra mediante la restauración de la función neurológica y la evaluación neurológica. Se han proporcionado ejemplos para el protocolo de tratamiento para la LME como estudios de caso en la presente solicitud.

Tratamiento de los trastornos del desarrollo del sistema nervioso

Las células hES y/o sus derivados de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento se administran en una cantidad de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células para el tratamiento de trastornos del desarrollo, tales como autismo y retraso mental. En otra práctica desvelada en el presente documento, se administran de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 80 millones de células por vía intramuscular o intravenosa después de una dosis de prueba. La vía intratecal también se puede utilizar. En una práctica adicional desvelada en el presente documento, el trasplante intracraneal también se puede utilizar. Las células hES y/o sus derivados son predominantemente células progenitoras neuronales. En otra práctica desvelada en el presente documento, las células progenitoras hematopoyéticas y neuronales se administran por vía intramuscular o intravenosa. Este tratamiento continúa durante un período de un año, comenzando con inyecciones diarias por vía intramuscular o intravenosa durante un período de 3 meses. A continuación, las mismas inyecciones continúan una vez a la semana durante los próximos 3-6 meses y luego una vez cada quince días durante los siguientes 3 meses y, a continuación, una vez al mes según las observaciones del médico. La inyección intratecal se incluye en el protocolo solo de 6 a 8 meses después del inicio del tratamiento y, a continuación, también solo si el paciente no muestra respuesta a las inyecciones intramuscular e intravenosa. Una práctica adicional desvelada en el presente documento es que, se suspenden de 750.000 a 80 millones de células hES y/o sus derivados en 100 ml de solución salina normal y se administran por infusión intravenosa

Ejemplo 1:

Un paciente diagnosticado con autismo con temblores de aleteo, estado hiperactivo, sin habilidades sociales, sin contacto visual, movimientos de rodamiento de píldora, incapacidad para seguir instrucciones, falta de disposición a aprender, mostró una mejora después de la administración de una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados, incluidos los progenitores de células madre neuronales y los progenitores de células madre hematopoyéticas.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 2. Para esta tabla y todas las tablas siguientes con respecto a los programas de inyección, el indicador de tipo celular "neuronal" se refiere a una población celular de células hES que se han diferenciado parcialmente en un medio (por ejemplo, DMEM) que promueve la diferenciación en células madre progenitoras neurales. La población celular comprende células hES y células madre que son, predominantemente, células madre progenitoras neuronales. El indicador "no neuronal" se refiere a una población celular de células hES que se han diferenciado parcialmente en un medio (por ejemplo, RPMI) que promueve la diferenciación a células madre progenitoras distintas de las células madre progenitoras neuronales. La población celular comprende células hES y varias células madre que no son predominantemente células madre progenitoras neuronales.

TABLA 2

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
3/13	dosis de prueba	no neuronal
3/14	im	neuronal
3/16	im	neuronal
3/17	im	neuronal
3/18	im	neuronal
3/20	im	neuronal
3/21	im	neuronal
3/22	im	neuronal
3/23	im	no neuronal
3/24	im	neuronal
3/27	im	neuronal
3/28	im	no neuronal
3/29	im	no neuronal
3/30	im	no neuronal
3/31	im	neuronal
4/3	im	neuronal
4/4	im	neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
4/5	im	neuronal
4/6	im	neuronal
4/7	im	neuronal
4/11	im	neuronal
4/12	im	neuronal
4/13	im	neuronal
4/14	im	neuronal
4/17	iv	neuronal
4/19	im	neuronal
4/21	iv	neuronal
4/24	im	neuronal
4/25	im	neuronal
4/28	iv	neuronal
5/1	iv	neuronal
5/3	iv	neuronal
5/5	im	neuronal
5/8	iv	neuronal
5/10	im	neuronal
5/12	im	neuronal
5/15	iv	neuronal
5/17	im	neuronal
5/29	im	neuronal
5/31	iv	neuronal
6/2	iv	no neuronal
6/5	im	neuronal
6/7	iv	neuronal
6/9	iv	no neuronal
6/12	iv	neuronal
6/14	infusión iv	neuronal
6/16	im	neuronal
6/19	im	no neuronal
6/21	im	neuronal
6/23	iv	neuronal
7/3	iv	neuronal
7/5	infusión iv	neuronal
7/7	im	no neuronal
7/10	im	no neuronal
7/12	im	neuronal
7/14	im	neuronal
7/17	infusión iv x 2	neuronal
7/18	im	no neuronal
7/20	im	no neuronal
7/24	im	no neuronal
7/28	im	no neuronal
7/31	im	no neuronal
8/2	im	no neuronal
8/4	im	no neuronal
8/7	im	no neuronal
8/10	im	no neuronal
8/11	im	no neuronal
8/14	im	no neuronal
8/18	im	no neuronal
8/21	im	neuronal
8/23	im	no neuronal
8/28	im	no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
8/30	im	no neuronal
9/1	im	no neuronal
9/4	im	no neuronal

Tratamiento de los trastornos degenerativos del sistema nervioso

Se administran células hES y/o sus derivados, en donde dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento, se administran en una cantidad de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células para el tratamiento de trastornos degenerativos del sistema nervioso, incluyendo, sin limitaciones, degeneración cortico-basal, atrofia olivo-pontocerebelosa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, demencia, atrofia del nervio auditivo y enfermedad de la neurona motora. En otra práctica desvelada en el presente documento, se administran de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 80 millones de células.

Si bien los protocolos de administración pueden variar para adaptarse al paciente en particular, un protocolo típico para el tratamiento de trastornos degenerativos del sistema nervioso en niños comprende inyecciones intramusculares e intravenosas diarias en el primer mes, inyecciones tres veces a la semana durante los meses 2-4, inyecciones semanales los meses 5 y 6 y vacunas de refuerzo semanales los meses 9-12. Para adultos, un protocolo típico implica inyecciones intramusculares e intravenosas diarias junto con la administración por catéter epidural, punción lumbar, rutas intratecales o caudales. Esto es seguido por dos infusiones intravenosas con un espacio mínimo de al menos 7 días. Finalmente, las inyecciones de refuerzo se administran una vez al mes durante 6 meses y luego una vez cada 2 meses durante al menos 6 meses. El tratamiento puede continuar por períodos más largos e incluso puede durar toda la vida, ya que las enfermedades son progresivas.

En el caso de trastornos progresivos y degenerativos, detener o estabilizar la progresión de la enfermedad a través de una intervención rápida de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento permite una mayor autodependencia del paciente. Es solo después del efecto estabilizador que se pueden ver algunas mejoras.

Ejemplo 2:

Un paciente con antecedentes de dos años de esclerosis múltiple progresiva repetitiva que tomaba SOLUMEDROL (metilprednisolona) diariamente no podía caminar, no tenía control de la vejiga o el intestino, y sufría con frecuencia trastornos respiratorios.

De conformidad con el tratamiento de acuerdo con la divulgación en el presente documento, la afección del sujeto mejoró, el paciente pudo caminar y se restableció el control de la vejiga y el intestino y se redujo el uso de SOLUMEDROL. La RMI ha mostrado una mejora del 50 %.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 3.

TABLA 3

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
7/15	dosis de prueba	neuronal
7/25	im	neuronal
7/26	im	neuronal
7/27	im	no neuronal
7/28	im	neuronal
7/29	im	neuronal
8/1	im	neuronal
8/2	im	neuronal
8/3	im	neuronal
8/4	im x 2	neuronal
8/5	im x 2	neuronal
8/9	im x 2	neuronal
8/10	im x 2	neuronal
8/11	im	neuronal
8/12	im x 2	neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
8/16	iv im	neuronal
8/22	im x 4	hES
8/24	iv im	neuronal
9/2	iv	neuronal
9/8	im	neuronal
9/15	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/19	iv	neuronal
9/22	im	neuronal
9/26	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/29	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/3	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/6	im	no neuronal
10/13	iv	mezcla neuronal y no neuronal
10/17	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/20	iv	neuronal
10/24	iv	mezcla neuronal y no neuronal
10/31	iv	mezcla neuronal y no neuronal
11/3	iv im	mezcla neuronal y no neuronal
11/7	im	no neuronal
11/21	iv	no neuronal
11/24	im	no neuronal
1/19	im x 2	no neuronal neuronal
1/25	im x 2	neuronal
2/2	im iv	no neuronal neuronal
2/15	im x 2 iv	neuronal no neuronal
2/23	im x 2 iv	neuronal no neuronal
3/2	im x 2 iv	neuronal no neuronal
3/8	im x 2 iv	no neuronal
3/16	im x 2 iv	neuronal no neuronal
5/2	im x 2	no neuronal
5/12	im x 2 iv	neuronal no neuronal
6/8	im x 2 iv	neuronal no neuronal
6/16	im x 2 iv	neuronal no neuronal
7/3	im	neuronal
7/4	im	neuronal
7/5	im	neuronal
7/6	im	neuronal
7/7	im	neuronal
7/18	im x 2 iv	neuronal no neuronal
7/22	im x 2 iv	neuronal no neuronal
7/24	im x 2	neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
	iv	no neuronal
8/1	im x 2 iv	no neuronal
8/4	im x 2 iv	no neuronal
8/7	im x 2 iv	no neuronal
8/24	im x 2 iv	no neuronal
8/28	im x 2 iv	no neuronal
9/2	im x 2 iv	no neuronal
9/6	im x 2 iv	no neuronal
9/9	im x 2 iv	no neuronal

Ejemplo 3:

5 Un hombre de 60 años se presentó con ENM (enfermedad de la neurona motora) hace dos años con un rápido deterioro en las brazos y las manos. Sufría continuas sacudidas y fasciculaciones en los brazos, las manos y la lengua. No podía supinar y pronar el brazo izquierdo, ni levantarlo por encima de la cabeza. El brazo derecho se podía levantar con un tirón y tenía manos esqueléticas.

10 1½ años después del tratamiento, las manos se habían recuperado del marco esquelético con la regeneración de los músculos hipotenar y tenar de ambas manos. Podía realizar supinación y pronación con ambos brazos. Tenía la misma dificultad para tragar, que no ha empeorado desde entonces. No hay deterioro de las piernas, la respiración y el habla.

15 El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 4.

TABLA 4

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
8/2	im	neuronal (dosis de prueba)
8/4	im	neuronal no neuronal
8/5	im	neuronal
8/8	im	neuronal
8/9	im	neuronal
8/10	im	neuronal
8/11	im	neuronal
8/12	im	neuronal
8/16	im	neuronal
8/17	im	hES
8/22	im	neuronal
8/23	im	neuronal
8/24	im x 3	no neuronal
8/25	im x 3	no neuronal
8/26	im	neuronal
8/29	im	neuronal
8/31	im iv	neuronal
9/2	im	neuronal
9/5	im iv	neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
9/7	im	neuronal
9/9	im	neuronal
	iv	mixta
9/12	im	neuronal
	iv	no neuronal
9/13	im	neuronal
	iv	no neuronal
9/16	im	mixta
9/19	im	neuronal
	iv	mixta
9/22	iv	neuronal
9/23	im	neuronal
	iv	no neuronal
9/26	im	mixta
9/27	im	mixta
9/28	im	neuronal
	iv	no neuronal
9/30	im	mixta
	iv	no neuronal
10/3	iv	mixta
10/7	im	no neuronal
10/10	iv	neuronal
10/12	iv	mixta
10/17	im	neuronal
	iv	mixta
10/20	epidural	neuronal
10/21	iv	neuronal
10/24	iv	mixta
10/27	iv	neuronal
10/28	iv	mixta
10/31	iv	mixta
11/2	iv	mixta
11/3	epidural	neuronal
11/4	iv	mixta
11/7	im	no neuronal
11/9	im	no neuronal
11/11	im	neuronal
11/14	im	neuronal
11/17	im	no neuronal
11/21	im	no neuronal
11/23	im	no neuronal
12/13	im	no neuronal
12/19	im	neuronal
12/21	im	neuronal
12/23	im	neuronal
12/29	im	neuronal
1/3	im	neuronal
1/9	im	neuronal
1/12	im	neuronal
1/13	iv	no neuronal
1/16	iv	neuronal
1/19	im	neuronal
	iv	no neuronal
1/23	epidural	neuronal
1/27	im	neuronal
	iv	no neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
1/29	im	neuronal
	iv	no neuronal
2/1	iv	neuronal
2/3	im	neuronal
	iv	no neuronal
2/6	im	neuronal
	iv	no neuronal
2/8	iv	no neuronal
2/10	iv	no neuronal
2/13	iv	no neuronal
2/15	iv	no neuronal
2/17	im	neuronal
	iv	no neuronal
2/20	im	neuronal
	iv	no neuronal
2/22	im	neuronal
	iv	no neuronal
2/24	im	neuronal
	iv	no neuronal
2/27	iv	neuronal
	pulverizador oral	no neuronal
3/1	im	neuronal
	iv	no neuronal
3/6	iv	no neuronal
3/8	epidural	neuronal
3/9	epidural	neuronal
3/10	epidural	neuronal
3/11	iv	neuronal
3/22	im	no neuronal
3/24	im	no neuronal
3/27	iv	no neuronal
3/29	im	no neuronal
	iv	
3/31	im	neuronal
	pulverizador oral	no neuronal
4/3	im	neuronal
	iv	no neuronal
4/5	im	neuronal
	iv	no neuronal
4/7	im	neuronal
	iv	no neuronal
4/10	im	neuronal
	iv	no neuronal
4/12	im	neuronal
	iv	no neuronal
4/19	epidural	neuronal
4/24	iv	neuronal
4/26	iv	no neuronal
4/28	im	neuronal
	iv	no neuronal
5/2	im	no neuronal
5/3	im	neuronal
5/5	im	neuronal
	iv	no neuronal
5/8	iv	no neuronal
5/11	infusión intravenosa	neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
5/12	im	no neuronal
5/14	im iv	neuronal no neuronal
5/15	im iv	neuronal no neuronal
5/16	im iv	neuronal no neuronal
5/17	im iv	neuronal no neuronal
5/19	im iv	neuronal no neuronal
5/22	im iv	neuronal no neuronal
5/24	im iv	neuronal no neuronal
5/26	im iv	neuronal no neuronal
5/29	im iv	neuronal no neuronal
6/1	im iv	neuronal no neuronal
6/2	im iv	neuronal no neuronal
6/5	catéter epidural	neuronal
6/6	catéter epidural	neuronal
6/7	catéter epidural	neuronal
6/12	im	neuronal no neuronal
6/14	im iv	neuronal no neuronal
6/16	infusión intravenosa	neuronal
6/21	im	neuronal
6/24	im	neuronal
7/3	iv	neuronal
7/5	iv	neuronal
7/7	iv	neuronal
7/10	iv	neuronal
7/12	iv	neuronal
7/14	iv	neuronal
7/17	iv	no neuronal
7/20	iv	no neuronal
7/24	iv	no neuronal
7/25	epidural (intratecal)	no neuronal
7/31	iv	neuronal
8/2	iv	neuronal
8/3	iv	no neuronal
8/8	iv	no neuronal
8/11	iv	no neuronal
8/16	iv	neuronal
8/23	iv	neuronal
8/28	iv	no neuronal
8/29	iv	no neuronal
9/5	iv	no neuronal
9/6	iv	no neuronal
9/8	iv	no neuronal
9/13	iv	no neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
9/15	im iv	no neuronal
9/18	im iv	no neuronal
9/19	infusión intravenosa	neuronal
9/20	infusión intravenosa	no neuronal
9/22	im iv	no neuronal
9/25	im iv	no neuronal
9/27	im iv	no neuronal
9/29	im iv	no neuronal
10/2	im iv	no neuronal
10/4	im iv	no neuronal
10/9	im iv	no neuronal
10/13	im iv	no neuronal
10/16	im iv	no neuronal
10/18	im iv	no neuronal
10/20	im iv	no neuronal
10/23	im iv	no neuronal
10/25	infusión iv	mixta
10/27	infusión iv	no neuronal
11/1	im iv	no neuronal
11/6	im iv	no neuronal
11/8	im iv	no neuronal
11/10	intratecal	neuronal
11/13	im iv	no neuronal
11/15	im iv	no neuronal
11/17	im iv	neuronal no neuronal
11/20	im iv	no neuronal
11/22	im iv	no neuronal
11/24	iv	neuronal
11/27	im iv	mixta
12/1	im iv	mixta
12/4	infusión iv	mixta
12/6	im	no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
	iv	
12/8	iv	neuronal
12/11	im iv	no neuronal
12/14	infusión iv	no neuronal
12/15	infusión iv	no neuronal
12/18	im iv	no neuronal
12/20	iv	neuronal
12/27	im iv	neuronal
12/29	im iv	neuronal
1/4	im iv	no neuronal
1/8	infusión iv	mixta
1/9	infusión iv	mixta
1/10	infusión iv	mixta
1/12	im iv	no neuronal
1/16	im iv	no neuronal
1/19	im iv	no neuronal
1/22	im iv	mixta

Ejemplo 4:

5 El paciente fue diagnosticado con la enfermedad de Parkinson. El paciente no respondió al tratamiento estándar y su estado empeoró con el paso del tiempo. Tenía un típico andar arrastrando los pies. Sufría temblores unilaterales en el brazo derecho y estaba fisiológicamente muy deprimido. No podía abrir los ojos. Desde que comenzó el tratamiento, el paciente ha mostrado una mejora gradual y, después de un año de tratamiento con células hES, el paciente mejoró notablemente. La marcha es normal, los temblores en la mano son mínimos y psicológicamente es optimista. Abre los ojos por completo. Ahora puede firmar y escribir, lo cual era imposible al comienzo del

10 tratamiento. Ahora es menos dependiente de los demás.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 5.

TABLA 5

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
1/30	im iv	neuronal (dosis de prueba)
1/31	im	neuronal
2/1	iv	neuronal
2/2	iv im	no neuronal neuronal
2/3	iv im	neuronal
2/4	iv im	neuronal
2/5	iv im	neuronal
2/6	iv im	no neuronal neuronal
2/8	iv	no neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
	im	neuronal
2/9	iv im	no neuronal neuronal
2/10	iv im	no neuronal neuronal
2/11	iv im	no neuronal
2/12	iv im	neuronal no neuronal
2/13	iv im	neuronal no neuronal
2/14	iv	neuronal
2/15	iv im	neuronal no neuronal
2/16	iv im	neuronal no neuronal
2/17	iv im	neuronal no neuronal
2/18	iv im	neuronal no neuronal
2/19	iv im	neuronal no neuronal
2/20	iv im	neuronal no neuronal
2/21	iv im	neuronal no neuronal
2/23	iv im	neuronal no neuronal
2/25	iv im	neuronal no neuronal
2/26	iv im	neuronal no neuronal
2/27	iv im	neuronal no neuronal
2/28	iv	neuronal
3/1	iv im	neuronal no neuronal
3/2	iv im	neuronal no neuronal
3/3	iv	neuronal
3/4	im	neuronal
3/5	iv	neuronal
3/7	im	neuronal
3/9	iv	no neuronal
3/10	iv im	neuronal no neuronal
3/11	iv im	neuronal no neuronal
3/12	iv im	neuronal no neuronal
3/13	iv im	neuronal no neuronal
3/28	iv	neuronal
3/29	iv im iv im	neuronal no neuronal
3/30	iv im	neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
	im	no neuronal
3/31	iv im	neuronal no neuronal
4/1	iv im	neuronal no neuronal
4/2	iv im	neuronal no neuronal
4/3	iv im	neuronal no neuronal
4/4	iv im im	neuronal no neuronal
4/5	iv im	neuronal no neuronal
4/6	iv im	neuronal no neuronal
4/7	iv im im	neuronal no neuronal
4/8	iv im	neuronal no neuronal
4/9	iv im	neuronal no neuronal
4/10	iv im	neuronal no neuronal
4/11	iv im	neuronal no neuronal
4/12	iv im	neuronal no neuronal
4/13	iv im	neuronal no neuronal
4/14	iv im	neuronal no neuronal
4/15	iv im	neuronal no neuronal
4/16	iv im	neuronal no neuronal
5/20	iv im	neuronal no neuronal
5/21	infusión	no neuronal
7/10	iv im	neuronal no neuronal
7/11	iv im	neuronal no neuronal
7/12	iv im	neuronal no neuronal
7/13	iv im	neuronal no neuronal
7/14	iv im	neuronal no neuronal
7/15	infusión iv	no neuronal
7/16	infusión iv	no neuronal
7/17	iv im	neuronal no neuronal
7/18	iv im	neuronal no neuronal
7/19	iv im	neuronal no neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
7/20	iv	neuronal
	im	no neuronal
7/21	iv im	neuronal no neuronal
7/22	infusión iv	neuronal
7/23	infusión iv	neuronal
7/24	infusión iv	no neuronal
7/25	iv im	neuronal no neuronal
7/26	iv im	neuronal no neuronal
7/27	iv im	neuronal no neuronal
7/28	iv im	no neuronal
7/29	infusión iv	neuronal
7/30	im	neuronal no neuronal
9/9	im iv	no neuronal
9/12	im iv	no neuronal
9/13	iv im	no neuronal
9/14	im iv	no neuronal
9/15	im iv	no neuronal
9/16	im iv	no neuronal
9/17	infusión iv	neuronal
9/18	infusión iv	neuronal
9/19	iv	neuronal
9/20	im iv	no neuronal
9/21	im iv	no neuronal
9/22	im iv	no neuronal
9/23	infusión iv	no neuronal
9/24	infusión iv	no neuronal
9/25	iv im	no neuronal
9/26	iv im	no neuronal
9/27	iv im	no neuronal
9/28	iv im	no neuronal
9/29	iv infusión iv	neuronal
9/30	iv im	no neuronal
11/9	iv im	no neuronal
11/10	iv im	no neuronal
11/11	iv im	no neuronal
11/12	iv	no neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
	im	
11/14	infusión iv	mixta
11/16	iv im	no neuronal
11/17	iv im	no neuronal
11/18	infusión iv	neuronal
11/19	infusión iv	neuronal
11/20	iv im	no neuronal
11/21	iv im	no neuronal
11/22	iv im	no neuronal
11/23	iv im	no neuronal
11/24	infusión iv	neuronal
11/25	infusión iv	neuronal
11/26	im iv	mixta
11/29	iv im	no neuronal
1/9	iv im	no neuronal
1/10	iv im	no neuronal
1/11	iv im	no neuronal
1/12	iv im	no neuronal
1/13	infusión iv	mixta
1/14	infusión iv	mixta
1/15	iv im	no neuronal
1/16	iv im	no neuronal
1/17	iv im	no neuronal
1/18	iv	no neuronal
1/19	iv	no neuronal
1/20	infusión iv	no neuronal
1/21	infusión iv	mixta
1/22	im iv	mixta
1/23	im iv	mixta
1/24	iv im	neuronal
1/25	iv im	neuronal
1/26	iv im	neuronal
1/27	infusión iv	mixta
1/28	infusión iv	mixta
1/29	iv im	neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
1/30	iv im	neuronal

Tratamiento de la parálisis cerebral

5 Se administran células hES y/o sus derivados, en donde dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento, se administran en una cantidad de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células para el tratamiento de la parálisis cerebral. El protocolo y la dosis son los mismos que para el tratamiento de los trastornos neurodegenerativos.

10 **Ejemplo 5:**

Un hombre de 48 años diagnosticado en AIIMS como PC al nacer tenía dificultad para hablar, caminar arrastrando los pies, dificultad para tragar y hemiparesia del lado izquierdo. Se realizó el gráfico del tono muscular, los reflejos y la potencia para confirmarla.

15 Seis meses después del tratamiento tiene un habla más clara, sin dificultad para tragar, puede usar el lado izquierdo del cuerpo y la marcha ha mejorado. Puede afeitarse con la mano izquierda y también usar la mano izquierda para coger tazas, etc. Su equilibrio es mejor y puede dar largos paseos.

