

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 316**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 35/28</b>	(2015.01)
<b>A61P 37/06</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/077</b>	(2010.01)
<b>C12N 5/0789</b>	(2010.01)
<b>A61K 38/21</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/0775</b>	(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2012 PCT/AU2012/000626**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12162754**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2012 E 12792873 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 2714057**

54 Título: **Procedimientos de tratamiento o prevención de enfermedades neurológicas**

30 Prioridad:

**03.06.2011 US 201161493073 P**

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

**28.05.2020**

73 Titular/es:

**MESOBLAST, INC. (100.0%)  
275 Madison Ave, 4th Floor  
New York, New York 10016, US**

72 Inventor/es:

**BERNARD, CLAUDE**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 763 316 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

Procedimientos de tratamiento o prevención de enfermedades neurológicas

### 5 CAMPO

La presente descripción se refiere a procedimientos para el tratamiento o prevención de enfermedades neurológicas.

### ANTECEDENTES

10

Las enfermedades neurológicas inflamatorias son una clase de afecciones en las que el sistema inmunitario de un sujeto se dirige o ataca a los componentes del sistema neurológico. Estas enfermedades pueden producirse por ataques contra el sistema inmunitario, por ejemplo, las neuronas, las células de Schwann u otras células de la mielina o los neurotransmisores del sistema nervioso. En algunos casos, la enfermedad neurológica inflamatoria puede

15 aparecer como una complicación o un componente de una enfermedad existente, por ejemplo, las enfermedades neurológicas inflamatorias de ejemplo incluyen esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Guillain-Barré, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, miastenia grave, mielitis transversa, leucodistrofia o leucoencefalopatía multifocal progresiva.

20

La EM es una de las enfermedades neurológicas inflamatorias más comunes. Es una enfermedad degenerativa inflamatoria y desmielinizante del sistema nervioso central (SNC) humano. Es una enfermedad de ámbito mundial que afecta aproximadamente a 300.000 personas solo en los Estados Unidos. La mayoría de las personas afectadas por EM (aproximadamente el 70%-80% de los casos) muestran un inicio entre los 20 y los 40 años de edad. La EM es un trastorno heterogéneo basado en el curso clínico, la valoración con estudios de resonancia magnética (RM) y los

25 análisis histopatológicos de material de biopsia y autopsia. La enfermedad se manifiesta en un gran número de combinaciones posibles de déficits, lo que incluye síndromes de la médula espinal, tronco del encéfalo, los pares craneales, cerebelosos, cerebrales y cognitivos. El destino de la mayoría de los pacientes con EM es la discapacidad progresiva. Aproximadamente la mitad de los pacientes con EM necesita un bastón para caminar a los 15 años desde el inicio de la enfermedad.

30

La EM se presenta en la mayoría de los casos (aproximadamente el 80%) con recidivas clínicas caracterizadas por déficits focales total o parcialmente reversibles. Esta forma de EM se conoce como EM recidivante-remitente (EMRR), y está dominada por inflamación y edema. La inflamación activa del SNC se visualiza en la RM como lesiones de materia blanca realizadas con gadolinio. Después de una media de aproximadamente 39 años, aproximadamente la

35 mitad de los casos de EMRR acumula gradualmente déficits neurológicos irreversibles en ausencia de recidivas clínicas o nuevas lesiones de materia blanca tal como se detecta mediante RM. Este estadio de enfermedad se conoce como EM progresiva secundaria (EMPS) o enfermedad crónica. El 20% de los pacientes que no presentan con EMRR presentan deterioro clínico progresivo desde el inicio de la enfermedad, que se conoce como EM progresiva primaria (EMPP), que es otra forma de enfermedad crónica.

40

En la actualidad, las recidivas de EM agudas se tratan normalmente con corticoesteroides intravenosos en dosis altas y con breve duración. Este tratamiento abrevia la duración de la recidiva pero no mejora el grado de recuperación o el curso a largo plazo de la enfermedad. En la actualidad en EE.UU. existen varias terapias aprobadas de modificación de la enfermedad, que pretenden reducir la tasa de recidivas clínicas, extender el tiempo hasta la siguiente recidiva

45 y/o reducir la acumulación de nuevas lesiones en la RM. Sin embargo, estas terapias son sólo moderadamente efectivas para el tratamiento de la EM, especialmente durante la fase recidivante-remitente. Además, estos tratamientos simplemente retrasan la progresión de la enfermedad y no producen una remielinización.

50

El LES es una enfermedad inflamatoria que afecta a diversos sistemas de órganos del cuerpo. Los sujetos que padecen LES pueden desarrollar diversos trastornos neurológicos como cefaleas, cambios de personalidad, síndrome cerebral orgánico, neuropatías periféricas, neuropatía sensitiva, problemas psicológicos que incluyen paranoia, manía y esquizofrenia, convulsiones, mielitis transversa, y parálisis y accidente cerebrovascular. Algunos de estos cambios pueden desencadenarse por anticuerpos antifosfolípidos (por ejemplo, anticuerpos anticardiolipina), que pueden unirse a las células del sistema nervioso central y perturbar la función y/o provocar trombosis.

55

Los tratamientos farmacológicos comunes del lupus incluyen el uso de corticoesteroides o fármacos inmunosupresores, donde ambos tienen efectos secundarios indeseables y tan solo tratan los síntomas cuando aparecen.

Otras enfermedades neurológicas inflamatorias se tratan, por ejemplo, usando fármacos inmunosupresores, corticoesteroides, plasmaféresis o inmunoglobulina intravenosa, todos los cuales comportan un riesgo de infección u otros efectos secundarios adversos.

5 Zappia y col., 2005, Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T cell anergy, *Blood* 106:1755-1761, describen propiedades inmunorreguladoras de las CMM que interfieren eficazmente con el ataque autoinmunitario en el curso de EAE que induce un estadio *in vivo* de falta de respuesta a los linfocitos T que tiene lugar en órganos linfoides secundarios.

10 Burt, 2005, Finding a less toxic stem cell therapy for multiple sclerosis, *Blood* 106:1514-1515, aporta observaciones a Zappai y col.

Rojewski y col., 2008, Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues, *Transfus Med Hemother* 35:168-184, es un artículo de revisión que resume diversos intentos de caracterizar las células madre mesenquimales basándose en la expresión de proteínas de superficie.

La publicación de solicitud de patente internacional nº WO-2010/090843-A2 describe células madre mesenquimales derivadas de las encías y su uso para regular la respuesta inflamatoria en un escenario normal frente a curación de heridas patológicas y para tratar una enfermedad inflamatoria y/o autoinmunitaria.

20 Por tanto, para los expertos en la materia será evidente que existe una necesidad en la técnica de nuevas terapias útiles para el tratamiento de enfermedades neurológicas inflamatorias.

## RESUMEN

25 Los autores de la invención han estudiado el efecto de preparados de células multipotentes STRO-1<sup>+</sup> en modelos animales aceptados de una enfermedad neurológica inflamatoria, en concreto, la encefalomiелitis inflamatoria experimental paralítica crónica (EAE). Los autores de la invención encontraron que las células STRO-1<sup>+</sup> administradas después de la inducción de EAE reducían la gravedad de la enfermedad.

30 Los autores de la invención también encontraron que las células STRO-1<sup>+</sup> prevenían una respuesta inmunitaria frente a un antígeno mediante linfocitos T derivados de un animal inmunizado previamente con el antígeno.

La presente invención está dirigida al asunto expuesto en las reivindicaciones adjuntas.

35 La presente descripción proporciona un procedimiento para el tratamiento o prevención de una enfermedad neurológica inflamatoria, comprendiendo el procedimiento la administración al sujeto de una población de células enriquecida con STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie y/o los factores solubles derivados de las mismas.

40 En un ejemplo, la enfermedad neurológica inflamatoria está asociada con o es causada por una respuesta de linfocitos T a un estímulo inflamatorio.

En un ejemplo, el procedimiento comprende la administración de una población de células enriquecida con STRO-1<sup>brillante</sup> y/o su progenie y/o los factores solubles derivados de las mismas.

45 En un ejemplo, la enfermedad neurológica inflamatoria se selecciona de entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Guillain-Barré, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, miastenia grave, mielitis transversa, leucodistrofia y leucoencefalopatía multifocal progresiva.

50 En un ejemplo, la enfermedad es lupus eritematoso sistémico.

En otro ejemplo, la enfermedad es esclerosis múltiple. En un ejemplo, la enfermedad es una forma progresiva crónica de esclerosis múltiple. En otro ejemplo, la enfermedad es una forma recidivante-remitente de esclerosis múltiple.

55 En un ejemplo, el procedimiento comprende la administración de una población de células enriquecida con STRO-1<sup>brillante</sup> y/o su progenie y/o los factores solubles derivados de las mismas. En un ejemplo, la progenie está enriquecida adicionalmente con células STRO-1<sup>brillante</sup>.

Las células de ejemplo y/o la progenie expresan adicionalmente fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP, por

sus siglas en inglés) y/o proteína de choque térmico 90β (HSP90β) y/o CD146.

En un ejemplo, la población de células se obtiene de médula ósea o pulpa dental.

- 5 En un ejemplo, la población enriquecida con células STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie y/o los factores solubles obtenidos de las mismas se administran sistémicamente. Por ejemplo, la población de células enriquecida con STRO-1<sup>+</sup> y/o las células de su progenie y/o los factores solubles obtenidos de las mismas pueden administrarse por vía intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, en una aorta, en una aurícula o ventrículo del corazón o en un vaso sanguíneo conectado con un órgano afectado por la enfermedad neurológica inflamatoria. Por ejemplo, la población y/o la
- 10 progenie y/o los factores solubles se administran por vía intravenosa.

En otro ejemplo, la población enriquecida con células STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie y/o los factores solubles obtenidos de las mismas se administran en líquido cefalorraquídeo o en el sistema nervioso central.

- 15 En un ejemplo adicional, la población enriquecida con células STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie y/o los factores solubles obtenidos de las mismas se administran en un sitio de enfermedad, por ejemplo, en un sitio de degeneración de mielina.

En el caso de una enfermedad recidivante-remitente (por ejemplo, EM recidivante-remitente), las células pueden

20 administrarse durante la recidiva de la enfermedad para prevenir o retrasar la recidiva de la enfermedad.

En un ejemplo, el procedimiento comprende la administración de una cantidad efectiva de la población enriquecida con células STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie y/o los factores solubles obtenidos de las mismas. En un ejemplo, la cantidad efectiva es una cantidad suficiente para aumentar el número de linfocitos T reguladores (Treg) en el sujeto y/o en el

25 sitio de patogenia.

Un procedimiento de ejemplo descrito en la presente memoria descriptiva según cualquier ejemplo, comprende la administración de una dosis de la población y/o la progenie y/o los factores solubles suficiente para mejorar una medida clínica de la enfermedad neurológica inflamatoria y/o para reducir o prevenir una respuesta inmunitaria contra un

30 antígeno asociado con la enfermedad neurológica inflamatoria.

En un ejemplo, el procedimiento comprende la administración de una dosis efectiva o una dosis terapéuticamente efectiva de la población y/o la progenie y/o los factores solubles.

- 35 En un ejemplo, el procedimiento comprende la administración de entre  $1 \times 10^4$  y  $5 \times 10^6$  células STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie por kg. Por ejemplo, el procedimiento comprende la administración de entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  células STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie por kg. Por ejemplo, el procedimiento comprende la administración de entre  $2 \times 10^5$  y  $8 \times 10^5$  células STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie por kg. Por ejemplo, el procedimiento comprende la administración de aproximadamente  $2 \times 10^5$  células STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie por kg o aproximadamente  $4 \times 10^5$  células STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie por kg o
- 40 aproximadamente  $8 \times 10^5$  células STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie por kg.

En un ejemplo, un procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva según cualquier ejemplo, comprende la administración de una dosis baja de células STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie. Por ejemplo, la dosis baja de STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie comprende entre  $1 \times 10^3$  y  $3 \times 10^5$  células STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie por kg.

45

En un ejemplo, la población y/o la progenie y/o los factores solubles se administran varias veces. Por ejemplo, la población y/o la progenie y/o los factores solubles se administran varias veces en una semana o una vez cada cuatro o más semanas.

- 50 En un ejemplo, la población y/o la progenie y/o los factores solubles se administran durante una remisión de una afección neurológica inflamatoria.

En otro ejemplo, la población enriquecida con células STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie es diseñada genéticamente para expresar una molécula con el fin de bloquear la estimulación de linfocitos T y/o los factores solubles se obtienen a

55 partir de dichas células modificadas genéticamente.

En otro ejemplo, la población enriquecida con células STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie y/o los factores solubles de las mismas se administran con un compuesto para bloquear la estimulación de linfocitos T.

La población enriquecida con células STRO-1<sup>+</sup> y/o las células de progenie pueden ser autógenas o alogénicas y/o los factores solubles pueden obtenerse de células autógenas o alogénicas. En un ejemplo, la población de células y/o las células de progenie son alogénicas y/o los factores solubles se obtienen de células autógenas.

5 En un ejemplo, la población enriquecida con células STRO-1<sup>+</sup> y/o las células de progenie se han expandido en cultivo antes de la administración y/o antes de la obtención de los factores solubles.

En otro ejemplo, un procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva comprende además la administración de un agente inmunosupresor. El agente inmunosupresor puede administrarse durante un tiempo suficiente para  
10 permitir que dichas células trasplantadas sean funcionales.

La presente descripción también proporciona un procedimiento para la prevención de una respuesta inmunitaria en respuesta a un antígeno, comprendiendo el procedimiento la administración al sujeto de una población de células enriquecida con STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie y/o los factores solubles obtenidos de las mismas.

15

En un ejemplo, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T. Una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T de ejemplo comprende la proliferación de linfocitos T.

En un ejemplo, la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T está suprimida en respuesta a un antígeno específico  
20 y una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T en respuesta a otro antígeno no está suprimida.

En un ejemplo, el sujeto ha provocado previamente una respuesta inmunitaria al antígeno y la población, la progenie y/o los factores solubles suprimen una respuesta inmunitaria adicional al antígeno.

25 En un ejemplo, la población, la progenie y/o los factores solubles se administran después de que el sujeto provoque una respuesta inmunitaria al antígeno para prevenir de este modo una respuesta inmunitaria adicional al antígeno.

En un ejemplo, la respuesta inmunitaria está suprimida durante al menos aproximadamente 24 días después de la administración de la población de células enriquecida con STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie y/o los factores solubles obtenidos  
30 de las mismas.

La presente descripción también proporciona un procedimiento para inducir tolerancia a un antígeno en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la administración al sujeto de una población de células enriquecida con STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie y/o los factores solubles obtenidos de las mismas.

35

En un ejemplo de un procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva el antígeno o el antígeno específico es uno frente al cual se provoca una respuesta inflamatoria. Por ejemplo, la respuesta inflamatoria es causa de una enfermedad neurológica inflamatoria.

40 En un ejemplo de un procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva según cualquier ejemplo, la población de células enriquecida con STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie y/o los factores solubles obtenidos de las mismas se administra con un compuesto que trata o previene una enfermedad neurológica inflamatoria. Un compuesto de ejemplo es acetato de glatirámico y/o interferón beta.

45 El compuesto puede mezclarse con la población y/o la progenie y/o los factores solubles o administrarse al mismo tiempo y/o administrarse antes o después de la población y/o la progenie y/o los factores solubles (por ejemplo, de manera que el compuesto y la población y/o la progenie y/o los factores solubles proporcionen un beneficio al mismo tiempo).

50 La presente descripción también proporciona una población de células enriquecida con STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie y/o los factores solubles obtenidos de las mismas para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurológica inflamatoria y/o para la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T contra un antígeno y/o para la inducción de tolerancia a un antígeno.

55 La presente descripción también proporciona para su uso una población de células enriquecida con STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie y/o los factores solubles obtenidos de las mismas en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad neurológica inflamatoria y/o para la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T contra un antígeno y/o para la inducción de tolerancia a un antígeno.

Cada ejemplo de la descripción se tomará para su aplicación *mutatis mutandis* a un procedimiento para reducir, retrasar o prevenir la destrucción de mielina y/o una respuesta inflamatoria contra la mielina o un componente de la misma.

- 5 Cada ejemplo de la descripción se tomará para su aplicación *mutatis mutandis* a la inflamación en el sistema nervioso o un componente del mismo,

Cada ejemplo de la descripción se tomará para su aplicación *mutatis mutandis* a un procedimiento para inducir o promover la remielinización o la excrecencia de neuritas.

10

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**Figura 1.** Coexpresión de TNAP (STRO-3) y el marcador de células precursoras mesenquimales, STRO-1<sup>brillante</sup> por células morfonucleares de médula ósea humana adulta (BMMNC, por sus siglas en inglés). Se practicó una inmunofluorescencia de color doble y citometría de flujo por incubación de BMMNC de STRO-1 seleccionadas por MACS y marcadas indirectamente con un anticuerpo de IgM antimurina de cabra acoplado a FITC (eje x) y AcM STRO-3 (IgG1 murina) marcado indirectamente con una IgG antimurina de cabra acoplada a PE (eje y). El histograma de gráfico de puntos representa 5 x 10<sup>4</sup> eventos recogidos como datos en modo de lista. Se establecieron las líneas vertical y horizontal a niveles de reactividad de <1,0% de fluorescencia media obtenidos con los anticuerpos de control de isotipo coincidente, 1B5 (IgG) y 1A6.12 (IgM) tratados en las mismas condiciones. Los resultados demuestran que una población menor de células STRO-1<sup>brillante</sup> coexpresó TNAP (cuadrante superior derecho) mientras que las células STRO-1<sup>+</sup> restantes no reaccionaron con el AcM de STRO-3.

**Figura 2.** Perfil de expresión génica de progenie de STRO-1<sup>bri</sup> o STRO-1<sup>débil</sup> de CPM de STRO-1<sup>bri</sup> en cultivo y ampliadas. Se prepararon suspensiones de células individuales de CPM de médula ósea ampliadas *ex vivo* mediante tratamiento con tripsina/EDTA. Se tiñeron las células con el anticuerpo STRO-1 que posteriormente se reveló mediante incubación con isotiocianato de IgM/fluoresceína antimurina de cabra. Se preparó ARN celular total a partir de poblaciones purificadas de células que expresan STRO-1<sup>débil</sup> o STRO-1<sup>bri</sup>, seguido por clasificación celular activada por fluorescencia (A). Usando un procedimiento de extracción RNAzoIB, y procedimientos estándar, se aisló el ARN total de cada subpoblación y se usó como una plantilla para síntesis de ADNc. Se valoró la expresión de varios transcritos por amplificación PCR, usando un protocolo estándar tal como se ha descrito anteriormente (Gronthos y col. J Cell Sci. 116:1827-1835, 2003). Los conjuntos de cebadores usados en este estudio se muestran en la Tabla 2. Después de la amplificación, se analizó cada mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio (B). Se valoró la expresión génica relativa para cada marcador celular con referencia a la expresión del gen de limpieza, GAPDH, usando el software ImageQant (C).

