

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 357**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)  
**C12N 5/02** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 5/16** (2006.01)  
**C12N 5/077** (2010.01)  
**C12N 5/0786** (2010.01)  
**C12N 5/0789** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2005 E 10190450 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 2292733**

54 Título: **Producción de células provenientes de líneas neurales a partir de sangre**

30 Prioridad:

**14.12.2004 US 636391 P**  
**05.04.2005 US 668739 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.05.2020**

73 Titular/es:

**KWALATA TRADING LIMITED (100.0%)**  
**Zinonos Kiteos, 8, Kato Lakatamia**  
**2322 Nicosia , CY**

72 Inventor/es:

**FULGA, VALENTIN;**  
**PORAT, YAEL y**  
**POROZOV, SVETLANA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

Observaciones :

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

**ES 2 763 357 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

Producción de células provenientes de líneas neurales a partir de sangre

**Antecedentes de la invención**

5 Desde el descubrimiento de las células madre, se entiende que éstas tienen un potencial significativo para tratar eficazmente muchas enfermedades [1]. Las células madre embrionarias pluripotentes derivadas de embriones y tejido fetal tienen el potencial de producir más de 200 tipos diferentes de células conocidas y, por lo tanto, pueden reemplazar potencialmente las células apoptóticas o dañadas de cualquier tejido específico [2, 3]. Las células madre difieren de otros tipos de células en el cuerpo e, independientemente de su origen, son capaces de dividirse y renovarse ellas mismas por largos períodos. Además, las células madre pueden dar lugar a tipos de células especializadas.

10 Se han identificado células madre en la mayoría de los órganos y tejidos, y se pueden encontrar en animales adultos y seres humanos. Las células madre adultas comprometidas (también denominadas células madre somáticas) fueron identificadas hace mucho tiempo en la médula ósea (BM). Tradicionalmente, se pensaba que las células madre adultas tenían capacidades limitadas de autorrenovación y diferenciación, restringidas a su tejido de origen [1, 4, 5, 6, 7]. Estos límites están siendo cuestionados en la actualidad por una cantidad abrumadora de investigaciones que demuestran tanto la plasticidad de las células madre (la capacidad de diferenciarse en tipos de células maduras diferentes de su tejido de origen) como su potencial terapéutico [8, 9, 10, 11, 12, 13]. Por ejemplo, trabajos recientes respaldan la opinión de que las células derivadas de las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden diferenciarse en células nativas del cerebro adulto [12], proporcionando más pruebas de la existencia de cierta plasticidad en dichas células madre.

15 Las HSC son las células madre mejor caracterizadas. Estas células, que se originan en la médula ósea, la sangre periférica, la sangre del cordón umbilical, el hígado fetal y el saco vitelino, generan a su vez células sanguíneas y dan lugar a múltiples linajes hematopoyéticos. En 1998, algunos investigadores ya publicaron que las células madre pluripotentes de la médula ósea podían, bajo ciertas condiciones, convertirse en varios tipos de células diferentes a partir de células hematopoyéticas previamente conocidas [14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25]. Tal capacidad para cambiar el linaje se denomina transdiferenciación celular o plasticidad celular.

20 Hasta la fecha, la incapacidad general del sistema nervioso central (SNC) para regenerarse sustancialmente ha limitado el éxito de los neurocientíficos con respecto al desarrollo de terapias para muchos trastornos traumáticos, degenerativos, inflamatorios e, incluso, graves del cerebro. Sin embargo, la posibilidad de un uso eventual de células madre en los tratamientos del SNC ha aumentado las esperanzas que se tienen de las terapias basadas en células del SNC.

25 Previamente se ha demostrado que las células madre derivadas de la médula ósea (BMSC) tienen la capacidad de diferenciarse en neuronas y otros tipos de células como adipocitos, condrocitos, osteocitos, hepatocitos, células endoteliales y células del músculo esquelético [26, 27, 28, 29, 30].

30 El proceso de diferenciación de las células madre está controlado por señales internas, que son activadas por genes dentro de la célula, así como por señales externas para la diferenciación celular que incluyen agentes químicos secretados por otras células, contacto físico con células vecinas y ciertas moléculas en su microambiente [31, 32].

35 Se han realizado diversos intentos con éxito in vitro e in vivo para inducir la diferenciación de células madre adultas en otras células. Varios grupos han descubierto recientemente que las células BM in vivo pueden dar lugar a astrocitos y oligodendrocitos (ambos tipos de células se originan en el neuroectodermo) en el cerebro murino [33, 34, 35]. De hecho, incluso se ha descubierto que las neuronas expresan marcadores de la médula ósea trasplantada en ratones quiméricos [35, 36, 37, 38]. En el cerebelo, se han mostrado células de Purkinje completamente desarrolladas que expresaban GFP después del trasplante de las células madre BM marcadas con GFP [38, 39].

40 Una lesión tisular puede ser una forma de generar un estímulo para recuperar células madre de un sitio lesionado, al causar cambios en el ambiente circundante tisular, extrayéndose por medio de esto células madre de la sangre periférica, y provocándose así el reemplazo del tejido por células madre residentes en la proximidad. Algunas publicaciones de elevados niveles de quimiocinas y receptores de quimiocinas como CXCR4-SDF pueden explicar parte de esta recuperación in vivo de células madre [40]. El injerto de células microgliales y astrogiales derivadas de la médula ósea se mejora significativamente después de la lesión del SNC [41, 42].

45 La medicina regenerativa en general y especialmente la regeneración del tejido dañado del SNC es un campo científico emergente con implicaciones tanto para la investigación básica como para la práctica. Las células madre y progenitoras se aplican en forma de terapia celular para la reparación y regeneración de los tejidos próximos [43, 44].

50 La aparente plasticidad de las células madre de BM ha aumentado las esperanzas de su uso en estrategias de reparación basadas en células dentro del SNC. En modelos de ratón de trastornos neurológicos, el trasplante de células madre mesenquimales (MSC) ha dado como resultado una mejora en varios estudios:

1. La administración intravenosa, intracarotídea e intracerebral de MSC después de una isquemia cerebral mejoró la recuperación conductual en ratones y ratas [45, 46, 47, 48]. Además, las células derivadas de la médula ósea también contribuyeron a la neovascularización después de la isquemia cerebral en ratones [49, 50];
  2. En el modelo de ratón MPTP (metil-fenil-tetrahidropiridina) de la enfermedad de Parkinson, el trasplante intraestriatal de las MSC ha promovido cierta recuperación funcional [51];
  3. Ratas a las que les fueron inyectadas MSC después de una contusión espinal y una lesión cerebral traumática mostraron una mejora a largo plazo de la función locomotora [52, 53];
  4. Se encontró que las MSC remielinizan la médula espinal de ratas después de la desmielinización focal y mejoran la velocidad de conducción [54].
- Las siguientes referencias se citan por si son de interés:
1. Leblond C.P. (1964), "Classification of cell populations on the basis of their proliferative behaviour," *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 14:119-150
  2. Evans M.J. and Kaufman M.H. (1981), "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos," *Nature* 292:154-156
  3. Donovan P.J. and Gearhart J. (2001), "The end of the beginning for pluripotent stem cells," *Nature* 414:92-97
  4. Spradling A. et al. (2001), "Stem cells find their niche," *Nature* 414:98-104
  5. Weissman I.L. et al. (2001), "Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations," *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17:387-403
  6. Weissman I.L. (2000), "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution," *Cell* 100:157-68
  7. Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, Mattson NIP (2003), "Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain," *Dev Biol.* 258(2):319-33
  8. Cousin B, Andre M, Arnaud E, Penicaud L, Casteilla L (2003), "Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue," *Biochem Biophys Res Commun.* 301(4):1016-22
  9. Anderson D.J., Gage, F.H., and Weissman, I.L. (2001), "Can stem cells cross lineage boundaries?" *Nat. Med.* 7:393-395
  10. Robey P.G. (2000), "Stem cells near the century mark," *J. Clin. Invest,* 105:1489-1491
  11. Eisenberg LM, Burns L, Eisenberg CA (2003), "Hematopoietic cells from bone marrow have the potential to differentiate into cardiomyocytes in vitro," *Anat Rec.* 274A(1):870-82
  12. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM (2000), "From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice," *Science* 290(5497): 1775-9
  13. Slack, J.M. (2000), "Stem cells in epithelial tissues," *Science* 287:1431-1433
  14. Jackson KA, Mi T, Goodell MA (1999), "Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle," *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25):14482-6
  15. Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., and Mavilio F. (1998), "Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors," *Science* 279:528-30
  16. Lagasse E, Connors H. Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M. Weissman IL, Grompe M (2000), "Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo," *Nat Med.* 6:1229-34
  17. Hirschi, K. K., and Goodell, M. A. (2002), "Hematopoietic, vascular and cardiac fates of bone marrow-derived stem cells," *Gene Ther.* 9:648-652
  18. Theise N.D. et al. (2000), "Liver from bone marrow in humans," *Hepatology* 32:11-16
  19. Kleeberger W. et al. (2002), "High frequency of epithelial chimerism in liver transplants demonstrated by microdissection and STR-analysis," *Hepatology* 35:110-116
  20. Weimann J.M. et al. (2003), "Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:2088-2093

21. Quaini F. et al. (2002), "Chimerism of the transplanted heart," *N. Engl. Med* 346:5-15
22. Blau H.M. et al. (2001), "The evolving concept of a stem cell: entity or function?" *Cell* 105:829-841
23. Goodell M.A. et al. (2001), "Stem cell plasticity in muscle and bone marrow," *Ann. NY Acad. Sci.* 938:208-218
24. Krause D.S. (2002), "Plasticity of marrow-derived stem cells," *Gene Ther.* 9:754-758
- 5 25. Wulf G.G. et al. (2001), "Somatic stem cell plasticity," *Exp Hematol.* 29:1361-1370
26. Pittenger M.F. et al. (1999), "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells," *Science* 284:143-147
27. Liechty K.W. et al. (2000), "Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep," *Nature Med.* 6:1282-1286
- 10 28. Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ (2004), "Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion," *Nat Cell Biol.* 6(6):532-9. Epub 2004 May 09
29. Bittner R.E., Schofer C., Weipoltshammer K., Ivanova S., Streubel B., Hauser E., Freilinger M., Hoger H., Elbe-Burger A., and Wachtler F. (1999), "Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice," *Anat. Embryol. (Berl)* 199:391-396
- 15 30. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR (2000), "Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow," *Science.* 290(5497):1779-82
31. Douglas W.L., Dimmeler S. (2004), "Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic diseases. Part I: Angiogenic cytokines," *Circulation* 109:2487-2491
- 20 32. Douglas W.L., Dimmeler S. (2004), "Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic diseases. Part II: Cell-based therapy," *Circulation* 109:2692-2697
33. Eglitis MA, Mezey E (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4080-4085.
34. Bonilla S, Alarcon P, Villaverde R, Aparicio P, Silva A, Martinez S (2002) Haematopoietic progenitor cells from adult bone marrow differentiate into cells that express oligodendroglial antigens in the neonatal mouse brain. *Eur J Neurosci* 15:575-582.
- 25 35. Corti S, Locatelli F, Strazzer S, Salam S, Del Bo R, Soligo D, Bossolasco P, Bresolin N, Scarlato G, Comi GP (2002) Modulated generation of neuronal cells from bone marrow by expansion and mobilization of circulating stem cells with in vivo cytokine treatment. *Exp Neurol* 177:443-452.
36. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290:1775-1779.
- 30 37. Mezey E, Chandross KI, Harta G, Maki RA, McKercher SR (2000), Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290:1779-1782.
38. Priller J, Persons DA, Klett FF, Kempermann G, Kreutzberg GW, Dimagl U (2001b) Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J Cell Biol* 155:733-738.
- 35 39. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL (2002) Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297:2256-2259.
- 40 40. Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ. et al. (2003), "HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver," *J Clin Invest.* 112(2):160-9
41. Eglitis MA, Dawson D, Park KW, Mouradian MM (1999) Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. *Neuroreport* 10:1289-1292.
- 40 42. Priller I, Fogel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernandez-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dimagl U (2001a) Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 7:1356-1361.
43. Bianco, P. and Robey P.G. (2001), "Stem cells in tissue engineering," *Nature* 414:118-121
- 45 44. Lagasse E. et al. (2001), "Toward regenerative medicine," *Immunity* 14:425-436

45. Li Y, Cbopp M, Chen J, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Zhang Z (2000) Intrastratial transplantation of bone marrow nonhemaiopoietic cells improves factional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 1311-1319
- 5 46. Li Y, Chen J, Wang L, Lu M, Chopp M (2001a) Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology* 56:1666-1672
47. Chen I, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M (2001) Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32:1005-1011.
- 10 48. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC (2002) Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats *Exp Neurol* 174:11-20
49. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M (2002) Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res* 90:284-288
50. Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, Carroll J, Brailer J, Carothers J (2002) Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke. *Stroke* 33:1362-1368
- 15 51. Li Y, Chen J, Wang L, Zhang L, Lu M, Chopp M (2001b) Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 316:67-70
52. Mahmood A, Lu D, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M (2001) Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* 49:1196-1203
- 20 53. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, Olson L (2002) Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2199-2204
54. Akiyama Y, Radtke C, Kocsis JD (2002) Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J Neurosci* 22:6623-6630
- 25 55. Hershinkel M, Moran A, Grossman N et al. A zinc-sensing receptor triggers the release of intracellular Ca<sup>2+</sup> and regulates ion transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:1 1749-1 1754

**Sumario de la invención**

La invención proporciona una composición de materia, derivada mediante la estimulación in vitro de una población de células centrales (CCP) derivada de la sangre de al menos 5 millones de células que tienen una densidad de menos de 1,072 g/ml, y al menos 1,5% de las cuales son CD34+CD45-/débil, con factores de crecimiento para diferenciarse en una población de células progenitoras/precursoras neurales (NPCP), donde la composición de materia comprende la NPCP, donde la NPCP comprende células que expresan uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: Neu-N, nestina y beta-tubulina y células que expresan uno o más de CD34 y CD117.

30

En el contexto de la presente solicitud de patente y en las reivindicaciones, una "población de células centrales" (CCP) es una población de al menos 5 millones de células que tienen una densidad de menos de 1,072 g/ml, y al menos 1,5% de las cuales son CD34+CD45-/débil. (Es decir, al menos 75.000 de las células son (a) CD34 positivas y (b) CD45 negativas o CD45 débil.)

35

Para algunas aplicaciones, al menos el 2% de los 5 millones de células son CD34+CD45-/débil. (Es decir, al menos 100.000 de las células son (a) CD34 positivas y (b) CD45 negativas o CD45 débil.)