20 El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 6.

TABLA 6

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
3/8	dosis de prueba	no neuronal
3/10	iv im	neuronal
3/17	iv im	neuronal
4/8	iv im x 2	neuronal
4/9	iv x 3 im x 3	neuronal no neuronal
4/10	iv x 3 im x 3	neuronal no neuronal
5/10	iv im	neuronal no neuronal
5/11	im x 2 iv	neuronal
5/12	infusión iv x 2	neuronal
5/13	infusión iv	no neuronal
5/14	infusión iv iv im	neuronal no neuronal
5/15	infusión iv	no neuronal
7/19	iv im	neuronal no neuronal
7/20	infusión iv	no neuronal
7/21	infusión iv x 2	no neuronal
7/22	iv im	neuronal no neuronal
7/24	iv im	neuronal no neuronal
7/25	espinal profundo	neuronal
7/26	iv im	neuronal no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
7/27	iv im	neuronal no neuronal
7/28	iv im	no neuronal
7/31	iv im	neuronal no neuronal
8/1	iv im	no neuronal
8/2	iv im	no neuronal
8/3	iv im	no neuronal
8/4	infusión iv x 2	no neuronal
8/5	infusión iv	no neuronal
8/7	iv im	no neuronal
8/8	iv im	no neuronal
8/9	iv im	no neuronal
8/10	iv im	no neuronal
8/11	iv im	no neuronal
8/12	iv im	no neuronal
8/14	espinal profundo	neuronal
8/16	infusión iv	neuronal
8/17	infusión iv	neuronal
8/18	iv im	neuronal
8/19	espinal profundo	neuronal
8/20	iv im	no neuronal
8/21	iv im	no neuronal
8/22	iv im	no neuronal
8/24	infusión iv	no neuronal
8/25	infusión iv	no neuronal
8/26	iv im	no neuronal

Ejemplo 6:

5 Una niña de 3 años llegó a la clínica con PC y parecía y se comportaba como un bebé de un mes sin control del cuello, llanto débil, sin respuesta e incapacidad para succionar el biberón. Estaba absolutamente floja.

10 Después de un año y medio de tratamiento, ha crecido y parece un bebé de 2 años. Tiene control del cuello, reconoce a sus padres, se arrastra sobre la cama, come comida normal, sonríe con el reconocimiento, se sienta con apoyo y ha dado algunos pasos con su madre sujetándola. Tiene una marcha en un paso de tijera y también ha comenzado a llamar a sus padres.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 7.

TABLA 7

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
8/4	im	neuronal (dosis de prueba)
8/5	im	neuronal
8/8	im	neuronal
8/9	im	neuronal
8/10	im	neuronal
8/11	im	neuronal
8/12	im	neuronal
8/16	im	neuronal
8/17	im	neuronal
8/18	im	neuronal
8/19	im	no neuronal
8/22	im	mixta
8/23	im	mixta
8/25	im	mixta
8/26	im	neuronal
8/29	im	neuronal
8/30	im	neuronal
8/31	im	neuronal
9/1	im	neuronal
9/2	im	neuronal
9/5	im	no neuronal
9/6	im	neuronal
9/7	im	neuronal
9/8	im	neuronal
9/12	im	mixta
9/14	im	no neuronal
9/16	im	mixta
9/19	im	neuronal
9/23	im	neuronal
9/26	im	mixta
9/28	im	mixta
9/30	im	mixta
10/3	im	mixta
10/5	im	neuronal
10/10	im	no neuronal
10/17	im	mixta
10/19	im	no neuronal
10/21	im	neuronal
10/24	im	mixta
10/28	im	mixta
10/31	im	mixta
11/4	im	mixta
11/7	im	no neuronal
11/9	im	no neuronal
11/11	im	neuronal
11/14	im	neuronal
11/15	im	no neuronal
11/16	im	no neuronal
11/18	im	no neuronal
11/22	im	no neuronal
11/23	im	no neuronal
11/25	m	no neuronal
11/28	im	mixta
11/29	im	mixta

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
12/2	im	mixta
12/7	im	no neuronal
12/9	m	no neuronal
12/12	im	no neuronal
12/14	m	neuronal
12/16	im	neuronal
12/19	im	no neuronal
12/21	m	neuronal
12/23	im	neuronal
12/26	m	no neuronal
12/30	im	neuronal
1/5	im	neuronal
1/11	im	neuronal
1/13	im	neuronal
1/16	im	neuronal
1/18	im	neuronal
1/23	im	neuronal
1/25	im	neuronal
1/27	m	neuronal
1/30	im	neuronal
2/1	im	neuronal
2/3	im	neuronal
2/6	im	neuronal
2/8	im	neuronal
2/10	im	neuronal
2/13	im	neuronal
2/15	im	neuronal
2/17	im	no neuronal
22.2.06	im	neuronal
2/24	im	neuronal
2/27	im	neuronal
3/1	m	neuronal
3/3	im	neuronal
3/6	im	no neuronal
3/8	im	no neuronal
3/22	im	no neuronal
3/24	im	neuronal
3/27	im	no neuronal
3/29	im	neuronal
3/31	im	neuronal
4/7	im	neuronal
4/10	im	neuronal
4/12	im	neuronal
4/14	im	neuronal
4/17	im	neuronal
4/19	im	neuronal
4/21	im	neuronal
4/24	im	neuronal
4/26	im	neuronal
5/1	im	neuronal
5/8	im	no neuronal
5/18	im	neuronal
5/22	im	neuronal
5/26	im	neuronal
5/29	im	neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
5/31	im	neuronal
6/2	im	neuronal
6/5	im	neuronal
6/12	im	neuronal
6/16	im	neuronal
6/19	im	neuronal
6/21	im	neuronal
6/28	im	neuronal
6/30	im	neuronal
7/4	im	neuronal
7/7	im	neuronal
7/17	im	neuronal
7/19	m	neuronal
7/21	im	neuronal
7/24	im	neuronal
7/26	im	neuronal
7/31	im	no neuronal
8/2	im	no neuronal
8/4	im	no neuronal
8/7	im	no neuronal
8/9	im	no neuronal
8/11	im	no neuronal
8/14	im	no neuronal
8/16	im	no neuronal
8/18	im	no neuronal
8/21	im	no neuronal
8/23	im	no neuronal
8/25	im	no neuronal
8/28	im	no neuronal
8/30	im	no neuronal
9/1	im	no neuronal
9/4	im	no neuronal
9/11	im	no neuronal
9/13	im	no neuronal
9/15	im	no neuronal
9/20	im	no neuronal
9/25	im	no neuronal
9/27	im	no neuronal
10/3	im	no neuronal
10/4	im	no neuronal
10/13	im	no neuronal
10/16	im	no neuronal
10/18	im	no neuronal
10/19	im	no neuronal
10/23	im	no neuronal
10/25	im	no neuronal
10/27	im	no neuronal
10/30	im	no neuronal
10/31	im	no neuronal
11/3	im	no neuronal
11/6	im	no neuronal
11/8	im	no neuronal
11/10	im	no neuronal
11/13	im	no neuronal
11/15	im	no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
11/17	im	no neuronal
11/20	im	no neuronal
11/22	im	no neuronal
11/24	im	no neuronal
11/27	im	no neuronal
11/29	im	no neuronal
12/1	im	no neuronal
12/8	im	no neuronal
12/11	im	no neuronal
12/15	im	no neuronal
12/26	im	neuronal
12/27	im	neuronal
1/3	im	no neuronal
1/7	im	no neuronal
1/15	im	neuronal
1/24	im	neuronal
1/25	im	neuronal
1/29	im	neuronal

Ejemplo 8:

5 A una niña de 8 años le diagnosticaron parálisis cerebral y retraso mental severo, y no podía caminar solo. No podía identificar objetos y su tiempo de atención era muy bajo. Babeaba mucho y mantenía la boca abierta.

Después del tratamiento, ya no babeaba, su capacidad de atención ha mejorado y está más alerta. Camina con un apoyo mínimo.

10 El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 8.

TABLA 8

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
10/9	im	no neuronal (dosis de prueba)
10/10	im	no neuronal
10/11	im	no neuronal x 2
10/12	im	no neuronal
10/13	im	no neuronal
12/5	im	no neuronal
12/6	im iv	no neuronal
12/7	im x 3	no neuronal
12/8	im iv	no neuronal
12/9	im iv	no neuronal
12/10	im x 3	no neuronal
12/11	im iv	no neuronal
12/12	im x 3	no neuronal
12/13	im iv	no neuronal
12/14	im	no neuronal
12/15	im iv	no neuronal
12/16	im x 3	no neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
12/17	im iv	no neuronal
12/18	im	no neuronal
12/19	im iv	no neuronal
12/20	im x 3	no neuronal
12/21	im iv	no neuronal
12/22	im iv	no neuronal
12/23	im iv	no neuronal
12/24	im iv	no neuronal neuronal
12/25	im iv	neuronal
12/26	im iv	neuronal mixta
12/27	im x 3	neuronal
12/28	im iv	neuronal
12/29	im x 3	neuronal
12/30	im iv	neuronal
12/31	im x 3	neuronal
1/1	im iv	mixta
1/9	infusión iv	mixta
1/10	infusión iv	mixta
1/11	im iv	no neuronal
1/12	im iv	no neuronal
1/13	im iv	no neuronal
1/14	im iv	no neuronal
1/15	im x 3	no neuronal
1/16	im iv	no neuronal
1/17	im x 3	no neuronal
1/18	im	no neuronal
1/19	im	no neuronal
1/20	im	no neuronal
1/21	im	mixta
1/22	im	mixta
1/23	im	mixta
1/24	im	neuronal
1/25	im	neuronal
1/26	im	mixta
1/27	im	mixta
1/28	im iv	neuronal
1/29	im iv	neuronal
1/30	im	neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
	iv	
1/31	im	no neuronal
1/2	iv	no neuronal
2/2	im	no neuronal

Tratamiento de traumatismos del sistema nervioso

5 Se administran células hES y/o sus derivados, en las que dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento, en una cantidad de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células para el tratamiento de traumatismos del sistema nervioso, incluidos, pero sin limitación, daño cerebral, coma y estado vegetativo. En otra práctica desvelada en el presente documento, se administran de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 80 millones de células.

10 Si bien los protocolos de administración pueden variar para adaptarse al paciente en particular, un protocolo típico para el tratamiento del traumatismo del sistema nervioso comprende inyecciones intramusculares e intravenosas diarias durante los primeros 2 meses junto con inyecciones intratecales y epidurales.

15 Tratamiento de accidente cerebrovascular o ictus

20 Se administran células hES y/o sus derivados, en donde dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento, en una cantidad de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células para tratar accidentes cerebrovasculares o ictus. En otra práctica desvelada en el presente documento, se administran de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 80 millones de células.

25 Si bien los protocolos de administración pueden variar para adaptarse al paciente en particular, un protocolo típico para el tratamiento del accidente cerebrovascular comprende inyecciones intramusculares e intravenosas diarias durante dos semanas e infusión intravenosa durante 3 días a partir de ese momento durante el primer mes, infusión intravenosa durante 2 días cada 15 días durante los meses 2 y 3, infusión intravenosa durante 2 días y una inyección intratecal durante el mes 5, e infusión intravenosa durante 4 días seguido de inyección intramuscular durante 4 días durante los meses 8, 10 y 12.

30 Ejemplo 9:

35 Un paciente diagnosticado con accidente cerebrovascular o ictus sufría hemiparesia del lado derecho con babeo, dificultad para tragar e incapacidad para hablar o caminar. Además, el paciente tenía cáncer de colon. Después del tratamiento de acuerdo con la divulgación en el presente documento, el paciente mostró signos de mejoría a medida que el habla y las actividades motoras mejoraron, la columna vertebral se enderezó y la hemiparesia se curó.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 9.

TABLA 9

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
8/17	dosis de prueba	no neuronal
8/22	im	hES
8/23	im x 2	neuronal hES
8/24	im x 2	hES
8/25	im	hES
8/26	im x 2	neuronal
8/29	im	neuronal
8/30	iv	neuronal
8/31	im	neuronal
9/2	im x 2	neuronal
9/5	iv	no neuronal
9/6	iv	neuronal
9/7	im	neuronal
9/8	iv	neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
9/9	iv	neuronal
9/12	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/13	iv	neuronal
9/14	im	no neuronal
9/19	iv	neuronal
9/22	iv	neuronal
9/26	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/29	iv	neuronal
10/3	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/6	im	no neuronal
10/10	iv	neuronal
10/13	iv	neuronal
10/17	iv	mezcla neuronal y no neuronal
10/20	iv	no neuronal
10/24	iv	mezcla neuronal y no neuronal
10/27	iv	neuronal
10/31	iv	mezcla neuronal y no neuronal
11/3	iv	mezcla neuronal y no neuronal
11/7	im	no neuronal
11/10	iv	no neuronal
11/14	im	neuronal
11/17	im	no neuronal
11/21	im	no neuronal
11/24	im	no neuronal
12/4	iv	mezcla neuronal y no neuronal
12/12	iv	no neuronal
12/19	iv	neuronal
12/26	iv	no neuronal
1/4	iv	neuronal
1/11	infusión iv	neuronal
8/18	iv im	neuronal
8/21	iv im	no neuronal
8/22	iv im	no neuronal
8/24	im iv	no neuronal
9/1	infusión iv	no neuronal
9/2	infusión iv	no neuronal

Ejemplo 9:

5 Un hombre de 82 años sufrió un derrame cerebral hace 5 años y se presentó con hemiparesia del lado derecho, con asimetría facial y dificultad para hablar. Caminaba con un palo y una gran cojera y no podía comer con la mano derecha debido a la dificultad en la coordinación. No podía sentarse o levantarse solo y arrastraba los pies al caminar. Presentaba babeo de saliva y tampoco pudo tragar bien.

10 Dos meses después del tratamiento, puede caminar sin apoyo, se sienta y se pone de pié solo, come con la mano derecha, no tiene dificultad para hablar ni asimetría facial. Puede levantarse de una silla. Dobra la rodilla afectada al caminar mientras mantiene el equilibrio.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 10.

TABLA 10

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
11/4	im	no neuronal (dosis de prueba)
11/6	im	no neuronal
11/7	im	neuronal
11/8	im	no neuronal
11/9	im	neuronal
11/10	im	neuronal
11/11	im	no neuronal
11/13	im	no neuronal
11/14	im	no neuronal
11/15	iv im	neuronal
11/16	iv im	neuronal
11/18	iv im	no neuronal
11/22	infusión iv	neuronal
11/23	infusión iv	neuronal
11/24	im	neuronal
11/27	im	neuronal
11/28	im	no neuronal
11/29	im	neuronal
11/30	im	neuronal
12/2	im	no neuronal
12/4	im	no neuronal
12/5	infusión iv	neuronal
12/6	infusión iv im	mixta
12/7	im	mixta
12/8	im	mixta
12/9	im	mixta
12/11	im	mixta
12/12	im	mixta
12/14	im iv	mixta
12/15	im	mixta
12/16	im	mixta
12/18	im	mixta
12/19	im iv	mixta
12/20	im	mixta
12/21	im	mixta
12/22	im	mixta
12/23	im	mixta
12/25	im	neuronal
12/26	im	neuronal
12/27	iv	mixta
12/28	im	neuronal
12/29	im	neuronal
12/30	im	neuronal
1/1	im	mixta
1/2	im	mixta
1/3	iv	no neuronal
1/4	im	no neuronal

Tratamiento de los trastornos del sistema nervioso familiar

Se administran células hES y/o sus derivados, en las que dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento, en una cantidad de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células a sujetos para el tratamiento de trastornos familiares del sistema nervioso, incluidos, pero sin limitación, atrofia olivo pontinocerebral y corea de Huntington. En otra práctica desvelada en el presente documento, se administran de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 80 millones de células. Las vías de administración son intramuscular e intravenosa, junto con intratecal, catéter epidural e infusión intravenosa. Es probable que esto continúe durante toda la vida de la persona, pero el primer año sería un programa intensivo como las siguientes inyecciones intramusculares e intravenosas diarias durante al menos tres meses, tiempo durante el cual también se administran catéter epidural intratecal e infusión intravenosa. El mismo conjunto de inyecciones se administra después de un intervalo de un mes y medio durante un período de 21 días. Las inyecciones intramusculares e intravenosas diarias se continúan y, después, se reducen a tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada quince días y, a continuación, mensualmente según el estado del paciente. La inyección intratecal se puede repetir en un intervalo de 4-6 meses al igual que el catéter epidural. Se pueden administrar infusiones intravenosas cada dos semanas, cada mes o cada dos meses.

Ejemplo 10:

Un paciente diagnosticado con ataxia cerebelosa espinal esporádica con incapacidad para girar en la cama, caminar o cambiar de posición mientras está sentado, tenía dificultad para hablar, tenía temblores e incapacidad para levantar el cuello.

Después del tratamiento con células madre de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento, se notaron mejoras en todos los síntomas y el paciente pudo equilibrarse y caminar algunos pasos. El habla se hizo coherente.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 11.

TABLA 11

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
8/8	dosis de prueba	no neuronal
8/9	im	neuronal
8/10	im x 2	neuronal
8/11	im x 2	neuronal
8/12	im x 2	neuronal
8/13	im x 2	neuronal
8/16	im x 2	neuronal
8/17	im x 2	no neuronal
8/18	im espinal profundo	neuronal
8/19	im	hES
8/23	im	neuronal hES
8/24	im x 2	hES
8/25	im x 2	hES
8/26	im x 2	neuronal
8/29	im x 2	neuronal
8/31	im x 2	neuronal
9/5	im iv	no neuronal
9/7	im	neuronal
9/12	im	neuronal
9/15	epidural	neuronal
9/16	im	neuronal
9/19	iv	neuronal
9/22	iv	neuronal
9/28	im	neuronal
9/30	iv	neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
10/3	im iv	neuronal
10/4	im iv	no neuronal mezcla neuronal y no neuronal
10/5	iv	neuronal
10/13	im	neuronal
10/14	intraarticular	neuronal
10/17	iv	neuronal
11/15	iv	neuronal
11/18	im	no neuronal
11/21	iv	no neuronal
11/23	im	no neuronal
12/1	im iv	mezcla neuronal y no neuronal
12/6	im	mezcla neuronal y no neuronal
12/8	im	no neuronal
12/13	im	no neuronal neuronal
12/15	epidural	neuronal
12/16	im	neuronal
12/21	im	neuronal
12/22	im iv	neuronal
12/25	im iv	no neuronal
3/5	espinal	no neuronal

Ejemplo 11:

- 5 Una paciente con atrofia olivo pontocerebral familiar fue diagnosticado en la Universidad John Hopkins. su padre, su hermana gemela y su hermano estaban afectados por la misma enfermedad. Ella solo podía hablar al espirar, estaba anclada a una silla de ruedas con goteo continuo de orina y tuvo que hacer una evacuación manual de las heces. Tenía temblores en todo el cuerpo y no podía mantener el equilibrio incluso mientras estaba sentada. Habría hipotensión postural severa.
- 10 Después de 2 años de tratamiento, la paciente va al baño para realizar sus funciones corporales, habla bien, no tiene temblores y puede caminar con apoyo. No ha habido deterioro desde entonces, aunque su hermana gemela está postrada en cama con la misma enfermedad. No hay hipotensión postural y definitivamente no se ha deteriorado.
- 15 **Tratamiento de trastornos de la piel**
- 20 Se administran células hES y/o sus derivados, en las que dichas células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento, mediante inyección subcutánea o intravenosa o mediante aplicación local o tópica en una cantidad de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células para el tratamiento de trastornos de la piel, incluidas, aunque sin limitación, úlceras que no se curan, psoriasis, úlceras por presión y sarcoidosis. En el caso de trastornos de la piel, las células hES también pueden usarse tópicamente para tratar el trastorno o daño de la piel. En otra práctica desvelada en el presente documento, se administran de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 80 millones de células.
- 25 En una práctica desvelada en el presente documento, las células hES o las células diferenciadas de la piel y el extracto embrionario pueden mezclarse con un vehículo biocompatible, como un gel, ungüento o pasta, y se aplican a la piel dañada o al tejido mucoso para acelerar la curación, así como para curar heridas resistentes a la curación, tales como úlceras de decúbito o por diabetes. Como alternativa, las células pueden proporcionarse en suspensión o emulsión. En una práctica desvelada en el presente documento, el vehículo también contiene agentes antimicrobianos, analgésicos u otros agentes farmacéuticos.
- 30

Como alternativa, en una práctica diferente desvelada en el presente documento, Las células hES se cultivan en un sustrato poroso artificial estéril como la muselina y se aplican directamente a la herida. Después de 12-24 horas, se extrae la muselina y las células madre continúan creciendo, curando la herida. Aplicadas intralesionalmente, las

células hES se diferencian y, en última instancia, reemplazan las células dañadas.

Ejemplo 12:

5 Una mujer de 70 años sufrió una quemadura en el tobillo izquierdo que no sanó a pesar de la terapia convencional. Después de la aplicación de células hES en el sitio de la quemadura, su herida comenzó a sanar y tres años después la piel está absolutamente bien.

Tratamiento de trastornos autoinmunes

10 Se administran células hES y/o sus derivados, en las que dichas células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento, por inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intraarticular o infusión intravenosa o combinaciones de las mismas en una cantidad de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células para el
 15 tratamiento de trastornos autoinmunes, que incluyen, pero sin limitación, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, cardiomiopatía, sarcoidosis, artritis y colitis ulcerosa. En otra práctica desvelada en el presente documento, se administran de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 80 millones de células. La administración de las células hES es altamente efectiva no solo en el tratamiento de trastornos autoinmunes sino también en la restauración de un sistema inmunitario debilitado. Como alternativa al tratamiento con
 20 inmunosupresores o como procedimiento para "cebar" pacientes para trasplante de órganos u otra intervención médica, las células hES y sus derivados pueden usarse para permitir la aceptación del órgano mediante la reducción en los procesos de rechazo del injerto del huésped.

25 Si bien los protocolos de administración pueden variar para adaptarse al paciente en particular, un protocolo típico para el tratamiento de trastornos autoinmunes comprende inyecciones diarias durante los primeros 2 meses, inyecciones en días alternos junto con una infusión intravenosa durante el mes 3, inyecciones semanales junto con una infusión intravenosa continua de 2 días cada 15 días durante los meses 5-7 y 10-12, e inyecciones de refuerzo cada 3 meses durante un año y luego cada 6 meses durante un año.

Ejemplo 13:

30 Un paciente que sufría de psoriasis durante los últimos 26 años estaba en silla de ruedas con hipertensión, diabetes mellitus y artritis psoriásica con enormes úlceras en su pierna que no curaban y no eran susceptibles al injerto de piel.

35 Después de recibir terapia durante 6 meses, no tiene úlceras ni artritis. Su diabetes e hipertensión estaban bajo control. Ha comenzado a caminar sola y ha comenzado todas las actividades y está recibiendo vacunas de refuerzo durante el último año. Afirma que ha caminado por primera vez en los últimos 26 años y que puede hacer todas las tareas domésticas por su cuenta.

40 El tratamiento con células madre se realizó localmente en las llagas y las llagas se curaron. También después del tratamiento no se detectaron más llagas. También se redujo la descamación y el picor de la piel y la hinchazón de las piernas. La afección diabética también se curó con presión arterial controlada que condujo a una reducción en la medicación.