**Figura 3.** La progenie de STRO-1<sup>bri</sup> de CPM de STRO-1<sup>+</sup> en cultivo y ampliadas expresa altos niveles de SDF-1, mientras que la progenie de STRO-1<sup>débil</sup> no lo hace. (A) Se distribuyeron preparados aislados con MACS de BMMNC STRO-1<sup>+</sup> en diferentes subconjuntos de STRO-1 según las regiones, STRO-1<sup>brillante</sup> y STRO-1<sup>débil/opaca</sup> usando FACS. Se preparó ARN total a partir de cada subpoblación de STRO-1 y se usó para construir una biblioteca de hibridación por sustracción de STRO-1<sup>brillante</sup> (B-C). Los filtros de nitrocelulosa replicados, que se han sometido a inmunosupresión con productos de PCR representativos se amplificaron a partir de clones bacterianos transformados con ADNc con sustracción de STRO-1<sup>brillante</sup>. A continuación se sondearon los filtros con ADNc con sustracción de STRO-1<sup>brillante</sup> (B) o STRO-1<sup>débil/opaca</sup> (C) marcado con [<sup>32</sup>P] trifosfato de desoxicitidina (dCTP). Las flechas indican expresión diferencial de 1 clon que contiene un fragmento de ADNc correspondiente a SDF-1 humano. (D) Análisis por transcriptasa inversa (RT)-PCR que muestra la expresión relativa de transcritos de SDF-1 y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en ARN total preparado a partir de poblaciones de BMMNC STRO-1 aisladas con MACS/FACS nuevas antes del cultivo. pb indica par de bases.

**Figura 4** es una representación gráfica que muestra el efecto del tratamiento con CPM en las puntuaciones medias de enfermedad clínica en un modelo de EAE progresiva crónica. Se inmunizó a ratones C57BL/6 con MOG35-55 en el día 0 y a continuación se les trató con inyecciones intravenosas de CPM en los días 8, 10 y 12 después de la inducción de la enfermedad. Se indica la dosificación de CPM.

**Figura 5** es una representación gráfica que muestra que el tratamiento con CPM induce una reducción dependiente de la dosis en el índice de enfermedad acumulado en EAE progresiva crónica (análisis de área total bajo la curva de puntuación media de enfermedad clínica)

**Figura 6** es una representación gráfica que muestra el aumento en veces en proliferación de esplenocitos aislados de

ratones inmunizados con MOG<sub>35-55</sub> en comparación con esplenocitos no inmunizados después de estimulación con MOG<sub>35-55</sub>.

**Figura 7** es una representación gráfica que muestra el aumento en veces en proliferación de esplenocitos aislados de ratones inmunizados con MOG<sub>35-55</sub> en comparación con esplenocitos no inmunizados después de reestimulación no específica con PMA/ionomicina.

#### CLAVE DEL LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 SEQ ID NO: 1 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica GAPDH
- SEQ ID NO: 2 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica GAPDH
- SEQ ID NO: 3 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica SDF-1
- SEQ ID NO: 4 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica SDF-1
- SEQ ID NO: 5 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica IL-1 $\beta$
- 15 SEQ ID NO: 6 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica IL-1 $\beta$
- SEQ ID NO: 7 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica FLT-1
- SEQ ID NO: 8 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica FLT-1
- SEQ ID NO: 9 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica TNF- $\alpha$
- SEQ ID NO: 10 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica TNF- $\alpha$
- 20 SEQ ID NO: 11 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica KDR
- SEQ ID NO: 12 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica KDR
- SEQ ID NO: 13 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica RANKL
- SEQ ID NO: 14 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica RANKL
- SEQ ID NO: 15 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica Leptina
- 25 SEQ ID NO: 16 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica Leptina
- SEQ ID NO: 17 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica CBFA-1
- SEQ ID NO: 18 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica CBFA-1
- SEQ ID NO: 19 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica PPAP $\gamma$ 2
- SEQ ID NO: 20 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica PPAP $\gamma$ 2
- 30 SEQ ID NO: 21 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica OCN
- SEQ ID NO: 22 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica OCN
- SEQ ID NO: 23 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica MyoD
- SEQ ID NO: 24 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica MyoD
- SEQ ID NO: 25 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica SMMHC
- 35 SEQ ID NO: 26 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica SMMHC
- SEQ ID NO: 27 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica GFAP
- SEQ ID NO: 28 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica GFAP
- SEQ ID NO: 29 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica Nestina
- SEQ ID NO: 30 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica Nestina
- 40 SEQ ID NO: 31 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica SOX9
- SEQ ID NO: 32 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica SOX9
- SEQ ID NO: 33 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica Colágeno tipo X
- SEQ ID NO: 34 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica Colágeno tipo X
- SEQ ID NO: 35 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica Agrecano
- 45 SEQ ID NO: 36 oligonucleótido para la amplificación de ácido nucleico que codifica Agrecano

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

Técnicas generales y definiciones seleccionadas

50

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se especifique o que el contexto exija lo contrario, al hacer referencia a una única etapa, composición de materia, grupo de etapas o grupo de composiciones de materia se entenderá que esta abarca una y una pluralidad (es decir, uno o más) de dichas etapas, composiciones de materia, grupos de etapas o grupo de composiciones de materia.

55

Cada ejemplo descrito en la presente memoria descriptiva debe aplicarse *mutatis mutandis* a todos y cada uno de los ejemplos de la descripción, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Los expertos en la materia apreciarán que la descripción puede someterse a variaciones y modificaciones distintas de

las descritas específicamente. Se ha de entender que la descripción incluye todas estas variaciones y modificaciones. La descripción también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en la presente memoria descriptiva, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones o dos o más cualesquiera de dichas etapas o características.

5

El alcance de la presente descripción no está limitado por los ejemplos específicos descritos en la presente memoria descriptiva, que están destinados únicamente a fines de ejemplo. Los productos, composiciones y procedimientos funcionalmente equivalentes están claramente dentro del alcance de la descripción.

- 10 La presente descripción se lleva a cabo sin experimentación indebida usando, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, virología, tecnología de ADN recombinante, síntesis de péptidos en disolución, síntesis de péptidos en fase sólida e inmunología. Dichos procedimientos se describen, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Segunda edición (1989), todos los Vols I, II y III; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vols. I and II (D. N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, texto completo; *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (M. J. Gait, ed., 1984) IRL Press, Oxford, texto completo, y concretamente los trabajos de Gait, pág. 1-22; Atkinson y col., pág. 35-81; Sproat y col., pág. 83-115; y Wu y col., pág. 135-151; 4. *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, todo el texto; *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach* (1986) IRL Press, Oxford, texto completo; Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), serie completa; J.F. Ramalho Ortigao, "The Chemistry of Peptide Synthesis" En: Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website (Interactiva, Alemania); Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. Land Fenichel, R.L. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73 336-342; Merrifield, R.B. (1963). *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154; Barany, G. y Merrifield, R.B. (1979) en *The Peptides* (Gross, E. y Meienhofer, J. eds.), vol. 2, págs. 1-284, Academic Press, Nueva York. 12. Wünsch, E., ed. (1974) *Synthese von Peptiden en Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie* (Müller, E., ed.), vol. 15, 4a ed., Partes 1 y 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) *Int. J. Peptide Protein Res.* 25, 449-474; *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); y *Animal Cell Culture: Practical Approach*, tercera edición (John R. W. Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970, texto completo.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto lo exija de otro modo, se entenderá que el término "comprende", o variaciones tales como "comprenden" o "que comprende/comprenden" implican la inclusión de determinada etapa o elemento o número entero o grupo de etapas o elementos o números enteros, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se entenderá que el término "derivados/derivadas de" indica que un número entero especificado se puede obtener de una fuente en particular aunque no necesariamente directamente de dicha fuente. En el contexto de los factores solubles derivados de células STRO-1<sup>+</sup> y/o células de su progenie, este término se entenderá que significa uno o más factores, por ejemplo, proteínas, péptidos, carbohidratos, etc. producidos durante el cultivo *in vitro* de células STRO-1<sup>+</sup> y/o células de su progenie.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se entenderá que el término "enfermedad neurológica inflamatoria" incluye cualquier trastorno caracterizado por un defecto en la señalización neuronal y/o disfunción neuronal y/o muerte de células neuronales derivado de una respuesta inflamatoria, y, en algunos ejemplos, una respuesta autoinmunitaria. En un ejemplo, un trastorno neurológico inflamatorio es un trastorno asociado con o causado por degeneración de mielina y/o autoanticuerpos contra un componente del sistema nervioso, tal como, por ejemplo, un componente de mielina o un fosfolípido o un gangliósido. Una enfermedad neurológica inflamatoria puede ser una enfermedad primaria o puede ser una complicación de una enfermedad existente, por ejemplo, en algunos casos de LES.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se entenderá que el término "cantidad efectiva" significa una cantidad suficiente de STRO-1<sup>+</sup> y/o las células de su progenie y/o los factores solubles obtenidos de las mismas para reducir una respuesta inflamatoria en un sujeto que causa o está asociada con una enfermedad neurológica. Por ejemplo, una cantidad efectiva de STRO-1<sup>+</sup> y/o las células de su progenie y/o los factores solubles obtenidos de las mismas puede reducir lesiones en el encéfalo o la médula espinal, por ejemplo, detectable usando resonancia magnética (RM) y/o autoanticuerpos contra mielina y/o bandas oligoclonales en el LCR.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se entenderá que el término "cantidad terapéuticamente efectiva"

significa una cantidad suficiente de STRO-1<sup>+</sup> y/o las células de su progenie y/o los factores solubles obtenidos de las mismas para reducir o inhibir uno o más síntomas de una enfermedad neurológica inflamatoria clínica.

5 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se entenderá que el término "cantidad profilácticamente efectiva" significa una cantidad suficiente de STRO-1<sup>+</sup> y/o las células de su progenie y/o los factores solubles obtenidos de las mismas para prevenir o inhibir o retrasar el inicio de uno o más síntomas detectables de una enfermedad neurológica inflamatoria clínica.

10 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se entenderá que el término "dosis baja" significa una cantidad de STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie menor que  $0,7 \times 10^6$ , aunque todavía suficiente para que los niveles de lípidos y/o lipoproteínas en un sujeto que causen o estén asociados con una enfermedad neurológica inflamatoria y/o para tratar o prevenir una enfermedad neurológica inflamatoria. Por ejemplo, una dosis baja comprende  $0,5 \times 10^6$  células o menos, o  $0,4 \times 10^6$  células o menos o  $0,3 \times 10^6$  células o menos o  $0,2 \times 10^6$  células o menos.

15 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se entenderá que el término "tratar" o "tratamiento" o "que trata" significa la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de factores solubles y/o células y la reducción o inhibición de al menos un síntoma de una afección clínica asociada con o causada por una afección neurológica inflamatoria.

20 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se entenderá que el término "prevenir" o "que previene" o "prevención" significa administrar una cantidad profilácticamente efectiva de factores solubles y/o células y detener u obstaculizar o retrasar el desarrollo o progresión de al menos un síntoma de una afección neurológica inflamatoria clínica.

25 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se entenderá que el término "factores solubles" significa cualquier molécula, por ejemplo, proteína, péptido, glucoproteína, glucopéptido, lipoproteína, lipopéptido, carbohidrato, etc., producida por células STRO-1<sup>+</sup> y/o su progenie que son solubles en agua. Dichos factores solubles pueden ser intracelulares y/o secretados por una célula. Dichos factores solubles pueden ser una mezcla compleja (por ejemplo, sobrenadante) y/o una fracción de estos y/o pueden ser un factor purificado. En un ejemplo, los factores solubles están  
30 o están contenidos dentro del sobrenadante. En consecuencia, cualquier ejemplo en la presente memoria descriptiva dirigido a la administración de uno o más factores solubles se tomará para aplicar *mutatis mutandis* a la administración de sobrenadante.

35 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se entenderá que el término "sobrenadante" se refiere al material no celular producido después del cultivo *in vitro* de células precursoras mesenquimales, y/o las células de progenie de las mismas, en un medio adecuado, tal como medio líquido. Normalmente, el sobrenadante es producido mediante cultivo de las células en el medio en condiciones y tiempo adecuados, seguido por la eliminación del material celular mediante un proceso tal como centrifugación. El sobrenadante puede haberse sometido o no a etapas de purificación adicional antes de su administración. En un ejemplo, el sobrenadante comprende menos de  $10^5$ , tal como menos de  
40  $10^4$ , por ejemplo, menos de  $10^3$  y, por ejemplo, sin células vivas.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se entenderá que el término "previene una respuesta inmunitaria a un antígeno" significa que una población y/o la progenie y/o los factores solubles descritos en la presente memoria descriptiva según cualquier ejemplo retrasan y/o reducen y/o detienen el desarrollo de una respuesta inmunitaria, en  
45 oposición a la supresión de una respuesta inmunitaria preexistente. En algunos ejemplos en la presente memoria descriptiva, se aplicará un ejemplo de la descripción dirigido a prevenir una respuesta inmunitaria a un antígeno *mutatis mutandis* para reducir o inhibir una respuesta inmunitaria existente a un antígeno.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se entenderá que el término "individuo normal o sano" significa  
50 un sujeto que no padece una afección neurológica inflamatoria según lo evaluado por cualquier procedimiento conocido en la técnica y/o descrito en la presente memoria descriptiva.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se entenderá que el término "acetato de glatirámico" significa un fármaco inmunomodulador que comprende un polímero aleatorio de cuatro aminoácidos presentes en proteína básica  
55 de mielina, en concreto ácido glutámico, lisina, alanina y tirosina comercializados en la actualidad con el nombre comercial de Copaxone.

Células STRO-1<sup>+</sup> o células de progenie, y sobrenadante o uno o más factores solubles obtenidos de las mismas

Las células STRO-1<sup>+</sup> son células que se encuentran en la médula ósea, la sangre, las células de la pulpa dental, el tejido adiposo, la piel, el bazo, el páncreas, el encéfalo, el riñón, el hígado, el corazón, la retina, el encéfalo, los folículos pilosos, el intestino, el pulmón, los ganglios linfáticos, el timo, el hueso, el ligamento, el tendón, el músculo esquelético, la dermis y el periostio; y son capaces de diferenciarse en líneas germinales tales como mesodermo y/o endodermo  
5 y/o ectodermo.

En un ejemplo, las células STRO-1<sup>+</sup> son células multipotentes que son capaces de diferenciarse en una gran cantidad de tipos celulares que incluyen, entre otros, tejidos conectivos adiposos, óseos, cartilagosos, elásticos, musculares y fibrosos. El compromiso con un linaje específico y la ruta de diferenciación que estas células toman depende de  
10 diversas influencias, desde influencias mecánicas y/o factores bioactivos endógenos, tales como factores de crecimiento, citoquinas y/o condiciones microambientales locales establecidas por los tejidos huésped. Las células multipotentes STRO-1<sup>+</sup> son, por lo tanto, células progenitoras no hematopoyéticas que se dividen para producir células hijas que son células madre o células precursoras que, con el tiempo, se diferenciarán irreversiblemente para producir una célula fenotípica.

15 En un ejemplo, las células STRO-1<sup>+</sup> se enriquecen a partir de una muestra obtenida de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que recibirá tratamiento o un sujeto relacionado o un sujeto no relacionado (ya sea de la misma especie o diferente). Los términos “enriquecido”, “enriquecimiento” o variaciones de los mismos se usan en el presente documento para describir una población de células en la cual la proporción de un tipo celular particular o la proporción  
20 de una serie de tipos celulares particulares aumenta en comparación con una población de células no tratada (por ejemplo, células en su entorno nativo). En un ejemplo, una población enriquecida para las células STRO-1<sup>+</sup> comprenden al menos aproximadamente el 0,1% o 0,5% o 1% o 2% o 5% o 10% o 15% o 20% o 25% o 30% o 50% o 75% de células STRO-1<sup>+</sup>. En este sentido, el término “población de células enriquecidas para células STRO-1<sup>+</sup> “se tomarán para proporcionar soporte explícito para el término” población de células que comprende X% de células  
25 STRO-1<sup>+</sup>”, donde X% es un porcentaje tal como se menciona aquí. Las células STRO-1<sup>+</sup> pueden, en algunos ejemplos, formar colonias clonogénicas, por ejemplo, CFU-F (fibroblastos) o un subconjunto de las mismas (por ejemplo, el 50% o 60% o 70% o 80% o 90% o 95%) pueden tener esta actividad.

En un ejemplo, la población de células se enriquece a partir de una preparación celular que comprende células STRO-  
30 1<sup>+</sup> en forma seleccionable. A este respecto, se entenderá que el término “forma seleccionable” significa que las células expresan un marcador (por ejemplo, un marcador de superficie celular) que permite la selección de células STRO-1<sup>+</sup>. El marcador puede ser, pero no necesariamente, STRO-1. Por ejemplo, como se describe y/o ejemplifica en el presente documento, las células (por ejemplo, CPM) que expresan STRO-2 y/o STRO-3 (TNAP) y/o STRO-4 y/o VCAM-1 y/o CD146 y/o 3G5 también expresan STRO-1 (y pueden ser STRO-1<sup>brillante</sup>). En consecuencia, una indicación  
35 de que las células son STRO-1<sup>+</sup> no significa que las células se seleccionen mediante la expresión STRO-1. En un ejemplo, las células se seleccionan basándose en al menos la expresión de STRO-3, por ejemplo, son STRO-3<sup>+</sup> (TNAP<sup>+</sup>).

La referencia a la selección de una célula o población de la misma no requiere la selección de una fuente de tejido  
40 específica. Como se describe en la presente memoria descriptiva, las células STRO-1<sup>+</sup> pueden seleccionarse o aislarse o enriquecerse a partir de una gran variedad de fuentes. Dicho esto, en algunos ejemplos, estos términos proporcionan soporte para la selección de cualquier tejido que comprenda células STRO-1<sup>+</sup> (por ejemplo, CPM) o tejido vascularizado o tejido que comprende pericitos (por ejemplo, pericitos STRO-1<sup>+</sup>) o cualquiera de los tejidos mencionados en la presente memoria descriptiva.

45 En un ejemplo, las células usadas en los métodos de la presente descripción expresan uno o más marcadores seleccionados individual o colectivamente de entre el grupo que consiste en TNAP<sup>+</sup>, VCAM-1<sup>+</sup>, THY-1<sup>+</sup>, STRO-4<sup>+</sup> (HSP-90β), STRO-2<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD146<sup>+</sup>, 3G5<sup>+</sup> o cualquier combinación de los mismos.

50 Se entenderá que el término “individualmente” se refiere a que la descripción engloba los marcadores o grupos de marcadores indicados por separado, y que, a pesar de que los marcadores individuales o grupos de marcadores pueden no estar mencionados por separado en el presente documento, las reivindicaciones que lo acompañan pueden definir dicho marcador o grupos de marcadores por separado y divisiblemente entre sí.

55 Se entenderá que el término “colectivamente” se refiere a que la descripción engloba cualquier cantidad o combinación de los marcadores o grupos de péptidos indicados, y que, a pesar de que dichas cantidades y combinaciones de marcadores o grupos de marcadores pueden no estar mencionados específicamente en el presente documento, las reivindicaciones que lo acompañan pueden definir dichas combinaciones o subcombinaciones por separado y divisiblemente con respecto a cualquier otra combinación de marcadores o grupos de marcadores.