40 Se describe en este documento un método para producir una población de células progenitoras/precursoras neurales (NPCP), que comprende (a) procesar células extraídas de un donante de células de mamífero para producir una CCP, y (b) estimular la CCP para que se diferencie en la población de células progenitoras/precursoras neurales. En el contexto de la presente solicitud de patente y en las reivindicaciones, las células "progenitoras/precursoras" son células parcialmente diferenciadas que pueden dividirse y dar lugar a células diferenciadas.

45

Mientras que para algunas aplicaciones descritas en este documento la densidad de las células en la CCP es inferior a 1,072 g/ml (como se describe), para algunas aplicaciones, la CCP tiene al menos 5 millones de células que tienen una densidad inferior a 1,062 g/ml.

50 En el contexto de la presente solicitud de patente, una "población de células elementales" (ECP) es una población de al menos 5 millones de células que tienen una densidad de menos de 1,072 g/ml, de las cuales al menos 1,5% son CD34+CD45-/débil, y al menos el 30% de los cuales son CD14+.

Típicamente, pero no necesariamente, al menos el 30% o el 40% de las células en la ECP son CD14+. Alternativa o adicionalmente, al menos el 40%, 50%, 60% o 70% de las células son CD31+.

5 Típicamente, pero no necesariamente, al menos el 2% de las células en la ECP son CD34+CD45-/débil. Para algunas aplicaciones, la ECP tiene al menos 5 millones de células que tienen una densidad de menos de 1,062 g/ml. Típicamente, pero no necesariamente, el caso es que una CCP también es una ECP. Se observa que los procedimientos descritos en el presente documento con respecto a una CCP, también se pueden realizar en relación con una ECP.

10 Para algunas aplicaciones, las células progenitoras derivadas de CCP se usan como un producto celular terapéutico (por ejemplo, para terapia contra el cáncer, para regeneración de tejidos, para ingeniería de tejidos y/o para reemplazo de tejidos), como una herramienta de investigación (por ejemplo, para la investigación de transducción de señales, o para la detección de factores de crecimiento), y/o como herramienta de diagnóstico y/o para terapia génica. Cuando las células progenitoras derivadas de CCP y/o cuando las células parcialmente diferenciadas derivadas de CCP se usan como un producto celular terapéutico, generalmente se administran a un paciente, en el que las células progenitoras maduran en los tipos celulares deseados (p. ej., neuronas, astrocitos, células gliales, oligodendrocitos, fotorreceptores, etc.). Alternativamente, las células completamente diferenciadas derivadas de CCP se usan como un producto celular terapéutico y, típicamente, se administran a los pacientes, pudiéndose regenerar la estructura y/o función de su tejido dañado.

20 Un resultado de una etapa en un procedimiento descrito en este documento se usa como indicador de diagnóstico. Por ejemplo, puede indicarse patología en un paciente si, en un procedimiento in vitro realizado en sangre extraída del paciente, éste no produce una CCP, cuando el mismo procedimiento produciría una CCP a partir de células extraídas de un voluntario sano. Alternativa o adicionalmente, puede indicarse patología en un paciente si, en un procedimiento de estimulación in vitro realizado en una CCP autóloga, éste no produce un número deseado de una clase particular de células progenitoras, cuando el mismo procedimiento produciría el número deseado de una clase particular de células progenitoras de una CCP derivada de células de un voluntario sano.

25 Cuando las células madre hematopoyéticas se utilizan como células fuente para crear la CCP, la CCP resultante se caracteriza típicamente, pero no necesariamente, porque al menos el 30% o el 40% de las células en la CCP son CD14+, al menos el 40%, 50%, 60% o 70% de las células en la CCP son CD31+, y/o al menos 2,2% o al menos 2,5% de las células son CD34+CD45-/débil.

30 Típicamente, pero no necesariamente, el procedimiento de estimulación de la CCP dura entre aproximadamente 3 y aproximadamente 15 días, o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 60 días. Alternativamente, estimular la CCP lleva menos de 3 días, o más de 60 días.

35 El donante de células de mamífero puede ser humano o no humano, según corresponda. Para algunas aplicaciones, el donante de células de mamífero finalmente recibe una administración de un producto derivado de la CCP, mientras que para otras aplicaciones, el donante de células de mamífero no recibe dicho producto. Células madre que pueden usarse para producir la CCP pueden derivarse específicamente de uno o más de los siguientes: sangre del cordón umbilical, médula ósea, sangre movilizada o células mononucleares de sangre periférica.

40 La CCP se prepara típicamente generando u obteniendo una suspensión de células individuales de una de estas fuentes. Por ejemplo, las células mononucleares de sangre movilizadas se pueden extraer usando un gradiente de densidad de 1,077 g/ml (por ejemplo, un gradiente Ficoll (TM), que incluye copolímeros de sacarosa y epiclorhidrina). (Se observa que dicho gradiente no se usa para todas las aplicaciones, por ejemplo, para aplicaciones en las que se genera una suspensión de una sola célula a partir de una fuente no hematopoyética tal como células del bulbo olfatorio, la mucosa o la piel.) La salida de este gradiente generalmente se pasa a través de un segundo gradiente (p. ej., un gradiente Percoll (TM), que incluye coloides de sílice recubiertos de polivinilpirrolidona), adecuado para seleccionar células que tienen una densidad inferior a 1,072 g/ml o inferior a 45 1,062 g/ml. Estas células seleccionadas se incrementan típicamente en número, in vitro, hasta que se convierten en una CCP. Según corresponda, se pueden usar otros gradientes de densidad, además o en lugar de los citados anteriormente. Por ejemplo, también se puede usar un gradiente OptiPrep (TM), que incluye una solución acuosa de Iodixanol, y/o un gradiente Nycodenz (TM).

50 La CCP se estimula típicamente para generar células progenitoras neurales de una o más de las siguientes clases de células:

neuronas del SNC;

oligodendrocitos;

astrocitos;

neuronas del sistema nervioso periférico (SNP); y

células de la retina (incluidas, entre otras, los fotorreceptores, células de epitelio pigmentario o células ganglionares de la retina).

5 Para algunas aplicaciones, la CCP se transfecta con un gen antes de la estimulación de la CCP, por lo que la CCP se diferencia en una población de células progenitoras deseadas que contienen el gen transfectado. Típicamente, estas células progenitoras se administran luego a un paciente. Alternativa o adicionalmente, se transfecta un gen en la población de células progenitoras/precursoras neurales para su uso en terapia génica.

10 Para estimular que la CCP se diferencie en una clase deseada de células progenitoras, o en asociación con la estimulación de la CCP para diferenciarse en una clase deseada de células progenitoras, la CCP típicamente se cocultiva directa o indirectamente con "tejido diana" de un órgano representando un estado final deseado de las células progenitoras. Por ejemplo, el tejido diana puede incluir cerebro o tejido similar cuando se desea que las células progenitoras se diferencien en tejido cerebral. Otros ejemplos incluyen:

(a) cocultivar la CCP con nervios periféricos (y/o cultivar la CCP en medio condicionado derivado del mismo), para inducir la diferenciación de la CCP en neuronas periféricas;

15 (b) cocultivar la CCP con nervios del sistema nervioso central (SNC) (y/o cultivar la CCP en medio acondicionado derivado del mismo), para inducir la diferenciación de la CCP en neuronas del SNC;

(c) cocultivar la CCP con tejido retiniano (y/o cultivar la CCP en medio acondicionado derivado del mismo), para inducir la diferenciación de la CCP en tejido retiniano. El tejido retiniano puede incluir, por ejemplo, uno o más de: epitelio pigmentario o fotorreceptores. Según sea apropiado, el tejido retiniano puede comprender tejido retiniano fetal, tejido retiniano embrionario o tejido retiniano maduro.