45 El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 12.

TABLA 12

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
12/27	dosis de prueba	no neuronal
1/22	im	no neuronal
2/20	im	neuronal
2/23	im	neuronal
2/28	m	neuronal
4/1	im	neuronal
4/7	im	mezcla neuronal y no neuronal
4/10	im	mezcla neuronal y no neuronal
4/21	m	mezcla neuronal y no neuronal
6/29	im	no neuronal
7/6	m	no neuronal
7/29	im	no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
10/17	im pulverizador	no neuronal
11/1	im pulverizador	mezcla neuronal y no neuronal
11/2	im pulverizador	mezcla neuronal y no neuronal
11/3	im pulverizador	mezcla neuronal y no neuronal
11/4	im x 2	neuronal
11/5	iv pulverizador	no neuronal
11/6	im pulverizador	no neuronal
11/7	im pulverizador	no neuronal
11/11	iv pulverizador	neuronal
11/14	iv pulverizador	neuronal
11/15	im pulverizador	no neuronal
11/16	im	no neuronal
11/21	iv	no neuronal
11/23	im	no neuronal
11/29	im	mezcla neuronal y no neuronal
1/4	im	no neuronal
3/28	im	no neuronal

Tratamiento de trastornos sanguíneos

5 Aún otro procedimiento de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento es en el tratamiento de trastornos de la sangre tales como trombocitopenia, talasemia, leucemia mieloide aguda por inyección intravenosa de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden células progenitoras de células madre hematopoyéticas. Las células se administran durante 10 días a 14 días y luego se repiten como una inyección semanal para condiciones benignas. Para afecciones malignas, las inyecciones se administran diariamente durante 10 días y luego se repiten si hay una recaída.

Tratamiento de trastornos genéticos

15 Otros procedimientos de trasplante de células hES de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento son el tratamiento de los trastornos genéticos, incluidos, pero sin limitación, síndrome de Down, ataxia de Friederich, corea de Huntington, síndrome de Asperger y atrofia espinomuscular

20 Los síntomas de los trastornos genéticos se manifiestan con retraso mental, disfunción musculoesquelética e insuficiencia orgánica en combinación o solos y dan como resultado un debilitamiento incurable grave y una esperanza de vida reducida. En el caso de pacientes que padecen un trastorno genético, las células hES se administran al paciente de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento y, una vez administradas, se diferencian para proporcionar al paciente una población de células que expresen el producto génico que falta o comprometido con la consiguiente restauración de la homeostasis intracelular.

25 Si bien los protocolos de administración pueden variar para adaptarse al paciente en particular, un protocolo típico para el tratamiento de los trastornos genéticos comprende inyecciones intramusculares e intravenosas diarias durante el primer mes, inyecciones en días alternos durante el mes 2, inyecciones dos veces a la semana durante el mes 3, inyecciones una vez a la semana durante los meses 5, 7, 9, 11 y 12 e inyecciones de refuerzo cada 3 meses durante un año. También se administran infusiones intravenosas cada 15 días

30 Ejemplo 14:

Una paciente con síndrome de Down no mostró respuesta a las órdenes verbales, no podía subir y bajar escaleras y tenía bajo peso corporal como resultado de dificultades para comer. La paciente no podía comer, mostró una postura típica con las piernas muy abiertas y sufría de toses y resfriados frecuentes. Los ojos eran mongoloides.

35

De conformidad con el tratamiento de acuerdo con la divulgación en el presente documento, la paciente es capaz de comprender y ejecutar órdenes verbales, comenzó a hablar y comenzó a subir y bajar las escaleras. Las pruebas de DQ han demostrado que la edad mental es de 1 año por detrás de su edad cronológica en comparación con 2 años y 6 meses de retraso en un lapso de menos de un año. Socialmente, va a colegio y juega con otros niños. También se alimenta a sí misma.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 13.

TABLA 13

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
7/8	dosis de prueba	no neuronal
7/16	im	neuronal
7/25	im	neuronal
7/26	im	neuronal
7/27	im	neuronal
7/30	im	neuronal
8/3	im	neuronal
8/10	im	neuronal
8/12	im	neuronal
8/16	im	neuronal
8/18	im	neuronal
8/22	im	hES
8/26	im	neuronal
8/29	im	neuronal
8/31	im	neuronal
9/2	im	neuronal
9/6	im	neuronal
9/8	im	no neuronal
9/13	im	no neuronal
9/19	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/22	im	no neuronal
9/30	im	no neuronal
10/3	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/10	im	no neuronal
10/18	im	no neuronal
10/27	im	neuronal
11/7	im	no neuronal
11/8	im	no neuronal
11/9	im	no neuronal
11/10	im	no neuronal
11/11	im	neuronal
11/14	im	neuronal
11/17	im	no neuronal
11/18	im	no neuronal
11/21	im	no neuronal
11/22	im	no neuronal
11/23	im	no neuronal
11/25	im	no neuronal
11/28	im	mezcla neuronal y no neuronal
12/4	im	mezcla neuronal y no neuronal
12/8	im	no neuronal
12/12	im	no neuronal
12/15	im	neuronal
12/19	im	neuronal
12/27	iv	neuronal
1/4	im iv	no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
1/11	im	no neuronal neuronal
1/19	im	neuronal
1/20	im	no neuronal
1/23	im	no neuronal
1/30	im	neuronal
2/9	im	neuronal
2/13	im	neuronal
2/23	im	neuronal
2/27	im	neuronal
3/10	im	neuronal
3/14	im	neuronal
3/20	im	neuronal
5/11	im	neuronal
5/15	im	neuronal
5/16	im	neuronal
5/17	im	neuronal
5/18	im	neuronal
5/22	im	neuronal
5/23	im	neuronal
7/3	im	neuronal
7/5	im	neuronal
7/11	im	neuronal
7/13	im	neuronal
7/17	im	neuronal
7/19	im	neuronal
7/21	iv	neuronal
7/24	im	neuronal
7/28	im	no neuronal
7/31	im	neuronal
8/2	im	no neuronal
8/21	im	no neuronal
8/23	im	no neuronal
8/28	im	no neuronal
8/30	im	no neuronal

Ejemplo 15:

5 Una niña de 3 años fue diagnosticada con síndrome de Down. No podía hablar, comprender ni subir y bajar las escaleras. No comía sola y su habla limitada a una sola palabra era muy poco clara.

Después de 8 meses de tratamiento, comprende todo, habla oraciones de tres palabras y reconoce colores, formas y tamaños. Puede subir y bajar las escaleras sola y ha comenzado a comer sola.

10 El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 14.

TABLA 14

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
1/30	im	neuronal (dosis de prueba)
2/6	im	neuronal
2/7	im	neuronal
2/8	im	neuronal
2/9	im	neuronal
2/10	im	no neuronal
2/13	im	neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
2/15	im	neuronal
2/16	im	neuronal
2/17	im	neuronal
2/20	im	neuronal
2/22	im	neuronal
2/24	im	no neuronal
2/27	im	neuronal
3/1	im	neuronal
3/3	im	no neuronal
3/6	im	no neuronal
3/13	im	neuronal
3/15	im	neuronal
3/22	im	neuronal
3/24	im	neuronal
3/26	im	neuronal
3/27	im	no neuronal
3/29	im	neuronal
4/3	im	neuronal
4/5	im	neuronal
4/7	im	neuronal
4/10	im	neuronal
4/12	im	no neuronal
4/14	im	no neuronal
4/21	im	neuronal
4/24	im	neuronal
4/26	im	neuronal
4/28	im	neuronal
5/1	im	neuronal
5/10	im	neuronal
5/12	im	neuronal
5/13	im	no neuronal
5/22	im	neuronal
5/24	im	neuronal
5/29	im	neuronal
6/5	im	neuronal
6/7	im	neuronal
6/10	im	neuronal
6/14	im	neuronal
6/16	im	neuronal
6/19	im	neuronal
6/21	im	neuronal
6/23	iv	no neuronal
6/27	im	neuronal
6/29	im	neuronal
7/3	im	neuronal
7/5	im	neuronal
7/12	im	neuronal
7/14	im	neuronal
7/17	im	neuronal
7/19	im	neuronal
7/21	im	neuronal
7/27	im	neuronal
7/28	im	no neuronal
8/1	im	no neuronal
8/3	im	no neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
8/5	im	no neuronal
8/7	im	no neuronal
8/19	im	no neuronal
8/24	im	no neuronal
8/26	im	neuronal
8/28	im	no neuronal
8/31	im	no neuronal
9/2	im	no neuronal
9/7	im	no neuronal
9/9	im	no neuronal
9/11	im	no neuronal
9/14	im	no neuronal
9/21	im	no neuronal
9/23	im	no neuronal
9/25	im	no neuronal
9/28	im	no neuronal
9/29	im	no neuronal
10/4	im	no neuronal
10/7	im	no neuronal
10/10	im	no neuronal
10/14	im	no neuronal
10/16	im	no neuronal
10/18	im	no neuronal
10/22	im	no neuronal
10/26	im	no neuronal
10/28	im	no neuronal
11/1	im	no neuronal
11/4	im	no neuronal
11/7	im	no neuronal
11/9	im	no neuronal
11/13	im	no neuronal
11/16	im	no neuronal
11/17	im	no neuronal
11/20	im	no neuronal
11/23	im	no neuronal
11/27	im	no neuronal
11/30	im	no neuronal
12/3	im	no neuronal
12/4	im x 2	no neuronal
12/7	im	no neuronal
12/9	im	no neuronal
12/11	im	no neuronal
12/14	im x 2	no neuronal
12/16	im	no neuronal
12/21	im	no neuronal
12/24	im	no neuronal
12/27	im	neuronal
1/1	im	mixta
1/3	im	no neuronal
1/6	im	no neuronal
1/9	im	no neuronal
1/12	im	no neuronal
1/15	im	no neuronal
1/18	im	no neuronal
1/22	im	mixta

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
1/25	im	neuronal
1/28	im	neuronal

Ejemplo 16:

5 Un niño de 13 años sufría un defecto genético con falta de concentración, ataques frecuentes y discapacidad visual. Tenía visión en túnel total. Tenía dificultades para sentarse en clase y ver la pizarra a pesar de estar sentado en la primera fila. Presentaba retraso en los hitos y si leía algo, tendría que leerlo tres veces para recordar lo que leía. También tenía dificultades para localizar artículos en una habitación.

10 Desde que comenzó a recibir células hES, su vista ha mejorado y se sienta dos filas más atrás en el aula y puede ver la pizarra mucho mejor. Es capaz de recordar mucho más y su tiempo de respuesta a las órdenes verbales ha mejorado. No tiene tantos ataques como antes y su medicamento se ha reducido. Los informes del oftalmólogo muestran que las áreas muertas en la periferia han sido restauradas.

15 El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 15.

TABLA 15

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
6/8	im	neuronal (dosis de prueba)
6/9	im	neuronal
6/12	im	neuronal
6/13	im	neuronal
6/14	im	no neuronal
6/15	im	no neuronal
6/16	im	neuronal
6/20	im	neuronal
6/21	im	no neuronal
6/22	im	neuronal
6/23	iv	no neuronal
6/27	im	neuronal
6/28	im	neuronal
6/29	im	neuronal
7/3	im	no neuronal
7/4	im	neuronal
7/5	im	neuronal
7/6	im	neuronal
7/7	im	neuronal
7/10	im	neuronal
7/11	im	neuronal
7/12	im	neuronal
7/13	im	no neuronal
7/14	im	neuronal
7/17	im	neuronal
7/18	im	neuronal
7/20	im	neuronal
7/21	infusión iv	neuronal
7/22	infusión iv	neuronal
7/24	im	neuronal
7/25	im	neuronal
7/26	im	neuronal
7/27	im	neuronal
7/28	im	no neuronal
7/31	im	no neuronal
8/2	im	no neuronal
8/3	im	no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
8/4	im	no neuronal
8/7	im	no neuronal
8/8	im	no neuronal
8/9	im	no neuronal
8/10	im x 2	no neuronal
8/11	infusión iv	no neuronal
8/12	infusión iv	no neuronal
8/13	im	no neuronal
8/14	im	no neuronal
8/17	im x 2	no neuronal
8/18	im	no neuronal
8/21	im	no neuronal
8/22	im	no neuronal
8/23	im	no neuronal
8/24	im	no neuronal
8/25	im	no neuronal
8/2/	im	no neuronal
8/29	im	no neuronal
8/30	im	no neuronal
9/2	infusión iv	no neuronal
9/3	infusión iv	no neuronal
9/4	im x 3	no neuronal
9/5	im	no neuronal
9/6	im	no neuronal
9/7	im	no neuronal
9/8	im	no neuronal
9/11	im	no neuronal
9/13	im	no neuronal
9/14	im	no neuronal
9/16	im	no neuronal
9/18	im	no neuronal
9/19	im	no neuronal
9/21	im x 2	no neuronal
9/22	infusión iv	no neuronal
9/23	infusión iv	no neuronal
10/3	im	no neuronal
10/4	im	no neuronal
10/5	im	no neuronal
10/6	im	no neuronal
10/9	im	no neuronal
10/10	im	no neuronal
10/11	im	no neuronal
10/12	im	no neuronal
10/13	retroorbital	neuronal
10/16	im	no neuronal
10/17	im	no neuronal
10/18	im	no neuronal
10/20	im	no neuronal
10/23	im	no neuronal
10/24	im	no neuronal
10/25	im	no neuronal
10/26	im	no neuronal
10/27	infusión iv	no neuronal
10/28	infusión iv x 3	no neuronal
10/31	im x 2	no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
11/2	im x 2	no neuronal
11/3	im x 2	no neuronal
11/6	im x 2	no neuronal
11/8	im	no neuronal
11/9	im	no neuronal
11/10	im	no neuronal
11/13	im	no neuronal
11/14	retroorbital	neuronal
11/15	im	no neuronal
11/16	im	no neuronal
11/17	im	no neuronal
11/20	im	no neuronal
11/21	im	no neuronal
11/23	im	no neuronal
11/24	im	no neuronal
11/29	im	no neuronal
11/30	iv	mixta
12/1	infusión iv	mixta
12/4	im	no neuronal
12/5	iv	mixta
12/6	im	no neuronal
12/7	im	no neuronal
12/8	im	no neuronal
12/11	im	no neuronal
12/12	im	no neuronal
12/13	im	no neuronal
12/14	im	no neuronal
12/18	im	no neuronal
12/19	iv	no neuronal
12/21	im	no neuronal
12/22	retroorbital	neuronal
12/29	im	neuronal
2/2	im	no neuronal

Ejemplo 17:

5 El paciente es un hombre de 32 años que sufre ataxia de Fredrick y cuya hermana murió de la enfermedad. No podía estar de pie, tenía un habla debilitada, dificultad para tragar, estaba en silla de ruedas y necesitaba ayuda para ir al baño. Anteriormente se había tratado en Alemania y EE.UU. sin resultados. El corazón se estaba dilatando y funcionaba del 15 al 20 %.

10 Desde que comenzó a recibir las células hES, ha mostrado mejoría. Es capaz de hablar mucho más claro y no tiene dificultad para tragar. El corazón ha mejorado, con todas las dimensiones volviendo a la normalidad y la capacidad de funcionamiento de hasta el 58 al 60 %. No ha habido deterioro.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 16.

15

TABLA 16

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
2/17	im	no neuronal (dosis de prueba)
2/20	im	neuronal
	iv	no neuronal
2/21	im	neuronal
	iv	no neuronal
2/22	im	neuronal
	iv	no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
2/23	im iv	neuronal no neuronal
2/24	im iv	neuronal no neuronal
2/25	im iv	neuronal no neuronal
2/26	im iv	neuronal no neuronal
2/27	epidural	neuronal
2/28	im iv	neuronal no neuronal
3/1	im iv	neuronal no neuronal
3/2	im iv	neuronal no neuronal
3/3	im iv	neuronal no neuronal
3/4	im iv	neuronal no neuronal
3/5	im iv	neuronal no neuronal
3/6	im	neuronal no neuronal
3/7	epidural (catéter)	neuronal
3/8	epidural (catéter)	neuronal
3/9	epidural (catéter)	neuronal
3/10	epidural (catéter)	neuronal
3/13	im iv	neuronal no neuronal
3/14	im	no neuronal
3/16	im	no neuronal
3/17	im iv	neuronal no neuronal
3/18	im iv	neuronal no neuronal
3/19	im iv	neuronal no neuronal
3/20	im iv	neuronal no neuronal
3/21	im	no neuronal
3/22	im	no neuronal
3/24	im iv	neuronal no neuronal
3/25	im	no neuronal
3/26	im	no neuronal
3/27	im	neuronal
3/28	im	no neuronal
3/29	im	no neuronal
3/30	im	no neuronal
3/31	im	no neuronal
4/1	im	no neuronal
4/2	im	no neuronal
4/3	im	no neuronal
4/4	im iv	neuronal no neuronal
4/5	im	no neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
4/6	im	no neuronal
4/7	im	no neuronal
4/8	im	no neuronal
4/9	im iv	neuronal no neuronal
4/10	im iv	neuronal no neuronal
4/11	im	no neuronal
4/15	im	no neuronal
4/16	im	no neuronal
4/18	im iv	neuronal no neuronal
4/19	im iv	neuronal no neuronal
4/20	im iv	neuronal no neuronal
4/21	im	no neuronal
4/22	im	no neuronal
4/24	im	no neuronal
4/25	im	no neuronal
4/26	iv im	neuronal no neuronal
4/27	iv im	neuronal no neuronal
4/29	iv	neuronal
4/30	iv im	neuronal no neuronal
502	im	no neuronal
5/3	iv	neuronal
5/5	iv epidural	neuronal
5/7	iv im	neuronal no neuronal
5/9	iv im	neuronal no neuronal
5/10	iv im	neuronal no neuronal
5/12	iv im	neuronal no neuronal
5/13	iv im	neuronal no neuronal
5/14	iv im	neuronal no neuronal
5/16	epidural (intratecal)	neuronal
5/18	iv im	neuronal no neuronal
8/26	im iv	no neuronal
8/27	im iv	no neuronal
8/28	iv infusión iv	no neuronal
8/29	iv infusión iv	no neuronal
8/30	im iv	no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
8/31	im iv	no neuronal
9/4	im iv	no neuronal
9/6	im iv	no neuronal
9/7	im iv	no neuronal
9/9	im iv	no neuronal
9/10	epidural (intratecal)	neuronal
9/12	im iv	no neuronal
9/14	im iv	no neuronal
9/15	epidural (catéter)	neuronal,
9/16	epidural (catéter)	neuronal,
9/17	epidural (catéter)	neuronal
9/18	im iv	no neuronal
9/19	im iv	no neuronal
9/20	iv infusión iv	no neuronal
9/21	iv infusión iv	no neuronal

Tratamiento de trastornos oculares

- 5 Otro uso del trasplante de células hES de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento es en el tratamiento de los trastornos oculares, incluidos, pero sin limitaciones, atrofia del nervio óptico, degeneración macular, daño ocular, rechazo del injerto corneal y retinitis pigmentosa a través de inyección directa de células progenitoras neuronales y células hES de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento en la porción retrobulbar del ojo, el área superficial del ojo y la cámara interna del ojo.
- 10 Si bien los protocolos de administración pueden variar para adaptarse al paciente en particular, un protocolo típico para el tratamiento de los trastornos oculares comprende 10 días de inyecciones intramusculares e intravenosas, seguidas de una inyección retrobulbar o intravítrea, 15 días de inyecciones intramusculares e intravenosas seguidas de una inyección retrobulbar, 2 infusiones intravenosas y una inyección retrobulbar después de 2 meses. Se administra un total de 4 inyecciones retrobulbar durante un período de 8 meses a un año antes de que se vean los resultados, pero en algunos casos los resultados se ven antes. Se pueden utilizar vías intravítreas. Además, la
- 15 córnea se puede reparar mediante el uso de lentes de contacto en los que se han cultivado las células madre. También se pueden usar gotas para los ojos que comprenden células madre.

Ejemplo 18:

- 20 Un paciente diagnosticado de atrofia del nervio óptico tenía trastornos que incluían dificultad para leer letras pequeñas y no poder ver los objetos colocados lejos. Tampoco podía ver los colores azul oscuro y violeta. La visión era nula con la percepción de la luz y ahora es 6/24.
- 25 De conformidad con la terapia con células madre de acuerdo con la divulgación en el presente documento, es decir, las células hES y sus derivados, incluidos los progenitores de células madre neuronales administrados por inyección retrobulbar y las células hES y sus derivados, incluidos los progenitores de células madre neuronales y los progenitores de células madre hematopoyéticas de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento se administran mediante inyección intravenosa local, inyección subcutánea o inyección intramuscular, inyección
- 30 intravítrea o aplicación tópica en una cantidad de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células, el paciente mostró mejoras significativas. Es capaz de leer durante tiempo y puede ver vallas publicitarias, así como televisión a distancia.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 17.

TABLA 17

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
2/14	im	neuronal
2/15	iv	neuronal no neuronal
3/20	iv x 2 im	neuronal
3/21	iv retrobulbar	neuronal
4/30	iv	no neuronal
5/1	iv im	neuronal
5/2	retrobulbar	no neuronal

Tratamiento de trastornos hepáticos y renales

5

Otro uso más del trasplante de células hES según la práctica desvelada en el presente documento es en el tratamiento de trastornos hepáticos y trastornos renales, incluidos, pero sin limitación, nefrosis renal terminal y síndrome nefrótico a través del trasplante de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento. Las vías de administración son intravenosa, intramuscular y por infusión intravenosa.

10

Ejemplo 19:

15

Un paciente diagnosticado de síndrome nefrótico exhibió urea elevada, niveles de creatina y proteína P. La diferenciación corticomedular no se mantuvo y el cuerpo se había hinchado. Las células hES y sus derivados, incluidos los progenitores de células madre hematopoyéticas, los progenitores de células madre productoras de albúmina y los progenitores de células madre productoras de bilirrubina de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento se administraron mediante inyección intravenosa o inyección subcutánea o inyección intramuscular o infusión intravenosa en una cantidad de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células. Después del tratamiento con células madre, el cuerpo estaba menos hinchado y se restableció la diferenciación corticomedular. Los niveles de urea, creatina y proteína P también se normalizaron.

20

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 18.

TABLA 18

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
8/10	dosis de prueba	neuronal
8/11	im	neuronal
8/12	im	neuronal
8/16	im	hES
8/22	im	hES
8/24	im	hES
8/25	im	neuronal
8/29	im	neuronal
9/1	im	neuronal
9/7	im	neuronal
9/8	im	no neuronal
9/12	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/19	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/3	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/10	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/11	iv	mezcla neuronal y no neuronal
10/31	iv	no neuronal
11/10	im	no neuronal
11/21	im	no neuronal
12/8	im	no neuronal
12/23	iv	no neuronal
2/7	im	no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
8/24	im	no neuronal
8/25	im	no neuronal
9/9	im	no neuronal

Tratamiento de trastornos musculoesqueléticos

5 Otro uso del trasplante de células hES de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento es en el tratamiento de trastornos musculoesqueléticos, incluidos, pero sin limitación, artritis, distrofia muscular de Duchenne, distrofia de la faja del miembro, atrofia muscular espinal y atrofia muscular de Becker.

10 Si bien los protocolos de administración pueden variar para adaptarse al paciente en particular, un protocolo típico para el tratamiento de los trastornos musculoesqueléticos comprende inyecciones intramusculares o intravenosas diarias durante el primer mes, inyecciones dos veces a la semana durante los meses 3, 5, 6 y 7, inyecciones semanales durante los meses 9-12 e inyecciones de refuerzo cada 3 meses. Las infusiones intravenosas se administran cada 10 a 15 días y las inyecciones musculares espinales profundas se administran cada 15 a 30 días.

Ejemplo 20:

15 El historial del caso de un paciente diagnosticado con distrofia muscular de Duchenne mostró síntomas, tales como apatía, muslos y cara hinchados, y signo positivo de Gower, con niveles altos de creatina fosfoquinasa (CPK) a 10.000 unidades.

20 Después del tratamiento del paciente con células hES y sus derivados, incluidos los progenitores de células madre neuronales y los progenitores de células madre hematopoyéticas solos o en combinación mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea o inyección intramuscular o infusión con catéter intravenoso, o infusión con catéter epidural o infusión con catéter de bloqueo subaracnoideo durante un período predeterminado, los niveles de CPK disminuyeron drásticamente a 1198 unidades y el signo de Gower fue negativo.