En un ejemplo, las células STRO-1<sup>+</sup> son STRO-1<sup>brillante</sup> (*sin*. STRO-1<sup>bri</sup>). En un ejemplo, las células STRO-1<sup>bri</sup> se enriquecen preferentemente en relación con las células STRO-1<sup>débil</sup> o STRO-1<sup>intermedia</sup>.

- 5 En un ejemplo, las células STRO-1<sup>brillante</sup> son adicionalmente uno o más (o todos) de TNAP<sup>+</sup>, VCAM-1<sup>+</sup>, THY-1<sup>+</sup>, STRO-4<sup>+</sup> (HSP-90β), STRO-2<sup>+</sup> y/o CD146<sup>+</sup>. Por ejemplo, las células se seleccionan para uno o más de los marcadores anteriores y/o se muestra que expresan uno o más de los marcadores anteriores. En este sentido, una célula que muestra expresión de un marcador no necesita ser específicamente analizada, más bien, se pueden analizar las células previamente enriquecidas o aisladas, y se puede asumir razonablemente que las células posteriormente  
10 usadas, aisladas o enriquecidas también expresan el mismo marcador.

- En un ejemplo, las células precursoras mesenquimales son células precursoras mesenquimales perivasculares como se define en el documento WO-2004/85630. Por ejemplo, las células precursoras mesenquimales expresan un marcador de una célula perivascular, por ejemplo, las células son STRO-1<sup>+</sup> o STRO-1<sup>brillante</sup> y/o 3G5<sup>+</sup>. En un ejemplo,  
15 las células son o fueron anteriormente o son progenie de células que fueron aisladas a partir de tejido vascularizado u órganos o partes del mismo.

- Cuando se hace referencia a una célula como “positiva” para un marcador dado, puede ser que tenga una expresión baja (ba u opaca) o alta (brillante, bri) de ese marcador, dependiendo del grado en que el marcador esté presente sobre la superficie celular, donde los términos se relacionan con la intensidad de fluorescencia u otro marcador usado en el proceso de clasificación de las células. La distinción entre ba (u opaco u débil) y bri se entenderá en el contexto del marcador usado en una población de células particular que se está clasificando. Una célula a la que se hace referencia como “negativa” para un marcador dado no necesariamente implica que la misma esté completamente libre del mismo. Este término significa que el marcador se expresa en un nivel relativamente bajo por esa célula y que  
20 genera una señal muy baja cuando se marca de manera detectable o es indetectable por encima de los niveles de fondo, por ejemplo, niveles detectados demandando un anticuerpo de control de isotipo.

- El término “brillante”, cuando se usa en el presente documento, hace referencia a un marcador sobre una superficie celular que genera una señal relativamente alta cuando se marca de manera detectable. Sin restringirse a  
30 consideraciones teóricas, se propone que las células “brillantes” expresan más de la proteína marcadora diana (por ejemplo, el antígeno reconocido por STRO-1) que otras células en la muestra. Por ejemplo, las células STRO-1<sup>bri</sup> producen una mayor señal fluorescente, cuando se marcan con un anticuerpo STRO-1 conjugado con FITC, según lo determinado por el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés), que las células no brillantes (STRO-1<sup>débil/opaca</sup>). En un ejemplo, las células “brillantes” constituyen al menos aproximadamente el 0,1% de las células mononucleares de médula ósea marcadas con mayor brillo contenidas en la muestra de partida. En otros ejemplos, las células “brillantes” constituyen al menos aproximadamente un 0,1%, al menos aproximadamente un 0,5%, al menos aproximadamente un 1%, al menos aproximadamente un 1,5% o al menos aproximadamente un 2% de las células mononucleares de médula ósea marcadas con mayor brillo contenidas en la muestra de partida. En un ejemplo, las células STRO-1<sup>brillante</sup> tienen una expresión de magnitud 2 log mayor de  
40 la expresión de superficie STRO-1 en relación con el “fondo”, es decir, las células que son STRO-1<sup>-</sup>. En comparación, las células STRO-1<sup>opaca</sup> y/o STRO-1<sup>intermedia</sup> tienen una expresión mayor de menos de magnitud 2 log de la expresión de superficie STRO-1, normalmente aproximadamente 1 log o menos que el “fondo”.

- Tal como se usa en el presente documento, el término “TNAP” pretende englobar todas las isoformas de fosfatasa alcalina no específica de tejido. Por ejemplo, el término abarca la isoforma hepática (LAP), la isoforma ósea (BAP) y la isoforma renal (KAP). En un ejemplo, la TNAP es BAP. En un ejemplo, la TNAP como se usa en el presente documento hace referencia a una molécula que puede unirse al anticuerpo STRO-3 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 19 de diciembre de 2005 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con número de acceso al depósito PTA-7282.  
50

Además, en un ejemplo, las células STRO-1<sup>+</sup> son capaces de dar lugar a CFU-F clonogénico.

- En un ejemplo, una proporción significativa de células multipotentes STRO-1<sup>+</sup> son capaces de diferenciarse en al menos dos líneas germinales diferentes. Los ejemplos no limitantes de los linajes con los que pueden estar  
55 comprometidas las células multipotentes incluyen células precursoras óseas; progenitores hepatocíticos, que son multipotentes para células epiteliales de conducto biliar y hepatocitos; células restringidas neurales, que pueden generar precursores de células gliales que evolucionan hasta oligodendrocitos y astrocitos; precursores neuronales que evolucionan hasta neuronas; precursores para músculo cardíaco y miocardiocitos y líneas celulares beta pancreáticas secretoras de insulina sensibles a glucosa. Otros linajes incluyen, pero sin limitación, odontoblastos,

células productoras de dentina y condrocitos y células precursoras de las siguientes: células epiteliales de pigmento retiniano, fibroblastos, células cutáneas tales como queratinocitos, células dendríticas, células de folículo piloso, células epiteliales de conducto renal, células de músculo liso y esquelético, progenitores testiculares, células endoteliales vasculares, tendón, ligamento, cartílago, adipocito, fibroblasto, estroma medular, músculo cardíaco, 5 músculo liso, músculo esquelético, pericito, células vasculares, epiteliales, gliales, neuronales, astrocíticas y oligodendrocíticas.

En otro ejemplo, las células STRO-1<sup>+</sup> no son capaces de dar lugar, al cultivo, a células hematopoyéticas.

10 En un ejemplo, las células se toman del sujeto que recibirá tratamiento, se cultivan *in vitro* usando técnicas estándar y usadas para obtener factores sobrenadantes o solubles o células expandidas para la administración al sujeto como una composición autóloga o alogénica. En un ejemplo alternativo, se usan las células de una o más de las líneas celulares humanas establecidas. En otro ejemplo útil de la descripción, se usan células de un animal no humano (o, si el paciente no es un humano, de otra especie).

15

La presente descripción también contempla el uso de sobrenadante o factores solubles obtenidos o derivados de células STRO-1<sup>+</sup> y/o células de su progenie (las últimas también denominadas células expandidas) que se producen a partir de un cultivo *in vitro*. Las células expandidas de la descripción pueden tener una amplia variedad de fenotipos dependiendo de las condiciones de cultivo (incluyendo el número y/o tipo de factores estimulantes en el medio de cultivo), el número de pases y similares. En ciertos ejemplos, las células de progenie se obtienen después de aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 pases de la población parental. No obstante, las células de progenie se pueden obtener después de cualquier número de pases de la población parental.

25

Las células de progenie se pueden obtener cultivando en cualquier medio adecuado. El término "medio", como se usa en referencia a un cultivo celular, incluye los componentes del entorno que rodea a las células. Los medios pueden ser sólidos, líquidos, gaseosos o una combinación de fases y materiales. Los medios incluyen medios de crecimiento líquido, así como también medios que no sostienen el crecimiento celular. Los medios también incluyen medios 30 gelatinosos como agar, agarosa, gelatina y matrices de colágeno. Los medios gaseosos a modo de ejemplo incluyen la fase gaseosa a la que se exponen las células que crecen en una placa de Petri u otro soporte sólido o semisólido. El término "medio" también hace referencia al material cuyo uso se pretende en un cultivo celular, incluso si aún no ha estado en contacto con las células. En otras palabras, un líquido rico en nutrientes preparado para el cultivo bacteriano es un medio. Una mezcla en polvo que, cuando se mezcla con agua u otro líquido, se vuelve adecuado para cultivo 35 celular se puede denominar un "medio en polvo".

En un ejemplo, las células de progenie útiles para los procedimientos de la descripción se obtienen aislando células STRO-1<sup>+</sup> TNAP<sup>+</sup> de la médula ósea usando bolas magnéticas marcadas con el anticuerpo STRO-3, y a continuación cultivo expandiendo las células aisladas (véase Gronthos y col. Blood 85: 929-940, 1995 para obtener un ejemplo de 40 las condiciones de cultivo adecuadas).

En un ejemplo, tales células expandidas (progenie) (por ejemplo, después de al menos 5 pases) pueden ser TNAP<sup>-</sup>, CC9<sup>+</sup>, HLA clase I<sup>+</sup>, HLA clase II<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD11a<sup>-</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup> y/o CD80<sup>-</sup>. Sin embargo, es posible que, en condiciones de cultivo diferentes a las descritas en la presente memoria descriptiva, la expresión de 45 diferentes marcadores pueda variar. Además, aunque las células de estos fenotipos pueden predominar en la población celular expandida, no significa que haya una proporción menor de las células que no tienen este o estos fenotipos (por ejemplo, un pequeño porcentaje de las células expandidas puede ser CC9<sup>-</sup>). En un ejemplo, las células expandidas aún tienen la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos de células.

50 En un ejemplo, una población celular expandida usada para obtener sobrenadante o factores solubles, o células *per se*, comprende células donde al menos el 25%, tal como, al menos el 50%, de las células son CC9<sup>+</sup>.

En otro ejemplo, una población celular expandida usada para obtener sobrenadante o factores solubles, o células *per se*, comprende células en las que al menos el 40%, tal como, al menos el 45%, de las células son STRO-1<sup>+</sup>.

55

En otro ejemplo, las células expandidas pueden expresar uno o más marcadores seleccionados colectiva o individualmente del grupo que consiste en LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, 3G5, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD 90, CD29, CD18, CD61, integrina beta 6-19, trombosmodulina, CD10, CD13, SCF, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, Leptina-R (STRO-2 = Leptina-R), RANKL, STRO-1<sup>brillante</sup>

y CD 146 o cualquier combinación de estos marcadores.

En un ejemplo, las células de la progenie son progenie de células multipotentes STRO-1<sup>+</sup> expandida multipotente (MEMP) como se define y/o describe en el documento WO 2006/032092. En los documentos WO 01/04268 y WO 2004/085630 se describen los procedimientos de preparación de poblaciones enriquecidas de células multipotentes STRO-1<sup>+</sup> de las que puede derivarse la progenie. En un contexto *in vitro*, las células multipotentes STRO-1<sup>+</sup> raramente estarán presentes como una preparación absolutamente pura y, por lo general, estarán presentes con otras células que son células comprometidas específicas de tejido (TSCC, por sus siglas en inglés). El documento WO 01/04268 hace referencia a la recolección de dichas células de la médula ósea en niveles de pureza de aproximadamente entre un 0,1% y un 90%. La población que comprende CPM de la que se deriva la progenie puede cosecharse directamente de una fuente de tejido, o alternativamente puede ser una población que ya se ha expandido *ex vivo*

Por ejemplo, la progenie se puede obtener de una población de células multipotentes STRO-1<sup>+</sup> sustancialmente purificada recolectada, no expandida, que comprende al menos aproximadamente el 0,1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 95% de células totales de la población en la cual están presentes. Este nivel se puede lograr, por ejemplo, seleccionando células que son positivas para al menos un marcador seleccionado individual o colectivamente de entre el grupo que consiste en TNAP, STRO-1<sup>brillante</sup>, 3G5<sup>+</sup>, VCAM-1, THY-1, CD146 y STRO-2.

Las MEMP se pueden distinguir de células multipotentes STRO-1<sup>+</sup> recién recolectadas por ser positivas para el marcador STRO-1<sup>bri</sup> y negativas para el marcador fosfatasa alcalina (ALP). En cambio, las células multipotentes STRO-1<sup>+</sup> recién aisladas son positivas para STRO-1<sup>bri</sup> y ALP. En un ejemplo de la presente descripción, al menos el 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de las células administradas tienen el fenotipo STRO-1<sup>bri</sup>, ALP<sup>-</sup>. En un ejemplo, las MEMP son positivas para uno o más de los marcadores Ki67, CD44 y/o CD49c/CD29, VLA-3, α3β1. En aun otro ejemplo, las MEMP no presentan actividad TERT y/o son negativas para el marcador CD18.

La población inicial de células STRO-1<sup>+</sup> puede derivarse de cualquiera o más de un tipo de tejidos de aquellos descritos en los documentos WO 01/04268 o WO 2004/085630, es decir, médula ósea, células de la pulpa dental, tejido adiposo y piel, o tal vez de manera más amplia del tejido adiposo, dientes, pulpa dental, piel, hígado, riñón, corazón, retina, encéfalo, folículos pilosos, intestino, pulmón, bazo, ganglio linfático, timo, páncreas, hueso, ligamento, médula ósea, tendón y músculo esquelético.

Se entenderá que al llevar a la práctica la presente descripción, la separación de las células que poseen cualquier marcador superficial de célula dado se puede efectuar a través de una serie de procedimientos diferentes, sin embargo, algunos procedimientos se basan en la unión de un agente de unión (por ejemplo, un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno del mismo) al marcador en cuestión seguido de una separación de los que presentan unión, ya sea unión de alto nivel o unión de bajo nivel o ausencia de unión. Los agentes de unión más convenientes son anticuerpos o moléculas basadas en anticuerpo, tales como anticuerpos monoclonales o basados en anticuerpos monoclonales debido a la especificidad de estos últimos agentes. Se pueden usar anticuerpos para ambas etapas, sin embargo, también se podrían usar otros agentes, por lo tanto, también se pueden emplear ligandos para estos marcadores para enriquecer las células que los poseen o que carecen de estos.

Los anticuerpos o ligandos pueden enlazarse con un soporte sólido para permitir una separación bruta. En algunos ejemplos, las técnicas de separación maximizan la retención de la viabilidad de la fracción a recoger. Pueden emplearse diversas técnicas de diferente eficacia para obtener separaciones relativamente brutas. La técnica particular empleada dependerá de la eficiencia de separación, la citotoxicidad asociada, la facilidad y velocidad de rendimiento y la necesidad de un equipo sofisticado y/o habilidades técnicas. Los procedimientos para la separación pueden incluir, pero sin limitación, separación magnética usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo, cromatografía de afinidad e "inmunopurificación" con anticuerpo enlazado con una matriz sólida. Las técnicas que proporcionan una separación precisa incluyen, entre otros, la FACS. Los procedimientos para llevar a cabo FACS serán evidentes para los expertos en la materia.

Los anticuerpos contra cada uno de los marcadores descritos en el presente documento están disponibles en el mercado (por ejemplo, los anticuerpos monoclonales contra STRO-1 se pueden conseguir en R&D Systems, EE.UU.), se pueden conseguir en ATCC u otra organización depositaria y/o se pueden producir usando técnicas reconocidas en la materia.

Por ejemplo, el procedimiento para aislar células STRO-1<sup>+</sup> comprende una primera etapa de clasificación en fase sólida usando, por ejemplo, clasificación celular activada magnéticamente (MACS, por sus siglas en inglés) que reconoce expresión de alto nivel de STRO-1. Entonces, es posible seguir con una segunda etapa de clasificación, en

caso de así desearlo, que resulte en un nivel más alto de una expresión de célula precursora, tal como se describe en la memoria descriptiva de la patente WO 01/14268. Esta segunda etapa de clasificación podría comprender el uso de dos o más marcadores.

5 El procedimiento para obtener células STRO-1<sup>+</sup> también podría incluir la recolección de una fuente de las células antes de la primera etapa de enriquecimiento usando técnicas conocidas. Por ende, el tejido se retirará quirúrgicamente. Entonces, se separarán las células que comprenden el tejido fuente en lo que se denomina suspensión celular simple. Esta separación puede conseguirse por medios físicos y/o enzimáticos.

10 Una vez obtenida una población de células STRO-1<sup>+</sup> adecuada, se puede cultivar o expandir a través de cualquier medio adecuado para obtener MEMP.

En un ejemplo, las células se toman del sujeto que recibirá tratamiento, se cultivan *in vitro* usando técnicas estándar y usadas para obtener factores sobrenadantes o solubles o células expandidas para la administración al sujeto como  
 15 una composición autóloga o alogénica. En un ejemplo alternativo, se usan las células de una o más de las líneas celulares humanas establecidas para obtener el sobrenadante o factores solubles. En otro ejemplo útil de la descripción, se usan células de un animal no humano (o, si el paciente no es un humano, de otra especie) para obtener factores sobrenadantes o solubles.

20 La descripción se pueden llevar a la práctica usando células de cualquier especie animal no humana, incluyendo, pero sin limitarse a, células de primate no humano, células de ungulados, caninas, felinas, de lagomorfos, de roedores, aves y de peces. Las células de primates con las cuales se puede llevar a la práctica la descripción incluyen, pero no se limitan a, células de chimpancés, babuinos, monos *Cynomolgus*, y de cualquier otro mono del nuevo o viejo mundo. Las células de ungulados con las que puede llevarse a cabo la descripción incluyen, entre otras, las células  
 25 de bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, equinos, búfalos y bisontes. Las células de roedores con las que puede llevarse a cabo la descripción incluyen, entre otras, las de ratones, ratas, conejillos de Indias, hámsteres y jerbos. Los ejemplos de especies de lagomorfos con los que puede llevarse a cabo la descripción incluyen conejos domesticados, salvajes, liebres, conejos de cola blanca, liebres americanas y picas. Los pollos (*Gallus gallus*) son un ejemplo de una especie aviar con la cual se puede llevar a la práctica la descripción.

30 Las células útiles para los procedimientos de la descripción se pueden almacenar antes de su uso o antes de obtener el sobrenadante o los factores solubles. Los procedimientos y protocolos para preservar y almacenar células eucariotas, y en particular células de mamíferos, son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Pollard, J. W. y Walker, J. M. (1997) *Basic Cell Culture Protocols*, segunda edición, Humana Press, Totowa, N.J.; Freshney, R.I. (2000)  
 35 *Culture of Animal Cells*, cuarta edición, Wiley-Liss, Hoboken, N.J.). Cualquier procedimiento que mantiene la actividad biológica de las células madre aisladas tales como células madre/progenitoras mesenquimales, o su progenie, se puede usar en relación con la presente descripción. En un ejemplo, las células se mantienen y almacenan usando criopreservación.

#### 40 Células genéticamente modificadas

En un ejemplo, las células STRO-1<sup>+</sup> y/o las células de su progenie son modificadas genéticamente, por ejemplo, para expresar y/o secretar una proteína de interés, por ejemplo, una proteína que proporciona un beneficio terapéutico y/o  
 45 y/o diferenciación de neuronas y/o la producción de mielina. Los antagonistas de linfocitos T de ejemplo incluyen, por ejemplo, los péptidos descritos en Toda y col., *Eur. J. Immunol.*, 30: 403-414, 2000.