20 Aunque en algunas realizaciones, el cocultivo se realiza con tejidos de muestra que son tejidos diana, como se describió anteriormente, en otras realizaciones, la CCP se cocultiva directa o indirectamente con un tejido de muestra que no representa en sí mismo un estado final deseado de las células progenitoras.

25 Para algunas aplicaciones, se usan rodajas o un homogeneizado del tejido objetivo para el cocultivo, aunque otras técnicas para preparar el tejido diana serán evidentes para las personas con conocimientos ordinarios en la técnica que hayan leído la descripción de la presente solicitud de patente.

30 El tejido diana puede estar esencialmente en contacto directo con la CCP, o separado de la misma por una membrana semipermeable. Según corresponda, el tejido diana puede ser autólogo, singénico, alogénico o xenogénico con respecto al tejido fuente a partir del cual se produjo la CCP. Alternativa o adicionalmente, la CCP se cultiva en un medio acondicionado hecho usando tejido diana (por ejemplo, el tejido diana descrito anteriormente), que es autólogo, singénico, alogénico o xenogénico con respecto al tejido fuente del cual se produjo la CCP. Para algunas aplicaciones, el tejido diana y la CCP se cultivan juntos en el medio acondicionado. Se observa que la fuente del tejido diana también puede ser tejido de un cadáver, y/o puede estar liofilizado, fresco o congelado.

35 Para producir una clase deseada de células progenitoras, las células de la CCP se pueden cultivar en presencia de estimulación causada por "factores de estimulación", por ejemplo, uno o más anticuerpos, citocinas y/o factores de crecimiento tales como: anti-CD34, anti-CD133, anti-CD117, LIF, EPO, IGF, b-FGF, M-CSF, GM-CSF, TGF alfa, TGF beta, VEGF, BHA, B27, F12, BDNF, GDNF, NGF, NT3, NT4/5, S-100, CNTF, EGF, NGF3, CFN, ADMIF, estrógeno, prolactina, un adrenocorticoide, glutamato, serotonina, acetilcolina, NO, ácido retinoico (RA), heparina, insulina, forskolina y/o cortisona, y/o un derivado de uno de estos. Debe apreciarse que los factores de estimulación particulares descritos en este documento son a modo de ilustración y no de limitación. Según sea apropiado, estos pueden utilizarse a una concentración de entre aproximadamente 100 pg/ml y aproximadamente 100 µg/ml (o equivalentes molares). En algunos casos, se añaden aditivos de medios a proporciones en volumen de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:30, o de aproximadamente 1:30 a aproximadamente 1:500 del volumen total del medio. Típicamente, los factores de estimulación particulares se seleccionan de acuerdo con la clase particular de células progenitoras deseadas (por ejemplo, para inducir células progenitoras neurales, se usan uno o más de los siguientes factores de estimulación o aditivos de medios: BHA, BDNF, NGF, NT3, NT4/5, EGF, NGF3, S-100, CNTF, GDNF, CFN, ADMIF, B27, F12 y acetilcolina).

50 Para algunas aplicaciones, los factores de estimulación se introducen en la CCP en forma soluble, y/o en forma agregada, y/o se unen a una superficie de una placa de cultivo. En una realización, la CCP se incuba en una superficie que comprende una molécula que mejora el crecimiento que no sea colágeno o fibronectina. La molécula potenciadora del crecimiento puede comprender, por ejemplo, BDNF u otro anticuerpo o factor adecuado descrito en este documento. Según corresponda, la molécula que mejora el crecimiento puede mezclarse con colágeno o fibronectina, o puede recubrirse en la superficie en una capa separada de una capa en la superficie que comprende colágeno o fibronectina. Alternativamente, la única molécula o únicas moléculas que mejoran el crecimiento en la superficie es el colágeno y/o la fibronectina y/o el plasma autólogo.

55 Después de la estimulación de la CCP, el producto resultante se prueba típicamente para verificar que se ha diferenciado en una forma deseada. Por ejemplo, cuando las células progenitoras neurales son el producto deseado, el producto típicamente comprende uno o más de: CD34, CD117, CD44, Neu-N, nestina, proteína 1 asociada a

5 microtúbulos (MAP-1), MAP Tau, proteína-2 asociada a microtúbulos (MAP-2), neurofilamento NF200, enolasa neuronal específica (NSE), colina acetiltransferasa (ChAT) [beta]-Tubulina neuronal clase III, ácido glutámico descarboxilasa (GAD), ácido glutámico, ácido gamma-aminobutírico (GABA), marcador de oligodendrocitos (O4), proteína básica de mielina (MBP), galactocerebrosida (GalC), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), CD211b, dopamina, norepinefrina, epinefrina, glicina, glutamato, acetilcolina, serotonina y endorfina. El sobrenadante también puede incluir uno o más de los anteriores, o neurotrofinas, tales como S-100, GDNF, CNTF, BDNF, NGF, NT3, NT4/5, que pueden ser secretadas por la NPCP.

10 Típicamente, más del 1,5% de la población celular muestra una o más de estas moléculas. Alternativa o adicionalmente, las células progenitoras neurales son típicamente positivas para uno o más de: Nestina, NSE, Notch, numb, Musashi-1, presenilina, FGFR4, Fz9, SOX 2, GD2, rodopsina, recoverina, calretinina, PAX6, RX y Chx10.

15 Para algunas aplicaciones, se realiza un esfuerzo para minimizar el tiempo transcurrido desde la recolección de las células del donante de células hasta que se usan las células progenitoras derivadas de CCP (por ejemplo, para la administración a un paciente). Alternativamente, las células se conservan en uno o más puntos del procedimiento. Por ejemplo, la CCP puede congelarse antes de la estimulación de éstas que genera células progenitoras. En otro ejemplo, la CCP se estimula para generar células progenitoras deseadas, y estas células progenitoras se congelan. En cualquiera de estos casos, las células congeladas pueden almacenarse y/o transportarse para su posterior descongelación y uso.

20 A modo ilustrativo y no limitativo, se observa que ciertas aplicaciones son adecuadas para la comercialización a gran escala, incluida la congelación y el transporte, como (a) generación de tiendas de CCP, (b) generación de tiendas de NPCP y (c) bancos de células madre donde los individuos pueden almacenar una CCP o células NPCP diferenciadas, para su posible uso posterior. "Transporte", en este contexto, significa el transporte a un sitio remoto, por ejemplo, un sitio a más de 10 km o 100 km de distancia del sitio donde se creó la CCP por primera vez.

25 Para algunas aplicaciones, la CCP se cultiva durante un período que dura entre aproximadamente 1 y aproximadamente 60 días en un medio de cultivo sin suero (libre de suero) o en un medio de cultivo que comprenda menos de aproximadamente 5% de suero. Alternativamente, la CCP se cultiva durante un período que dure entre aproximadamente 1 y aproximadamente 60 días en un medio de cultivo que comprenda más de aproximadamente 10% de suero. Uno de estos períodos sigue al otro de estos períodos.