25 El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 19.

TABLA 19

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
3/18	dosis de prueba	no neuronal
3/19	im	neuronal
3/20	im x 2	neuronal
3/25	im x 2	no neuronal
3/26	im x 2	no neuronal
3/27	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
3/28	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
3/29	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
3/30	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
3/31	im x 4	neuronal no neuronal x 3
4/1	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/2	im x 3	neuronal no neuronal x 2
4/3	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/4	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/5	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/6	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
4/7	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/8	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/9	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/10	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/11	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/12	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/13	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/14	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/15	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/16	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/17	im x 5	neuronal x 3 no neuronal x 2
4/18	im x 3	neuronal no neuronal x 2
4/19	im x 3	neuronal x 2 no neuronal
4/20	im x 3	neuronal no neuronal x 2
4/21	im x 3	neuronal no neuronal x 2
4/22	im x 3	neuronal no neuronal x 2
4/23	im x 3	neuronal x 2 no neuronal
4/24	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/25	im x 3	neuronal no neuronal x 2
4/26	im x 2	neuronal no neuronal
7/1	im x 2	neuronal no neuronal
7/2	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/3	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/4	im x 2	neuronal no neuronal
7/5	infusión iv x 2	neuronal
7/6	infusión iv x 2	neuronal
7/7	im x 2	neuronal
7/8	im x 2	neuronal
7/9	im x 2	neuronal no neuronal
7/10	im x 2	neuronal no neuronal
7/11	im x 2	neuronal no neuronal
7/12	im x 2	neuronal no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
7/13	im x 2	neuronal no neuronal
7/14	im x 2	neuronal no neuronal
7/15	im x 2	neuronal no neuronal
7/16	im x 3	neuronal
7/17	iv infusión im x 2	neuronal no neuronal
7/18	iv infusión im x 2	neuronal no neuronal
7/19	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/20	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/21	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/22	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/23	iv x 2 im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 4
7/24	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/25	iv im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 4
7/26	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/27	iv im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 4
7/28	im x 4	neuronal no neuronal x 3
7/29	iv im x 4	no neuronal
7/30	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/31	iv im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 3
8/1	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
8/2	im x 4	no neuronal
8/3	infusión iv x 2	no neuronal
8/4	infusión iv x 2	no neuronal
8/5	im x 4	no neuronal
8/6	im x 4	no neuronal
8/7	iv infusión im x 2	no neuronal
8/8	iv infusión im x 2	no neuronal
8/9	iv infusión x 2 im x 2	no neuronal
8/10	im x 4	no neuronal
8/11	im x 4	no neuronal
8/12	iv infusión im x 2	neuronal

Ejemplo 21:

5 Un niño de 14 años diagnosticado con un caso de DMD estaba postrado en cama sin fuerza en las manos ni en las piernas y con atrofia muscular. También tenía escoliosis.

Después de 8 meses de terapia, ha desarrollado músculos en los bíceps, tríceps y braquiorradiales y es capaz de levantar los brazos hasta el nivel del codo. Ha aumentado de peso y está creciendo sin ninguna escoliosis espinal asociada. Sus niveles de CPK, que indican la tasa de degradación muscular, se han reducido.

10

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 20.

TABLA 20

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
4/13	im	no neuronal (dosis de prueba)
4/14	im	no neuronal
4/15	im	neuronal
4/16	im	neuronal
4/17	im	neuronal no neuronal
4/18	im	no neuronal
4/19	im	neuronal no neuronal
4/20	im	neuronal no neuronal
4/21	im	neuronal no neuronal
4/22	im	neuronal no neuronal
4/23	im	neuronal no neuronal
4/24	im	neuronal no neuronal
4/25	im	neuronal no neuronal
4/26	im	no neuronal
4/27	im	no neuronal
4/28	im	neuronal no neuronal
4/29	im	neuronal no neuronal
4/30	im	neuronal no neuronal
5/1	im	no neuronal
5/2	im	no neuronal
5/3	im	neuronal no neuronal
5/4	im	no neuronal
5/5	im	neuronal no neuronal
5/6	im	neuronal
5/7	im	neuronal no neuronal
5/8	im	neuronal no neuronal
5/9	infusión iv im	neuronal
5/13	im	neuronal no neuronal
5/15	im	no neuronal
5/16	im	no neuronal
5/17	im	neuronal no neuronal
5/18	im	neuronal no neuronal
5/19	im	neuronal no neuronal
5/20	im	neuronal no neuronal
5/21	im	neuronal no neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
5/22	im	neuronal no neuronal
5/23	im	neuronal no neuronal
5/24	im	neuronal no neuronal
5/26	im	neuronal no neuronal
5/27	im	neuronal no neuronal
5/28	im	neuronal no neuronal
5/29	im	neuronal no neuronal
5/30	im	neuronal no neuronal
6/1	im	neuronal no neuronal
6/2	im	neuronal no neuronal
6/3	im	neuronal no neuronal
6/4	im	neuronal no neuronal
6/5	im	neuronal no neuronal
6/6	im	neuronal no neuronal
6/7	im	neuronal no neuronal
6/8	im	neuronal no neuronal
6/9	im	neuronal no neuronal
6/10	im	neuronal no neuronal
6/11	im	neuronal no neuronal
6/12	im	no neuronal
6/13	im	neuronal no neuronal
6/14	im	neuronal no neuronal
6/15	im	neuronal no neuronal
6/16	im	neuronal no neuronal
6/17	im	neuronal no neuronal
6/18	im	neuronal no neuronal
6/19	im	neuronal x 2
6/20	im	neuronal no neuronal
6/22	im	neuronal x 2
6/23	iv	no neuronal x 2
6/24	iv	no neuronal x 2
6/25	iv	no neuronal x 2
6/27	im	neuronal no neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
6/28	im	neuronal no neuronal
6/29	im	neuronal no neuronal
6/30	im	neuronal no neuronal
7/1	im	neuronal no neuronal
7/2	im	neuronal no neuronal
7/3	im	neuronal no neuronal
7/4	im	neuronal no neuronal
7/5	im	neuronal x 2
7/6	im	neuronal x 2
7/7	im	neuronal x 2
7/8	im	neuronal no neuronal
7/9	im	neuronal no neuronal
7/10	im	neuronal no neuronal
7/11	im	neuronal no neuronal
7/12	im	neuronal no neuronal
7/13	im	neuronal no neuronal
7/14	im	neuronal no neuronal
7/15	im	neuronal no neuronal
8/18	im	no neuronal x 3
8/19	im	no neuronal x 2
8/20	im	no neuronal x 3
8/21	im	no neuronal x 3
8/22	im	no neuronal x 3
8/23	im	no neuronal x 3
8/24	im	no neuronal x 3
8/25	im	neuronal no neuronal x 2
8/26	im	neuronal x 3
8/27	im	no neuronal x 3
8/28	iv	no neuronal 7
8/29	iv	no neuronal 7x 2
8/30	im	no neuronal x 2
8/31	im	no neuronal x 3
9/1	infusión iv	no neuronal
9/2	infusión iv	no neuronal
9/3	im	no neuronal x 3
9/4	im	no neuronal x 3
9/5	im	no neuronal x 3
9/6	im	no neuronal x 3
9/7	im	no neuronal x 3
9/8	im	no neuronal x 3
9/9	im	no neuronal x 3
9/10	im	no neuronal x 3
9/11	im	no neuronal x 3

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
9/12	im	no neuronal x 3
9/13	im	no neuronal x 3
9/14	im	no neuronal x 3
9/15	im	no neuronal x 3
9/16	im	no neuronal x 3
9/17	im	no neuronal x 3
9/18	im	no neuronal x 3
9/19	im	no neuronal x 3
9/20	im	no neuronal x 3
9/21	im	no neuronal x 3
9/22	infusión iv	no neuronal
9/23	infusión iv	no neuronal
9/24	im	no neuronal x 3
9/25	im	no neuronal x 3
9/26	im	no neuronal x 3
9/27	im	no neuronal x 3
9/28	im	no neuronal x 3
9/29	im	no neuronal x 3
9/30	im	no neuronal x 3
10/1	im	no neuronal x 3
10/2	im	no neuronal x 3
10/3	im	no neuronal x 3
10/4	im	no neuronal x 3
10/5	im	no neuronal x 3
10/6	im	no neuronal x 3
10/7	im	no neuronal x 3
10/8	im	no neuronal x 3
10/9	im	no neuronal x 3
10/11	im	no neuronal x 3
10/12	im	no neuronal x 3
10/13	im	no neuronal x 3
10/14	im	no neuronal x 3
10/15	im	no neuronal x 3
10/16	im	no neuronal x 3
10/17	im	no neuronal x 3
10/18	im	no neuronal x 3
10/19	im	no neuronal x 3
10/20	im	no neuronal x 3
10/21	im	no neuronal x 3
10/23	im	no neuronal x 3
10/24	im	no neuronal x 3
10/25	im	no neuronal x 3
10/26	im	no neuronal x 3
10/27	im	no neuronal x 3
10/28	im	no neuronal x 3
10/29	im	no neuronal x 3
10/30	im	no neuronal x 3
10/31	im	no neuronal x 5
11/2	im	no neuronal x 4
11/3	im	no neuronal x 3
11/4	im	no neuronal x 3
11/5	im	no neuronal x 3
11/7	im	no neuronal x 3
11/8	im	no neuronal x 2
11/9	im	no neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
11/10	im	no neuronal x 3
11/11	im	no neuronal x 3
11/12	im	no neuronal x 3
11/13	im	no neuronal x 3
11/14	im	no neuronal x 3
11/15	im	no neuronal x 3
11/30	im	mixta x 3
12/1	im	no neuronal x 3
12/2	im	no neuronal x 3
12/3	im	no neuronal x 3
12/4	im	no neuronal x 3
12/5	im	no neuronal x 3
12/6	im	no neuronal x 3
12/7	im	no neuronal x 3
12/8	im	no neuronal x 3
12/9	im	no neuronal x 3
12/10	im	no neuronal x 3
12/12	im	no neuronal x 3
12/13	im	no neuronal x 3
12/14	im	no neuronal x 3
12/15	im	no neuronal x 3
12/16	infusión iv	no neuronal
12/17	infusión iv im	no neuronal x 3
12/18	im	no neuronal
12/19	iv im	no neuronal
12/20	im	no neuronal x 3
12/21	iv im	no neuronal x 3
12/22	iv	no neuronal x 3
12/23	im	no neuronal x 3
12/24	im	no neuronal x 3
12/25	im	mixta x 3
12/26	iv im	no neuronal x 3
12/27	iv	mixta
12/28	im	no neuronal x 3
12/29	im	no neuronal x 3
12/30	im	no neuronal
12/31	im	no neuronal x 3
1/1	im	mixta x 3
1/2	im	mixta x 3
1/3	im	no neuronal x 3
1/4	im	no neuronal x 3
1/5	infusión iv	no neuronal
1/6	infusión iv	no neuronal
1/7	im	no neuronal x 3
1/8	im	no neuronal x 3
1/9	im	no neuronal x 3
1/10	im	no neuronal x 3
1/11	im	no neuronal x 3
1/12	im	no neuronal x 3
1/13	im	no neuronal x 3
1/14	im	no neuronal x 3
1/15	im	no neuronal x 3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
1/16	infusión iv	mixta
1/17	infusión iv	mixta
1/18	im	no neuronal
1/19	im	no neuronal
1/20	im	no neuronal
1/21	infusión iv	mixta
1/22	im	mixta
1/23	im	mixta
1/24	im	neuronal
1/25	im	neuronal
1/26	im	mixta
1/27	im	mixta
1/28	im	neuronal x 3
1/29	infusión iv	mixta
1/30	infusión iv	no neuronal

Ejemplo 22:

5 Un niño de 8 años en silla de ruedas debido a DMD no podía caminar ni estar de pie. Después de 6 meses de tratamiento, su nivel de CPK se redujo. No se ha deteriorado y puede mover sus brazos. Ha comenzado a caminar con un apoyo mínimo.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 21.

10

TABLA 21

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
4/29	im	neuronal no neuronal
4/30	im	no neuronal
5/1	im	neuronal no neuronal
5/3	im	neuronal
5/4	im	neuronal no neuronal
5/5	im	neuronal no neuronal
5/6	im	neuronal no neuronal
5/7	im	no neuronal
5/8	im	neuronal no neuronal
5/9	im	neuronal no neuronal
5/10	im	neuronal no neuronal
5/11	im	neuronal no neuronal
5/12	im	neuronal no neuronal
5/13	im	neuronal no neuronal
5/14	im	neuronal no neuronal
5/15	im	neuronal no neuronal
5/16	im	neuronal no neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
5/17	im	neuronal no neuronal
5/18	im	neuronal no neuronal
5/19	im	neuronal no neuronal
5/20	im	neuronal no neuronal
5/21	im	neuronal no neuronal
5/22	im	neuronal no neuronal
5/23	im	neuronal no neuronal
5/24	im	neuronal no neuronal
5/25	im	neuronal no neuronal
5/26	im	neuronal no neuronal
5/27	im	neuronal no neuronal
5/28	im	neuronal no neuronal
5/29	im	neuronal no neuronal
5/30	im	neuronal no neuronal
6/1	im	neuronal no neuronal
6/2	im	neuronal no neuronal
6/3	im	neuronal no neuronal
6/4	im	neuronal no neuronal
6/5	im	neuronal no neuronal
6/6	im	neuronal no neuronal
6/7	im	neuronal no neuronal
6/8	im	neuronal no neuronal
6/9	im	neuronal no neuronal
11/15	im	no neuronal
11/16	infusión intravenosa	neuronal
11/17	infusión intravenosa	neuronal
11/18	im	no neuronal
11/19	im	no neuronal
11/20	im	no neuronal
11/21	infusión intravenosa	mixta
11/22	infusión intravenosa	mixta
11/23	im	no neuronal
11/25	im	mixta
11/26	im	mixta
11/27	im	mixta
11/29	im	no neuronal
12/1	im	no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
12/2	im	no neuronal
12/3	im	no neuronal
12/5	im	no neuronal
12/6	im	no neuronal
12/7	im	no neuronal
12/8	infusión intravenosa	mixta
12/9	infusión intravenosa	no neuronal
12/10	im	no neuronal
12/11	im	no neuronal
12/12	im	no neuronal
12/15	im	no neuronal
12/16	infusión intravenosa	no neuronal
12/17	infusión intravenosa	no neuronal
12/18	im	no neuronal
12/19	im iv	no neuronal
12/20	im	no neuronal
12/21	im	no neuronal
12/22	im	no neuronal
12/23	im	no neuronal
12/24	im	no neuronal
12/25	im	neuronal
12/26	im	neuronal
12/27	iv	mixta
12/28	im	neuronal
12/29	im	neuronal
12/30	im	neuronal
12/31	im	neuronal
1/1	im	neuronal
1/2	im	mixta
1/4	im	no neuronal
1/5	iv	no neuronal
1/6	infusión intravenosa	no neuronal
1/7	im	no neuronal
1/8	im	no neuronal

Ejemplo 23:

5 Un niño de 10 años diagnosticado con DMD que podía dar algunos pasos con ayuda comenzó a recibir terapia. No podía girarse solo en la cama ni sentarse solo. Podía levantar los brazos hasta 30° hasta el nivel del codo. Después de unos meses de tratamiento, su nivel de CPK ha comenzado a disminuir y puede girarse por sí solo y puede levantar una taza de agua sobre su cabeza para bañarse. No ha perdido peso.

10 El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 22.

TABLA 22

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
1/20	im	no neuronal (dosis de prueba)
1/23	im	no neuronal
1/24	im iv	no neuronal
1/25	im	no neuronal
1/26	im	neuronal no neuronal
1/27	im	no neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
2/1	im	no neuronal
2/2	im	neuronal no neuronal
2/3	im	no neuronal
2/4	im	neuronal no neuronal
2/5	im	neuronal
2/6	im	no neuronal
2/7	im	no neuronal
2/8	im	neuronal no neuronal
2/10	im	neuronal no neuronal
2/11	im	neuronal no neuronal
2/12	im	neuronal no neuronal
2/14	im iv	neuronal no neuronal
2/15	im	neuronal no neuronal
2/16	im	neuronal no neuronal
2/17	im	neuronal no neuronal
2/18	im	neuronal no neuronal
2/21	im	neuronal no neuronal
2/22	im	neuronal no neuronal
2/23	im	neuronal no neuronal
2/24	im	no neuronal
2/25	im	neuronal
2/26	im	neuronal no neuronal
2/27	im	neuronal no neuronal
2/28	im	neuronal no neuronal
3/28	im	neuronal no neuronal
3/29	im	neuronal
3/30	im	neuronal no neuronal
4/4	im	neuronal
4/5	im	neuronal no neuronal
4/6	im	neuronal no neuronal
4/7	im	neuronal no neuronal
4/8	im	neuronal no neuronal
4/9	im	neuronal no neuronal
5/16	im	neuronal no neuronal
5/17	im	neuronal no neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
5/18	im	neuronal no neuronal
5/19	infusión iv	no neuronal
5/20	infusión iv	no neuronal
5/21	im	neuronal no neuronal
5/22	im	neuronal no neuronal
5/23	im	neuronal no neuronal
7/27	infusión iv	neuronal
7/28	iv infusión im	neuronal no neuronal
7/29	im	neuronal
		no neuronal
7/30	im	neuronal no neuronal
7/31	im	no neuronal
8/1	im	no neuronal
8/24	im	neuronal no neuronal
8/25	im	neuronal no neuronal
8/26	infusión iv m	no neuronal
8/27	infusión iv im	no neuronal
8/28	iv	neuronal no neuronal
8/29	infusión iv im	no neuronal
8/30	im	no neuronal
8/31	im	no neuronal
9/1	im	no neuronal
9/2	infusión iv im	no neuronal
9/3	infusión iv im	no neuronal
9/4	im	no neuronal
9/5	im	no neuronal
11/17	iv im	mixta no neuronal
11/18	infusión iv im	neuronal no neuronal
11/19	infusión iv im	neuronal no neuronal
11/20	im	no neuronal
11/22	infusión iv	neuronal
11/23	iv im	mixta no neuronal
11/24	iv im	mixta no neuronal
11/25	im iv	mixta
11/26	im iv	mixta
11/27	iv	no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
	im	
11/28	iv	mixta
11/29	iv	mixta
11/30	im	mixta
12/1	iv im	no neuronal
12/2	iv im	no neuronal
12/3	iv im	no neuronal
12/4	iv	mixta
12/5	im iv	no neuronal
1/2	im	mixta
1/3	im	no neuronal
1/4	im	no neuronal
1/5	infusión iv im	no neuronal
1/6	infusión iv im	mixta no neuronal
1/7	infusión iv	mixta
1/8	infusión iv im	mixta no neuronal
1/9	im	no neuronal

Tratamiento de enfermedades y trastornos cardíacos

5 Otro uso del trasplante de células hES de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento es en el tratamiento de enfermedades y trastornos cardíacos incluyendo, pero sin limitación, miocardiopatía restrictiva, insuficiencia cardíaca, bradicardia sinusal y enfermedad coronaria. Algunas partes de las células diferenciadas se incorporan al tejido cardíaco del paciente, reproduciendo y reparando el músculo dañado.

10 Si bien los protocolos de administración pueden variar para adaptarse al paciente en particular, un protocolo típico para el tratamiento de enfermedades y trastornos cardíacos comprende inyecciones intramusculares e intravenosas cada dos días durante 2 semanas y luego cada 3 días durante las siguientes 2 semanas, e inyecciones intramusculares una vez al mes junto con infusiones intravenosas durante los meses 3, 6, 10, y 12. Se pueden administrar inyecciones intracardíacas alrededor del área dañada durante la cirugía de derivación.

15 Ejemplo 23:

20 Se aconsejó a un paciente diagnosticado con síndrome del Sinus Corda con bradicardia sinusal la implantación de un marcapasos. El paciente fue tratado de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento en el que las células hES y sus derivados que incluyen progenitores de células madre hematopoyéticas mediante inyección intravenosa o inyección subcutánea, o inyección intramuscular o inyección intracardíaca o durante la angiografía se administraron en una cantidad de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células. El paciente mostró signos de mejoría después de someterse al tratamiento con células hES y se eliminó la necesidad de un marcapasos.

25 El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 22.

TABLA 22

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
7/6	dosis de prueba	no neuronal
7/19	im x 2	neuronal
7/21	im x 2	neuronal
7/26	im x 2	neuronal
8/4	im x 2	neuronal
8/10	im x 4	neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
8/26	im x 2	neuronal
9/1	im x 2	neuronal
9/8	iv	neuronal
9/15	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/22	iv im	neuronal no neuronal
9/28	caudal	neuronal
10/13	iv x 2	mezcla neuronal y no neuronal
10/27	im x 2	mezcla neuronal y no neuronal neuronal
11/8	im x 2	no neuronal
3/23	intraarticular en la articulación de la rodilla	neuronal
4/14	intraarticular en la articulación de la rodilla	neuronal
5/18	intraarticular en la articulación de la rodilla	neuronal
6/14	caudal	neuronal

Tratamiento de células cancerosas y tejidos oncogénicos

5 Como alternativa, las células hES pueden administrarse de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento para complementar el tratamiento de quimioterapia convencional de pacientes con cáncer. En quimioterapia convencional, los agentes citotóxicos se administran para destruir células cancerosas. Sin embargo, los agentes citotóxicos no distinguen entre células normales y células cancerosas, y pueden destruir las células no cancerosas del paciente, incluidas las células del sistema inmunitario del paciente. Como consecuencia, mientras se somete a quimioterapia y durante algún tiempo después de la quimioterapia, los pacientes con cáncer son susceptibles a la infección debido a que su sistema inmunitario está comprometido. Al administrar células madre hematopoyéticas, las células madre neuronales y las células hES a los pacientes que reciben quimioterapia, una parte de las células inyectadas se diferenciará en un nuevo sistema inmunitario, reemplazando los glóbulos blancos, los glóbulos rojos, las plaquetas y otras células destruidas por la quimioterapia. Asimismo, la regeneración de la médula ósea aplásica como resultado de radioterapia y quimioterapia, a través de la regulación de la mecánica de la mitosis, y la restauración de las vías normales de comunicación celular estimula el sistema inmunológico y detiene la mitosis mal regulada. Las células hES y/o sus derivados pueden administrarse mediante inyección intravenosa o intramuscular o administración directa en el crecimiento. Estas células también actúan sobre la ruta hedgehog aberrante y la controlan para permitir la detención de la multiplicación excesiva.

20 Ejemplo 24:

Un paciente con adenocarcinoma de grado III se sometió a tratamiento de quimioterapia y cirugía sin éxito. Debido a la aparición de metástasis hepáticas múltiples con aspecto nodular y ganglios celíacos y retropancreáticos, el paciente necesitaba cuidados de apoyo.

25 Las células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento se administraron en una cantidad de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 160 millones de células al paciente, lo que dio como resultado mejoras notables, incluida la restauración de un hígado uniformemente heterogéneo que antes era nodular y un área ecogénica aumentada en los ganglios linfáticos.