En otro ejemplo, las células STRO-1<sup>+</sup> y/o las células de su progenie son modificadas genéticamente para expresar una proteína que trata una afección neurológica inflamatoria, por ejemplo, interferón beta.

50

Los procedimientos para modificar genéticamente una célula serán evidentes para los expertos en la materia. Por ejemplo, un ácido nucleico que se ha de expresar en una célula está operativamente ligado a un promotor para inducir expresión en la célula. Por ejemplo, el ácido nucleico se une a un promotor operativo en una serie de células de un  
 55 sujeto, tal como, por ejemplo, un promotor vírico, por ejemplo, un promotor de CMV (por ejemplo, un promotor de CMV-IE) o un promotor SV-40. En la técnica se conocen otros promotores adecuados y se entenderá que se aplican *mutatis mutandis* al presente ejemplo de la descripción.

Por ejemplo, el ácido nucleico se proporciona en forma de una construcción de expresión. Tal como se usa en la

presente memoria descriptiva, el término "construcción de expresión" se refiere a un ácido nucleico que tiene la capacidad de otorgar expresión en un ácido nucleico (por ejemplo, un gen indicador y/o un gen indicador contra-seleccionable) al cual está operativamente conectado, en una célula. Dentro del contexto de la presente descripción, se ha de entender que una construcción de expresión puede comprender o ser un plásmido, bacteriófago, fagémido, cósmido, fragmento subgenómico o genómico de virus, u otro ácido nucleico capaz de mantener y/o replicar ADN heterólogo en un formato expresable.

Los procedimientos para la construcción de una construcción de expresión adecuado para el funcionamiento de la descripción serán evidentes para el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en Ausubel y col., (En: Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987) o Sambrook y col., (En: Molecular Cloning: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, tercera edición 2001). Por ejemplo, cada uno de los componentes de la construcción de expresión se amplifica a partir de un ácido nucleico de plantilla adecuado usando, por ejemplo, PCR y posteriormente se clona en una construcción de expresión adecuada, tal como, por ejemplo, un plásmido o un fagémido.

Los vectores adecuados para dicha construcción de expresión son conocidos en la técnica y/o se describen en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, un vector de expresión adecuado para el procedimiento de la presente descripción en una célula de mamífero es, por ejemplo, un vector del conjunto de vectores pcADN suministrado por Invitrogen, un vector del conjunto de vectores pCI (Promega), un vector del conjunto de vectores pCMV (Clontech), un vector pM (Clontech), un vector pSI (Promega), un vector VP 16 (Clontech) o un vector del conjunto de vectores pcADN (Invitrogen).

El experto en la materia conocerá vectores y fuentes de dichos vectores adicionales, tales como, por ejemplo, Life Technologies Corporation, Clontech o Promega.

Los medios para introducir la molécula de ácido nucleico aislada o una construcción génica que comprenda la misma en una célula para la expresión son conocidos por los expertos en la materia. La técnica usada para un organismo dado dependerá de las técnicas exitosas conocidas. Los medios para introducir ADN recombinante en células incluyen microinyección, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas usando, por ejemplo, lipofectamina (Gibco, MD, EE.UU.) y/o celfectina (Gibco, MD, EE.UU.), captación de ADN mediada por PEG, electroporación y bombardeo de micropartículas usando, por ejemplo, tungsteno recubierto por ADN o partículas de oro (Agracetus Inc., WI, EE.UU.) entre otros.

Como alternativa, una construcción de expresión de la descripción es un vector vírico. Los vectores víricos adecuados son conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado. Los sistemas convencionales basados en víricos para el suministro de un ácido nucleico e integración del mismo en un genoma de células huésped incluyen, por ejemplo, un vector retrovírico, un vector lentivírico o un vector vírico adenoasociado. De manera alternativa, un vector adenovírico se usa para la introducción de un ácido nucleico que permanece episomal hacia dentro de una célula huésped. Los vectores víricos constituyen un procedimiento eficiente y versátil para la transferencia de genes en las células y tejidos diana. De manera adicional, se han observado las eficiencias de alta transducción en muchos tipos celulares y tejidos diana diferentes.

Por ejemplo, un vector retrovírico por lo general comprende repeticiones terminales largas (LTR, por sus siglas en inglés) que actúan en cis con capacidad de empaquetado para como máximo 6-10 kb de secuencia extraña. Las LTR que actúan en cis mínimas son suficientes para replicar y empaquetar un vector, que a continuación se usa para integrar la construcción de expresión en la célula diana para proporcionar expresión a largo plazo. Los vectores retrovíricos ampliamente usados incluyen aquellos basados en el virus de la leucemia murina (VLM), el virus de la leucemia de monos gibones (VLMG), el virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, Buchscher y col., J. Virol. 56:2731-2739 (1992); Johann y col., J. Virol. 65:1635-1640 (1992); Sommerfelt y col., Virol. 76:58-59 (1990); Wilson y col., J. Virol. 63:274-2318 (1989); Miller y col., J. Virol. 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700; Miller y Rosman BioTechniques 7:980-990, 1989; Miller, A. D. Human Gene Therapy 7:5-14, 1990; Scarpa y col., Virology 75:849-852, 1991; Burns y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:8033-8037, 1993).

También se han desarrollado diversos sistemas de vectores de virus adenoasociados (AAV, por sus siglas en inglés) para administración de ácido nucleico. Los vectores AAV se pueden construir fácilmente usando técnicas conocidas en la materia. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses número 5.173.414 y 5.139.941; las publicaciones internacionales número WO 92/01070 y WO 93/03769; Lebkowski y col., Molec. Cell. Biol. 5:3988-3996, 1988; Vincent y col., (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter Current Opinion in Biotechnology 5:533-539,

1992; Muzyczka. *Current Topics in Microbiol, and Immunol.* 158:97-129, 1992; Kotin, *Human Gene Therapy* 5:793-801, 1994; Shelling and Smith *Gene Therapy* 7:165-169, 1994; y Zhou y col., *J Exp. Med.* 179:1867-1875, 1994.

Los vectores víricos adicionales útiles para administrar una construcción de expresión de la descripción incluyen, por ejemplo, los derivados de la familia de los poxvirus, tal como virus vacuna y poxvirus aviar o un alfavirus o un vector de virus conjugado (por ejemplo, el descrito en Fisher-Hoch y col., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 56:317-321, 1989).

Análisis del potencial terapéutico/profiláctico de células y factores solubles

10 Los procedimientos de determinación de la capacidad de las células o los factores solubles para tratar o prevenir o retrasar el inicio o la progresión de una afección neurológica inflamatoria serán evidentes para el experto en la materia.

Por ejemplo, las células o factores solubles (por ejemplo, una mezcla de factores o un único factor o una fracción de factores (por ejemplo, obtenida por purificación de afinidad o cromatografía)) se criban para identificar agentes terapéuticos en modelos *in vitro* de componentes de patología de enfermedad neurológica inflamatoria (por ejemplo, EM). Los modelos de ejemplo incluyen los que hacen uso de poblaciones de linfocitos T aislados o linfocitos mixtos de modelos de ratones transgénicos de EM que comprenden un receptor de linfocitos T transgénicos que reacciona con un componente de la vaina, por ejemplo, proteína básica de mielina, glucoproteína de oligodendrocitos de mielina o proteína de proteolípidos de mielina. Las células se ponen en contacto con la proteína de mielina en presencia y ausencia de células y/o factores solubles y se valora el nivel de respuesta inflamatoria, por ejemplo, detectando la secreción de citocinas proinflamatorias, tales como interleucina (IL)-2 o interferón  $\gamma$ . Alternativamente, o de forma adicional, se valora la respuesta proliferativa de las células, por ejemplo, usando incorporación de (<sup>3</sup>H)timidina. Las células y/o factores solubles que reducen una respuesta inflamatoria se seleccionan como terapéuticos. Se describen ensayos de ejemplo en Illés y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 11749-11754, 2004 o Rossi y col., *J. Biomolecular Screening*, 12: 481-489, 2007.

Las células y/o factores solubles se someten a ensayo también en modelos *in vivo* de enfermedad neurológica inflamatoria. Los modelos de ejemplo incluyen modelos EAE en los que un ratón o una rata son inmunizados con una proteína o péptido de vaina de mielina obtenidos de los mismos (por ejemplo, MOG, MBP o PLP) y se genera una respuesta inmunitaria contra la proteína induciendo con ello un modelo de EM. Alternativamente, se introducen linfocitos T que son inmunorreactivos con una proteína de vaina de mielina en ratones o ratas para inducir EAE. Se revisan modelos EAE de ejemplo, por ejemplo en Tsunoda y Fujinami, *J Neuropathol Exp Neurol.* 55:673-686, 1996.

Otros modelos de EM incluyen animales transgénicos que expresan receptores de linfocitos T específicos para una proteína de mielina, por ejemplo, MOG, MBP o PLP. Se describen modelos de ejemplo, por ejemplo, en Bettelli y col., *JEM* 197:1073-1081, 2003; Illés y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 11749-11754, 2004; o Rossi y col., *J. Biomolecular Screening*, 12: 481-489, 2007; o están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Jackson Laboratories USA (por ejemplo, ratones 2D2 que tienen receptores de linfocitos T transgénicos reactivos con MOG).

40 Los modelos de ejemplo de LES que desarrollan síntomas neurológicos inflamatorios incluyen modelos de síndrome antifosfolípido (por ejemplo, tal como se describe en Ziporen y col., *J. Clin. Invest.*, 100: :613-613, 1997) o modelos revisados en Brey y col., *Annals NY Acad Sci.*, 823: 97-106, 1996.

Los modelos del síndrome de Guillain-Barré incluyen los causados por sensibilización de animales, por ejemplo, conejos con gangliósido GM1 (por ejemplo, tal como se describe en Yuki y col., *Ann Neurol.* 49: 712-720, 2001).

Para los expertos en la materia será evidente a partir de lo anterior que la presente descripción también proporciona un procedimiento para identificar y aislar una célula o un factor soluble para el tratamiento, prevención o retraso de una afección neurológica inflamatoria, comprendiendo dicho procedimiento:

- 50 (i) la administración de una célula o un factor soluble a un sujeto de prueba que padece una afección neurológica inflamatoria y la evaluación de la respuesta inflamatoria o la función/disfunción neurológica del sujeto;
- (ii) la comparación de la respuesta inflamatoria o función/disfunción neurológica del sujeto de (i) a la respuesta inflamatoria o la función/disfunción neurológica de un sujeto de control que padece la afección neurológica inflamatoria
- 55 al que no se ha administrado la célula o factor soluble, donde la respuesta inflamatoria o la función/disfunción neurológica mejorada en el sujeto de prueba en comparación con el sujeto de control indica que la célula o factor soluble trata la afección neurológica inflamatoria.

La célula puede ser cualquier célula descrita en la presente memoria descriptiva según cualquier ejemplo.

Composiciones celulares

En un ejemplo de la presente descripción se administran células STRO-1<sup>+</sup> y/o células de su progenie en forma de una composición. Por ejemplo, dicha composición comprende un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los términos “vehículo” y “excipiente” se refieren a composiciones de materia que son convencionalmente usadas en la técnica para facilitar el almacenamiento, administración y/o la actividad biológica de un compuesto activo (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>a</sup> ed., Mac Publishing Company (1980)). Un vehículo también puede reducir cualquier efecto secundario no deseado del compuesto activo. Un vehículo adecuado es, por ejemplo, estable, por ejemplo, incapaz de reaccionar con otros ingredientes en el vehículo. En un ejemplo, el vehículo no produce efectos adversos locales o sistémicos significativos en receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas para tratamiento.

Los vehículos adecuados para la presente descripción incluyen los usados convencionalmente, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, lactosa, disolución de Ringer, una disolución tamponada, hialurano y glicoles, que son vehículos líquidos de ejemplo, en particular (cuando son isotónicos) para disoluciones. Los vehículos y excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, celulosa, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares.

En otro ejemplo, un vehículo es una composición de medio, por ejemplo, en la cual una célula se cultiva o se pone en suspensión. Por ejemplo, dicha composición de medio no induce ningún efecto adverso en un sujeto a quien se le administra.

Los vehículos y excipientes de ejemplo no afectan de manera adversa a la viabilidad de una célula y/o la capacidad de una célula para reducir, prevenir o retrasar una afección neurológica inflamatoria.

En un ejemplo, el vehículo o excipiente proporciona una actividad de tampón para mantener las células y/o los factores solubles con un pH adecuado para, de este modo, llevar a cabo una actividad biológica, por ejemplo, el vehículo o excipiente es tampón fosfato salino (PBS). El PBS representa un vehículo o excipiente atractivo dado que interacciona mínimamente con células y factores y permite la liberación rápida de las células y factores, en cuyo caso, la composición de la descripción se puede producir como un líquido para aplicación directa en el flujo sanguíneo o en un tejido o una región que rodea o es adyacente a un tejido, por ejemplo, mediante inyección.

Las células STRO-1<sup>+</sup> y/o células de su progenie también se pueden incorporar o incrustar en armazones que sean compatibles con el receptor y que se degraden en productos que no sean dañinos para el receptor. Estos armazones proporcionan soporte y protección para las células que se han de trasplantar en los sujetos receptores. Los armazones biodegradables naturales y/o sintéticos son ejemplos de dichos armazones.

En la práctica de la descripción se puede usar con éxito una variedad de distintos armazones. Los armazones de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, armazones biológicos, degradables. Los armazones biodegradables naturales incluyen colágeno, fibronectina y armazones de laminina. Un material sintético adecuado para un armazón de trasplante celular debería ser capaz de soportar crecimiento celular y función celular importantes. Dichos armazones también pueden ser reabsorbibles. Entre los armazones adecuados se incluyen armazones de ácido poliglicólico, por ejemplo, como describen Vacanti y col., J. Ped. Surg. 23:3-9 1988; Cima, y col., Biotechnol. Bioeng. 38:145 1991; Vacanti, y col., Plast. Reconstr. Surg. 88:753-9 1991; o polímeros sintéticos tales como polianhídridos, poliortoésteres y ácido poliláctico.

En otro ejemplo, las células se pueden administrar en un armazón de gel (tal como Gelfoam de Upjohn Company).

Las composiciones celulares útiles para los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva pueden administrarse solas o como mezclas con otras células. Las células que pueden administrarse junto con las composiciones de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, otras células multipotentes o pluripotentes o células madre o células de médula ósea. Pueden mezclarse células de diferentes tipos con una composición de la descripción inmediatamente o poco antes de la administración, o pueden cocultivarse conjuntamente durante un periodo de tiempo antes de la administración.

En un ejemplo, la composición comprende una cantidad efectiva o una cantidad terapéuticamente o profilácticamente

efectiva de células. Por ejemplo, la composición comprende de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células STRO-1<sup>+</sup>/kg a aproximadamente  $1 \times 10^7$  células STRO-1<sup>+</sup>/kg o de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células STRO-1<sup>+</sup>/kg a aproximadamente  $5 \times 10^6$  células STRO-1<sup>+</sup>/kg. La cantidad exacta de células a administrar depende de una variedad de factores, que incluyen la edad, el peso y el sexo del paciente, y el alcance y la gravedad de la afección neurológica inflamatoria.

5

En algunos ejemplos, las células están contenidas dentro de una cámara que no permite que las células salgan a la circulación del sujeto, aunque permite que los factores secretados por las células entren en la circulación. De esta manera, los factores solubles se pueden administrar a un sujeto permitiendo que las células secreten los factores en la circulación del sujeto. Dicha cámara se puede implantar de igual manera en un sitio de un sujeto para aumentar los niveles locales de los factores solubles.

10

En algunos ejemplos de la descripción, puede no ser necesario o deseable inmunosuprimir con composiciones celulares a un paciente antes del inicio de la terapia. Por consiguiente, el trasplante con células STRO-1<sup>+</sup> alogénicas, o incluso xenogénicas, o su progenie puede tolerarse en algunos casos.

15

Sin embargo, en otros casos, puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir farmacológicamente a un paciente antes de iniciar una terapia celular y/o reducir una respuesta inmunitaria de un sujeto contra la composición celular. Esto puede lograrse mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o puede lograrse suministrando las células en un dispositivo encapsulado. Las células pueden encapsularse en una cápsula que sea permeable a los nutrientes y oxígeno requeridos por la célula y a factores terapéuticos, pero la célula es impermeable a factores humorales inmunitarios y células. En un ejemplo, el encapsulante es hipoalergénico, se sitúa de manera sencilla y estable en un tejido diana y proporciona una protección añadida a la estructura implantada. Estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmunitaria a las células trasplantadas son conocidos en la técnica. Como alternativa, es posible modificar genéticamente las células para reducir su inmunogenicidad.

20

#### Composiciones de factores solubles

En un ejemplo de la presente descripción, los sobrenadantes o factores solubles derivados de células STRO-1<sup>+</sup> y/o derivados de células de progenie se administran en forma de una composición, por ejemplo, que comprende un vehículo y/o excipiente adecuado. Por ejemplo, el vehículo o excipiente no afecta negativamente al efecto biológico de los factores solubles o el sobrenadante.

30

En un ejemplo, la composición comprende una composición de materia para estabilizar un factor soluble o un componente de sobrenadante, por ejemplo, un inhibidor de proteasa. En un ejemplo, el inhibidor de proteasa no está incluido en una cantidad suficiente para tener un efecto adverso en un sujeto.

35

Las composiciones que comprenden sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1<sup>+</sup> y/o derivados de células de su progenie se pueden preparar como suspensiones líquidas apropiadas, por ejemplo, en medio de cultivo o en un vehículo estable o una disolución tamponada, por ejemplo, suero salino con tampón de fosfato. Los vehículos adecuados se describen anteriormente en la presente memoria descriptiva. En otro ejemplo, suspensiones que comprenden sobrenadantes o factores solubles derivados de células STRO-1<sup>+</sup> y/o derivados de células de su progenie son suspensiones oleosas para inyección. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo; o ésteres de ácido graso sintético tales como oleato de etilo o triglicéridos; o liposomas. Las suspensiones que se usan para inyección pueden contener también sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

40

45

Las disoluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el sobrenadante o factores solubles en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración.

50

Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el sobrenadante o factores solubles a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación de ejemplo son secado a vacío y liofilización, que procuran un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una disolución previamente esterilizada por filtración. Según un aspecto alternativo de la descripción, el sobrenadante o factores solubles pueden formularse con uno o más compuestos adicionales que potencien su solubilidad.

55

Otros vehículos o excipientes de ejemplo se describen, por ejemplo, en Hardman y col., (2001) Goodman and Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, N. Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams y Wilkins, Nueva York, N. Y.; Avis y col., (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman y col., (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman y col., (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y.

Las composiciones terapéuticas deberían ser típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de disolución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Además, los factores solubles pueden administrarse en una formulación de liberación retardada, por ejemplo en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán al compuesto frente a una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros poliláctico-poliglicólico (PLG). Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la materia.