30 Para algunas aplicaciones, la CCP se cultiva, en condiciones sin suero o con bajo contenido de suero durante un cierto período, en un medio de cultivo que comprenda menos de aproximadamente 10% de suero (por ejemplo, menos de 1% o 0,01% de suero, o que esté libre de suero), y, en condiciones de mucho suero durante otro período, en un medio de cultivo que comprenda más o igual a aproximadamente 10% de suero. El cultivo de la CCP durante el período sin suero o con bajo contenido en suero puede comprender cultivar la CCP durante un período de tiempo comprendido entre aproximadamente 1 y aproximadamente 60 días. Alternativa o adicionalmente, el cultivo de CCP durante el período de tiempo de mucho suero comprende el cultivo de CCP durante entre aproximadamente 1 y aproximadamente 60 días. Típicamente, el cultivo de CCP durante el período libre de suero o bajo en suero se realiza antes de cultivar la CCP durante el período de tiempo de mucho suero. Alternativamente, el cultivo de CCP durante el período de tiempo bajo en suero se realiza después de cultivar la CCP durante el período de tiempo alto en suero.

40 Para algunas aplicaciones, la CCP se cultiva en presencia de uno o más agentes potenciadores de la diferenciación de la proliferación, como anti-CD34, anti-CD133, anti-CD117, LIF, EPO, IGF, b-FGF, M-CSF, GM-CSF, TGF alfa, TGF beta, VEGF, BHA, B27, F12, BDNF, NGF, NT3, NT4/5, S-100, CNTF, GDNF, EGF, NGF3, CFN, ADMIF, estrógeno, prolactina, un adrenocorticoide, glutamato, serotonina, acetilcolina, NO, ácido retinoico (AR), heparina, insulina, forskolina y/o cortisona, y/o un derivado de cualquiera de estos.

45 Las técnicas descritas en el presente documento se ponen en práctica en combinación con (a) técnicas descritas en una o más de las referencias citadas en el presente documento, (b) técnicas descritas en los documentos US2008/0220466 y/o WO 2005/120090 del 2004, y/o (c) técnicas descritas en el documento WO 2006/064501.

50 Se proporciona un método que comprende cultivar la CCP en un primer recipiente durante una primera porción de un período de cultivo; eliminar, al menos, algunas células de la CCP del primer recipiente al final de la primera parte del período; y cultivar, en un segundo recipiente durante una segunda parte del período, las células retiradas del primer recipiente. Por ejemplo, eliminar, al menos, algunas de las células de CCP puede comprender seleccionar células de eliminación que se adhieran a una superficie del primer recipiente.

55 Si las células de una población de células progenitoras/precursoras derivadas de una CCP se van a trasplantar a un ser humano, generalmente deben estar libres de cualquier contaminación bacteriana o viral. Además, en el caso de un NPCP, se deben cumplir las siguientes condiciones:

(I) Las células deben caracterizarse morfológicamente como (a) de mayor tamaño que los linfocitos, y/o (b) con periferia irregular, desde la cual se extienden extensiones filamentosas o tubulares, en contacto con las células vecinas y formando organizaciones similares a redes, y/o (c) granulada o nucleada en la oscuridad.

- (II) La suspensión celular final generalmente debe contener al menos 1 millón de células que expresen uno o más de los siguientes: CD34, CDI 17, CD44, Neu-N, nestina, proteína 1 asociada a microtúbulos (MAP-1), MAP Tau, proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2), neurofilamento NF200, enolasa neuronal-específica (NSE), colina acetiltransferasa (ChAT), beta-Tubulina neuronal clase III, descarboxilasa de ácido glutámico (GAD), ácido glutámico, ácido gamma-aminobutírico (GABA), marcador de oligodendrocitos (O4), proteína básica de mielina (MBP), galactocerebrosida (GalC), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), CD21 1b, dopamina, norepinefrina, epinefrina, glutamato, glicina, acetilcolina, serotonina y endorfina. El sobrenadante también puede incluir uno o más de los anteriores, o neurotrofinas, tales como S-100, GDNF, CNTF, BDNF, NGF, NT3, NT4/5, que pueden ser secretadas por el NPCP.
- 5
- 10 Se observa que las células en las CCP generadas a partir de diversos tejidos típicamente se pueden caracterizar por tener una viabilidad superior al 80%.
- Se observa que las CCP generadas a partir de sangre, médula ósea y sangre del cordón umbilical típicamente tienen más del 70% de sus células, siendo éstas del tipo CD45+.
- 15 Por lo tanto, se proporciona, un método que incluye estimular in vitro una población de células centrales (CCP) de al menos 5 millones de células que tienen una densidad de menos de 1,072 g/ml, y al menos 1,5% de los cuales son CD34+CD45-/débil, para diferenciarse en una población de células progenitoras/precursoras neurales (NPCP).
- En una realización, la CCP incluye al menos 5 millones de células que tienen una densidad de menos de 1,062 g/ml, de las cuales al menos el 2% son CD34+CD45-/débil, y donde estimular la CCP incluye estimular la CCP que tiene al menos 5 millones de células que tienen una densidad de menos de 1,062 g/ml.
- 20 En una realización, al menos 1,5 millones de las células en el NPCP y al menos el 1,5% de las células en el NPCP incluyen al menos una molécula o estructura molecular seleccionada de la lista que consiste en: CD34, CD117, CD44, Neu-N, nestina, proteína 1 asociada a microtúbulos (MAP-1), MAP Tau, proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2), neurofilamento NF200, enolasa específica de neurona (NSE), colina acetiltransferasa (ChAT), beta-Tubulina neuronal clase III, ácido glutámico descarboxilasa (GAD), S-100, GDNF, CNTF, BDNF, NGF, NT3, NT4/5,
- 25 ácido glutámico, ácido gamma-aminobutírico (GABA), marcador de oligodendrocitos (O4), proteína básica de mielina (MBP), galactocerebrosido (GalC), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), CD211b, dopamina, norepinefrina, epinefrina, glutamato, glicina, acetilcolina, serotonina y endorfina.
- El método puede incluir preparar la NPCP como una herramienta de investigación.
- 30 En una realización, estimular la CCP puede incluir solo estimular la CCP si la CCP se deriva de un donante mamífero.
- El método puede incluir aplicar células extraídas de un donante mamífero a uno o más gradientes adecuados para seleccionar células que tengan una densidad inferior a 1,072 g/ml, y derivar la CCP sensible a la aplicación de las células al gradiente.
- En una realización, la CCP se caracteriza porque al menos el 2% de la CCP es CD34+CD45-/débil.
- 35 En una realización, la CCP se caracteriza por que al menos el 2,5% de la CCP es CD34+CD45-/débil.
- En una realización, la CCP se caracteriza porque al menos el 50% de la CCP es CD14+.
- En una realización, la CCP se caracteriza porque al menos el 30% de la CCP es CD14+.
- En una realización, la CCP se caracteriza porque al menos el 70% de la CCP es CD31+.
- En una realización, la CCP se caracteriza por que al menos el 40% de la CCP es CD31+.
- 40 En una realización, estimular la CCP incluye estimular la CCP para que se diferencie en una clase de células progenitoras neurales deseadas previamente designadas.
- En una realización, estimular la CCP incluye cultivar la CCP durante un período de entre 3 y 60 días in vitro.
- El método puede incluir derivar la CCP de al menos una fuente seleccionada de la lista que consiste en: sangre del cordón umbilical, tejido del cordón umbilical, tejido neonatal, tejido adulto, tejido adiposo, tejido nervioso, médula ósea, sangre movilizada, sangre periférica, células mononucleares de sangre periférica y tejido de la piel.
- 45 El método puede incluir derivar la CCP de al menos una fuente seleccionada de la lista que consiste en: tejido fresco y tejido congelado.
- El método puede incluir identificar un receptor previsto de la NPCP y derivar la CCP de al menos una fuente seleccionada de la lista que consiste en: tejido autólogo al tejido del receptor previsto, tejido singénico al tejido del receptor previsto, tejido alogénico al tejido del receptor previsto, y tejido xenogénico al tejido del receptor previsto.
- 50

En una realización, estimular la CCP incluye incubar la CCP en un recipiente que tenga una superficie que incluya al menos uno de: un anticuerpo y plasma autólogo.