30 El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 23.

TABLA 23

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
3/23	dosis de prueba	no neuronal
3/24	im	no neuronal
3/25	im	no neuronal
3/26	im	no neuronal
3/27	im	no neuronal
3/28	iv	no neuronal
3/29	iv	no neuronal
3/30	iv	no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
3/31	iv	neuronal
4/1	iv	no neuronal
4/2	im	no neuronal
4/3	iv	no neuronal
4/4	iv	no neuronal
4/5	iv im x 2	neuronal no neuronal
4/6	iv im	no neuronal neuronal
4/7	iv	no neuronal
4/8	iv	no neuronal
4/9	iv	no neuronal
4/10	iv	no neuronal
4/11	iv im	no neuronal neuronal
4/12	iv im	no neuronal neuronal
4/13	iv im	neuronal no neuronal
4/14	iv	neuronal
4/15	iv im	no neuronal neuronal
4/16	iv im	no neuronal neuronal
4/17	iv	no neuronal
4/19	iv im	no neuronal neuronal
4/20	iv im	no neuronal neuronal
4/21	iv im	no neuronal neuronal
4/23	infusión iv	neuronal
4/24	iv	no neuronal
4/25	im	no neuronal
4/26	iv	no neuronal
4/27	im	no neuronal
5/2	iv	no neuronal
5/3	iv	no neuronal
5/6	im iv	neuronal no neuronal
5/7	im	neuronal no neuronal
5/8	iv	no neuronal
5/12	iv	no neuronal
5/16	im iv	neuronal no neuronal
5/18	infusión iv	no neuronal
5/19	iv	no neuronal
5/20	im iv	neuronal no neuronal
5/22	infusión iv iv x 2	no neuronal
5/23	infusión iv iv x 2	no neuronal

Tratamiento de úlceras aftosas/liquen plano

Otro uso más de las células hES y/o sus derivados es el tratamiento de cualquier úlcera en las áreas mucosas del cuerpo, tal como una úlcera aftosa de la boca. Las células se administran por vía intravenosa, intramuscular y localmente. Las inyecciones diarias se administran por vía intramuscular o intravenosa durante los primeros 4 meses y la infusión intravenosa cada 15-30 días. También se realiza la aplicación local directamente o mediante la mezcla con un gel.

Ejemplo 25:

Una mujer de 65 años acudió con lengua llena de tejido necrótico y úlceras aftosas que eran dolorosas. Tenía dificultades para comer y deglutir y para hablar. Tras recibir células, está mejor; encuentra más fácil tragar y hablar, y abre mejor la boca. También muestra recuperación de las úlceras y el tejido necrótico.

15 Tratamiento de artrosis, artritis, articulaciones anquilosantes

Otro uso más de las células hES y/o sus derivados es en el tratamiento de artrosis, artritis y articulaciones anquilosantes. Se administran inyecciones intramusculares diarias para la sensibilización x 10 días. Se administra una inyección intraarticular de 750.000 a 80 millones de células hES mezcladas con salumedrol y se repite 1½ a 3 meses después.

Tratamiento de la lesión del plexo braquial

Otro uso más de las células hES y/o sus derivados es en el tratamiento de las lesiones del plexo braquial en las que el brazo afectado está paralizado. Las células se administran por vía intramuscular, por vía intravenosa y en el plexo braquial, y se repite cada 1 mes y medio durante un año o hasta que el brazo esté mejor. También se usan infusiones intravenosas.

Ejemplo 26:

El paciente es un hombre de 26 años que sufrió una lesión en el plexo braquial (Lt.) en la mano y perdió la función durante los últimos 7-8 años. Con el tratamiento con células madre, la mano izquierda ha mejorado mucho con más potencia motora hasta el codo y las muñecas. Puede mover la muñeca y la mano ya no está tan flácida como antes. También es capaz de mover el brazo hacia arriba.

Tratamiento de trastornos reproductivos

Otro uso del trasplante de células hES de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento es el tratamiento de los trastornos reproductivos, a través de la restauración de la fertilidad de pacientes que sufren atrofia testicular, insuficiencia ovárica y azoospermia.

Ejemplo 27:

El tratamiento de un paciente azoospermático con células hES y sus derivados, incluidos los progenitores de células madre hematopoyéticas mediante inyección intramuscular local de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento, dio como resultado la producción de espermatozoides. Asimismo, se usaron inyecciones intravenosas e intramusculares, así como inyecciones directas en los testículos, y también se usaron inyecciones subcutáneas cerca del epidídimo.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 24.

TABLA 24

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
2/1	dosis de prueba	no neuronal
8/4	im	no neuronal
2/5	im	no neuronal
8/7	im	no neuronal
2/2	im	mezcla neuronal y no neuronal
7/27	im	neuronal
3/6	im	no neuronal
9/1	im	neuronal
9/2	im	neuronal
9/6	im	neuronal
9/7	im	neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
9/12	im	neuronal
9/13	im	mezcla neuronal y no neuronal
1/17	iv	no neuronal
3/27	im	no neuronal
4/26	im	neuronal
5/8	im	no neuronal
5/25	im	no neuronal
8/11	im	no neuronal
8/17	im	no neuronal
9/7	im	no neuronal

Regeneración de tejidos

- 5 Las células hES pueden administrarse de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento para la inducción de la regeneración de tejidos, incluyendo, pero sin limitaciones, regeneración muscular, el tratamiento de la cirrosis hepática y la formación de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización) que es eficaz en el tratamiento de enfermedades degenerativas y en el tratamiento de úlceras no curativas.

10 Tratamiento de diabetes

También se desvela en el presente documento el uso de células hES y/o sus derivados, en el que dichas células comprenden células progenitoras productoras de insulina, en el tratamiento de la diabetes. Los pacientes diabéticos tienen un riesgo cuatro veces mayor de sufrir un ataque cardíaco o un derrame cerebral y también tienen un mayor riesgo de degeneración e insuficiencia multiorgánica, incluyendo los riñones, los ojos, el sistema nervioso y la inmunidad general. Mediante el tratamiento de la diabetes mediante el trasplante de células hES productoras de insulina y la restauración de la producción de insulina en el cuerpo, hay una reducción en la necesidad de insulina y una reducción en los efectos secundarios debilitantes.

- 15
- 20 Si bien los protocolos de administración pueden variar para adaptarse al paciente en particular, un protocolo típico para el tratamiento de la diabetes comprende inyecciones intramusculares e intravenosas dos veces a la semana durante el primer mes e inyecciones una vez a la semana durante los meses 3, 6, 11 y 12. Las infusiones intravenosas también se pueden administrar durante el mes 6.

25 Ejemplo 28:

El paciente es un hombre de 70 años con diabetes y que había sufrido hipercetoacidosis y estaba con 52 unidades de insulina y un hipoglucemiente oral. A los 6 meses de la terapia, dejó de tomar medicamentos e insulina y ahora puede mantener el nivel de azúcar en la sangre con una dieta normal durante los últimos 1 año y medio. Recibe inyecciones de refuerzo.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 25.

TABLA 25

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
9/5	dosis de prueba	no neuronal
9/6	im	neuronal
9/7	im	neuronal
9/8	im	no neuronal
9/9	im	no neuronal
9/12	iv	neuronal
9/13	im	no neuronal
9/19	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/22	iv	no neuronal
9/26	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/29	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/3	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/5	im	no neuronal
10/10	im	no neuronal
10/13	iv	no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
10/17	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/20	iv	no neuronal
10/24	iv	mezcla neuronal y no neuronal
10/31	iv	mezcla neuronal y no neuronal
11/3	iv	mezcla neuronal y no neuronal
11/7	im	no neuronal
11/10	im	no neuronal
11/14	iv	neuronal
11/17	im	no neuronal
11/21	im	no neuronal
12/12	iv	no neuronal
12/19	iv	neuronal
12/26	iv	no neuronal
1/4	im	no neuronal
8/18	im	no neuronal
8/21	im	no neuronal
8/22	im	no neuronal
8/24	im	no neuronal
8/26	im	no neuronal

Ejemplo 29:

5 Un hombre de 54 años se presentó con diabetes mellitus no controlada durante los últimos tres años y estaba tomando 42 unidades de insulina junto con un hipoglucemiante oral. Su nivel de azúcar en sangre en ayunas fue de 200 mg/dl y el nivel de azúcar posprandial fue de 280 mg/dl con todos los medicamentos.

10 Después de tomar células hES durante tres semanas, dejó de tomar insulina y está tomando una dosis reducida de medicamentos hipoglucemiantes. Se siente mucho mejor y está más alerta.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 26.

TABLA 26

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
1/18	im	neuronal (dosis de prueba)
1/19	im	no neuronal
1/20	im	no neuronal
1/21	im	mixta
1/22	im	mixta
1/23	im	mixta
1/24	im	neuronal
1/25	im	neuronal
1/26	im	no neuronal
1/27	im	no neuronal
1/28	im	neuronal
1/29	im	neuronal
1/30	im	neuronal
1/31	im	mixta

15 **Ejemplo 30:**
Un hombre de 45 años tenía angina y era diabético. Estaba tomando insulina y una hipoglucemiante oral y se había sometido a una angioplastia.

20 Tres meses después, tras recibir el tratamiento con células hES, ha dejado de usar insulina y está tomando una dosis reducida de hipoglucemiante oral. Sus registros de azúcar en sangre y medicamentos muestran niveles de azúcar en sangre bien controlados.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 27.

TABLA 27

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
8/21	im	no neuronal (dosis de prueba)
8/22	im	no neuronal
8/23	im	no neuronal
8/24	im	no neuronal
8/25	im	no neuronal
8/28	im	no neuronal
8/30	im	no neuronal
9/1	im	no neuronal
9/4	im	no neuronal
9/6	iv	no neuronal
9/8	im	no neuronal
9/11	im	no neuronal
9/13	im	no neuronal
9/18	im	no neuronal
9/20	im	no neuronal
9/25	im	no neuronal
9/28	im	no neuronal
9/29	im	no neuronal
9/30	im	no neuronal
10/9	im	no neuronal
10/11	im	no neuronal
10/18	im	no neuronal
10/23	im	no neuronal
10/25	im	no neuronal
10/31	im	no neuronal
11/2	im	no neuronal
11/08	im	no neuronal
11/11	infusión iv	mixta
11/12	infusión iv	mixta
11/13	im	no neuronal
11/15	im	no neuronal
11/17	im	no neuronal
11/18	infusión iv	neuronal
11/19	infusión iv	neuronal
11/20	im	no neuronal
11/22	im	no neuronal
11/25	infusión iv	neuronal
11/26	infusión iv	neuronal
11/27	im	no neuronal
11/29	iv im	neuronal no neuronal
11/30	infusión iv	neuronal
12/1	infusión iv	neuronal
12/10	infusión iv	mixta
12/11	im	no neuronal
12/13	im	no neuronal
12/16	infusión iv	neuronal
12/17	infusión iv	neuronal
12/18	im	no neuronal
12/20	im	neuronal
12/21	im	neuronal
12/22	iv	neuronal
1/5	im	no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
1/6	im iv	no neuronal
1/8	im	no neuronal

Tratamiento de la enfermedad pulmonar intersticial

5 **Ejemplo 31:**

Una mujer de mediana edad llegó a la clínica con EPI (enfermedad pulmonar intersticial). Estaba en un estadio terminal con SPO₂ del 69% en reposo. A partir de ahora, con el tratamiento con células hES, la enfermedad ha dejado de progresar. El paciente se siente mucho mejor en general e incluso su respiración ha mejorado. El tratamiento continúa. Presenta ruidos respiratorios que se pueden escuchar en la auscultación y las pruebas generales de la función pulmonar muestran cierta mejoría.

10

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 28.

15

TABLA 28

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
10/16	im	no neuronal (dosis de prueba)
10/17	im	no neuronal
10/18	im	no neuronal
10/19	iv epidural	neuronal no neuronal
	nebulización	
10/20	iv nebulización	neuronal
10/21	iv nebulización	neuronal
10/22	im iv nebulización	neuronal no neuronal
10/23	iv nebulización	neuronal
10/24	im nebulización	no neuronal
10/25	im iv nebulización	mixta
10/26	iv nebulización	mixta
10/27	iv nebulización	mixta
10/28	iv nebulización	neuronal
10/29	iv nebulización	neuronal
10/30	iv nebulización	mixta
10/31	iv nebulización	mixta
11/2	iv nebulización	mixta
11/3	iv nebulización	mixta
11/4	iv nebulización	mixta
11/5	iv nebulización	mixta

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
11/6	iv nebulización	mixta
11/7	iv nebulización	mixta
11/8	iv nebulización	no neuronal
11/9	iv nebulización	mixta
11/10	iv nebulización	no neuronal
11/11	iv nebulización	mixta
11/12	iv nebulización	mixta
11/13	iv nebulización	mixta
11/14	iv nebulización	mixta
11/15	iv nebulización	neuronal
11/16	im iv nebulización	neuronal no neuronal
11/17	im iv nebulización	no neuronal
11/18	im iv nebulización	no neuronal
11/19	im iv nebulización	no neuronal
11/20	IM IV Nebulización	no neuronal
11/21	im iv nebulización	no neuronal
11/22	im iv nebulización	no neuronal
11/23	iv nebulización	neuronal
11/24	iv nebulización	no neuronal
11/25	iv nebulización	no neuronal
11/26	iv nebulización	no neuronal
11/27	iv nebulización	no neuronal
11/28	im iv nebulización	no neuronal
11/29	im iv nebulización	no neuronal
11/30	im iv nebulización	no neuronal
12/1	iv nebulización	no neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
12/2	iv nebulización	no neuronal
12/3	iv nebulización	no neuronal
12/4	iv nebulización	no neuronal
12/5	iv nebulización	no neuronal
12/6	iv nebulización	no neuronal
12/7	iv nebulización	no neuronal
12/8	iv nebulización	no neuronal
12/9	iv nebulización	neuronal
12/10	iv nebulización	neuronal
12/11	iv nebulización	no neuronal
12/12	iv nebulización	no neuronal
12/13	iv nebulización	no neuronal
12/14	iv nebulización	no neuronal
12/15	iv nebulización	no neuronal
12/16	iv nebulización	no neuronal
12/17	iv nebulización	no neuronal
12/18	iv Nebulización	no neuronal
12/19	IV nebulización	no neuronal
12/20	iv nebulización	no neuronal
12/21	iv nebulización	no neuronal
12/22	iv nebulización	neuronal no neuronal
12/23	im iv nebulización	neuronal no neuronal
12/24	im iv nebulización	neuronal no neuronal
12/25	im iv	mixta
12/26	iv nebulización	mixta
12/27	iv nebulización	mixta
12/28	iv nebulización	mixta
12/29	im iv	neuronal mixta
12/30	im iv nebulización	neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
12/31	im iv nebulización	neuronal mixta
1/1	im iv nebulización	mixta
1/2	im mixta iv	nebulización
1/3	im iv nebulización	no neuronal
1/4	im iv nebulización	no neuronal
1/5	im iv nebulización	neuronal no neuronal
1/6	im iv nebulización	mixta no neuronal
1/7	im iv nebulización	mixta no neuronal
1/8	im iv nebulización	mixta no neuronal
1/9	im iv nebulización	mixta no neuronal
1/10	im iv nebulización	mixta no neuronal
1/11	im iv nebulización	mixta no neuronal
1/12	im iv nebulización	mixta no neuronal
1/13	iv	mixta
1/14	im iv nebulización	mixta no neuronal
1/15	im iv nebulización	neuronal no neuronal
1/16	im iv nebulización	mixta no neuronal
1/17	im iv Nebulización	mixta no neuronal
1/18	IM IV nebulización	mixta no neuronal
1/19	im iv nebulización	mixta no neuronal
1/20	im iv nebulización	no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
1/21	im iv nebulización	mixta
1/22	im iv nebulización	mixta
1/23	im iv nebulización	neuronal mixta
1/24	im iv nebulización	neuronal mixta
1/25	im iv nebulización	neuronal mixta
1/26	im iv nebulización	neuronal mixta
1/27	im iv nebulización	neuronal mixta
1/28	im iv nebulización	neuronal mixta
1/29	im iv nebulización	neuronal mixta
1/30	im iv nebulización	no neuronal
1/31	im iv nebulización	no neuronal

Desarrollo de nuevos fármacos

Otro uso más para las células hES es el desarrollo y prueba de nuevos medicamentos. Por ejemplo, las células hES pueden cultivarse de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento y usarse como sustrato para probar los objetivos, el modo de acción, la captación, el metabolismo, la excreción, la toxicidad y la seguridad de nuevas entidades químicas, candidatos a medicamentos y nuevos productos farmacéuticos durante la investigación y el desarrollo farmacéuticos. En una práctica, la divulgación en el presente documento se refiere a procedimientos para probar el efecto de un compuesto en células hES y/o sus derivados, que comprende cultivar células hES y/o sus derivados obtenidos por los procedimientos descritos en el presente documento en presencia del compuesto y determinar el efecto del compuesto sobre las células.

Ejemplo 32:

Los efectos de los antibióticos tetraciclina y ceftriaxona en células hES cultivadas se analizaron junto con el suero del paciente. Estos fármacos se introdujeron por separado, así como juntas en diferentes concentraciones y los efectos estudiados en las células madre. Finalmente, se determinaron la dosis de la medicación y la eficacia de los fármacos.

20 Administración de fármaco

Otro uso para las células hES y/o sus derivados es llevar medicamentos al sitio de una lesión o enfermedad para su administración localizada. Las células hES y/o sus derivados pueden incubarse en presencia de un fármaco para que las células absorban el fármaco. A continuación, las células cargadas se pueden liberar localmente en el sitio de tratamiento donde el fármaco se difundirá fuera de las células y se producirá el tratamiento de la lesión o enfermedad. En otra práctica desvelada en el presente documento, las células cargadas pueden enviarse a un sitio que no sea el área dañada o enferma si el área dañada o enferma no es adecuada para la aplicación directa del medicamento (por ejemplo, el área está demasiado dañada para la inyección directa del medicamento). Este procedimiento de administración de medicamentos permite el uso de medicamentos que serían tóxicos si se administraran sistemáticamente a un sujeto. El procedimiento también permite que se administren concentraciones

más altas del fármaco en el sitio de lo que puede ser posible por otras vías de administración. En una práctica adicional desvelada en el presente documento, las células hES y/o sus derivados pueden cargarse con uno o más fármacos que mejorarán el tratamiento producido por el trasplante de las células mismas. Ejemplos no limitantes incluyen cargar células con agentes antihipertensivos para el tratamiento de enfermedades cardíacas, cargar las células con agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de pacientes con cáncer y cargar células con factores neurotróficos para el tratamiento de la LME. Una práctica desvelada en el presente documento se refiere a procedimientos para administrar un fármaco a un sujeto que comprende cultivar células hES y/o sus derivados obtenidos por los procedimientos descritos en el presente documento en presencia del fármaco, en el que las células toman el medicamento y administran las células en un sitio en el sujeto, en el que se libera el fármaco.

Además, las metodologías de cultivo desveladas en el presente documento permiten la exposición de las células hES y/o sus derivados a fármacos y otros agentes activos *in vitro* antes del trasplante, en comparación con la administración de medicamentos o agentes activos directamente a los pacientes. La exposición de las células *in vitro* proporciona ventajosamente los efectos positivos de los fármacos (por ejemplo, los efectos neurotróficos del ácido valproico) al tiempo que evita la toxicidad de la administración sistémica del fármaco.

Tratamiento de lesiones de la médula espinal: Estudios de casos

Los tratamientos clínicos que utilizan células hES y sus derivados para LME han mostrado resultados notables. Dada la naturaleza de la práctica desvelada en el presente documento y que los pacientes eran voluntarios incurables y que su afección era LME crónica ASIA A y, por lo tanto, más allá del estadio en el que son posibles los procesos de regeneración neural natural, no se han realizado ensayos doble ciego o controlados con placebo, con respecto al juramento de los médicos. Los resultados del protocolo se demuestran a través de los ejemplos detallados proporcionados como estudios de casos a continuación.

ESTUDIO DE CASO 1

La práctica desvelada en el presente documento dio como resultado la inversión de los síntomas de LME en un sujeto que padece LME por trasplante de células hES de acuerdo con el protocolo descrito en el presente documento.

ReRo 1.3.4./000/220905/α, un sujeto de 29 años con fractura y dislocación de C6-C7 fue declarado intratable en diferentes consultas médicas. El sujeto no tenía sensación desde el área intermamaria hacia abajo y no podía sentarse solo. no tenía control de la vejiga ni el intestino, no podía mover los brazos y los dedos y no tenía fuerza ni tono en las piernas. El sujeto había desarrollado úlceras de decúbito bilaterales no curativas durante un período de tres años. La administración de células hES y sus derivados de acuerdo con las prácticas desveladas en el presente documento se inició en estas condiciones como sigue.

Una composición farmacéutica que contenía aproximadamente entre 750.000 y aproximadamente 80 millones de células hES y sus derivados, incluidos los progenitores de células madre hematopoyéticas y los progenitores de células madre neuronales, se diluyó en solución salina estéril normal hasta un volumen final de 0,25 a 1,0 ml, se cariotipó, se probó para determinar la existencia de contaminación, la viabilidad y el recuento usando protocolos estándar y, después, se administraron mediante inyección subcutánea en el antebrazo. Se observó al sujeto para detectar shock anafiláctico, dolor o la inflamación en el sitio de la inyección, picor generalizado, rubor o fiebre después de cinco minutos, diez minutos, quince minutos, treinta minutos, una hora y veinticuatro horas.

El tratamiento del sujeto se realizó mediante administración de una inyección de sensibilización subcutánea de una composición farmacéutica que contiene de 750.000 a 80 millones de células hES y sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas y progenitores de células madre neuronales, resuspendidas en un volumen de 0,25 ml a 1,0 ml de solución salina normal estéril. Se administró una inyección de sensibilización adicional que transportaba el mismo número de células madre hematopoyéticas y células madre neuronales resuspendidas en 0,25 ml a 1,0 ml de solución salina normal estéril mediante inyección intramuscular. Se administró una inyección de sensibilización final de 750.000 a 80 millones de células madre neuronales progenitoras resuspendidas en un volumen de 0,25 ml a 1,0 ml de solución salina normal estéril mediante inyección intravenosa.

El tratamiento directo de la LME de acuerdo con la práctica desveladas en el presente documento se realizó mediante resuspensión de una composición farmacéutica que comprende 750.000 a 80 millones de células hES y sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales, resuspendidas en un volumen de 2 ml de solución salina normal estéril y diluidas adicionalmente a 15 ml a 40 ml de solución salina normal estéril y administradas mediante inyección epidural en el sitio, por debajo del sitio y por encima del sitio de la lesión siete días después de la primera inyección de sensibilización. El tratamiento mediante administración de inyección epidural se repitió después de un mes y medio de sensibilización, cuatro meses después de la sensibilización y seis meses después de la sensibilización.

Además de la administración epidural, se trató al sujeto mediante inyección intratecal de una composición farmacéutica que comprende de 750.000 a 11 millones de células hES y sus derivados, en el que dichas células

comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas y progenitores de células madre neuronales resuspendidos en 2 ml de solución salina normal estéril dos y cinco meses después del inicio del tratamiento.

- 5 Además, se trató al sujeto mediante con una inyección epidural de una composición farmacéutica que comprende de 750.000 a 80 millones de células hES y sus derivados, en el que dichas células comprenden progenitores de células madre neuronales, resuspendidos en 2 ml de solución salina normal estéril y diluidos además hasta un volumen final de 4 ml dos veces al día durante tres días consecutivos.

10 El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 29.

TABLA 29

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
8/24	dosis de prueba	no neuronal
8/25	im x 3	hES
8/27	im x 2	neuronal
8/28	pulverización para las úlceras de decúbito	neuronal
8/29	im x 4	neuronal
9/6	im x 2	neuronal
9/8	epidural	neuronal
9/9	iv	neuronal
9/10	im	no neuronal
9/14	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/4	im intratecal	no neuronal
10/7	im espinal profundo	no neuronal
10/15	im	neuronal
10/21	im	no neuronal
10/26	iv	neuronal
11/7	im	no neuronal
3/1	im espinal profundo x 3	neuronal
3/2	im x 2	neuronal
3/3	im x 2	neuronal
3/5	im	neuronal
3/6	im x 2	neuronal
3/7	im x 2	neuronal
3/8	im epidural x 2	neuronal
3/9	catéter epidural	neuronal
3/10	catéter epidural	neuronal
3/11	catéter epidural	neuronal
3/12	espinal profundo	neuronal
3/13	espinal profundo	neuronal
3/14	im	neuronal
3/15	im	neuronal
3/16	im	neuronal
3/17	im	neuronal
3/18	im	neuronal
3/19	im	neuronal
3/20	im	neuronal
3/21	im	neuronal
3/22	im	neuronal
3/23	im	neuronal
3/24	im	neuronal
3/25	im	neuronal
3/26	im	neuronal
3/27	im	neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
3/28	im	neuronal
3/29	im	neuronal
3/30	im	neuronal
3/31	im	neuronal
5/1	im	neuronal
5/2	im	neuronal
5/3	catéter epidural	neuronal
5/4	catéter epidural	neuronal
5/5	catéter epidural	neuronal
5/6	im	neuronal
5/8	im	no neuronal
5/12	im	neuronal

El bienestar neurológico del sujeto se evaluó a intervalos regulares después del inicio del tratamiento y se observó una mejora notable del estado mental y la higiene general del sujeto después de dos semanas, como se muestra en la TABLA 30.