El sobrenadante o factores solubles se pueden administrar en combinación con una matriz apropiada, por ejemplo, para proporcionar liberación lenta de los factores solubles.

#### Componentes adicionales de las composiciones

El sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1<sup>+</sup>, las células STRO-1<sup>+</sup> o su progenie se pueden administrar con otros fármacos o moléculas biológicas beneficiosos (factores de crecimiento, factores tróficos). Cuando se administran con otros agentes, pueden administrarse conjuntamente en una sola composición farmacéutica, o en composiciones farmacéuticas separadas, simultánea o secuencialmente con los otros agentes (antes o después de la administración de los otros agentes). Los factores bioactivos que pueden coadministrarse incluyen agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, mimeticuerpos de EPO, TPO, IGF-I y IGF-II, HGF, inhibidores de caspasa); agentes antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMÚS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos; por ejemplo, TEPOXALINA, TOLMETINA, SUPROFENO); agentes inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de calcineurina tales como ciclosporina, tacrolimús; inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMÚS, EVEROLIMÚS); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato de mofetilo); corticoesteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales anti-receptor IL-2Ralfa (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti-linfocitos T (por ejemplo, anti-globulina de timocito (ATG); anti-globulina de linfocito (ALG); anticuerpo monoclonal anti-linfocitos T OKT3)); agentes antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, urocinasa, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos antitrombina, antagonistas de receptor de plaquetas, anticuerpos anti-trombina, anticuerpos anti-receptor de plaquetas, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandina e inhibidores de plaquetas); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína) así como anestésicos locales.

En un ejemplo, una composición tal como se describe en la presente memoria descriptiva según cualquier ejemplo comprende un factor adicional para el tratamiento o profilaxis de una afección neurológica inflamatoria.

Alternativamente, o de forma adicional, las células, los factores secretados y/o una composición tal como se describe en la presente memoria descriptiva según cualquier ejemplo se combina con un tratamiento conocido de una afección neurológica inflamatoria.

En un ejemplo, una composición farmacéutica tal como se describe en la presente memoria descriptiva según cualquier ejemplo comprende un compuesto usado para tratar una afección neurológica inflamatoria o un síntoma de la misma.

Alternativamente, un procedimiento de tratamiento/ profilaxis tal como se describe en la presente memoria descriptiva según cualquier ejemplo de la descripción comprende adicionalmente la administración de un compuesto usado para tratar una afección neurológica inflamatoria o un síntoma de la misma. Los compuestos de ejemplo incluyen un agente citotóxico, agente quimioterapéutico, agente inmunosupresor, citocina, antagonista o anticuerpo de citocina, factor de crecimiento, hormona, integrina, antagonista o anticuerpo de integrina (por ejemplo, un anticuerpo anti-LFA-1 tal como efalizumab (RAPTIVA®) disponible comercialmente en Genentech, o un anticuerpo anti-integrina alfa-4 tal como natalizumab (TYSABRI®) disponible en Biogen Idec/Elan Pharmaceuticals, Inc.), etc., o un anticuerpo que se une a un marcador de superficie de linfocitos B (por ejemplo, anticuerpo anti-CD20 tal como rituximab (Rituxan® o Mabthera® u ocrelizumab (los dos disponibles en Genentech) u ofatumumab (Arzerra®) disponible en Genmab/Glaxo Group)).

En algunos ejemplos de terapia de combinación, las células, factores y/o composición se combinan con un fármaco de la clase de los interferones tal como IFN-beta-1a (REBIF® y AVONEX®) o IFN-beta-1b (BETASERON®); un oligopéptido tal como un acetato de glatirámico (COPAXONE®); un agente citotóxico tal como mitoxantrona (NOVANTRONE®), metotrexato, ciclofosfamida, clorambucilo, azatioprina; inmunoglobulina intravenosa (gammaglobulina); terapia de depleción de linfocitos (por ejemplo, mitoxantrona, ciclofosfamida, Campath, anticuerpo anti-CD4, cladribina, irradiación corporal total, trasplante de médula ósea); corticoesteroide (por ejemplo, metilprednisolona, prednisona, dexametasona o glucocorticoide), que incluye terapia con corticoesteroides sistémicos; terapia inmunosupresora sin depleción de linfocitos (por ejemplo, micofenolato de mofetilo (MMF) o ciclosporina); fármaco reductor del colesterol de la clase de las "estatinas", que incluye cerivastatina (BAYCOL®), fluvastatina (LESCOL®), atorvastatina (LIPITOR®), lovastatina (MEVACOR®), pravastatina (PRAVACHOL®), simvastatina (ZOCOR®); estradiol; testosterona (opcionalmente en dosis elevadas; Stuve y col. Neurology 8:290-301, 2002); terapia de sustitución hormonal; tratamiento para síntomas secundarios o relacionados con EM (por ejemplo, espasticidad, incontinencia, dolor, fatiga); fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD, por sus siglas en inglés); antiinflamatorios no esteroideos (AINE); plasmaféresis; levotiroxina; ciclosporina A; análogo de la somatostatina; citocina o antagonista del receptor de las citocinas; antimetabolito; agente inmunosupresor; cirugía rehabilitadora; yodo radiactivo; o una tiroidectomía.

En otro ejemplo, una composición tal como se describe en la presente memoria descriptiva según cualquier ejemplo comprende adicionalmente un factor que induce o potencia la diferenciación de una célula progenitora en una célula vascular. Los factores de ejemplo incluyen factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés; por ejemplo, PDGF-BB) y FGF.

En otro ejemplo, una composición tal como se describe en la presente memoria descriptiva según cualquier ejemplo comprende adicionalmente una célula comprometida específica de tejido (TSCC, por sus siglas en inglés). A este respecto, la solicitud internacional de patente n.º PCT/AU2005/001445 demuestra que la administración de una TSCC y una célula STRO-1<sup>+</sup> puede producir la proliferación potenciada de la TSCC. En un ejemplo, la TSCC es una célula neuronal, por ejemplo, una neurona, una célula progenitora neuronal o una célula de Schwann. La administración de dicha composición a un sujeto puede conducir a un aumento en la producción, por ejemplo, de neuronas o mielina. En otro ejemplo, la TSCC es una célula vascular. La administración de dicha composición a un sujeto puede dar pie a una mayor producción de vasculatura, por ejemplo, dando pie a un mayor aporte de nutrientes al tejido afectado.

#### Dispositivos médicos

La presente descripción también proporciona dispositivos médicos para uso o cuando se usan en un procedimiento tal como se describe en la presente memoria descriptiva según cualquier ejemplo. Por ejemplo, la presente descripción proporciona una jeringa o catéter u otro dispositivo de administración adecuado que comprende células STRO-1<sup>+</sup> y/o células de su progenie y/o factores solubles de las mismas y/o una composición tal como se describe en la presente memoria descriptiva según cualquier ejemplo. Opcionalmente, la jeringa o catéter se empaqueta con instrucciones para su uso en un procedimiento tal como se describe en la presente memoria descriptiva según cualquier ejemplo.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un implante que comprende células STRO-1<sup>+</sup> y/o células de su progenie y/o factores solubles de las mismas y/o una composición tal como se describe en la presente memoria descriptiva según cualquier ejemplo. De manera opcional, el implante está empaquetado con instrucciones para uso en un procedimiento tal como se describe en la presente memoria descriptiva según cualquier ejemplo. Los implantes adecuados se pueden formar con un armazón, por ejemplo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva y células STRO-1<sup>+</sup> y/o células de su progenie y/o factores solubles obtenidos de las mismas.

#### Modos de administración

El sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1<sup>+</sup>, células STRO-1<sup>+</sup> o su progenie pueden implantarse quirúrgicamente, inyectarse, administrarse (por ejemplo, mediante un catéter o jeringa), o administrarse de otro modo directa o indirectamente al sitio que necesita reparación o aumento.

5

En un ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1<sup>+</sup>, células STRO-1<sup>+</sup> o su progenie se suministran al torrente sanguíneo de un sujeto. Por ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1<sup>+</sup>, células STRO-1<sup>+</sup> o su progenie se suministran por vía parenteral. Entre las vías de administración parenteral de ejemplo se incluyen, pero no se limitan a, las vías intraperitoneal, intraventricular, intracerebroventricular o intratecal. En un ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1<sup>+</sup>, células STRO-1<sup>+</sup> o su progenie se administran por vía intraarterial, en una aorta, en una aurícula o ventrículo del corazón o en un vaso sanguíneo.

En el caso de administración de células en una aurícula o ventrículo del corazón, las células pueden administrarse en la aurícula o ventrículo izquierdos para evitar complicaciones que puedan surgir de la rápida administración de células a los pulmones.

En un ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1<sup>+</sup>, las células STRO-1<sup>+</sup> o su progenie se inyectan en el sitio de administración, por ejemplo, usando una jeringa o por medio de un catéter o una vía central.

20

La elección de un régimen de administración para una formulación terapéutica depende de distintos factores, que incluyen la velocidad de reposición sérica o tisular de la entidad clínica, el nivel de los síntomas y la inmunogenicidad de la entidad clínica. Por ejemplo, un régimen de administración maximiza la cantidad de compuesto terapéutico suministrado al paciente según un nivel aceptable de efectos secundarios. En consecuencia, la cantidad de formulación suministrada depende en parte de la entidad en concreto y de la gravedad de la afección que se está tratando.

En un ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1<sup>+</sup>, las células STRO-1<sup>+</sup> o su progenie se administran en una dosis de bolo única. Como alternativa, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1<sup>+</sup>, las células STRO-1<sup>+</sup> o su progenie se administran mediante infusión continua, o mediante dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, una semana, o 1-7 veces por semana. Un protocolo de dosis de ejemplo es el que incluye la dosis máxima o frecuencia de dosis que evita efectos secundarios no deseados significativos. Una dosis semanal total depende del tipo y actividad del compuesto que se está usando. La dosis apropiada es determinada por un médico clínico, por ejemplo, usando los parámetros o factores que se sabe o se supone según la técnica que afectan al tratamiento o que se predice afectan dicho tratamiento. Generalmente, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y a continuación se incrementa en pequeños incrementos hasta que se logra el efecto deseado u óptimo en relación con cualquier efecto secundario negativo.

Según ejemplos de la descripción dirigida a tratar o retrasar la progresión de una afección neurológica inflamatoria, las células STRO-1<sup>+</sup> y/o las células de su progenie y/o los factores solubles derivados de las mismas pueden administrarse después del diagnóstico del trastorno, por ejemplo, usando procedimientos estándar conocidos en la técnica y/o descritos en la presente memoria descriptiva.

Para aquellos ejemplos dirigidos a prevenir o retrasar la aparición de afecciones neurológicas inflamatorias, las células STRO-1<sup>+</sup> y/o células de su progenie y/o factores solubles derivados de las mismas pueden administrarse antes del diagnóstico clínico del trastorno, por ejemplo, cuando el sujeto ha sufrido una lesión en la mielina y sin embargo todavía debe diagnosticársele la EM y/o ha producido anticuerpos antifosfolípidos.

La presente descripción se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitativos.

50

## **EJEMPLOS**

### Ejemplo 1: Inmunoselección de CPM por selección de células STRO-3<sup>+</sup>

Se recolecta médula ósea (MO) de voluntarios adultos sanos normales (20-35 años de edad). Brevemente, se aspiran 40 ml de MO de la cresta ilíaca posterior en tubos que contienen anticoagulante de litio-heparina.

Se preparan BMMNC mediante separación por gradiente de densidad usando Lymphoprep™ (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) tal como se describió anteriormente (Zannettino, A.C. y col., (1998) Blood 92: 2613-2628). Después

de centrifugación a 400 x g durante 30 minutos a 4°C, se retira la capa leucocítica con una pipeta de transferencia y se lava tres veces con "HHF", compuesto por solución salina equilibrada de Hank (HBSS; Life Technologies, Gaithersburg, MD), que contiene suero fetal de ternera al 5% (FCS, CSL Limited, Victoria, Australia).

5 Posteriormente, se aislaron células STRO-3<sup>+</sup> (o TNAP<sup>+</sup>) por clasificación celular activada magnéticamente tal como se describió anteriormente (Gronthos y col., (2003) Journal of Cell Science 116: 1827-1835; Gronthos, S. y Simmons, P.J. (1995) Blood 85: 929-940). Brevemente, se incuban aproximadamente 1-3 x 10<sup>8</sup> BMMNC en tampón de bloqueo, consistente en suero de conejo normal al 10% (v/v) en HHF durante 20 minutos en hielo. Se incuban las células con 10 200 µl de una solución 10 µg/ml de AcM STRO-3 en tampón de bloqueo durante 1 hora en hielo. Posteriormente, las 10 células se lavan dos veces con HHF por centrifugación a 400 x g. Se añade una dilución de 1/50 de γ-biotina antimurina de cabra (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, RU) en tampón HHF y se incuban las células durante 1 hora sobre hielo. Se lavan las células dos veces con tampón de MACS (PBS exento de Ca<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> suplementado con BSA al 1%, EDTA 5 mM y azida de sodio al 0,01%) como se indicó anteriormente y se vuelven a colocar en suspensión en un volumen final de 0,9 ml de tampón de MACS.

15 Se añaden 100 µl de microperlas de estreptavidina (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Alemania) a la suspensión celular y se incuban en hielo durante 15 minutos. La suspensión celular se lava dos veces y se vuelve a colocar en suspensión en 0,5 ml de tampón de MACS y, a continuación, se carga en una mini-columna de MACS (MS Columns, Miltenyi Biotec), y se lava tres veces con 0,5 ml de tampón de MACS para recuperar las células que no se unieron al 20 AcM STRO-3 (depositadas el 19 de diciembre de 2005 en la American Type Culture Collection (ATCC) con número de acceso al depósito PTA-7282 - véase la publicación internacional n.º WO 2006/108229). Después de la adición de 1 ml adicional de tampón de MACS, se retira la columna del imán y se aíslan las células TNAP<sup>+</sup> por presión positiva. Puede teñirse una parte alícuota de células de cada fracción con estreptavidina-FITC y valorarse la pureza por citometría de flujo.

25 Ejemplo 2: Las células seleccionadas mediante AcM STRO-3 son células STRO-1<sup>brillante</sup>.

Se diseñaron experimentos para confirmar el potencial de uso del AcM STRO-3 como reactivo único para el aislamiento de células STRO-1<sup>brillante</sup>.

30 Dado que el de STRO-3 (IgG1) es un isotipo diferente al de STRO-1 (IgM), se valoró la capacidad de STRO-3 de identificar CFU-F clonogénicas mediante análisis FACS de dos colores basado en su coexpresión con células STRO-1<sup>+</sup> aisladas usando el procedimiento de MACS (Figura 1). El histograma de gráfico de puntos representa 5 x 10<sup>4</sup> eventos recogidos como datos en modo de lista. Se establecieron las líneas vertical y horizontal a niveles de reactividad de <1,0% de fluorescencia media obtenidos con los anticuerpos de control de isotipo coincidente, 1B5 35 (IgG) y 1A6.12 (IgM) tratados en las mismas condiciones. Los resultados demuestran que una población menor de células STRO-1<sup>brillante</sup> coexpresó TNAP (cuadrante superior derecho) mientras que las células STRO-1<sup>+</sup> restantes no reaccionaron con el AcM de STRO-3. Posteriormente, las células aisladas mediante FACS de los cuatro cuadrantes se analizaron para determinar la incidencia de CFU-F (Tabla 1).

40 **Tabla 1:** Enriquecimiento de células de médula ósea humana por análisis FACS de color doble basado en la coexpresión de los marcadores de superficie celular STRO-1 y TNAP (véase la Figura 1). Se cultivaron células clasificadas por FACS en condiciones clonogénicas estándar en alfa-MEM suplementado con FCS al 20%. Los datos representan el número medio de células formadoras de colonias (CFU-F) el día 14 por 10<sup>5</sup> células sembradas ± EE 45 (n= 3 aspirados de médula ósea diferentes). Estos datos sugieren que las CPM humanas están exclusivamente restringidas a la fracción positiva de TNAP de MO que coexpresa el antígeno de STRO-1 fuertemente.

Fracción de médula ósea	Frecuencia de CFU-F/10 <sup>5</sup> células	Enriquecimiento (aumento en veces)
BMMNC no fraccionadas	11,0 ± 2,2	1,0
TNAP <sup>+</sup> /STRO-1 <sup>brillante</sup>	4,511 ± 185	410
TNAP <sup>+</sup> /STRO-1 <sup>opaca</sup>	0,0	0,0

Ejemplo 3: Expresión relativa de genes y proteínas de superficie de células STRO-1<sup>opaca</sup> y STRO-1<sup>bri</sup>

50 En la primera serie de experimentos, se empleó análisis RT-PCR semicuantitativo para examinar el perfil de expresión génica de varios genes asociados al linaje expresados por poblaciones STRO-1<sup>opaca</sup> o STRO-1<sup>bri</sup>, aisladas por clasificación celular activada por fluorescencia (Figura 2A). En la segunda serie de experimentos, se empleó citometría

de flujo y análisis de fluorescencia de canal media para examinar el perfil de expresión de proteínas de superficie de diversas proteínas asociadas con el linaje expresadas por las poblaciones de STRO-1<sup>opaca</sup> o STRO-1<sup>bri</sup>, aisladas por clasificación celular activada por fluorescencia.

- 5 Se preparó ARN celular total a partir de  $2 \times 10^6$  células primarias clasificadas de STRO-1<sup>bri</sup> o STRO-1<sup>opaca</sup>, sedimentos de condrocitos y otros cultivos inducidos y se lisaron usando un procedimiento de extracción RNAzolB (Biotecx Lab. Inc., Houston, TX), según las recomendaciones del fabricante. El ARN aislado de cada subpoblación se usó a continuación como plantilla para la síntesis de ADNc, preparado usando un kit de síntesis de ADNc de primera cadena (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Se valoró la expresión de varios transcritos por amplificación PCR, usando un protocolo estándar tal como se describe anteriormente (Gronthos y col., J. Bone y Min. Res. 14:48-57, 1999). Los conjuntos de cebadores usados en este estudio se muestran en la Tabla 2. Después de la amplificación, se analizó cada mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. La integridad de ARN se evaluó por la expresión de GAPDH.
- 10
- 15 La expresión génica relativa para cada marcador celular se evaluó con referencia a la expresión del gen de limpieza, GAPDH, usando software ImageQant (Figura 2B, C). Además, se usó análisis de citometría de flujo de color doble para examinar el perfil de expresión de proteínas de CPM expandido *ex vivo* basándose en su expresión de un intervalo más amplio de marcadores asociados con linaje celular en combinación con el anticuerpo de STRO-1. En la Tabla 3 se presenta un resumen del fenotipo general basado en la expresión génica y de proteínas de células STRO-1<sup>opaca</sup> y
- 20 STRO-1<sup>bri</sup> en cultivo. Los datos indican que las CPM de STRO-1<sup>bri</sup> expandido *ex vivo* muestran una expresión diferencialmente superior de marcadores asociados con células perivasculares, que incluyen angiopoyetina-1, VCAM-1, SDF-1, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , y RANKL. Las comparaciones entre los perfiles de expresión de proteínas y genes de células STRO-1<sup>opaca</sup> y STRO-1<sup>bri</sup> en cultivo se resumen en las Tablas 3 y 4.
- 25 También se realizaron estudios de hibridación sustractiva con el fin de identificar genes expresados de forma única por células STRO-1<sup>bri</sup>. Brevemente, STRO-1<sup>opaca</sup> y STRO-1<sup>bri</sup> se aislaron tal como se describe anteriormente (véase Figura 3A). El ARN total se preparó a partir de células STRO-1<sup>opaca</sup> y STRO-1<sup>bri</sup> en reserva de 5 muestras de médula diferentes usando el sistema ARN STAT-60 (TEL-TEST). La síntesis de primera cadena se realizó usando el kit de síntesis de ADNc SMART (Clontech Laboratories). El híbrido de ARNm/ADNc monocatenario resultante se amplificó
- 30 por PCR de larga distancia (kit Advantage 2 PCR; Clontech) usando sitios de cebadores específicos en los extremos de cebado 3' y 5' formados durante el proceso de RT inicial según las especificaciones del fabricante. Después de digestión RsaI del ADNc de STRO-1<sup>bri</sup>, se usaron 2 partes alícuotas para ligar diferentes oligonucleótidos de adaptador específicos usando el kit de sustracción Clontech PCR-Select DNAC. Se realizaron dos tandas de hibridación sustractiva usando ADNc de STRO-1<sup>bri</sup> (elemento de prueba) y STRO-1<sup>opaca</sup> (elemento activador), y a la inversa, según el protocolo del fabricante. Este procedimiento se realizó también de modo inverso usando ADNc de
- 35 elemento de prueba STRO-1<sup>opaca</sup> hibridado frente a ADNc de elemento activador de STRO-1<sup>bri</sup>.