En una realización, estimular la CCP incluye cultivar la CCP durante un período que dure entre 1 y 5 días en un medio de cultivo que incluya menos del 0,01% de suero.

- 5 En una realización, estimular la CCP incluye cultivar la CCP durante un período que dure entre 1 y 5 días en un medio de cultivo que incluya menos del 5% de suero.

En una realización, estimular la CCP incluye cultivar la CCP durante un período que dure entre 1 y 5 días en un medio de cultivo que incluya al menos 10% de suero.

- 10 En una realización, estimular la CCP incluye cultivar la CCP en presencia de al menos uno de los siguientes: B27, F12, un agente potenciador de la diferenciación y proliferación, anti-CD34, anti-CD117, LIF, IGF, b-FGF, M-CSF, GM-CSF, TGF-alfa, TGF-beta, BHA, BDNF, NGF, NT3, NT4/5, S-100, GDNF, CNTF, EGF, NGF3, CFN, ADMIF, estrógeno, prolactina, un adrenocorticoide, glutamato, serotonina, acetilcolina, ácido retinoico (AR), heparina, insulina, forskolina, cortisona y un derivado de cualquiera de estos.

- 15 El método puede incluir preparar la CCP y facilitar un diagnóstico que responda a una característica de la preparación de la CCP.

El método puede incluir congelar la CCP antes de estimular la CCP.

El método puede incluir congelar la NPCP.

El método puede incluir transportar la CCP a un sitio al menos a 10 km de un sitio donde se haya creado la CCP por primera vez, y estimular la CCP en el sitio remoto.

- 20 El método puede incluir transportar la NPCP a un sitio al menos a 10 km de un sitio donde se haya creado la NPCP por primera vez.

El método puede incluir transfectar un gen en la NPCP y, posteriormente, evaluar el nivel de expresión de dicho gen.

El método puede incluir transfectar un gen en la CCP y, posteriormente, evaluar el nivel de expresión de dicho gen.

El método puede incluir transfectar en la NPCP un gen identificado como adecuado para terapia génica.

- 25 El método puede incluir transfectar un gen en la CCP antes de estimular la CCP.

La transfección del gen puede incluir la transfección en la CCP de un gen identificado como adecuado para la terapia génica.

El método puede incluir preparar, como un producto para la administración a un paciente, la NPCP generada por diferenciación de la CCP en la que se ha transfectado el gen.

- 30 El método puede incluir preparar la NPCP como un producto para la administración a un paciente.

El paciente puede tener una afección seleccionada de la lista que consiste en: una consecuencia neural de un ataque isquémico transitorio (AIT), una consecuencia neural de un accidente cerebrovascular isquémico, una enfermedad circulatoria, neuropatía hipertensiva, trombosis venosa, un trastorno cerebrovascular, un trastorno cerebrovascular causado por sangrado, una consecuencia neural de hemorragia intracerebral, una consecuencia neural de hemorragia subdural, una consecuencia neural de hemorragia epidural, una consecuencia neural de hemorragia subaracnoidea, una consecuencia neural de una malformación arteriovenosa, demencia relacionada con Alzheimer, demencia no relacionada con Alzheimer, demencia vascular, demencia por SIDA, degeneración hereditaria, síndrome de Batten, lesión traumática del SNC, una consecuencia neural de una neoplasia del SNC, una consecuencia neural de la cirugía del sistema nervioso periférico, una consecuencia neural de la cirugía del sistema nervioso central, una lesión por radiación al SNC, una consecuencia neural de una infección del SNC, la enfermedad de Parkinson, un síndrome coreoatetoide, una parálisis supranuclear progresiva, degeneración espinocerebelosa, esclerosis múltiple, enfermedades desmielinizantes, encefalomiелitis diseminada aguda, adrenoleucodistrofia, neuromielitis óptica, un déficit neural debido a parálisis cerebral, una consecuencia neurológica de hidrocefalia, atrofia óptica de Leber, enfermedad de miocondrosis, epilepsia mioclónica asociada con las fibras rojas rotas (MERRF), encefalomiopátia mitocondrial, enfermedad de las neuronas motoras, atrofia muscular progresiva, esclerosis lateral amiotrófica, lesión del nervio craneal, síndrome de Homer, oftalmoplejía internuclear, síndrome de Parinaud, parálisis de la mirada, consecuencia neural por intoxicación, consecuencia neural por envenenamiento, degeneración retiniana adquirida, degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), retinopatía miope, enfermedad de Best, coroidoretinopatía serosa central, retinopatía vascular, retinopatía diabética, retinopatía hipertensiva, glaucoma, retinitis pigmentosa, retinopatía hereditaria, un agujero retinal, una lesión mecánica oftálmica que afecta a la retina, una lesión por radiación que afecta a la retina, una oclusión vascular retiniana, un

déficit retiniano causado por desprendimiento de retina, una enfermedad del oído interno, degeneración del sistema nervioso periférico, lesión del sistema nervioso periférico y una lesión vascular del sistema nervioso periférico.

El método puede incluir facilitar un diagnóstico sensible a la estimulación de la CCP para diferenciarse en la NPCP.

5 Facilitar el diagnóstico puede incluir evaluar en qué medida la estimulación de la CCP produce una característica particular de la NPCP.

En una realización, estimular la CCP puede incluir incubar la CCP en un recipiente con una superficie que incluya una molécula que mejore el crecimiento, que no sea ni colágeno ni fibronectina.

En una realización, incubar la CCP incluye incubar la CCP en un recipiente con una superficie que incluya, además de la molécula de mejora del crecimiento, al menos uno de: colágeno, fibronectina y plasma autólogo.

10 En una realización, mezclar la molécula que mejora el crecimiento con al menos uno de: colágeno, fibronectina y plasma autólogo.

En una realización, se aplica a la superficie una capa que incluye la molécula que mejora el crecimiento y una capa separada que incluye al menos uno de: colágeno, fibronectina y plasma autólogo.

En una realización, la estimulación de la CCP incluye:

15 durante un período de tiempo con poco suero, cultivar la CCP en un medio de cultivo que incluya menos del 10% de suero; y

durante un período de tiempo con mucho suero, cultivar la CCP en un medio de cultivo que incluya más o igual al 10% de suero.

20 En una realización, el cultivo de la CCP en el medio de cultivo que incluye menos del 10% de suero incluye el cultivo de la CCP en un medio de cultivo que incluye menos del 0,01% de suero.

En una realización, el cultivo de la CCP durante el período de tiempo con poco suero incluye el cultivo de CCP durante entre 1 y 5 días.

En una realización, el cultivo de la CCP durante el período de tiempo de mucho suero incluye el cultivo de CCP durante entre 1 y 30 días.