5

TABLA 30

Periodo de tiempo	Estado mental	Higiene	Comportamiento	Nervios craneales
0 días	Deprimido	Mala	Cortés	Normal
3 días	Deprimido	Mala	Cortés	Normal
15 días	Esperanzado	Promedio	Cortés	Normal
2 meses	Feliz	Promedio	Cortés	Normal
3 meses	Esperanzado	Promedio	Cortés	Normal
10 meses	Muy feliz y con ganas de vivir	Promedio	Cortés	Normal

Los signos y síntomas típicos del daño al sistema nervioso autónomo como resultado de una fractura en C6-C7 se evaluaron durante el curso del tratamiento. Una mejora marcada y progresiva en todos los parámetros probados, incluyendo la capacidad de sentir una presión profunda, sentido del tacto, sensación, equilibrio, capacidad de sentir dolor, capacidad de detectar cambios de temperatura, movimientos involuntarios, presencia de sudores fríos, mareo, presión sanguínea, dificultad para respirar, postura anormal mientras está acostado y la capacidad de sentarse sin ayuda, se observaron como se muestra en la TABLA 31.

10

TABLA 31

Periodo de tiempo	Presión profunda	Tacto	Sensación	Equilibrio	Dolor	Temp.
0 días	Intermamario	Borde inferior de la clavícula	Borde inferior de la clavícula	No sentado	Borde superior de la clavícula	Borde superior de la clavícula
3 días	Ombbligo	Brazo Intermamario	Brazo Intermamario antebrazo	No sentado	Intermamario	Intermamario
15 días	Debajo del ombbligo	Xifosternón	Xifosternón y brazo interno	Sentado	Xifosternón y brazo interno	Xifosternón y brazo interno
2 meses	Espina isquial	Espina isquial	Xifosternón y brazo interno	Sentado muy bien	Espina isquial	Espina isquial
3 meses	Borde superior del muslo	Espina isquial	Xifosternón y brazo interno	Sentado	Espina isquial	Espina isquial
10 meses	U	Perineal	Ombbligo	Bien sentado	Perineal	Perineal
05,06	Perineal	Hasta la mitad de los muslos	Ombbligo	Bien sentado	Perineal	Perineal

15

TABLA 31 (cont.)

Periodo de tiempo	Sudores fríos	Mareo	BP	Respiración	Postura anormal mientras está acostado
0 días	++++	++++	Fluctuante	Respiración diafragmática	Incapaz de sentarse
3 días	+++	+++	Fluctuante	Respiración diafragmática	Incapaz de sentarse
15 días	++	+	Estable	normal	Sentado estable
2 meses	Ninguno	+ al sentarse	Estable	normal	Sentado muy bien
3 meses	Ninguno	+ al sentarse	Estable	normal	Sentado muy bien
10 meses	Ninguno	+ en bipedestación	Estable	normal	De pie con ortesis y andador
05,06	Ninguno	Ninguno	Estable	normal	De pie con ortesis y andador y da un paso adelante

5 La disfunción de la vejiga y el intestino se asocia habitualmente con daño neurológico como resultado de LME. Este daño da como resultado un control deteriorado de la vejiga, el flujo vesical y la sensación de plenitud en la vejiga, el control intestinal, el tiempo para la evacuación del intestino y la sensación en el intestino. Durante el curso del tratamiento, se observaron mejoras marcadas y progresivas en todos los parámetros probados como resultado del tratamiento como se muestra en la TABLA 32.

TABLA 32

Periodo de tiempo	Movimientos involuntarios	Control de la vejiga	Corriente de vejiga	Sensación (vejiga)	Control intestinal	Tiempo de evacuación	Sensación (intestino)
0 días	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	3 horas	Ninguno
3 días	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	3 horas	Ninguno
15 días	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	2,5 horas	Ninguno
2 meses	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	2 horas	+
3 meses	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Iniciado	+	0,5 horas	++

10 Cambios en la función motora de la parte superior del cuerpo, como evidencia de regeneración neural en el sitio de la lesión C6-C7 se evaluaron durante el curso del tratamiento. Se observaron mejoras marcadas y progresivas en el movimiento del hombro, el movimiento de la muñeca y los dedos, la fuerza en los dedos, los reflejos tendinosos, la fuerza del movimiento de las extremidades, atrofia muscular y agarre de la mano como se muestra en la TABLA 33.

15

TABLA 33

Periodo de tiempo	Hombro		Muñeca Dedos		Reflejo de los tendones		Energía						Atrofia			Agarre de la mano
	L	R	L	R	L	R	S	FA	W	F	S	FA	W	F		
0 días		Encogerse de hombros	Muñeca caída		Biceps			4	2	3	0	0	3+	4+	4+	Ninguno
	+		Dedos ajados Sin movimiento		Enérgico Bilateral											B/I
3 días		Encogerse de hombros	Muñeca caída		Biceps			4	2	3	0	0	3+	4+	4+	Ninguno
	+		Dedos ajados Sin movimiento		Enérgico Bilateral											B/I
15 días		Encogerse de hombros	Muñeca caída		Enérgico			4	3	4	3	0	3	4	4+	Presente
	+		Mejor Puede agarrar Puede mover la muñeca													Puede aguantar Vidrio
2 meses		+	"		Equivoco			4	4	4	4	0	2+	3+	3+	Puede poner comida en la boca
3 meses		+	Movimiento mucho mejor		Equivoco			4	4	4	4	0	2+	3+	3+	

S = hombro; FA = antebrazo; W = muñeca; F = dedos; L = izquierda; R = derecha
 Energía: 0 es malo, 4 es bueno
 Atrofia: 0 es bueno, 4 es malo

Los cambios en la función motora de la parte inferior del cuerpo, como evidencia de regeneración neural en el sitio de la lesión C6-C7 se evaluaron durante el curso del tratamiento, incluyendo el movimiento de cadera, el movimiento de la rodilla, el movimiento del dedo del pie, los reflejos tendinosos, la fuerza de la extremidad, atrofia muscular y respuesta plantar. Aunque no hubo mejora en ninguno de los parámetros probados durante el curso del estudio, después de tres meses de tratamiento, el sujeto pudo ponerse de pie con la ayuda de un andador como se muestra en la TABLA 34.

TABLA 34

Periodo de tiempo	Cadera		Rodilla		Dedo del pie		Reflejo		Energía		Atrofia		Plantar	
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
					L	R								
0 días	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+	4+	equivoco	
3 días	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+	4+	equivoco	
15 días	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+	4+	equivoco	
2 meses	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+	4+	equivoco	
3 meses	SE PUSO DE PUE CON EL ANDADOR DURANTE 10 MINUTOS											equivoco		

10 ESTUDIO DE CASO 2

ReRo 1.3.4./001/051004/a001, un sujeto de veintidós años sufrió una paraplejia postraumática LME como resultado de una fractura EN D6-D7 después de una caída desde el tejado de un segundo piso. El sujeto entró en coma durante dos días después de la caída y recuperó la consciencia, pero desarrolló una parálisis bilateral con pérdida sensorial y motora total de la mitad inferior del cuerpo desde la región intermamaria hasta los pies, y no pudo levantar sus pies o piernas y no pudo sentarse sin ayuda o ponerse de pie. El sujeto estaba permanentemente en cama, había perdido el control de la vejiga y el intestino y dependía totalmente de la ayuda de su familia, aunque sus extremidades superiores no se vieron afectadas.

20 La administración de una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento se inició después de cinco meses de la lesión. En un plazo de cinco meses, el sujeto recuperó el control de la vejiga y el intestino, y la capacidad de sentarse sin ayuda, y deslizarse hacia arriba y hacia abajo levantando la cadera. La percepción sensorial se restauró al nivel perineal. El sujeto puede levantarse en un andador sin ayuda y puede ponerse de pie con facilidad en el andador sin la necesidad de soporte para las rodillas. El tratamiento dio como resultado la capacidad del sujeto para caminar usando el andador con el apoyo de una rodillera y regresar al trabajo, es decir, ha recuperado un estilo de vida normal.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 35.

TABLA 35

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
10/5	dosis de prueba	neuronal
8/17	im x 3	neuronal
8/18	im	neuronal
8/19	im	neuronal
9/5	im	no neuronal
9/6	im x 2	neuronal
9/7	im	neuronal
9/8	im	neuronal
9/10	im	no neuronal
9/13	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/14	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/15	im	no neuronal
11/6	catéter epidural	neuronal
11/7	catéter epidural x 3	neuronal
11/8	catéter epidural x 3	neuronal
11/9	catéter epidural x 3	neuronal
11/10	catéter epidural x 3	neuronal
11/11	iv	neuronal
11/12	im	neuronal
11/13	iv	neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
11/14	iv	neuronal
11/15	iv	neuronal
11/16	im	no neuronal
11/18	im	no neuronal
1/12	im	neuronal
2/14	im	no neuronal
2/15	im	neuronal
2/16	im	no neuronal
2/17	im	no neuronal
2/18	im	neuronal
3/26	im	neuronal
3/27	catéter epidural x 3	neuronal
3/28	catéter epidural x 4	neuronal
3/29	catéter epidural x 2	neuronal
3/30	catéter epidural x 2	neuronal
3/31	iv	neuronal
5/21	im	neuronal
5/24	intratecal	neuronal
5/26	im	neuronal
7/14	im	neuronal
7/15	im	neuronal
7/16	im	neuronal
7/17	im	neuronal
7/18	intratecal	neuronal
7/19	im	neuronal
7/21	im	neuronal
7/22	im	neuronal
7/24	caudal	neuronal

ESTUDIO DE CASO 3

- 5 ReRo 1.3.4./002/040205/α, un sujeto de cuarenta años sufría de LME cuadripléjica como resultado de una lesión en C5-C6 y rigidez y dolor en el cuello. El sujeto se sometió a cirugía después de seis meses y estaba tetrapléjico desde entonces. El sujeto sufría una sensación de abatimiento y mareo si se le hacía sentarse con apoyo, y tenía sensaciones desde el borde superior de la escápula hacia arriba, con pérdida total de potencia en las cuatro extremidades y pérdida de la función intestinal y vesical inmediatamente después de la cirugía.
- 10 La administración de una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento se inició nueve meses después de la cirugía. Como resultado del tratamiento con células hES, el sujeto puede sentarse cómodamente sin necesidad de apoyo y puede moverse y doblarse hacia un lado mientras está sentado en una silla con las piernas colgando cómodamente. El sujeto recuperó una notable mejora en su control de la parte superior del cuerpo. El sujeto recibió una mejora sustancial en su bienestar psicológico general a través de una mayor movilidad e independencia y actividades.
- 15 Es capaz de estar de pie con apoyo con fuerza en las extremidades inferiores, el control del movimiento del dedo del pie y sin caída de la muñeca. El tratamiento es continuo de acuerdo con las mejoras de la afección del sujeto.

ESTUDIO DE CASO 4

- 20 ReRo 1.3.4./003/260902/β, un sujeto de treinta y siete años que sufrió una lesión en la columna con daño cerebral hace diecisiete años después de un accidente de tráfico y quedó confinado a una silla de ruedas. El sujeto también sufrió con hemiplejía del lado derecho, incapacidad para hablar, parálisis facial, una pérdida total de memoria y ningún control de la vejiga.
- 25 Al sujeto se le administró una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento durante un año y dos meses, lo que dio como resultado la capacidad de caminar con la ayuda de un andador, hablando unas pocas palabras, cuello enderezado, eliminación de la parálisis facial y mejora de la memoria.
- 30

ESTUDIO DE CASO 5

5 ReRo 1.3.4./004/030505/α, un sujeto de cincuenta y seis años que sufrió una fractura postraumática en C5-C8 con retrovulsión de las vértebras fracturadas causando contusión del cordón y hemorragia epidural anterior asociada y estaba parapléjico. El sujeto no pudo mover ambas extremidades inferiores y sufrió un dolor agudo en la espalda.

10 La administración de una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento se llevó a cabo durante un período de un año que dio como resultado la recuperación de cierta fuerza en ambas piernas, percepción sensorial, tal como la vibración en las piernas y la capacidad de ponerse de pie con la ayuda de un andador sin dolor de espalda. El sujeto puede caminar con la ayuda de un andador, recuperó el control y la sensación de la vejiga, y superó episodios de sudores fríos y vértigo.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 36.

15

TABLA 36

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
5/25	dosis de prueba	no neuronal
5/27	im	mixto - neuronal> hematopoyético
6/3	im	mixto - neuronal> hematopoyético
6/6	im	mixto - neuronal> hematopoyético
6/20	im	mixto - neuronal> hematopoyético
6/22	im	mixto - neuronal> hematopoyético
6/24	im	mixto - neuronal> hematopoyético
6/27	im	mixto - neuronal> hematopoyético
6/29	iv	mixto - neuronal> hematopoyético
6/30	im iv	mixto - neuronal> hematopoyético
7/1	iv	mixto - neuronal> hematopoyético
7/4	im	mixto - neuronal> hematopoyético
7/5	iv	mixto - neuronal> hematopoyético
7/6	im	mixto - neuronal> hematopoyético
7/7	iv	mixto - neuronal> hematopoyético
7/11	im	no neuronal
7/12	im	hES
7/18	iv	neuronal
7/19	im	neuronal
7/20	im	neuronal
7/21	im x 2	neuronal
7/25	im x 2	neuronal
7/26	im	neuronal
7/27	im x 2	neuronal
7/28	im	neuronal
7/29	im x 2	neuronal
7/30	im x 2	neuronal
8/1	im x 2	neuronal
8/2	im x 2	neuronal
8/16	im x 2	neuronal
8/17	im	neuronal
8/25	im x 2	hES
8/30	im x 2	neuronal
9/1	im x 2	neuronal
9/2	im x 2	neuronal
9/6	intratecal	mixto - neuronal> hematopoyético
9/7	im	neuronal
9/13	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/14	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/15	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/19	im x 2	neuronal mezcla neuronal y no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
10/4	im	neuronal
10/5	im intratecal	neuronal
10/11	espinal profundo	neuronal
10/13	epidural	neuronal
10/17	lado de la columna vertebral	neuronal
11/5	intratecal	neuronal
11/7	im	no neuronal
11/8	im	no neuronal
11/9	espinal profundo	neuronal
11/17	im x 2	no neuronal
paciente hospitalizado hasta enero		
1/12	im	no neuronal
1/25	im	neuronal
2/8	im	neuronal
3/2	im x 3	neuronal (2) no neuronal
3/8	im	no neuronal
3/9	im	no neuronal
3/10	im	no neuronal
3/13	catéter epidural x 4	neuronal
3/14	catéter epidural x 4	neuronal
3/15	catéter epidural x 4	neuronal
3/16	catéter epidural x 2	neuronal
3/20	im	neuronal
3/22	im	neuronal
3/28	im	no neuronal
3/29	im	no neuronal
4/3	im	no neuronal
4/4	im	no neuronal
4/7	im x 2	neuronal
4/14	im	neuronal
4-20	catéter epidural x 5	neuronal
4/21	catéter epidural x 3	neuronal
4/24	im	neuronal
5/19	im x 2	neuronal no neuronal
5/25	caudal	neuronal
6/5	infusión iv x 2	neuronal
6/6	infusión iv x 2	neuronal
6/9	intratecal	neuronal
6/10	infusión iv	no neuronal
6/11	infusión iv	no neuronal
6/12	iv	no neuronal
6/13	im	no neuronal
6/21	im	neuronal
7/4	im	neuronal
7/10	intratecal	neuronal
7/11	infusión iv x 2	neuronal
7/12	infusión iv x 2	neuronal
7/13	caudal	neuronal
7/14	iv	no neuronal

ESTUDIO DE CASO 6

5 ReRo 1.3.4./005/130705/β, un sujeto de veinticinco años que fue diagnosticado con trastorno de la columna de Potts en el nivel D6 con paraplejía de miembros inferiores, se sometió a cirugía tres veces con una descompresión anterior

de la médula espinal. El sujeto estaba en silla de ruedas, no se podía sentar sin ayuda, con parálisis flácida de las piernas, no tenía control intestinal y evacuaba mientras estaba acostado y no tenía sensación de vejiga.

- 5 Al sujeto se le administró una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento, once años y seis meses después de la lesión. El protocolo de tratamiento seguido durante el primer año dio como resultado el fortalecimiento de la espalda, la capacidad de sentarse sin ayuda y la sensación de pesadez en las piernas. El sujeto también recuperó el dolor de espalda durante la menstruación y el dolor menstrual. Se observaron sensaciones en los muslos, piernas y recuperación de la sensación y el control de la vejiga. El sujeto puede caminar con la ayuda de un andado con buena restauración del movimiento en ambas piernas. El tratamiento está en curso.
- 10

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 37.

TABLA 37

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
7/13	dosis de prueba	no neuronal
7/27	im	neuronal
7/28	im	no neuronal
7/29	im	neuronal
8/3	im x 2	neuronal
8/4	im x 2	no neuronal
8/5	im	neuronal
8/9	im	neuronal
8/12	im x 2	neuronal
8/16	im	neuronal
8/23	im x 2	hES neuronal
8/30	im x 2	neuronal
9/1	im x 4	neuronal
9/2	im x 2	neuronal
9/8	iv	neuronal
9/12	im	neuronal
9/14	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/22	iv	neuronal
9/27	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/29	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/30	im	neuronal
10/4	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/6	Epidural x 2 viales	neuronal
10/10	im	neuronal
10/19	im	no neuronal
10/21	im	neuronal
10/24	epidural	neuronal
11/7	epidural	neuronal
11/14	iv	neuronal
11/15	im	no neuronal
11/18	im	no neuronal
12/1	intratecal	mezcla neuronal y no neuronal
12/7	espinal profundo	no neuronal
12/23	im	neuronal
12/26	im	no neuronal
1/5	im	neuronal
1/11	im	neuronal
1/17	im	neuronal
1/24	iv	neuronal
1/26	im	neuronal
2/1	im	neuronal
2/3	im	neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
2/9	im	no neuronal
2/15	im	no neuronal
2/22	im	neuronal
3/1	im	no neuronal
3/9	im	no neuronal
3/21	im	neuronal
3/28	im	neuronal
4/13	catéter epidural	neuronal
4/26	im	neuronal
5/2	im	no neuronal
5/4	catéter epidural	neuronal
5/5	catéter epidural	neuronal
5/6	catéter epidural	neuronal
5/7	im	neuronal
5/21	im	neuronal
6/5	im	neuronal
6/12	im	neuronal
6/26	iv x 2	no neuronal
7/8	im	neuronal

ESTUDIO DE CASO 7

- 5 ReRo 1.3.4./006/220805/α, un sujeto de treinta años que padecía una lesión medular parapléjica en C6-C7 no podía mover las extremidades inferiores y no tenía control intestinal ni sensación intestinal. El sujeto tenía una sensación de presión fina y profunda solo desde la región intermamaria hacia arriba. Así, el sujeto tuvo dificultad para sentarse. Las manos del sujeto tenían muy poca fuerza, con movimientos muy débiles de los dedos y el sujeto tenía dificultad para respirar.
- 10 El sujeto se trató de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados aproximadamente tres meses después de la lesión. El sujeto recuperó la capacidad de sentarse sin ayuda, no sufre vértigo, puede sentir presión en la ingle, tiene sensación en el lado medial del codo y siente dolor en las piernas si el paciente intentaba moverse. El sujeto respira fácilmente, tiene sensación en la vejiga y el intestino, tiene sensación en las piernas y ahora puede estar de pie unos minutos con apoyo. El sujeto también tiene mayor fuerza y movimiento en los dedos. El tratamiento está en curso.
- 15

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 38.

TABLA 38

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
2/22	dosis de prueba	no neuronal
2/23	im	neuronal
2/24	im	neuronal
2/27	im	no neuronal
2/28	im	no neuronal
3/2	im	neuronal
3/3	im	neuronal
3/8	catéter epidural	neuronal
3/9	catéter epidural x 2	neuronal
3/10	catéter epidural x 2	neuronal
3/11	iv	neuronal
3/20	im	neuronal
3/22	im	neuronal
3/23	im x 2	neuronal
3/24	im	no neuronal
3/27	im	no neuronal
4/5	intratecal	neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
4/12	im	neuronal
5/1	im catéter epidural x 4	neuronal
5/2	im catéter epidural	neuronal
5/10	catéter epidural x 4	neuronal
5/11	catéter epidural x 4	neuronal
5/12	catéter epidural x 4	neuronal

ESTUDIO DE CASO 8

5 ReRo 1.3.4./007/221005/β, un sujeto de veintiséis años, parapléjico como resultado de LME en D6, no podía mover ambas extremidades inferiores, aunque era capaz de sentarse sin apoyo. El sujeto no tenía control de la vejiga o el intestino y solo tenía sensación desde el área intermamaria hacia arriba.

10 Al sujeto se le administró una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento aproximadamente diez meses después de la lesión. El sujeto recuperó la sensación en el lado lateral del cuerpo y hasta la región no biliar bilateralmente desde el área axilar hasta el hueso de la cadera. El sujeto puede caminar con la ayuda de un andador y una férula con potencia motriz en las piernas.

15 El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 39.

TABLA 39

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
9/26	dosis de prueba im	neuronal
9/27	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/28	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/29	im	neuronal
9/30	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/1	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/3	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/4	im intratecal	no neuronal
10/5	m	neuronal
10/6	epidural	neuronal
10/8	m	no neuronal
10/10	im	neuronal
10/12	im espinal profundo	neuronal
10/15	iv	neuronal
10/19	im	no neuronal
10/24	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/25	epidural	neuronal
12/8	espinal profundo	no neuronal
12/10	intratecal	no neuronal
12/11	im	no neuronal
12/12	espinal profundo	no neuronal
12/13	im	neuronal
12/14	epidural	neuronal
12/15	im	neuronal
2/13	im	neuronal
2/15	epidural	neuronal
2/16	iv	neuronal
2/17	im	neuronal
5/24	im iv	neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
5/25	im iv	no neuronal neuronal
5/26	im iv x 2	neuronal no neuronal, neuronal
5/27	im x 2 iv x 2	no neuronal neuronal
5/28	im	neuronal, no neuronal
5/29	im	neuronal, no neuronal
5/30	infusión epidural	neuronal
5/31	im	neuronal

ESTUDIO DE CASO 9

- 5 ReRo 1.3.4./008/151005/β, un sujeto de veintisiete años sufría de tetraplejía traumática y tenía gran dificultad para hablar y respirar, con cuello rígido. Las piernas del sujeto estaban paralizadas y el sujeto no tenía movimiento de los dedos ni sensación en el resto del cuerpo.

- 10 El tratamiento mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento se inició aproximadamente dos años después de la lesión. El sujeto experimentó una mejora en el movimiento del cuello, facilidad en el habla y mejora en el control del tono de voz. El sujeto encontró que la respiración era menos engorrosa y recuperó la función motora con un poco de movimiento de los dedos. Las piernas se volvieron menos espásticas y el sujeto pudo sentarse sin ayuda. Los movimientos de los dedos también se reanudaron y el sujeto puede mover los hombros.

- 15 El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 40.