Para identificar los genes expresados de forma singular por la población de STRO-1<sup>bri</sup>, se usó ADNc con sustracción de STRO-1<sup>bri</sup> para construir filtros de micromatriz de baja densidad replicados que comprendían 200 clones bacterianos seleccionados aleatoriamente transformados con los ADNc con sustracción de STRO-1<sup>bri</sup> ligados a un vector de clonación T/A. Posteriormente se sondearon las micromatrices con sustracción de STRO-1<sup>bri</sup> o STRO-1<sup>opaca</sup> marcado con [<sup>32</sup>P] dCTP (Figura 3B-C). El cribado diferencial identificó un total de 44 clones, que se expresaron con alta diferenciación entre las subpoblaciones de STRO-1<sup>opaca</sup> y STRO-1<sup>brillante</sup>. La secuenciación de ADN de todos los clones expresados de forma diferencial reveló que sólo 1 clon era representativo de un mitógeno de

40 célula de estroma conocido; en concreto, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés) (Gronthos y Simmons, Blood. 85: 929-940, 1995). Es interesante observar que en 6 de los 44 clones se encontró que contenían inserciones de ADN correspondientes al factor derivado de estroma 1 (SDF-1, por sus siglas en inglés) de quimiocina. La alta abundancia de transcritos de SDF-1 en células STRO-1<sup>brillante</sup> humanas se confirmó por RT-PCR semicuantitativa de ARN total preparado a partir de subpoblaciones de médula ósea de STRO-1<sup>brillante</sup>,

50 STRO-1<sup>opaca</sup> y STRO-1<sup>negativa</sup> recién clasificadas (Figura 3D y Tabla 3).

**Tabla 2.** Cebadores RT-PCR y condiciones para la amplificación específica de ARNm humano

Gen diana	Secuencias de cebador sentido/antisentido (5'-3')	Tamaño del producto
GAPDH	CACTGACACGTTGGCAGTGG (SEQ ID NO: 1)	417
	CATGGAGAAGGCTGGGGCTC (SEQ ID NO: 2)	
SDF-1	GAGACCCGCGCTCGTCCGCC (SEQ ID NO: 3)	364
	GCTGGACTCCTACTGTAAGGG (SEQ ID NO: 4)	

<b>IL-1<math>\beta</math></b>	AGGAAGATGCTGGTTCCCTCTC (SEQ ID NO: 5) CAGTTCAGTGATCGTACAGGTGC (SEQ ID NO: 6)	151
<b>FLT-1</b>	TCACTATGGAAGATCTGATTTCTTACAGT (SEQ ID NO: 7) GGTATAAATACACATGTGCTTCTAG (SEQ ID NO: 8)	380
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	TCAGATCATCTTCTCGAACC (SEQ ID NO: 9) CAGATAGATGGGCTCATACC (SEQ ID NO: 10)	361
<b>KDR</b>	TATAGATGGTGAACCCGGA (SEQ ID NO: 11) TTTGTCACTGAGACAGCTTGG (SEQ ID NO: 12)	450
<b>RANKL</b>	AACAGGCCTTTCAAGGAGCTG (SEQ ID NO: 13) TAAGGAGGGTTGGAGACCTCG (SEQ ID NO: 14)	538
<b>Leptina</b>	ATGCATTGGGAACCCTGTGC (SEQ ID NO: 15) GCACCCAGGGCTGAGGTCCA (SEQ ID NO: 16)	492
<b>CBFA-1</b>	GTGGACGAGGCAAGAGTTTCA (SEQ ID NO: 17) TGGCAGGTAGGTGTGGTAGTG (SEQ ID NO: 18)	632
<b>PPAP<math>\gamma</math>2</b>	AACTGCGGGGAACTTGGGAGATTCTCC (SEQ ID NO: 18) AATAATAAGGTGGAGATGCAGGCTCC (SEQ ID NO: 19)	341
<b>OCN</b>	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC (SEQ ID NO: 20) CGTAGAAGCGCCGATAGGC (SEQ ID NO: 21)	289
<b>MyoD</b>	AAGCGCCATCTCTTGAGGTA (SEQ ID NO: 22) GCGAGAAACGTGAACCTAGC (SEQ ID NO: 23)	270
<b>SMMHC</b>	CTGGGCAACGTAGTAAACC (SEQ ID NO: 24) TATAGCTCATTGCAGCCTCG (SEQ ID NO: 25)	150
<b>GFAP</b>	CTGTTGCCAGAGATGGAGGTT (SEQ ID NO: 26) TCATCGCTCAGGAGTCCCTT (SEQ ID NO: 27)	370
<b>Nestina</b>	GGCAGCGTTGGAACAGAGGTTGGA (SEQ ID NO: 28) CTCTAAACTGGAGTGGTCAGGGCT (SEQ ID NO: 29)	460
<b>SOX9</b>	CTCTGCCTGTTTGGACTTTGT (SEQ ID NO: 30) CCTTTGCTTGCCTTTTACCTC (SEQ ID NO: 31)	598
<b>Colágeno tipo X</b>	AGCCAGGGTTGCCAGGACCA (SEQ ID NO: 32) TTTTCCCACTCCAGGAGGGC (SEQ ID NO: 33)	387
<b>Agrecano</b>	CACTGTTACCGCCACTTCCC (SEQ ID NO: 34) ACCAGCGGAAGTCCCCTTCG (SEQ ID NO: 35)	184

**Tabla 3.** Resumen de la expresión génica relativa en poblaciones de STRO-1<sup>bri</sup> y STRO-1<sup>opaca</sup>. Se presenta una lista de genes que mostraron expresión mensurable y diferencial entre las poblaciones de STRO-1<sup>bri</sup> y STRO-1<sup>opaca</sup> determinado por transcripción inversa-PCR. Los valores representan la expresión génica relativa con referencia al gen de limpieza, GAPDH.

Tejido	Marcador	Expresión génica relativa a GAPDH	
		STRO-1 <sup>bri</sup>	STRO-1 <sup>opaca</sup>
<b>Neuronas</b>	<i>GFAP (Proteína ácida fibrilar glial)</i>	0,1	0,7
<b>Hueso</b>	<i>OCN (Osteocalcina)</i>	1,1	2,5
	<i>OSX (Osterix)</i>	0,4	1,3
<b>Inmunorregulador</b>	<i>CBFA-1 (Proteína de unión a factor central-1)</i>	0,3	0,6
	<i>RANKL (Factor nuclear activador de receptor <math>\kappa</math> B)</i>	1,6	0,3
	<i>SDF-1-alfa (Factor derivado de estroma-1-alfa)</i>	3,2	0,1
<b>Grasa</b>	<i>Leptina</i>	3,1	4,2
<b>Miocardocitos</b>	<i>GATA-4</i>	1,1	2,9
<b>Células endoteliales</b>	<i>Ang-1 (Angiopoyetina-1)</i>	1,5	0,8
<b>Condrocitos</b>	<i>Sox 9</i>	0,3	1,1
	<i>COL X (Colágeno X)</i>	3,5	2,8
<b>Citocinas proinflamatorias</b>	<i>TNF-alfa (Necrosis tumoral alfa)</i>	1,7	0,9

Para correlacionar la expresión superficial de proteínas con la densidad de expresión de STRO-1, se prepararon suspensiones de células individuales de células expandidas *ex vivo* derivadas de CPM de médula ósea por

desprendimiento de tripsina/EDTA y posteriormente se incubaron con el anticuerpo de STRO-1 en combinación con anticuerpos que identifican un amplio intervalo de marcadores asociados con linaje celular. STRO-1 se identificó usando un isotiocianato de IgM-fluoresceína antimurina de cabra mientras que todos los demás marcadores se identificaron usando una IgG-ficoeritrina anti-ratón o anti-conejo de cabra. Para aquellos anticuerpos que identifican 5 antígenos intracelulares, las preparaciones de células se marcaron primero con el anticuerpo STRO-1, se fijaron con etanol al 70% en frío para permeabilizar la membrana celular y a continuación se incubaron con anticuerpos específicos de antígeno intracelulares. Se usaron anticuerpos de control de isotipo coincidente en condiciones idénticas. El análisis de citometría de flujo de color doble se realizó usando un citómetro de flujo COULTER EPICS y se recogieron datos en modo de lista. Los gráficos de puntos representan 5.000 episodios en modo de lista que indican el nivel de intensidad de fluorescencia para cada marcador celular de linaje (eje y) y STRO-1 (eje x). Los cuadrantes 10 verticales y horizontales se establecieron con referencia a los anticuerpos de control negativo de isotipo coincidente.

**Tabla 4.** Resumen de la expresión relativa de proteínas en poblaciones de STRO-1<sup>bri</sup> y STRO-1<sup>Opaca</sup>. Se presenta una lista de proteínas que mostraron expresión diferencial entre las poblaciones de STRO-1<sup>bri</sup> y STRO-1<sup>Opaca</sup> determinado 15 por citometría de flujo. Los valores representan la intensidad de tinción por fluorescencia media relativa.

Tejido	Marcador	Intensidad de fluorescencia media	
		STRO-1 <sup>bri</sup>	STRO-1 <sup>Opaca</sup>
Neuronas	<i>Neurofilamento</i>	1,7	20,5
Hueso	<i>ALK PHOS (Fosfatasa alcalina)</i>	5,7	44,5
Inmunorregulador	<i>RANKL (Activador receptor de factor nuclear <math>\kappa B</math>)</i>	658,5	31,0
Células epiteliales	<i>Citoqueratina celular 10 + 13</i>	1,2	23,3
	<i>Citoqueratina 14</i>	1,8	8,8
Músculo liso	<i><math>\alpha</math>-SMA (Actina de músculo liso alfa)</i>	318,0	286,0
Condrocitos	<i>Biglucano</i>	84,4	65,9
Fibroblasto basal	<i>Tenascina C</i>	22,2	6,9
Miocardiocito	<i>Troponina C</i>	2,5	15,0

Estos resultados muestran que SDF-1 $\alpha$  y RANKL están muy expresados por las células STRO-1<sup>bri</sup>. Este hecho es importante ya que se sabe que estas dos proteínas intervienen en la regulación por aumento de linfocitos T reguladores (Treg) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> que confieren protección contra trastornos inmunitarios tales como EAE (Loser y col., Nature Medicine 12:1372-1379, 2006; Hess, Biol. Blood Marrow Transplant, 12 (1 Suppl 2):13-21, 2006; y Meiron y col., J. Exp. Medicine 205:2643-2655, 2008). 20

#### Ejemplo 4 – Efecto de las células STRO-1<sup>+</sup> en EAE

Para los siguientes experimentos se usaron ratones C57B1/6J con encefalomiелitis inflamatoria experimental (EAE) inducida por glucoproteínas de oligodendrocitos de mielina (MOG). Los ratones C57B1/6J muestran síntomas fenotípicos similares (parálisis progresiva) a los de los pacientes con EM y muestran además una inflamación, desmielinización y pérdida/daño axonal extensos en el SNC. El procedimiento de inmunización para la inducción de 30 EAE, la valoración de los síntomas clínicos y el trasplante de CPM usado tal como se indica a continuación.

#### Inducción activa de EAE

Se inmunizó a los ratones con 200  $\mu$ g de MOG recombinante disueltos en Solución salina con tampón de fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) y se mezcló con un volumen igual de adyuvante completo de Freund que contenía 400  $\mu$ g de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra desactivada. Se inyectaron 0,1 ml de esta mezcla por vía subcutánea en el flanco derecho e izquierdo (0,2 ml/ratón en total) usando una aguja de calibre 25 (G). Además se inmunizó a los ratones con 350 ng de toxina de *Bordetella pertussis* inactivada en 0,30 ml de PBS por vía intravenosa (i.v.) a través de la vena caudal en el día 0 y el día 2 usando una aguja 29 G. Se aplicó una presión suave en el sitio i.v. durante 30 s después 40 de la inyección para reducir el riesgo de hemorragia en el sitio i.v.

Se monitorizó a los ratones cada 2-5 minutos durante 10-15 minutos para asegurarse de que no había hemorragia activa.

#### 45 Tratamiento con CPM

Las CPM se aislaron esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 1. En los días 8, 10 y 12 después de la

inducción de la enfermedad se administraron  $2 \times 10^5$  o  $4 \times 10^5$  de CPM como una única inyección intravenosa (i.v.) en un volumen de 200  $\mu$ l de PBS (véase la Tabla 5). Los controles recibieron inyecciones i.v. de volúmenes iguales de solo PBS. Se llevó un seguimiento de los ratones cada día y se anotaron los signos clínicos según la escala descrita a continuación. Se continuó con los experimentos durante aproximadamente 36 días para vigilar el curso de la enfermedad. Al terminar el experimento, se diseccionó el encéfalo, la médula espinal y el nervio óptico y se fijó en solución de formalina.

**Tabla 5:** Resumen de régimen terapéutico

Tratamiento	Nº de células por ratón por inyección	CPM total inyectado por 20 g de ratón	Número de ratones
PBS i.v.	-	-	12
Dosis alta de CPM i.v.	$4 \times 10^5$ CPM	$6 \times 10^6$ CPM/kg	5
Dosis baja de CPM i.v.	$2 \times 10^5$ CPM	$3 \times 10^6$ CPM/kg	5

10

#### Monitorización de los ratones

Todos los ratones fueron examinados diariamente en busca de signos de disfunción neurológica durante todo el experimento.

15

Grado de disfunción neurológica:

0 - normal

1 - pérdida de tono caudal únicamente

20 2 - debilidad ligera de 1 o 2 extremidades traseras y marcha anormal

3 - incapacidad de mover las extremidades traseras

4 - incapacidad de mover las extremidades traseras y ligera debilidad en las delanteras

5 - muerte

25 **Resultados**

Los ratones C57B1/6J de control mostraron síntomas fenotípicos similares (parálisis progresiva) a los de los pacientes con EM y mostraron una inflamación, desmielinización y pérdida/daño axonal extensos en el SNC.

30 Tal como se muestra en la Figura 4, las CPM administradas por vía intravenosa al inicio de la inducción de la enfermedad EAE son capaces de inhibir la gravedad de las puntuaciones medias de enfermedad en el curso de 36 días comparado con los animales de EAE tratados con PBS.

La Figura 5 muestra que el tratamiento con CPM induce una reducción dependiente de la dosis en el índice de enfermedad acumulado en EAE progresiva crónica (análisis de área total bajo la curva de la puntuación media de enfermedad clínica).

35 Los efectos de la administración de las CPM se resumen en la Tabla 6:

**Tabla 6:** Resumen de resultados clínicos en modelo EAE de ratón después del tratamiento con CPM

40

	PBS	Dosis de CPM total $0,6 \times 10^5$ ( $3 \times 10^6$ de CPM/kg)	Dosis de CPM total $1,2 \times 10^5$ ( $6 \times 10^6$ de CPM/kg)
Incidencia de la enfermedad	12/12	5/5	5/5
Día de inicio de la enfermedad (intervalo)	$13,92 \pm 0,54$ (11-18)	$11,6 \pm 0,6$ (10-13)	$13,8 \pm 0,97$ (12-17)
Muerte o enfermedad grave (%)	3/12 (25)	0/5 (0)	0/5 (0)
Puntuación clínica máxima	$3,5 \pm 0,26$	3	$2,6 \pm 0,4$
Índice de enfermedad acumulado (área bajo la curva)	$62 \pm 5,8$	$55,7 \pm 2,1$	$44,3 \pm 4,4$

Los datos de la Tabla 6 revelan que todos los animales muestran enfermedad neurológica entre 10-18 días después

de la inducción de EAE con péptido MOG 35-55. El 25% (3/12) de los animales de control tratados con PBS murieron en comparación con 0/15 animales tratados con CPM. La puntuación clínica máxima fue la más alta en el grupo de control y todos los grupos tratados con CPM mostraron una puntuación clínica máxima inferior.

- 5 El índice de enfermedad acumulado que es el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) para la puntuación clínica media en el tiempo de 36 días fue siempre inferior para los grupos de terapia con CPM que lo observado para el grupo de control lo que indica una supresión robusta y sostenida de la enfermedad EAE mediante CPM.

Estos datos muestran que en este modelo de una afección neurológica inflamatoria las CPM humanas son efectivas para reducir la gravedad clínica de la EAE.

#### Ejemplo 4 - Efecto de CPM en la proliferación de linfocitos T

Los ratones tratados con CPM y los controles tal como se describe en el Ejemplo 3 se recogieron en el día 36 después de la inducción de la enfermedad (inmunización con MOG<sub>35-55</sub>). Los esplenocitos se cultivaron *in vitro* con medio en solitario o reestimulado con MOG<sub>35-55</sub> y a continuación se midieron las respuestas proliferativas con linfocitos T a través de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina. Las respuestas proliferativas específicas a MOG se compararon con los esplenocitos correspondientes en cultivo en medio en solitario (sin estimulación). Los esplenocitos cultivados en PMA/ionomicina sirvieron para determinar la estimulación no específica (independiente del antígeno) de la proliferación de linfocitos T.

Los datos presentados en la Figura 6 muestran que las respuestas inmunitarias de linfocitos T a la prueba de provocación antigénica *in vitro* secundaria con MOG están inhibidas en comparación con los linfocitos T cultivados a partir de animales de control. Los datos de la Figura 7 muestran que las respuestas inmunitarias de linfocitos T en animales tratados previamente con CPM *in vivo* mantienen respuestas potentes a la estimulación no específica con PMA/ionomicina *in vitro* en comparación con linfocitos T en cultivo a partir de animales de control tratados con PBS. Esta respuesta exagerada a la estimulación no específica puede ser reflejo de una respuesta xenogénica a los antígenos humanos por los linfocitos T de ratón.