25 En una realización, el cultivo de la CCP durante el período de tiempo con poco suero se realiza antes de cultivar la CCP durante el período de tiempo con mucho suero.

En una realización, el cultivo de la CCP durante el período de tiempo con poco suero se realiza después de cultivar la CCP durante el período de tiempo con mucho suero.

En una realización, estimular la CCP incluye:

30 cultivar la CCP en un primer recipiente durante una primera porción de un período de cultivo;

eliminar, al menos, algunas células de la CCP del primer recipiente al final de la primera parte del período; y

cultivar, en un segundo recipiente durante una segunda parte del período, las células retiradas del primer recipiente.

En una realización, la eliminación de al menos algunas células de la CCP incluye la selección de células de eliminación que se adhieren a una superficie del primer recipiente.

35 En una realización, eliminar al menos algunas células de la CCP incluye seleccionar células de eliminación que no se adhieren a una superficie del primer recipiente.

En una realización, el primer recipiente incluye en una superficie del mismo una molécula que mejora el crecimiento, y en donde el cultivo de la CCP en el primer recipiente incluye el cultivo de la CCP en el primer recipiente que incluye la molécula que mejora el crecimiento.

40 En una realización, la molécula potenciadora del crecimiento se selecciona de la lista que consiste en: colágeno, fibronectina, plasma autólogo, un factor de crecimiento y un anticuerpo para un receptor de superficie de células madre.

45 En una realización, el segundo recipiente incluye en una superficie del mismo una molécula que mejora el crecimiento, y en donde el cultivo de la CCP en el segundo recipiente incluye el cultivo de la CCP en el segundo recipiente que incluye la molécula que mejora el crecimiento.

En una realización, la molécula potenciadora del crecimiento se selecciona de la lista que consiste en: colágeno, fibronectina, plasma autólogo, un factor de crecimiento y un anticuerpo para un receptor de superficie de células madre.

En una realización, la estimulación incluye cultivar la CCP con al menos un factor derivado de un tejido diana.

- 5 El método puede incluir preparar un medio acondicionado para cultivar la CCP en él, incluyendo el medio acondicionado el factor, siendo derivado el factor de un tejido seleccionado de la lista que consiste en: tejido nervioso periférico, tejido del sistema nervioso central (SNC), tejido retiniano, tejido epitelial pigmentado, tejido fotorreceptor, tejido retiniano fetal, tejido retiniano embrionario y tejido retiniano maduro.

En una realización, la estimulación incluye el cocultivo de la CCP con un tejido diana.

- 10 En una realización, el cocultivo incluye preparar el tejido diana mediante un método seleccionado de la lista que consiste en: cortar el tejido diana, homogeneizar el tejido diana, congelar el tejido diana, procesar el tejido diana por ultrasonido y procesar el tejido diana mediante radiación sin ultrasonido.

En una realización, el cocultivo incluye:

utilizar el tejido diana para producir un medio acondicionado; y

- 15 cocultivar la CCP con el tejido diana en el medio acondicionado.

En una realización, el cocultivo incluye separar el tejido diana de la CCP por una membrana semipermeable.

El método puede incluir designar el tejido diana para que incluya un tejido seleccionado de la lista que consiste en: tejido nervioso periférico, tejido del sistema nervioso central (SNC), tejido retiniano, tejido epitelial pigmentado, tejido fotorreceptor, tejido retiniano fetal, tejido retiniano embrionario y tejido retiniano maduro.

- 20 También se proporciona un método que incluye estimular in vitro una población de células centrales (CCP) de al menos 5 millones de células que tienen una densidad de menos de 1,072 g/ml, y al menos 1,5% o al menos 2% de los cuales son CD34+CD45-/débil, para diferenciarse en una población de células progenitoras/precursoras (PCP), como una población de células progenitoras/precursoras neurales (NPCP) o una población de células progenitoras/precursoras no neurales.

- 25 Para algunas aplicaciones, la CCP incluye al menos 5 millones de células que tienen una densidad de menos de 1,062 g/ml, de las cuales al menos el 2% son CD34+CD45-/débil, y estimular la CCP incluye estimular la CCP que tiene al menos 5 millones de células que tienen una densidad de menos de 1,062 g/ml.

Para algunas aplicaciones, el método incluye preparar la PCP como producto para la administración a un paciente. Alternativamente, el método incluye preparar la PCP como herramienta de investigación.

- 30 Para algunas aplicaciones, estimular la CCP incluye solo estimular la CCP si la CCP se deriva de un donante mamífero. Para algunas aplicaciones, el método incluye aplicar células extraídas de un donante mamífero a uno o más gradientes adecuados para seleccionar células que tengan una densidad inferior a 1,072 g/ml, y derivar la CCP sensible a la aplicación de las células al gradiente.

- 35 Para algunas aplicaciones, la CCP se caracteriza porque al menos el 2,5% de la CCP es CD34+CD45-/débil, y estimular la CCP incluye estimular la CCP que tiene al menos el 2,5% de la CCP que son CD34+CD45-/débil. Para algunas aplicaciones, la CCP se caracteriza porque al menos el 50% de la CCP es CD14+, y estimular la CCP incluye estimular la CCP que tiene al menos el 50% de la CCP que es CD14+. Para algunas aplicaciones, la CCP se caracteriza porque al menos el 30% de la CCP es CD14+, y estimular la CCP incluye estimular al CCP que tiene al menos el 30% de la CCP que es CD14+. Para algunas aplicaciones, la CCP se caracteriza porque al menos el 40% o al menos el 70% de la CCP es CD31+, y estimular la CCP incluye estimular la CCP que tiene al menos el 40% o al menos el 70% de la CCP que son CD31+.

Para algunas aplicaciones, estimular la CCP incluye estimular la CCP para que se diferencie en una clase anteriormente designada y deseada de células progenitoras.

Para algunas aplicaciones, estimular la CCP incluye cultivar la CCP durante un período de entre 3 y 60 días in vitro.

- 45 Para algunas aplicaciones, el método incluye derivar la CCP de al menos una fuente seleccionada de la lista que consiste en: sangre del cordón umbilical, tejido del cordón umbilical, tejido neonatal, tejido adulto, tejido adiposo, tejido nervioso, médula ósea, sangre movilizada, sangre periférica, células mononucleares de sangre periférica y células de la piel. Alternativamente, el método incluye derivar la CCP de al menos una fuente seleccionada de la lista que consiste en: tejido fresco y tejido congelado. Para algunas aplicaciones, el método incluye identificar un receptor previsto de la NPCP y derivar la CCP de al menos una fuente seleccionada de la lista que consiste en: tejido autólogo al tejido del receptor previsto, tejido singénico al tejido del receptor previsto, tejido alogénico al tejido del receptor previsto, y tejido xenogénico al tejido del receptor previsto.
- 50

Para algunas aplicaciones, estimular la CCP incluye incubar la CCP en un recipiente que tiene una superficie que incluye un anticuerpo.

5 Para algunas aplicaciones, estimular la CCP incluye cultivar la CCP durante un período que dure entre 1 y 60 días en un medio de cultivo, libre de suero o con menos del 5% de suero. Para algunas aplicaciones, estimular la CCP incluye cultivar la CCP durante un período que dure entre 1 y 5 días en un medio de cultivo que incluya al menos 10% de suero.