TABLA 40

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
5/26	dosis de prueba	no neuronal
5/27	im	neuronal
5/28	im	neuronal
5/29	im	neuronal
5/30	im	neuronal
5/31	im	neuronal
6/1	im	neuronal
6/8	im x 2	neuronal no neuronal
6/9	im	neuronal
6/10	im x 2	neuronal no neuronal
6/11	im x 2	neuronal no neuronal
6/12	im x 2	neuronal no neuronal
6/13	im x 2	neuronal no neuronal
6/14	intratecal	neuronal
6/15	im x 2	neuronal no neuronal
6/16	im x 2	neuronal no neuronal
6/17	im x 2	neuronal no neuronal
6/18	im	no neuronal
6/19	im x 2	neuronal no neuronal
6/20	im x 2	neuronal
6/21	im x 2	neuronal no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
6/22	im x 2	neuronal
6/23	iv x 2	no neuronal
6/24	iv x 2	no neuronal
6/25	iv x 2	no neuronal
6/26	catéter epidural x 2	neuronal
6/27	catéter epidural x 2	neuronal
6/28	catéter epidural x 3	neuronal
7/21	im iv	neuronal no neuronal
7/22	im x 2	neuronal no neuronal
7/23	im x 2	neuronal
8/22	intratecal	neuronal

ESTUDIO DE CASO 10

5 ReRo 1.3.4./009/300106/α, un sujeto de veinticinco años tuvo un accidente de tráfico y perdió la capacidad de sentarse sin ayuda, la columna vertebral era propensa a doblarse, el sujeto perdió el control de la vejiga y el intestino y el sujeto sufrió una pérdida total de fuerza en las piernas.

10 Se trató al sujeto mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento aproximadamente dos años después de la lesión. El sujeto mostró una mejora rápida y pudo sentarse sin apoyo. El sujeto no sufre vértigo, tiene movimiento en ambos pies, recuperó la sensación en las puntas de los dedos y puede experimentar un escalofrío que fluye a través de la columna vertebral.

ESTUDIO DE CASO 11

15 ReRo 1.3.4./010/020206/β, un sujeto de veintiséis años con LME en D12-L1 como resultado de un accidente de tráfico no podía ponerse de pie con las rodillas contraídas. El sujeto podía sentarse sin apoyo y tenía sensaciones normales en las extremidades. El sujeto no tenía control de la vejiga o el intestino y tenía una mayor espasticidad.

20 Se trató al sujeto aproximadamente doce años después de la lesión mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica desvelada en el presente documento. El sujeto experimentó una notable recuperación en la función motora de la pierna con disminución de la espasticidad, exhibió una pierna derecha completamente extensible y un retorno de fuerza a la pierna izquierda. El sujeto recuperó la capacidad de ponerse de pie y caminar con la ayuda de ortesis y un andador. Las sensaciones de vejiga e intestino también volvieron en el sujeto.

25

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 41.

TABLA 41

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
3/27	dosis de prueba	no neuronal
3/29	im iv	no neuronal neuronal
3/30	im	neuronal
3/31	im	neuronal
4/1	im	neuronal
4/2	im	no neuronal
4/3	im	neuronal
4/4	im	neuronal
4/5	caudal	neuronal
4/7	epidural	neuronal
4/8	im	neuronal
4/10	im	neuronal
4/13	im	neuronal
4/14	im	neuronal
4/14	im	neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
4/16	im	neuronal
4/18	iv	no neuronal
4/22	im	neuronal
4/23	im	neuronal
4/24	catéter epidural	neuronal
4/25	catéter epidural	neuronal
4/26	iv	neuronal
4/27	im	neuronal
4/28	im	neuronal
4/29	im	neuronal
4/30	im	neuronal
5/1	im	neuronal
5/2	im	no neuronal
5/3	im	neuronal
5/4	im	neuronal
5/5	im	neuronal
5/7	im	neuronal
5/8	im	no neuronal
5/9	im	no neuronal
5/10	im	neuronal
5/11	caudal	neuronal
5/12	im	neuronal
5/13	im	neuronal
5/14	im	neuronal
5/16	im	no neuronal
5/17	im	neuronal
5/20	epidural	neuronal
5/21	im	neuronal
5/22	im	neuronal
5/23	im	neuronal
5/24	im	neuronal

ESTUDIO DE CASO 12

- 5 El paciente era un hombre de 26 años con paraplejia después de una lesión entre D6-D8. Sufrió un traumático accidente de carretera en septiembre de 2004. Estaba totalmente postrado en cama sin sentir nada debajo del pecho, sin control de la vejiga o del intestino, y sin sensación o potencia motora desde el pecho hacia abajo. Tenía una úlcera de decúbito profunda en la parte baja de la espalda en el que se podía ver su sacro.
- 10 El paciente comenzó con células hES el 27 de abril de 2006. Debido a la úlcera de decúbito no pudo someterse a ningún procedimiento de T/T y se le administraron dosis diarias de células por vía intravenosa e intramuscular, y finalmente se le aplicaron células hES directamente a su úlcera de decúbito. También le administraron infusiones intravenosas.
- 15 El undécimo día de tratamiento, pudo ponerse de pie con ortesis completas (cintura hasta el tobillo) y un andador y dio 2 pasos. A medida que el tiempo continuó, su potencia muscular aumentó y después de 4 meses pudo dar hasta 100 pasos y aguantar hasta 20 minutos. Puede sentir las piernas y moverlas también. También puede sentir la vejiga y el intestino lleno y puede caminar ahora con solo una rodillera y el andador para apoyo. La úlcera de decúbito se ha curado y ha reanudado sus estudios.
- 20 El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 42.

TABLA 42

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
4/28	im	neuronal (dosis de prueba)
	iv	

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
4/29	iv im	neuronal no neuronal
4/30	iv im	neuronal no neuronal
5/1	iv im	neuronal no neuronal
5/2	iv im	neuronal no neuronal
5/3	infusión iv im	neuronal no neuronal
5/4	infusión iv im	neuronal no neuronal
5/5	iv im	neuronal no neuronal
5/6	iv im	neuronal no neuronal
5/8	infusión iv im	neuronal
5/9	infusión iv im	neuronal no neuronal
5/10	infusión iv im	neuronal no neuronal
5/11	iv im	neuronal
5/12	iv im	neuronal no neuronal
5/13	iv im	neuronal
5/14	iv im	neuronal no neuronal
5/15	infusión iv im	no neuronal
5/16	infusión iv im	no neuronal
5/17	iv im	neuronal no neuronal
5/18	iv im	neuronal no neuronal
5/19	iv im	neuronal no neuronal
5/20	iv im	neuronal no neuronal
5/21	iv im	neuronal no neuronal
5/22	infusión iv im	no neuronal
5/23	infusión iv im	no neuronal
5/24	iv im	neuronal no neuronal
5/25	iv im	neuronal no neuronal
5/26	iv im	neuronal no neuronal
5/27	iv im	neuronal no neuronal
5/28	iv	neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
	im	no neuronal
5/29	infusión iv	neuronal
	im	no neuronal
5/30	infusión iv	neuronal
	im	no neuronal
5/31	iv	neuronal
	im	no neuronal
6/1	iv	neuronal
	im	no neuronal
6/2	iv	neuronal
	im	no neuronal
6/3	iv	neuronal
	im	no neuronal
6/4	iv	neuronal
	im	no neuronal
6/5	infusión iv	neuronal
	im	no neuronal
6/6	infusión iv	neuronal
	im	no neuronal
6/7	iv	neuronal
	im	no neuronal
6/8	im	neuronal
	iv	no neuronal
6/9	im	neuronal
	iv	no neuronal
6/10	im	neuronal
	iv	no neuronal
6/11	im	neuronal
	iv	no neuronal
6/12	infusión iv	neuronal
6/13	infusión iv	no neuronal
	im	
6/14	iv	neuronal
	im	no neuronal
6/15	iv	neuronal
	im	no neuronal
6/16	iv	neuronal
	im	no neuronal
6/17	iv	neuronal
	im	no neuronal
6/18	iv	neuronal
	im	no neuronal
6/20	iv	neuronal
	infusión iv	
	im	
6/21	iv	neuronal no neuronal
6/22	iv	no neuronal (2)
	im	
6/23	iv	no neuronal (2)
6/24	iv	no neuronal (2)
6/25	iv	no neuronal (2)
6/26	iv	no neuronal
	infusión iv	
6/27	iv	no neuronal
	infusión iv	
	im	

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
6/28	iv im	neuronal
6/29	iv	neuronal
	im	no neuronal x 2
6/30	iv im	neuronal no neuronal x 2
7/1	iv im	neuronal no neuronal x 2
7/2	iv im	neuronal no neuronal x 2
7/3	iv infusión iv im	neuronal no neuronal x 2
7/4	iv infusión iv im	neuronal no neuronal
7/5	iv im	neuronal x 2
7/6	iv im	neuronal x 2
7/7	iv im	neuronal
7/8	iv im	neuronal no neuronal x 2
7/9	iv im	neuronal no neuronal
7/11	iv infusión iv im	neuronal no neuronal
7/12	iv infusión iv	neuronal
7/17	im apósito	neuronal no neuronal
7/18	infusión iv apósito	no neuronal
7/19	iv infusión im	no neuronal
7/20	iv im apósito	neuronal no neuronal
7/21	iv im apósito	neuronal no neuronal
7/22	iv im apósito	neuronal no neuronal
7/23	iv im	neuronal no neuronal
7/24	iv im	neuronal no neuronal
7/25	im apósito	neuronal no neuronal x 2
7/26	m apósito	neuronal no neuronal x 2
7/27	im	neuronal no neuronal
7/28	im apósito	no neuronal
7/29	im apósito	neuronal no neuronal
7/30	im	neuronal no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
7/31	im apósito	no neuronal
8/1	im apósito	no neuronal x 2
8/2	im apósito	no neuronal x 2
8/3	im	no neuronal x 2
8/4	im	no neuronal x 2
8/5	im apósito	no neuronal x 2
8/6	im	no neuronal x 2
8/7	im apósito	no neuronal x 2
8/8	im	no neuronal x 2
8/9	im apósito	no neuronal x 2
8/10	im	no neuronal x 2
8/11	im	no neuronal x 2
8/12	im apósito	no neuronal x 2
8/13	im	no neuronal x 2
8/14	im apósito	no neuronal x 2
8/15	im apósito	no neuronal x 2
8/16	im	no neuronal x 2
8/17	im	no neuronal x 2
8/18	infusión iv im	neuronal x 3
8/19	im apósito	neuronal x 3
12/5	im	no neuronal
12/6	infusión iv	no neuronal
12/7	infusión iv im apósito	no neuronal
12/8	epidural (intratecal)	neuronal
12/9	im apósito	no neuronal x 2
12/10	im apósito	no neuronal x 2
12/11	im apósito	no neuronal x 2
12/12	epidural (catéter)	neuronal x 2
12/13	epidural (catéter)	neuronal x 2
12/14	epidural (catéter)	neuronal x 2
12/15	infusión iv im	neuronal, no neuronal
12/16	infusión iv	neuronal, no neuronal

ESTUDIO DE CASO 13

5 El paciente es un hombre de 22 años que sufrió un accidente de equitación en junio de 2006 y está parapléjico en T-12, L-1. No tenía fuerza debajo de la cintura, sin control intestinal o vesical, y sin sensación por debajo de la cintura.

10 El paciente comenzó el tratamiento en septiembre de 2006 ingresado durante 6 semanas. Respondió a las células HES y en una semana pudo ponerse de pie y caminar unos pasos con ortesis completas (de cintura hasta el tobillo) y andador. Ha progresado y lleva una rodillera con la que puede ponerse de pie hasta 30 minutos con un andador. Ahora tiene una sensación completa y control del intestino y la vejiga. También tiene un buen equilibrio con bastón y también con muletas. Es capaz de subir y bajar las escaleras con la ortesis y las muletas.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 43.

TABLA 43

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
10/4	im	no neuronal (dosis de prueba)
10/5	im	no neuronal
10/6	im	no neuronal
10/7	im	no neuronal
10/8	im	no neuronal
10/9	infusión iv	neuronal
10/10	infusión iv	neuronal
10/11	im	no neuronal
10/12	im	no neuronal
10/13	im	no neuronal
10/14	im	no neuronal
10/15	im	no neuronal
10/16	caudal	neuronal
10/17	im	no neuronal
10/18	im	no neuronal
10/19	infusión iv im	no neuronal
10/20	infusión iv im	no neuronal
10/21	im	no neuronal
10/22	im	no neuronal
10/23	lumbar	neuronal
10/27	im	no neuronal
10/25	im	no neuronal
10/26	im	no neuronal
10/27	im	no neuronal
10/28	im	no neuronal
10/29	im	no neuronal
10/30	catéter epidural	neuronal
10/31	catéter epidural	neuronal
11/1	catéter epidural	neuronal
11/2	im	no neuronal
11/3	im	no neuronal
11/4	im	no neuronal
11/5	im	no neuronal
11/6	im	no neuronal
11/7	im	no neuronal
11/8	im	no neuronal
11/9	caudal	neuronal
11/10	im	no neuronal
11/11	im	no neuronal
11/12	im	no neuronal
11/13	iv infusión im	mixta no neuronal
11/14	im infusión iv	no neuronal
11/15	im	no neuronal
12/31	iv	mixta
1/10	im	no neuronal
1/11	infusión iv	mixta
1/12	infusión iv	mixta
1/13	im	no neuronal

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
1/14	im	no neuronal
1/15	caudal	neuronal
1/16	im	no neuronal
1/17	im	no neuronal
1/18	im	no neuronal
1/19	lumbar	neuronal
1/20	im	no neuronal mixta
1/21	im	mixta
1/22	im	mixta
1/23	catéter epidural	neuronal
1/24	im iv	neuronal
1/25	im	neuronal
1/26	infusión im	mixta neuronal
1/27	infusión im	mixta neuronal

ESTUDIO DE CASO 14

5 La paciente es una mujer de 26 años con paraplejía traumática en T-12, L-1 que sufrió un accidente de tráfico en septiembre de 2004. No tenía sensación debajo del pecho y no tenía control intestinal o vesical. No había potencia motora en ninguna de las piernas y estaba en silla de ruedas.

10 La paciente comenzó con células hES en marzo de 2006. Fue capaz de ponerse de pie y caminar unos pasos con ortesis completas (de cintura hasta el tobillo) y andador después de 9 días y continuó progresando. Su estado actual es que puede caminar continuamente con la ortesis y el andador y también se pone de pie usando la rodillera. Las sensaciones de intestino y vejiga se han restaurado con control y sin el uso de cateterismo o supositorio. La sensación ha mejorado a nivel del tobillo.

15 El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 44.

TABLA 44

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
3/27	im	no neuronal (dosis de prueba)
3/29	iv im	neuronal no neuronal
3/30	im	neuronal
3/31	im	neuronal
4/1	im	neuronal
4/3	im	neuronal
4/4	im	neuronal
4/5	Epidural (caudal)	neuronal x 2
4/7	epidural (intratecal)	neuronal x 2
4/9	im	neuronal
4/10	im	neuronal
4/12	im	neuronal
4/13	im	neuronal
4/14	im	neuronal
4/15	im	neuronal
4/16	im	neuronal
4/17	im	neuronal
4/18	iv	no neuronal
4/20	im	neuronal
4/21	im	neuronal

ES 2 748 475 T3

(continuación)

Fecha	Vía de administración	Tipos celulares
4/22	im	neuronal
4/24	Epidural (catéter)	neuronal x 4
4/25	Epidural (catéter)	neuronal x 4
4/26	iv (catéter)	neuronal x 4
4/27	im	neuronal
4/28	im	neuronal
4/29	im	neuronal
4/30	im	neuronal
5/1	im	neuronal
5/2	im	no neuronal
5/3	im	neuronal
5/4	im	neuronal
5/5	im	neuronal
5/7	im	neuronal
5/8	im	no neuronal
5/10	im	neuronal
5/11	EPI (caudal)	neuronal
5/13	IM	neuronal
5/14	IM	neuronal
5/16	IM	no neuronal
5/17	IM	neuronal
5/18	EPI (catéter)	neuronal x 2
5/19	EPI (catéter)	neuronal x 2
5/20	EPI (catéter)	neuronal x 2
5/21	im	neuronal
5/22	im	neuronal
5/23	im	neuronal
5/24	im	neuronal
5/25	im	neuronal
10/25	im	mixta no neuronal
10/26	im infusión iv	mixta no neuronal
10/27	im	no neuronal
10/28	im	no neuronal
10/29	im	no neuronal
10/30	caudal	neuronal
10/31	im	no neuronal
11/1	im	no neuronal x 2
11/2	im	no neuronal x 2
11/3	lumbar	neuronal
11/4	infusión	neuronal
11/5	im	no neuronal x 2
11/6	im	no neuronal x 2
11/7	im	no neuronal x 2
11/8	catéter epidural	neuronal
11/9	catéter epidural	neuronal
11/10	catéter epidural	neuronal
11/11	im	no neuronal x 2
11/12	im infusión	no neuronal mixta
11/13	caudal infusión	neuronal mixta
11/14	im	neuronal

Solo por referencia: Metodología de cultivo de células madre embrionarias humanas

Las células hES utilizadas como material de partida para las líneas celulares desarrolladas según la presente invención se derivan de un embrión de 2 a 7 días de edad antes de su implantación en el útero, por ejemplo, un embrión de 2 a 4 días de edad, por ejemplo, un embrión de 3 días.

- 5 Para el aislamiento de embriones, los óvulos se recolectan con el consentimiento de donantes humanos que se someten a un ciclo regular de FIV. Los óvulos son fertilizados por los espermatozoides y cultivados por procedimientos convencionales para obtener los embriones. Los embriones adicionales se incuban durante períodos variables para el desarrollo de la línea celular.
- 10 El embrión se suspende en una pequeña cantidad de medio esencial mínimo (por ejemplo, RPMI, por ejemplo, RPMI 1640 con 2,2 g/l de bicarbonato de sodio) y las células hES se aíslan del embrión por medios mecánicos (por ejemplo, agitación). Se añade medio adicional a las células aisladas junto con una progestina y un agonista de β hCG. En una práctica desvelada en el presente documento, se añaden progesterona (16-64 μ l de 250 mg/ml) y β hCG (16-64 μ l de 5000 ui/ml). Las células aisladas se cultivan durante 12-48 horas, por ejemplo, 24 horas, a una
- 15 temperatura de entre 34 y 38 °C, en un ambiente de 3,5-6 % de dióxido de carbono.

En una práctica desvelada en el presente documento, las células hES se cultivan en condiciones anaeróbicas o sustancialmente anaeróbicas para expandir las células mientras se evita la diferenciación. "Sustancialmente anaeróbico" se define como menos de aproximadamente 10 % de O₂, por ejemplo, inferior al 8 %, 6 %, 4 %, 2 % o

20 1 % de O₂. Se pueden crear condiciones de bajo oxígeno utilizando incubadoras de celdas de gases múltiples (CO₂, O₂, N₂) en las que el nivel de oxígeno puede establecerse entre 0 % y 20 % reemplazando el aire ambiente con gas nitrógeno. Ejemplos de incubadoras de gases múltiples incluyen la serie Fisher 11-730, la serie Napco 7000, la serie Sanyo MCO, la Jouan IG750 y la Heraeus Heracell 150. En otra práctica desvelada en el presente documento, las células se cultivan en una incubadora de CO₂ y el nivel de oxígeno se controla mediante la forma y la posición del

25 matraz en el que están contenidas las células. Por ejemplo, cuando un matraz de cultivo celular se mantiene en posición vertical, gran parte del medio de cultivo en el matraz es sustancialmente anaeróbico. Por el contrario, cuando el matraz de cultivo celular se mantiene en posición horizontal, El medio de cultivo es sustancialmente aeróbico. El nivel de oxígeno en el medio de cultivo puede variar entre sustancialmente anaeróbico y sustancialmente aeróbico alterando la forma y/o posición del matraz de cultivo celular dentro de la incubadora o la

30 cantidad de medio en el matraz (por ejemplo, la cantidad de espacio en la cabeza).

Durante la etapa de expansión, los matraces pueden mantenerse en posición vertical en lugar de horizontal. En una práctica desvelada en el presente documento, la incubación se lleva a cabo en un recipiente de cultivo donde el volumen está casi completamente ocupado por el medio y el recipiente se mantiene en posición vertical. Como

35 consecuencia, una proporción sustancial de las células no se adhiere a las paredes del matraz de cultivo, y el medio de cultivo es sustancialmente anaeróbico.

Bajo tales condiciones de crecimiento, Los ciclos de duplicación o replicación celular están en su punto máximo, y los procesos de diferenciación celular están sustancialmente inhibidos. Los ciclos de replicación celular durante la

40 expansión continúan durante 12-48 horas, por ejemplo, 24 horas.

Para el pasaje o el re-cultivo de las células hES, la suspensión celular se centrifuga, el sedimento celular se resuspende en una pequeña cantidad de medio de cultivo fresco que comprende progesterona y β hCG, las células se dividieron en alícuotas y se añadió medio fresco adicional sin progesterona y β hCG. En una práctica desvelada

45 en el presente documento, la relación de la alícuota de las células madre incubadas y el medio celular recién preparado es de aproximadamente 1:3,5 a aproximadamente 1:35 volumen/volumen. Las células se vuelven a incubar a 34-38 °C en una incubadora con camisa de agua suplementada con una atmósfera de dióxido de carbono al 3,5-6 % en condiciones sustancialmente anaeróbicas durante de 12 a 48 horas, por ejemplo, 24 horas. En este punto, las celdas pueden pasarse para una expansión continua o almacenarse para uso futuro.

50

Las células hES cultivadas en tales condiciones permanecen en una forma en gran medida indiferenciada según lo determinado por la actividad de fosfatasa alcalina y la ausencia de marcadores característicos de la especialización o diferenciación celular. Sin embargo, cabe señalar que no se obtiene población celular que esté completamente diferenciada o completamente indiferenciada. La población celular es una mezcla de líneas celulares diferenciadas e

55 indiferenciadas, con una proporción que varía de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1 de células indiferenciadas-diferenciadas.

Para el almacenamiento de las células hES expandidas, por ejemplo, en un congelador profundo o en nitrógeno líquido, un agente de crioconservación, incluyendo, pero sin limitación, 0,2-2 % (p/v) de dimetil sulfóxido (DMSO), pueden añadirse al cultivo. El nivel de DMSO utilizado es menor que el utilizado habitualmente para la

60 criopreservación (por ejemplo, Tubo de 2-84 μ l/0,5 ml) para evitar inducir diferenciación o daño a las células. La proporción de la cantidad de agente de crioconservación a la del medio de cultivo que contiene células madre puede variar de aproximadamente 1:500 a aproximadamente 16:1000. Otros agentes de crioconservación incluyen, sin limitación, glicerol, propanodiol, butanodiol, etanol, glucosa, D-glucosa, sacarosa, trehalosa, manitol, paparavina,

65 formamida, probuchol, curcumina, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, sulfato de condroitina, glicosaminoglicano dimetilsulfóxido, glutamina y piruvato de sodio. La temperatura de congelación de la suspensión celular puede variar

de aproximadamente -15 a aproximadamente -80 °C, por ejemplo, de aproximadamente -15 a aproximadamente -40 °C. A diferencia de otras técnicas para el almacenamiento de células madre embrionarias humanas y sus derivados, no hay necesidad de congelación instantánea o almacenamiento en "pajitas". Después del almacenamiento, Las células pueden prepararse para la expansión continua o para la diferenciación recogiendo las células por centrifugación y resuspendiendo el sedimento celular en medio recién preparado.