Estos datos muestran que las CPM humanas reducen o impiden la respuesta inmunitaria de linfocitos T a un antígeno específico (por ejemplo, estimulación antigénica por MOG), incluso 24 días después de la última administración de CPM. Los datos indican que las CPM enriquecidas con STRO-1 inducen tolerancia a los antígenos de la esclerosis múltiple.

#### Ejemplo 6 – Efectos *in vitro* de CPM

Las propiedades inmunorreguladoras de CPM se someten a prueba mediante ensayos de proliferación, reacciones de linfocitos mixtas y producción de citocinas tal como se describe a continuación.

#### Ensayos de proliferación y reacciones de linfocitos mixtas

Las células mononucleares son recogidas a partir de los bazos de ratones C57BL/6 sanos, ratones transgénicos 2D2 o ratones inmunizados con MOG tratados con CPM o vehículo en solitario esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 4. Se preparan suspensiones de células individuales en medio RPMI completo que contiene FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (todo de Invitrogen), piruvato de sodio 1 mM (Sigma) y β-mercaptoetanol 50 µM (Sigma). Después de lisis de eritrocitos, se lavaron las células dos veces y a continuación se sembraron en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos (Nunc) por triplicado a una concentración de  $2,5 \times 10^5$  células por pocillo en presencia de 20 µg/ml de MOG<sub>35-55</sub> (GL Biochem), 800 ng/ml de ionomicina y 20 pg/ml de acetato miristato de forbol (PMA) (los dos de Sigma), o en pocillos recubiertos previamente con 10 µg/ml de anti-CD3 y 10 µg/ml de anti-CD8 (los dos de BD). A continuación se incubaron las células a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% durante 72 horas y se añadió 1 µCi/pocillo de [<sup>3</sup>H] timidina durante las últimas 18 horas de cultivo. Se recogieron las células en superficies de filtro y se incorporaron ácidos nucleicos radiactivos contados en un Top Count Harvester (Packard Biosciences). Para experimentos que implicaban la inhibición de proliferación de linfocitos T por CPM, se sembraron concentraciones de CPM comprendidas entre 2,5 y  $0,002 \times 10^4$  células por pocillo antes de la adición de esplenocitos.

En reacciones de linfocitos mixtas (RLM), se incubaron  $2 \times 10^5$  esplenocitos de ratones C57BL/6 (respondedores) con números iguales de estimuladores Ba1b/c irradiados (20 Gy) o CPM irradiadas y se cultivaron durante un periodo de 5 días, con la adición de 1 µCi/pocillo de [<sup>3</sup>H] timidina durante las últimas 24 horas de cultivo.

En RLM que implican inhibición de linfocitos T, se sembraron  $2 \times 10^4$  CPM irradiadas en los pocillos antes de la adición de esplenocitos.

5 *Producción de citocinas*

Los sobrenadantes usados para el análisis de producción de citocinas se obtienen a partir de cocultivos de dos días de  $2,5 \times 10^6$  esplenocitos de ratones transgénicos 2D2 estimulados con  $20 \mu\text{g/ml}$  de MOG<sub>35-55</sub> en solitario o en presencia de  $2 \times 10^4$  CPM (relación de CPM:esplenocitos de 1:10). Se realizó un análisis cualitativo de citocinas usando un kit de matriz de perlas citométricas Th1/Th2/Th17 de ratón (CBA) (BD) esencialmente según las instrucciones del fabricante y se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSCanto II. Se miden las siguientes citocinas: interleucina (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Meoblast, Inc

5 <120> PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO O PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS

<130> 512123

<150> 61/493073

10 <151> 2011-06-03

<160> 36

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial

20

<220>

<223> oligonucleótido para la amplificación de GAPDH

<400> 1

25 cactgacacg ttggcagtgg 20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

30 <213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido para la amplificación de GAPDH

35 <400> 2

catggagaag gctggggctc 20

<210> 3

<211> 20

40 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido para la amplificación de SDF-1

45

<400> 3

gagacccgcg ctcgtccgcc 20

<210> 4

50 <211> 21

<212> ADN

<213> artificial

<220>

55 <223> oligonucleótido para la amplificación de SDF-1

<400> 4

gctggactcc tactgtaagg g 21

<210> 5  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> artificial

5

<220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de IL-1beta

<400> 5

10 aggaagatgc tggtcctc tc 22

<210> 6  
<211> 23  
<212> ADN

15 <213> artificial

<220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de IL-1beta

20 <400> 6

cagttcagtg atcgtagcagg tgc 23

<210> 7  
<211> 29  
<212> ADN

25 <213> artificial

<220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de FLT-1

30

<400> 7  
tcactatgga agatctgatt tcttagc 29

<210> 8  
<211> 25  
<212> ADN

35 <213> artificial

<220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de FLT-1

40

<400> 8  
ggtataaata cacatgtgct tcttag 25

<210> 9  
<211> 20  
<212> ADN

45 <213> artificial

<220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de TNFalfa

50

<400> 9  
tcagatcatc ttctgaacc 20

55

<210> 10  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de TNFalfa

5 <400> 10  
cagatagatg ggctcatacc 20

<210> 11  
<211> 20  
10 <212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de KDR  
15 <400> 11  
tatagatggt gtaaccgga 20

<210> 12  
20 <211> 21  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
25 <223> oligonucleótido para la amplificación de KDR  
  
<400> 12  
ttgtcactg agacagcttg g 21

30 <210> 13  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> artificial

35 <220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de RANK-ligando  
  
<400> 13  
aacaggcctt tcaaggagct g 21

40 <210> 14  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> artificial

45 <220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de RANK-ligando  
  
<400> 14  
50 taaggagggg ttggagacct cg 22

<210> 15  
<211> 20  
<212> ADN  
55 <213> artificial

<220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de Leptina

<400> 15  
atgcattggg aaccctgtgc 20

<210> 16  
5 <211> 20  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
10 <223> oligonucleótido para la amplificación de Leptina

<400> 16  
gcacccaggg ctgaggtcca 20

15 <210> 17  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> artificial

20 <220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de CBFA-1

<400> 17  
gtggacgagg caagagttc a 21

25 <210> 18  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> artificial

30 <220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de CBFA-1

<400> 18  
35 tggcaggtag gtgtgtagt g 21

<210> 19  
<211> 28  
<212> ADN  
40 <213> artificial

<220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de PPARgamma2

45 <400> 19  
aactgcgggg aaactggga gattctcc 28

<210> 20  
<211> 26  
50 <212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de PPARgamma2

55 <400> 20  
aataataagg tggagatgca ggctcc 26

<210> 21

<211> 21  
<212> ADN  
<213> artificial

5 <220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de OCN

<400> 21  
atgagagccc tcacactcct c 21

10 <210> 22  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> artificial

15 <220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de OCN

<400> 22  
20 cgtagaagcg ccgatagc 19

<210> 23  
<211> 20  
<212> ADN  
25 <213> artificial

<220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de MyoD

30 <400> 23  
aagcgccatc tcttgagta 20

<210> 24  
<211> 20  
35 <212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<223> oligonucleótido para la amplificación de MyoD

40 <400> 24  
gcgagaaacg tgaacctagc 20

<210> 25  
45 <211> 20  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
50 <223> oligonucleótido para la amplificación de SMMHC

<400> 25  
ctgggcaacg tagtaaac 20

55 <210> 26  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> artificial

## ES 2 763 316 T3

<220>

<223> oligonucleótido para la amplificación de SMMHC

<400> 26

5 tatagctcat tgcagcctcg 20

<210> 27

<211> 21

<212> ADN

10 <213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido para la amplificación de GFAP

15 <400> 27

ctgttgccag agatggaggt t 21

<210> 28

<211> 20

20 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido para la amplificación de GFAP

25

<400> 28

tcatcgctca ggaggtcctt 20

<210> 29

30 <211> 24

<212> ADN

<213> artificial

<220>

35 <223> oligonucleótido para la amplificación de nestina

<400> 29

ggcagcgttg gaacagaggt tgga 24

40 <210> 30

<211> 24

<212> ADN

<213> artificial

45 <220>

<223> oligonucleótido para la amplificación de nestina

<400> 30

ctctaaactg gagtggcag ggct 24

50

<210> 31

<211> 21

<212> ADN

<213> artificial

55

<220>

<223> oligonucleótido para la amplificación de SOX9

<400> 31

ctctgcctgt ttggactttg t 21

<210> 32

<211> 21

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido para la amplificación de SOX9

10

<400> 32

cctttgcttg ccttttacct c 21

<210> 33

15 <211> 20

<212> ADN

<213> artificial

<220>

20 <223> oligonucleótido para la amplificación de colágeno tipo X

<400> 33

agccagggtt gccaggacca 20

25 <210> 34

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial

30 <220>

<223> oligonucleótido para la amplificación de colágeno tipo X

<400> 34

tttcccact ccaggagggc 20

35

<210> 35

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial

40

<220>

<223> oligonucleótido para la amplificación de agrecano

<400> 35

45 cactgttacc gccactccc 20

<210> 36

<211> 20

<212> ADN

50 <213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido para la amplificación de agrecano

55 <400> 36

accagcggaa gtccccttcg 20

**REIVINDICACIONES**

1. Una población de células enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurológica inflamatoria, donde la población de células enriquecida comprende al menos el 5% de células multipotentes STRO-1<sup>+</sup> TNAP<sup>+</sup>.  
5
2. La población de células enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> para su uso según la reivindicación 1, donde la enfermedad neurológica inflamatoria está asociada con o causada por una respuesta de linfocitos T a un estímulo inflamatorio.  
10
3. La población de células enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la enfermedad neurológica inflamatoria se selecciona de entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple, tal como una forma progresiva crónica de esclerosis múltiple o una forma recidivante-remitente de esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Guillain-Barré, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, miastenia grave, mielitis transversa, leucodistrofia y leucoencefalopatía multifocal progresiva.  
15
4. La población de células enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la población enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> se administra sistémicamente.  
20
5. La población de células enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la enfermedad es una enfermedad recidivante-remitente y la población enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> se administrará durante una recidiva de la enfermedad.  
25
6. La población de células enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde:
  - (i) se administrarán entre  $2 \times 10^6$  y  $8 \times 10^6$  células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> por kg;
  - (ii) se administrarán entre  $3 \times 10^6$  y  $6 \times 10^6$  células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> por kg; o
  - (iii) se administrará una dosis baja de células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> de aproximadamente  $3 \times 10^6$  STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup>.
7. La población de células enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la población enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> se administrará una vez por semana o con menor frecuencia, o una vez cada cuatro semanas o con menor frecuencia.  
35
8. La población de células enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde:
  - (i) la población enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> está diseñada genéticamente para expresar una molécula para bloquear la estimulación de linfocitos T;
  - (ii) la población enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> se administrará con un compuesto para bloquear la estimulación de linfocitos T;
  - (iii) la población enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> es autógena o alogénica; o
  - (iv) la población enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> se ha sometido a una expansión en cultivo antes de la administración.
9. Una población de células enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> para su uso en la prevención de una respuesta inmunitaria en un sujeto en respuesta a un antígeno, donde la población de células enriquecida comprende al menos el 5% de células multipotentes STRO-1<sup>+</sup> TNAP<sup>+</sup>.  
50
10. La población de células enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> para su uso según la reivindicación 9, donde:
  - (i) la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T;
  - (ii) la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T que comprende proliferación de linfocitos T; o

(iii) la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T que se suprime en respuesta a un antígeno específico y una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T en respuesta a otro antígeno no se suprime.

5 11. La población de células enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> para su uso según la reivindicación 9 o 10, donde el sujeto ha provocado previamente una respuesta inmunitaria al antígeno y la población suprime una respuesta inmunitaria adicional al antígeno.

12. La población de células enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> para su uso según la reivindicación 11, donde:

10

(i) la población se administrará después de que el sujeto provoque una respuesta inmunitaria al antígeno impidiendo con ello una respuesta inmunitaria adicional al antígeno; o

(ii) la respuesta inmunitaria es suprimida durante al menos aproximadamente 24 días después de la administración de la población de células enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup>.

15

13. Una población de células enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> para su uso en la inducción de tolerancia a un antígeno en un sujeto, donde la población de células enriquecida comprende al menos el 5% de células multipotentes STRO-1<sup>+</sup> TNAP<sup>+</sup>.

20 14. La población de células enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, donde:

(i) el antígeno o el antígeno específico es uno contra el cual se provoca una respuesta inflamatoria, por ejemplo, la respuesta inflamatoria es causante de una enfermedad neurológica inflamatoria; o

25 (ii) la población de células enriquecida con células multipotentes STRO-1<sup>+</sup>, TNAP<sup>+</sup> se administrará con un compuesto que trata o previene una enfermedad neurológica inflamatoria, tal como acetato de glatirámico y/o interferón beta.

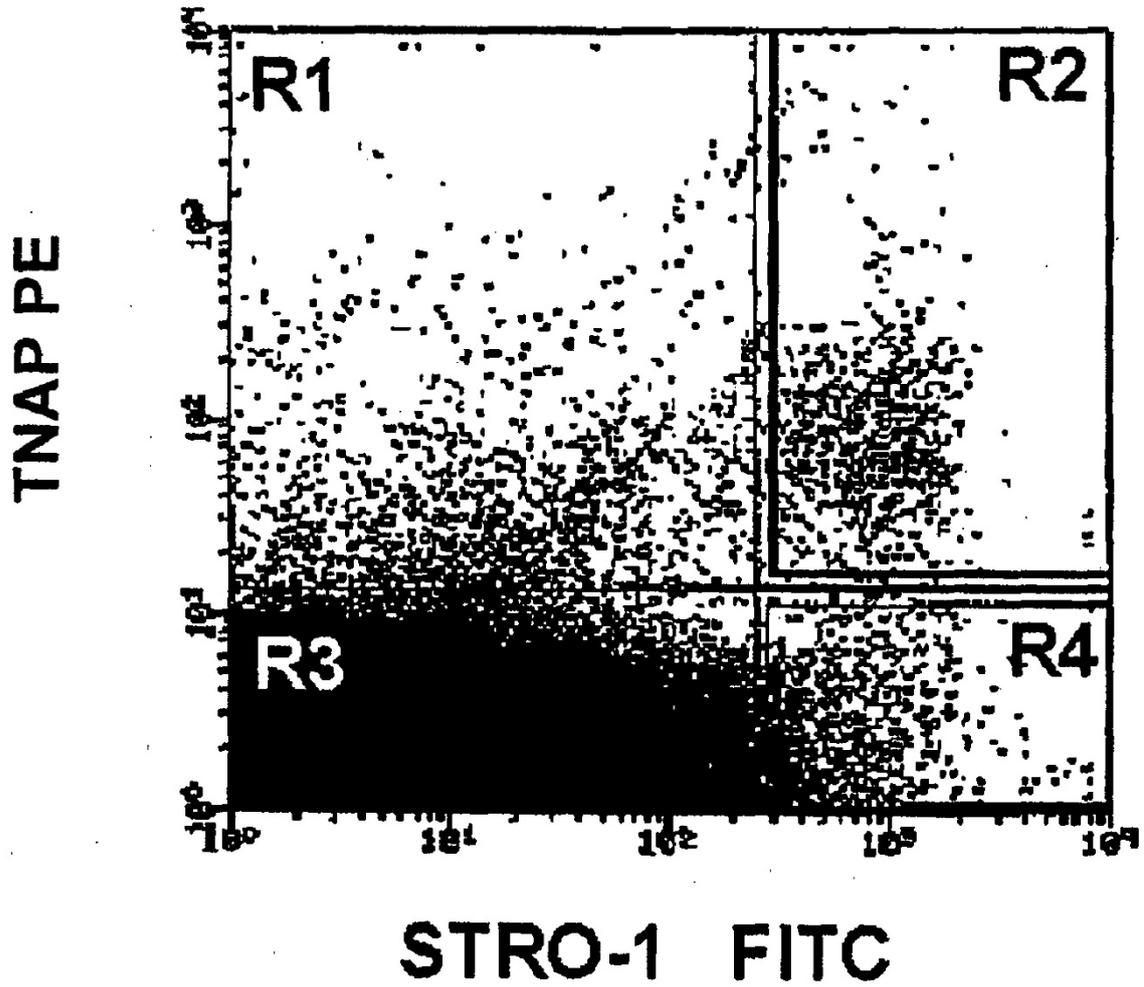
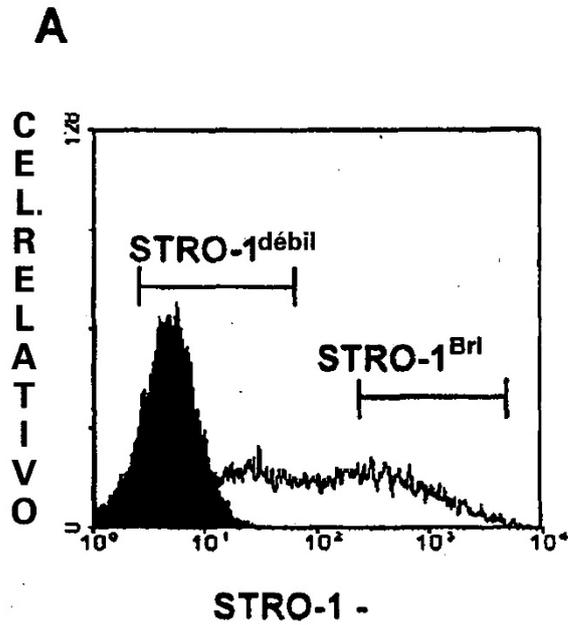
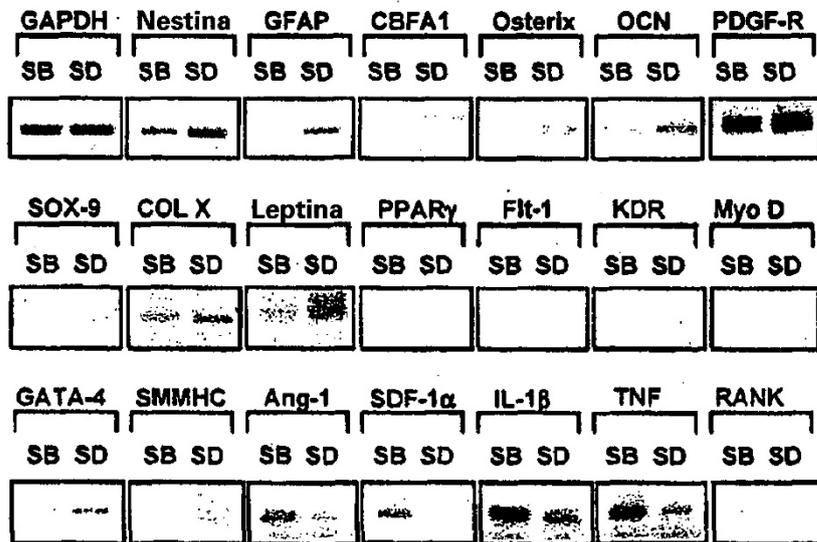


Figura 1



**B**



**Figura 2**

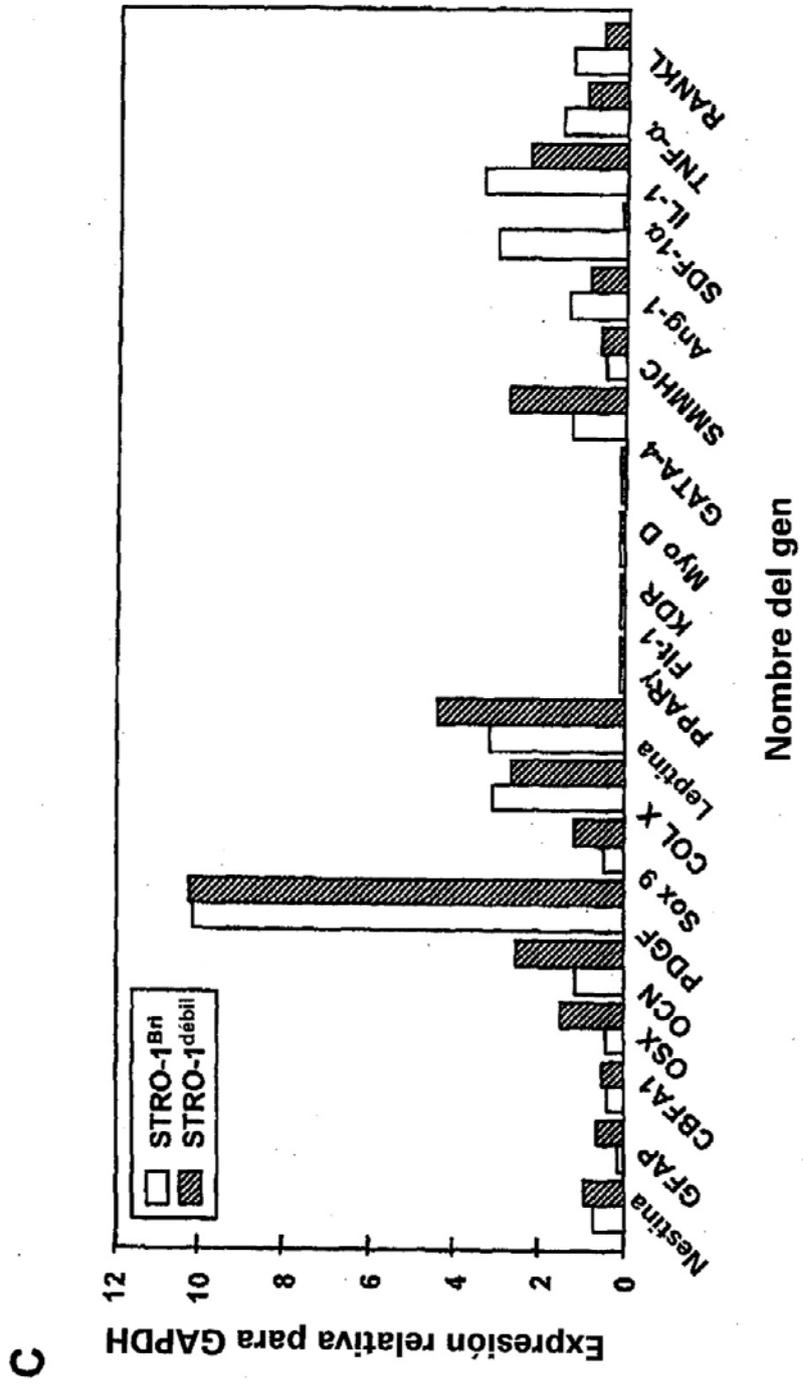


Figura 2 (continuada)

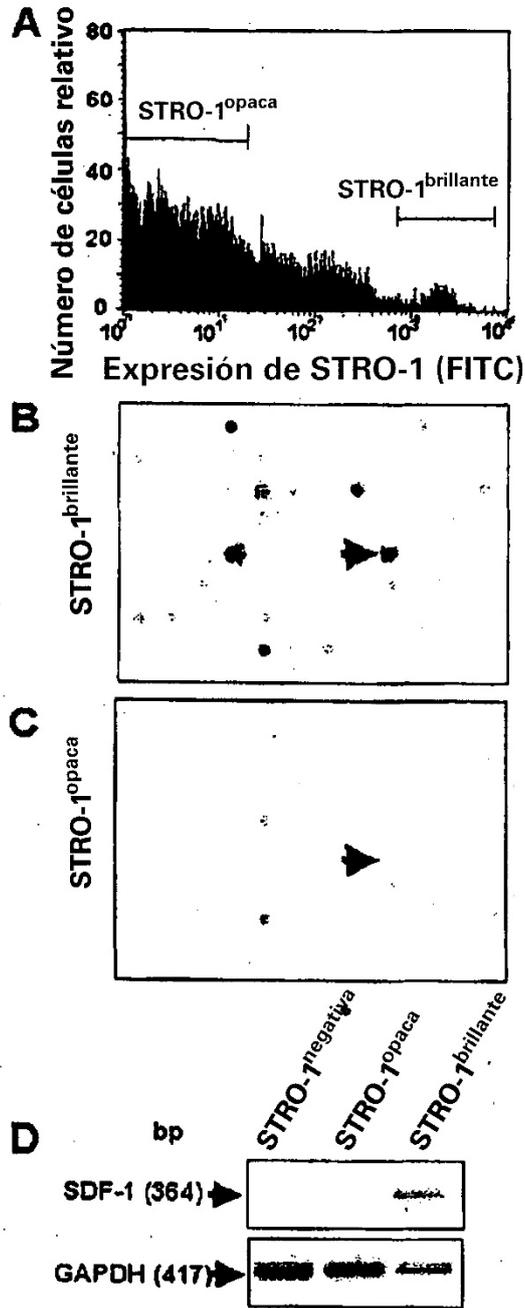


Figura 3

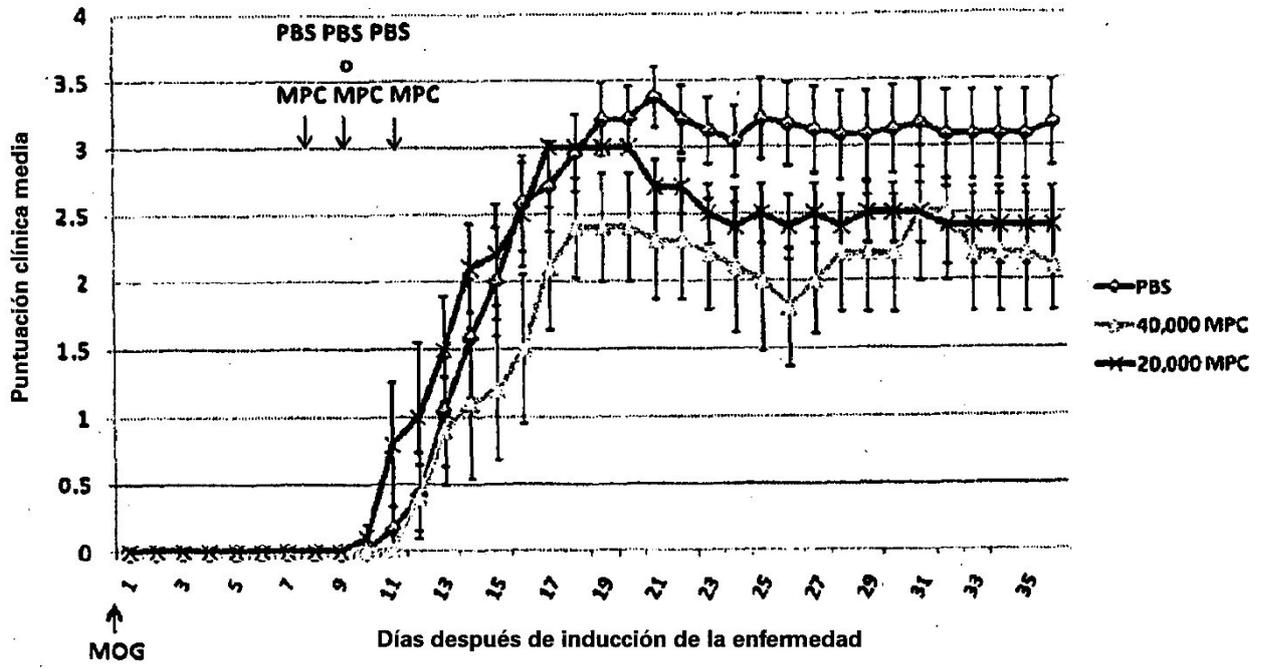


Figura 4

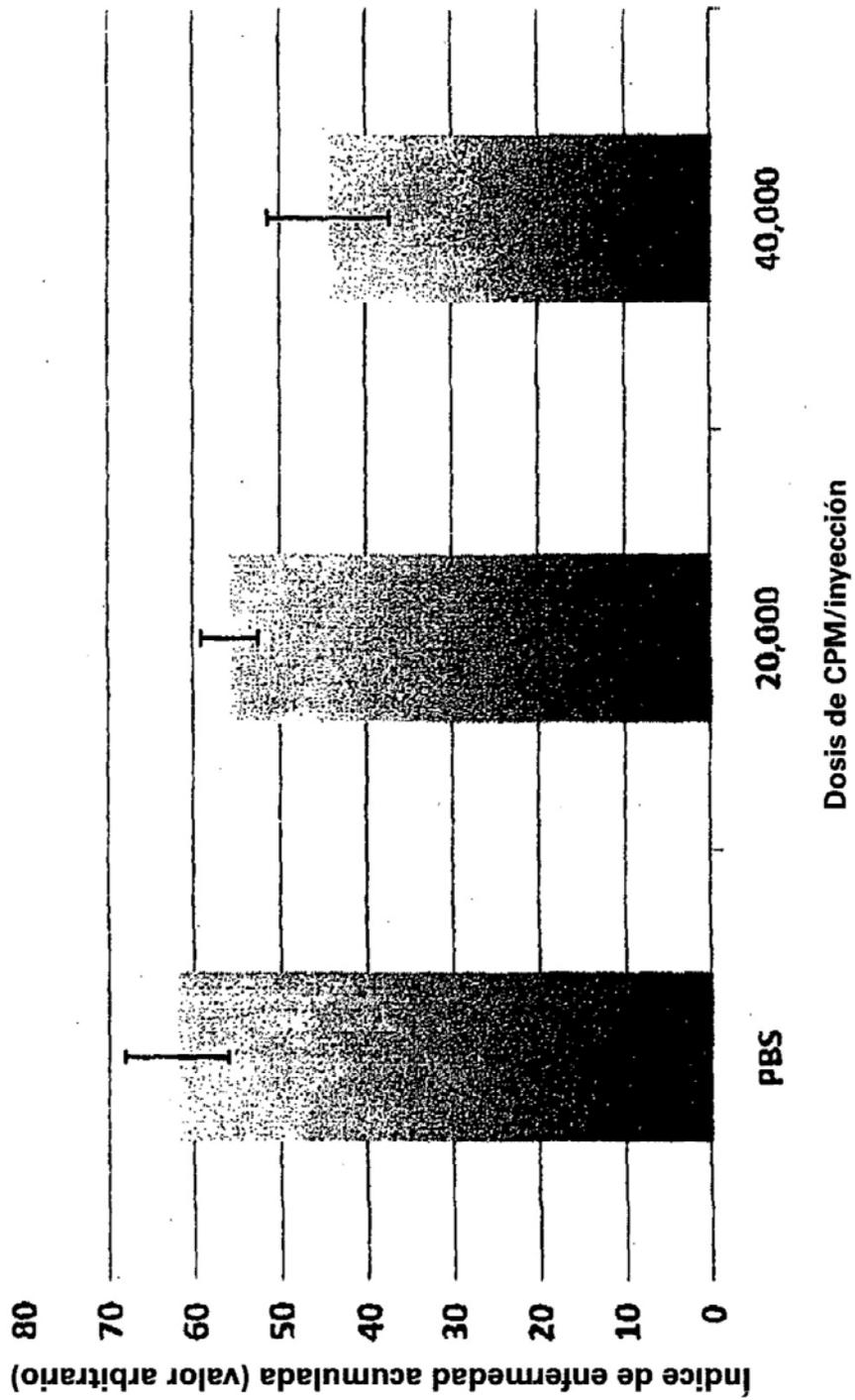


Figura 5

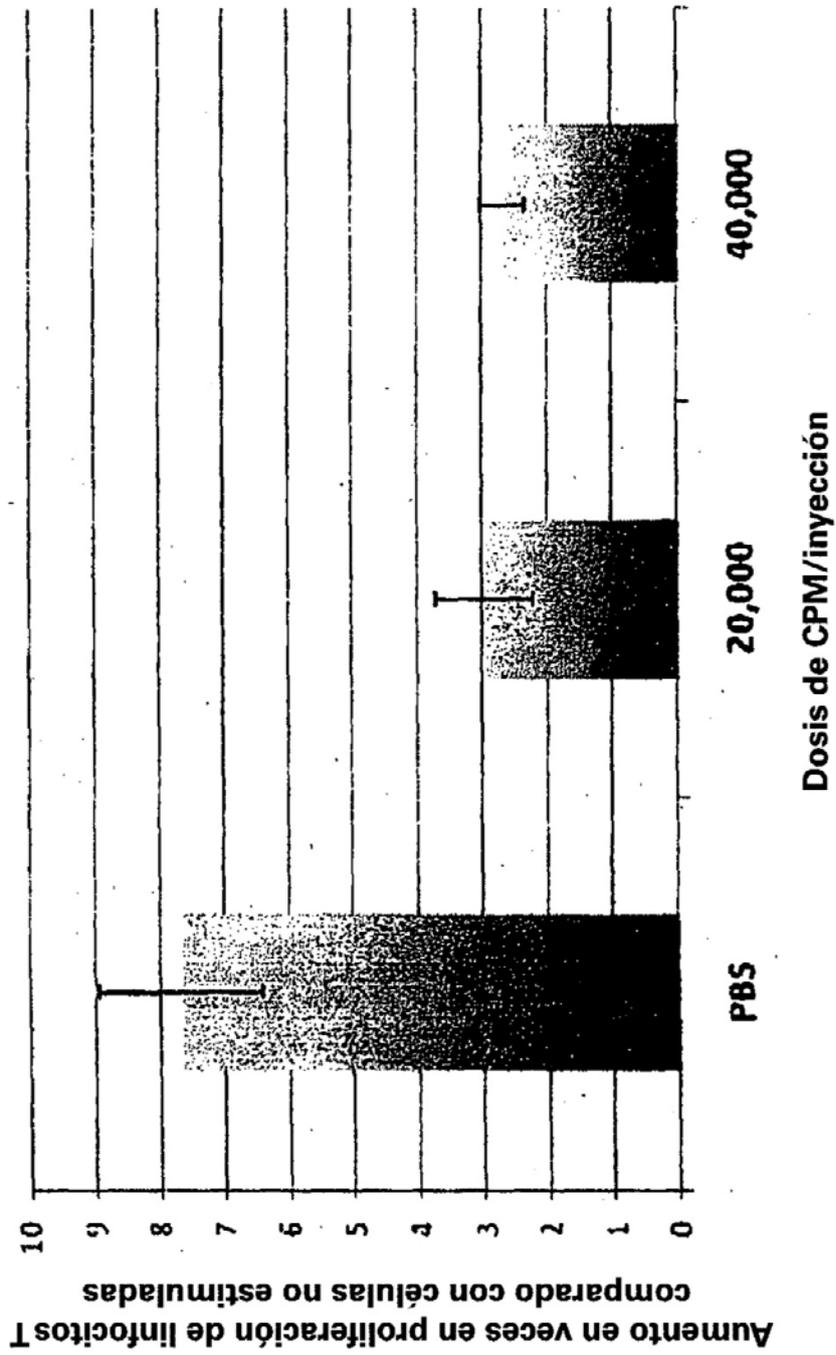


Figura 6

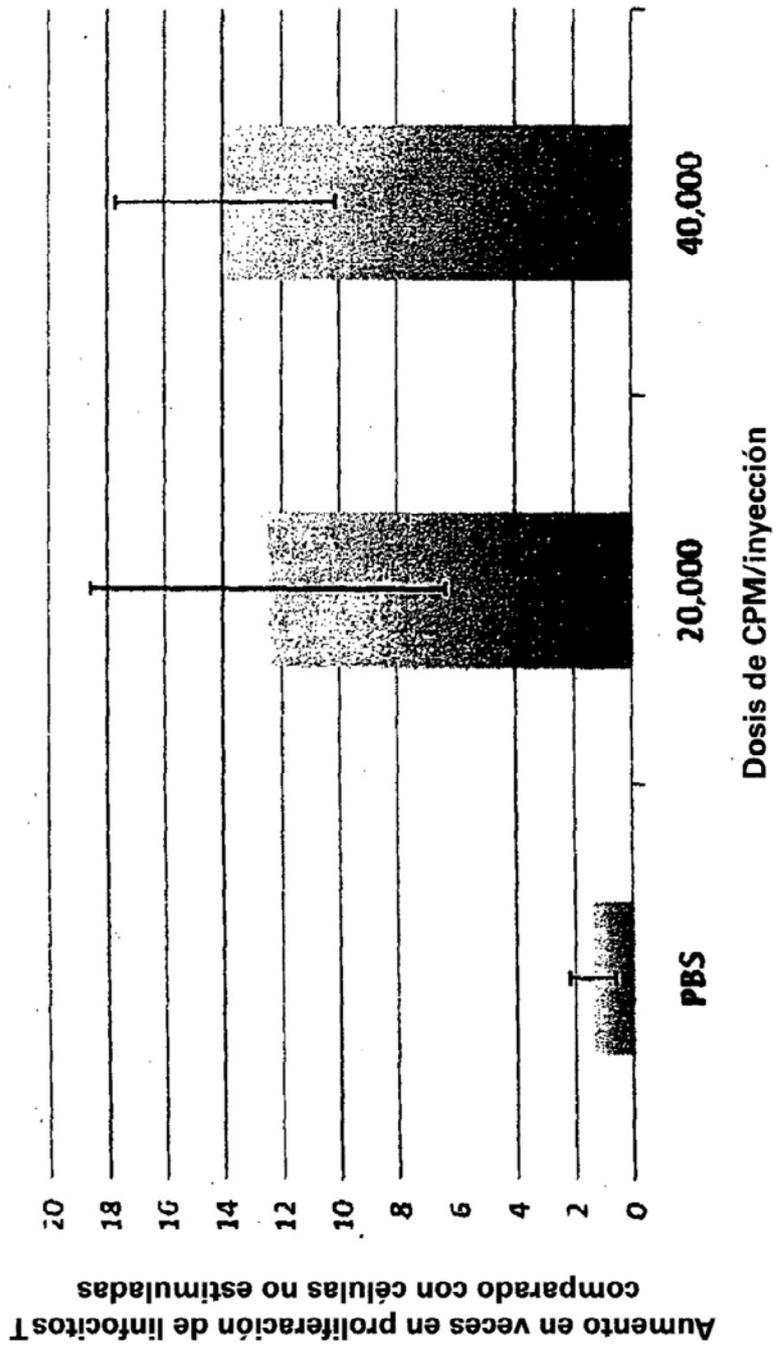


Figura 7