La diferenciación parcial de las células hES expandidas (por ejemplo, después de la expansión de células hES recién aisladas o el almacenamiento de células previamente expandidas) se lleva a cabo sedimentando la suspensión celular en una centrífuga (por ejemplo, entre 700-1400 rpm durante 5-12 minutos), eliminando y desechando el sobrenadante, y resuspendiendo las células en una pequeña cantidad de medio fresco (por ejemplo, RPMI) que contiene una progestina y un agonista de β hCG. Las células se dividieron en alícuotas y un medio de cultivo adicional (por ejemplo, un medio esencial mínimo, tal como RPMI o DMEM, por ejemplo, se añade DMEM o DMEM sin ácido IX glutámico con 4,5 g/l de glucosa y 3.7 g/l de bicarbonato de sodio) sin progestina o β hCG. Las células se cultivan en condiciones sustancialmente aeróbicas (por ejemplo, en un matraz en posición horizontal) durante 12 a 48 horas, por ejemplo, 24 horas. "Sustancialmente aeróbico" se define como al menos aproximadamente 15% de O₂, por ejemplo, al menos aproximadamente un 18 % o un 20 % de O₂. En condiciones sustancialmente aeróbicas, las células hES comenzarán a diferenciarse. La ruta de diferenciación para las células hES depende del medio de cultivo utilizado durante la etapa de diferenciación. Para producir células progenitoras neuronales, las células hES se cultivan en DMEM o su equivalente. Para producir células progenitoras que no sean progenitores neuronales, las células hES se cultivan en RPMI o su equivalente. Después del ciclo de replicación de 12-48 horas, las células se pueden recoger y resuspender en medio fresco para continuar la diferenciación. En general, la etapa de diferenciación no debería durar más de 48-72 horas, ya que una diferenciación adicional más allá de este tiempo produce células que no son adecuadas para el trasplante usando los procedimientos desvelados en el presente documento.

Una vez que las células están parcialmente diferenciadas, las células pueden almacenarse para uso futuro agregando un crioprotector y almacenando las células a -15 °C a aproximadamente -80 °C como se ha descrito anteriormente o preparando las células para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento. Para preparar las células para su uso, las células son alícuotadas, se añade medio fresco (por ejemplo, DMEM o RPMI según corresponda) y las células se cultivan durante 12-48 horas, por ejemplo, 24 horas, en condiciones sustancialmente anaeróbicas para evitar una mayor diferenciación. Las células se dividieron después en alícuotas en medio fresco para una expansión continua o se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en una solución biocompatible (por ejemplo, solución salina) en preparación para el trasplante. En este punto, las células pueden trasplantarse a pacientes o almacenarse a +4 °C a -80 °C para un trasplante futuro. El almacenamiento puede estar en cualquier recipiente adecuado, incluidos, entre otros, tubos de ensayo, viales, jeringas, etc. que pueden facilitar el transporte o el uso clínico. En una realización, las células resuspendidas en solución biocompatible se almacenan en una forma lista para usar (por ejemplo, en una jeringa precargada). Cuando sea necesario, alícuotas de células se descongelan naturalmente sin la necesidad de baños de agua o incubadoras.

En las condiciones de almacenamiento descritas en una solución biocompatible, se observa una viabilidad celular > 40 % después de la remodelación, incluso después de seis meses de almacenamiento, sin alteraciones genotípicas detectables (inestabilidad genética) o fenotípicas tales como aneuploidía o heteroploidía.

En cada etapa de expansión, diferenciación y almacenamiento, se analiza la viabilidad de una parte alícuota de las células mediante exclusión con azul tripán y examen microscópico. Una parte alícuota del cultivo celular también se analiza para detectar contaminación microbiológica. Una parte alícuota adicional de la suspensión celular también se coloca en un hemocitómetro y se examina microscópicamente para determinar la densidad celular. También se toma una alícuota adicional para probar la actividad de fosfatasa alcalina como un marcador para el estado de diferenciación del cultivo celular.

Durante el almacenamiento, las células se pueden analizar una vez al mes para detectar su cariotipo, para probar la inestabilidad genética que surge como resultado de la metodología de cultivo.

Ejemplos de referencia

Ejemplo de referencia 1

Para el aislamiento de embriones, los óvulos se recolectaron con el consentimiento de un donante humano que se sometió a un ciclo regular de FIV, que produjo 8 folículos. Los óvulos fueron fertilizados por los espermatozoides y cultivados por procedimientos convencionales para obtener los embriones. Tres de los embriones fueron trasplantados al donante. Los embriones adicionales se incubaron durante períodos variables para el desarrollo de una línea celular DE hES.

El embrión, intacto o en mal estado, se suspendió en medios de cultivo. Adicionalmente, se añadieron 84 μ l de progesterona (250 mg/ml) y 84 μ l de β hCG (5000 ui/ml). Los medios con las células embrionarias se analizaron para detectar cualquier contaminación y se descartó cualquier embrión infectado. Las células de los embriones en esta

forma se usaron para expansión y almacenamiento.

5 Después de un día de incubación, se introdujo 1 ml de los medios que contienen células embrionarias en un medio de cultivo celular de 40 ml (DMEM o RPMI) en un recipiente de 50 ml junto con progesterona y β hCG. El medio de cultivo junto con las células madre se incubó en posición horizontal a temperatura ambiente en un ambiente que contiene dióxido de carbono. La Tabla 45 muestra algunas de las condiciones experimentales seguidas para este procedimiento.

TABLA 45

(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	(j)	(k)	(l)	
N.º de serie	Etapa embrionaria en días	Estado embrionario	Medio celular IVF medios	Cantidad de (c)	Adición a los medios	Tiempo de incubación	alícuota de (f)	Medio celular	Cantidad de (h)	Volumen del recipiente	Grado de temp. de incubación C	% de CO ₂ en el ambiente
1	2	Intacto	IVF medios	2,5 ml	FF	24 h	-	-	-	-	36	4
2	2	Intacto	medios	2,5 ml	A	24 h	-	-	-	-	36,5	4,5
3	3	Roto	RPMI	2,5 ml	A	24 h	0,5 ml	RPMI	45 ml	50 ml	37	5
4	3	Roto	RPMI	2,5 ml	A y B	24 h	1,0 ml	RPMI	46 ml	50 ml	38	5
5	3	Roto	DMEM	2,5 ml	linfocito B	24 h	0,5 ml	DMEM	35 ml	50 ml	37	5

TABLA 46

N.º de serie	(a) Cantidad de cultivo ESC	(b) Medio celular	(c) Cantidad de (b)	(d) Adición a los medios	(e) Volumen del recipiente	(f) Temperatura de incubación	(g) % de CO ₂ en el ambiente	(h) Tiempo de incubación	(i) Alicuota de medio de cultivo (h)	(k) Volumen del recipiente	(l) Temp. de almacenamiento
1	0,5 ml	RPMI	35 ml	A	50 ml	36,5	5	24	0,5 ml RPMI	0,5 ml	-72
2	1,0 ml	RPMI	38 ml	linfocito B	50 ml	37	5	24	25 ml RPMI	0,5 ml	-20
3	1,5 ml	DMEM	45 ml	AB	50 ml	37	5	48	1,0 ml DMEM	1,5 ml	-20
4	2,0 ml	RPMI	46 ml	A	50 ml	37,2	5	48	1,5 ml RPMI	1,5 ml	-18
5	2,5 ml	DMEM	45 ml	A	50 ml	36,8	5	24	0,5 ml DMEM	1,5 ml	-72

FF = líquido folicular aspirado junto con el óvulo durante el ciclo de FIV. 16-84 µl; A = progesterona; B = βhCG

Después de 24 horas de incubación, se observaron números iguales de células nucleadas (parcialmente diferenciadas) y células blanco (no diferenciadas). Se tomaron alícuotas de aproximadamente 0,5 ml para su almacenamiento en esta etapa. Después de 48 horas de incubación, se observaron células de forma oblonga con pocas hebras con medio DMEM. Sin embargo, cuando se usó medio RPMI, se observaron muchas células nucleadas con formas variadas. Se encontró que el volumen del recipiente se llenaba hasta la marca de 37 ml después de la incubación de 48 horas. Se tomaron alícuotas de 0,5 ml para su almacenamiento en esta etapa. Después de 72 horas de incubación en DMEM, se observaron largas hebras de células entrecruzadas como el tejido nervioso. La incubación del medio RPMI produjo unas pocas células de pequeño tamaño y unas pocas células que se acumulan alrededor de una célula central. Se tomaron alícuotas de 0,5 ml para su almacenamiento en esta etapa.

Se introdujo una parte alícuota de las células embrionarias cultivadas en medios que contenían cultivos en más medio celular (RPMI o DMEM) con otros componentes de prueba, en un recipiente estéril (Tarsons steriflask). Las células madre se incubaron a temperatura ambiente en un entorno de dióxido de carbono en posición horizontal durante varios períodos de tiempo que van desde 18 horas hasta 5 días. Después de 24 horas de incubación, de nuevo se introdujeron alícuotas de aproximadamente 0,5 ml en más medios de cultivo y se volvieron a incubar. Se tomaron alícuotas para preparar composiciones listas para usar, así como para el almacenamiento después de diferentes etapas de incubación. La Tabla 46 representa algunas condiciones experimentales, seguidas para la expansión de células hES.

Ejemplo de referencia 2

El embrión, intacto o en mal estado, se suspendió en medios de cultivo. Adicionalmente, se añadieron 84 µl de progesterona y 84 µl de βhCG. Los medios con las células embrionarias se analizaron para detectar cualquier contaminación y se descartó cualquier embrión infectado. Las células de los embriones en esta forma se usaron para expansión y almacenamiento.

Después de un día de incubación, Se introdujo 1 ml del medio que contenía células embrionarias en un medio de cultivo celular de 46 ml (DMEM o RPMI) en un recipiente de 50 ml junto con progesterona y βhCG. Las células madre se incubaron en posición vertical a temperatura ambiente en un entorno de dióxido de carbono. La Tabla 47 muestra algunas de las variables de ejemplo de trabajo utilizadas para este experimento.

TABLA 47

N.º de serie	(A) Etapa embrionaria en días	(B) Estado embrionario	(C) Medio celular	(D) Cantidad de (c)	(E) Adición a los medios	(F) Tiempo de incubación	(G) alícuota de (f)	(H) Medio celular	(I) Cantidad de (h)	(J) Volumen del recipiente	(K) Temp. Incubación	(L) % de CO ₂ en el ambiente
1	2	Intacto	IVF medios	2,5 ml	FF	24 h	-	-	-	-	36	4
2	2	Intacto	IVF medios	2,5 ml	A	24 h	-	-	-	-	36,5	4,5
3	3	Roto	RPMI	2,5 ml	A	24 h	0,5 ml	RPMI	45 ml	50 ml	37	5
4	3	Roto	RPMI	2,5 ml	linfocito B	24 h	1,0 ml	RPMI	46 ml	50 ml	38	5
5	3	Roto	DMEM	2,5 ml	A&B	24 h	0,5 ml	DMEM	35 ml	50 ml	37	5

TABLA 48

N.º de serie	(a) Cantidad de cultivo ESC	(b) Medio celular	(c) Cantidad de (b)	(d) Adición a los medios	(e) Volumen del recipiente	(f) Temperatura de incubación	(g) % de CO ₂ en el ambiente	(h) Tiempo de incubación h	(i) Alicuota de (h)	(j) Medio de cultivo	(k) Volumen del recipiente	(l) Temp. de almacenamiento
1	0,5 ml	RPMI	35 ml	A	50 ml	36,5	5	24	0,5 ml	RPMI	0,5 ml	-40
2	1,0 ml	RPMI	38 ml	A	50 ml	37	5	24	25 ml	RPMI	0,5 ml	-20
3	1,5 ml	DMEM	45 ml	linfocito B	50 ml	37	5	48	1,0 ml	DMEM	1,5 ml	-18
4	2,0 ml	RPMI	46 ml	A	50 ml	37,2	5	48	1,5 ml	RPMI	1,5 ml	-20
5	2,5 ml	DMEM	45 ml	AB	50 ml	36,8	5	24	0,5 ml	DMEM	1,5 ml	-72

Después de 24 horas de incubación, se observaron células nucleadas (parcialmente diferenciadas) y células blanco (no diferenciadas) en una proporción de aproximadamente 1:4. Después de 48 horas de incubación, se observaron células nucleadas y células en blanco en la proporción 1:2. Se tomaron alícuotas de 0,5 ml para almacenamiento en las etapas de 24 y 48 horas.

Se introdujeron 0,5 ml de las células embrionarias cultivadas en medios que contienen cultivos en 46 ml de medio celular (RPMI o DMEM) con otros componentes de prueba, en un recipiente estéril de 50 ml (Tarsons steriflask). Las células madre se incubaron en posición horizontal a temperatura ambiente en un entorno que contiene dióxido de carbono. Después de 24 horas de incubación, alícuotas de 0,5 ml se introdujeron nuevamente en 46 ml de medio de cultivo y se volvieron a incubar. La Tabla 48 representa algunas condiciones experimentales, seguidas para la expansión de células hES.

Se tomaron alícuotas para preparar composiciones listas para usar, así como para el almacenamiento después de la etapa de incubación de 24 horas.

Ejemplo 3: Almacenamiento

Para almacenamiento, se tomaron células hES en un tubo de almacenamiento de 0,5 ml y se añadió un agente de crioconservación tal como DMSO al 0,2 % en una cantidad de 16 µl y después de agitar suavemente se almacenaron a -20 °C. Las células se descongelaron de forma natural para hacer composiciones listas para usar o para su expansión adicional. Se probó la viabilidad de las células descongeladas y se encontró que del 64 % al 84 % de las células eran viables. Las células almacenadas se analizaron para detectar contaminación y viabilidad después de intervalos regulares. La Tabla 49 muestra los parámetros reales seguidos para el almacenamiento en cinco experimentos diferentes, así como la viabilidad de las células después de la descongelación.

TABLA 49

N.º de serie	Cantidad de suspensión celular	Cantidad DMSO	% DMSO	Medios usados	Viabilidad de células descongeladas
1	0,5 ml	16 µl	0,2	NaCl	74 %
2	0,5 ml	32 µl	1,4	NaCl	66 %
3	0,5 ml	64 µl	0,4	NaCl	70 %
4	0,5 ml	48 µl	0,2	NaCl	78 %
5	0,5 ml	16 µl	0,2	NaCl	88 %

Ejemplo 4

Se llevaron a cabo varias pruebas para verificar cualquier contaminación o infección o anomalía en las células embrionarias en varios intervalos de las etapas de expansión y almacenamiento e identificar los derivados de hES que estaban presentes en cada cultivo. Las diferentes pruebas incluyen aquellas para VIH, HbSAg (para hepatitis), PCR convencional para prueba de Kochs (para tuberculosis), análisis cromosómico por procedimiento CG de bandas de giemsa, Bilirrubina mediante el procedimiento Jendrasik y Grof y Albúmina utilizando el procedimiento de unión a colorante BCG (para células progenitoras hepáticas), insulina a través del procedimiento CLIA (para células progenitoras pancreáticas), neurofilamento por procedimiento inmunohistoquímico (para células progenitoras neuronales), prueba de CD34 por procedimiento inmunohistoquímico (para células progenitoras hematopoyéticas), fosfatasa alcalina a través del procedimiento PNPP (para células no diferenciadas), pruebas de histopatología (para identificación celular por morfología), etc. La condición de cultivo se probó mediante el procedimiento de placa de cultivo manual y la sensibilidad manual y la identificación con versatrek/AP1 se llevaron a cabo para la infección por hongos. Se realizaron todas las pruebas y se verificó el recuento celular y la viabilidad de las células en cada etapa. La Tabla 50 proporciona los resultados de algunas de las pruebas.

Ejemplo 5: Preparación de células hES para trasplante

Se tomaron 15 ml de suspensión de células madre y se centrifugaron a 1000 r.p.m. por 7 minutos. El sobrenadante se desechó. Se añadieron de 2 a 15 ml de solución salina al sedimento y las células madre se suspendieron de este modo. La suspensión se verificó para detectar contaminación microbiana. También se realizó una prueba de viabilidad.

Ejemplo 6: Almacenamiento de células hES en forma lista para usar

Los recipientes (jeringa, tubo de ensayo, matraz, vial) cargados con la suspensión de células hES trasplantables se marcaron y almacenaron a -20 °C. La cadena de frío se mantuvo hasta la etapa de trasplante. La suspensión se descongeló naturalmente inmediatamente antes del trasplante.

TABLA 50

Código de lote	Bilirrubina	VIH	HbSag	Fos alc.	PCR	Albúmina	Insulina S	Neurofil	Histo	Recuento celular (en millones)	Viabilidad %	Estado del cultivo
B77	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,86	72	Estéril
B78	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,18	70	Estéril
B79	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,92	70	Estéril
B80	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,96	68	Estéril
L56	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,12	72	Estéril
L57	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,84	72	Estéril
B81	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,16	70	Estéril
B82	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,72	68	Estéril
B83	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,68	74	Estéril
B84	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,72	72	Estéril
B85	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,86	76	Estéril
B86	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,92	78	Estéril
L58	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,86	82	Estéril
L59	1,27	-ve	-ve	97	-ve	1,9	13,2	-	-	3,12	70	Estéril
B87	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,16	72	Estéril
B88	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,84	70	Estéril
L1/V 1	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,68	78	Estéril
L1/V2	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,72	74	Estéril
B89	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,68	72	Estéril
B90	0,05	-ve	-ve	14	-ve	0,15	-	-	-	3,76	70	Estéril
B91	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,64	68	Estéril
B92	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,72	72	Estéril
B93	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,74	70	Estéril
B94	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,92	72	Estéril
B95	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3,86	70	Estéril

-ve = resultado negativo de la prueba

- = no realizado

Líneas celulares

5 Los subcultivos se repitieron más de 100 veces para establecer las células hES de la presente invención. Adicionalmente, los subcultivos se probaron para detectar cualquier contaminación/infección en cada etapa de expansión o almacenamiento adicional. Se descubrió que las líneas celulares de hES eran estables y sin ninguna anomalía durante más de cinco años de ciclos de subcultivo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para expandir las células hES libres de productos animales no humanos, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones minerales suplementarias, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a la membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, con la condición de que esta definición no excluya las cantidades traza de progesterina y agonista de β hCG que pueden estar presentes como resultado del procedimiento de expansión, que comprende las etapas de:
- 5
- 10 (a) introducir células hES en un medio de cultivo celular que consiste en un medio esencial mínimo, una progesterina y un agonista de la gonadotropina coriónica β -humana (β hCG); e
(b) incubar las células madre a una temperatura de 34 °C a 38 °C en un entorno de dióxido de carbono del 3,5 % al 6 % durante 12 horas a 48 horas.
- 15 2. El procedimiento de expansión de células hES de la reivindicación 1 en el que dicho medio de cultivo celular es RPMI.
3. El procedimiento de expansión de células hES de la reivindicación 1, que comprende además:
- 20 (a) tomar una alícuota de células madre incubadas de la etapa (b) en donde dicha alícuota contiene al menos una célula madre,
(b) resuspender las células en medio de cultivo celular junto con progesterona y β hCG a la alícuota,
(c) diluir las células en medio de cultivo celular sin progesterina y agonista de β hCG, e
25 (d) incubar las células a una temperatura de 34 °C a 38 °C en un entorno de dióxido de carbono del 3,5 % al 6 % durante 12 horas a 48 horas.
4. El procedimiento de expansión de células hES de la reivindicación 1 en el que dicha incubación se lleva a cabo en una incubadora de cultivo celular con camisa de agua.
- 30 5. El procedimiento de expansión de células hES de la reivindicación 1, en el que dichas células madre en medio de cultivo se incuban en un recipiente biocompatible en condiciones sustancialmente anaeróbicas.
6. El procedimiento de expansión de células hES de la reivindicación 5, en el que dichas células madre no se diferencian en la proliferación.
- 35 7. El procedimiento de expansión de células hES de la reivindicación 1, que comprende además el paso de probar las células madre expandidas para detectar cualquier contaminación.
8. El procedimiento de expansión de células hES de la reivindicación 1 en el que dicho proceso de cultivo se lleva a cabo en recipientes biocompatibles.
- 40 9. El procedimiento de expansión de células hES de la reivindicación 1, en el que la proporción de la parte alícuota de células madre incubadas al medio celular es 1:3,5 a 1:35.
- 45 10. El procedimiento de expansión de células hES de la reivindicación 1 en el que dicha incubación se lleva a cabo en un entorno sustancialmente anaeróbico.
11. El procedimiento de expansión de células hES de la reivindicación 10, en el que dicha incubación se lleva a cabo en un recipiente biocompatible donde el volumen está casi completamente ocupado por el medio y el recipiente se mantiene en una posición vertical.
- 50 12. Un procedimiento para diferenciar parcialmente las células hES, que comprende las etapas de:
- (a) expandir las células hES por el procedimiento de la reivindicación 1;
55 (b) introducir las células hES en un medio de cultivo celular que consiste en un medio esencial mínimo; e
(c) incubar las células madre a una temperatura de 34 °C a 38 °C en un entorno de dióxido de carbono del 3,5% al 6% durante de 12 horas a 48 horas.
13. El procedimiento de diferenciar parcialmente las células hES de la reivindicación 12 en el que dicho medio de cultivo celular es RPMI o DMEM.
- 60 14. El procedimiento de diferenciar parcialmente las células hES de la reivindicación 12 en el que dicha incubación se lleva a cabo en una incubadora de cultivo celular con camisa de agua.
- 65 15. El procedimiento de diferenciar parcialmente las células hES de la reivindicación 12, en el que dichas células madre en medio de cultivo se incuban en un recipiente biocompatible en condiciones sustancialmente aeróbicas.

16. El procedimiento de diferenciar parcialmente las células hES de la reivindicación 15, en el que dichas células madre se diferencian en la proliferación.
- 5 17. El procedimiento de diferenciar parcialmente las células hES de la reivindicación 12, que comprende adicionalmente la etapa de probar las células madre expandidas para detectar cualquier combinación.
18. El procedimiento de diferenciar parcialmente las células hES de la reivindicación 12, en el que dicho procedimiento de cultivo se lleva a cabo en recipientes biocompatibles.
- 10 19. El procedimiento de diferenciar parcialmente las células hES de la reivindicación 12, en el que la relación de la alícuota de células madre incubadas y el medio celular es 1:3,5 a 1:35.
- 15 20. El procedimiento de diferenciar parcialmente las células hES de la reivindicación 12, en el que dicha incubación se lleva a cabo en ambiente sustancialmente aeróbico.
21. El procedimiento para diferenciar parcialmente las células hES de la reivindicación 20, en el que dicha incubación se lleva a cabo en un recipiente biocompatible y el recipiente se mantiene en una posición horizontal.
- 20 22. Un procedimiento de preparación de una preparación lista para usar de células hES para trasplante humano, que comprende las etapas de:
- (a) expandir las células hES y/o diferenciar parcialmente las células hES por el procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 12,
- 25 (b) centrifugar dichas células madre para obtener un gránulo, y
- (c) suspender el gránulo en una solución biocompatible;
23. El procedimiento de preparación de una preparación lista para usar de células hES para trasplante humano de la reivindicación 22, que comprende además las etapas de:
- 30 (a) almacenar la preparación de -15 °C a -72 °C, y
- (b) descongelar de manera natural la preparación almacenada antes del trasplante,
- 35 en el que la viabilidad de las células es al menos el 40 % al descongelar.
24. El procedimiento de preparar una preparación lista para usar de células hES para trasplante humano de la reivindicación 22 o 23, que comprende además la etapa de probar la preparación para detectar cualquier contaminación antes del trasplante.
- 40 25. Un procedimiento para almacenar una preparación de células hES en una condición viable que comprende las etapas de:
- (a) expandir las células hES y/o diferenciar parcialmente las células hES por el procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 12,
- 45 (b) añadir un agente de criopreservación, y
- (c) congelar las células a -15 a -72 °C.
26. El procedimiento para almacenar una preparación de células hES de la reivindicación 25 en el que la proporción de la cantidad de dicho agente de criopreservación a la del medio de cultivo es de 1:500 a 16:1000.
- 50 27. El procedimiento para almacenar una preparación de células hES de la reivindicación 25, en el que dicho almacenamiento está en un recipiente biocompatible.
28. El procedimiento para almacenar una preparación de células hES de la reivindicación 25, en el que las células se congelan a una temperatura de -18 a -20 °C.
- 55