10 Para algunas aplicaciones, estimular la CCP incluye cultivar la CCP en presencia de al menos uno de los siguientes: un agente que mejore la proliferación-diferenciación, anti-CD34, anti-CD133, anti-CD117, LIF, EPO, IGF, b-FGF, M-CSF, GM-CSF, TGF-alfa, TGF-beta, VEGF, BHA, B27, F12, BDNF, NGF, NT3, NT4/5, S-100, GDNF, CNTF, EGF, NGF3, CFN, ADMIF, estrógeno, prolactina, un adrenocorticoide, glutamato, serotonina, acetilcolina, NO, ácido retinoico (AR), heparina, insulina, forskolina y/o cortisona, y/o un derivado de cualquiera de estos.

Para algunas aplicaciones, el método incluye preparar la CCP y facilitar un diagnóstico que responda a una característica de la preparación de la CCP.

15 Para algunas aplicaciones, el método incluye congelar la CCP antes de estimular la CCP. Para algunas aplicaciones, el método incluye congelar la CCP.

Para algunas aplicaciones, el método incluye transportar la CCP a un sitio al menos a 10 km de un sitio donde se creó la CCP por primera vez, y estimular la CCP en el sitio remoto. Para algunas aplicaciones, el método incluye transportar la CCP a un sitio al menos a 10 km del sitio donde se creó la CCP por primera vez.

20 El método puede incluir facilitar un diagnóstico sensible a la estimulación de la CCP para diferenciarse en la CCP. Para algunas aplicaciones, facilitar el diagnóstico incluye evaluar en qué medida la estimulación de la CCP produce una característica particular de la CCP.

El método puede incluir transfectar un gen en la CCP antes de estimular la CCP. Para algunas aplicaciones, el método incluye preparar, como producto para la administración a un paciente, la CCP generada por la diferenciación de la CCP en la cual el gen ha sido transfectado.

25 En una realización, estimular la CCP incluye incubar la CCP en un recipiente con una superficie que incluye una molécula que mejora el crecimiento, que no sea ni colágeno ni fibronectina. Para algunas aplicaciones, incubar las células CCP incluye incubar la CCP en un recipiente que tiene una superficie que incluye, además de la molécula que mejora el crecimiento, al menos uno de: colágeno y fibronectina. Para algunas aplicaciones, el método incluye mezclar la molécula que mejora el crecimiento con al menos una de: colágeno y fibronectina. Para algunas aplicaciones, el método incluye aplicar a la superficie una capa que incluya la molécula que mejora el crecimiento y una capa separada que incluya al menos una de: colágeno y fibronectina.

30 En una realización, la estimulación de la CCP incluye:

durante un período sin suero o bajo en suero, cultivar la CCP en un medio de cultivo que incluya menos del 10% de suero; y

35 durante un período de tiempo con mucho suero, cultivar la CCP en un medio de cultivo que incluya más o igual al 10% de suero.

40 Para algunas aplicaciones, el cultivo de la CCP durante el período de tiempo sin suero o bajo en suero incluye el cultivo de la CCP por una duración de entre 1 y 60 días. Para algunas aplicaciones, el cultivo de CCP durante el período de tiempo con mucho suero incluye el cultivo de la CCP por una duración de entre 1 y 60 días. Para algunas aplicaciones, el cultivo de la CCP durante el período de tiempo sin suero o bajo en suero se realiza antes de cultivar la CCP durante el período de tiempo con mucho suero. Para algunas aplicaciones, el cultivo de CCP durante el período de tiempo sin suero o bajo en suero se realiza después de cultivar la CCP durante el período de tiempo con mucho suero.

En una realización, estimular la CCP incluye:

45 cultivar la CCP en un primer recipiente durante una primera porción de un período de cultivo;

eliminar al menos algunas células de la CCP del primer recipiente al final de la primera parte del período; y

cultivar, en un segundo recipiente durante una segunda parte del período, las células retiradas del primer recipiente.

50 Para algunas aplicaciones, la eliminación de al menos algunas células de la CCP incluye la selección de células de eliminación que se adhieren a una superficie del primer recipiente. Para algunas aplicaciones, eliminar al menos algunas células de la CCP incluye seleccionar células de eliminación que no se adhieran a una superficie del primer recipiente.

Para algunas aplicaciones, el primer recipiente incluye en una superficie del mismo una molécula que mejora el crecimiento, y el cultivo de la CCP en el primer recipiente incluye el cultivo de la CCP en el primer recipiente que incluye la molécula que mejora el crecimiento.

5 Para algunas aplicaciones, la molécula que mejora el crecimiento se selecciona de la lista que consiste en: colágeno, fibronectina, un factor de crecimiento y un anticuerpo para un receptor de superficie de células madre.

Para algunas aplicaciones, el segundo recipiente incluye en una superficie del mismo una molécula que mejora el crecimiento, y el cultivo de la CCP en el segundo recipiente incluye el cultivo de la CCP en el segundo recipiente que incluye la molécula que mejora el crecimiento.

10 Para algunas aplicaciones, la molécula que mejora el crecimiento se selecciona de la lista que consiste en: colágeno, fibronectina, un factor de crecimiento y un anticuerpo para un receptor de superficie de células madre.

15 En una realización, la estimulación incluye cultivar la CCP con al menos un factor derivado de un tejido diana. Para algunas aplicaciones, el método incluye la preparación de un medio acondicionado para cultivar la CCP en él, incluyendo el medio acondicionado el factor, estando derivado el factor de un tejido seleccionado de la lista que consiste en: tejido nervioso periférico, tejido del sistema nervioso central (SNC), tejido retiniano, tejido epitelial pigmentado, tejido fotorreceptor, tejido retiniano fetal, tejido retiniano embrionario y tejido retiniano maduro. En una realización, la estimulación incluye el cocultivo de la CCP con un tejido diana. Para algunas aplicaciones, el cocultivo incluye la preparación del tejido diana mediante un método seleccionado de la lista que consiste en: cortar el tejido diana, homogeneizar el tejido diana, congelar el tejido diana y procesar el tejido diana por ultrasonido u otro tipo de radiación.

20 Para algunas aplicaciones, el cocultivo incluye la utilización del tejido diana para producir un medio condicionado y el cocultivo de la CCP con el tejido diana en el medio condicionado. Para algunas aplicaciones, el cocultivo incluye la separación del tejido diana de la CCP por una membrana semipermeable.

25 Para algunas aplicaciones, el método incluye designar el tejido diana para incluir un tejido seleccionado de la lista que consiste en: tejido nervioso periférico, tejido del sistema nervioso central (SNC), tejido retiniano, tejido epitelial pigmentado, tejido fotorreceptor, tejido retiniano fetal, tejido retiniano embrionario y tejido retiniano maduro.

También se proporciona un método que incluye estimular in vitro una población de células elementales (ECP) de al menos 5 millones de células que tienen una densidad de menos de 1,072 g/ml, al menos 1,5% de los cuales son CD34+CD45-/débil, al menos 30% de los cuales son CD14 +, y/o al menos 40% de los cuales son CD31+ para diferenciarse en una población de células progenitoras/precursoras (PCP).

30 Para algunas aplicaciones, la ECP incluye al menos 5 millones de células que tienen una densidad de menos de 1,062 g/ml, al menos 2% de las cuales son CD34+CD45-/débil, y estimular la ECP incluye estimular la ECP que tiene al menos 5 millones de células que tienen una densidad de menos de 1,062 g/ml.

35 Para algunas aplicaciones, estimular la ECP incluye solo estimular la ECP si la ECP se deriva de un donante mamífero. Para algunas aplicaciones, el método incluye aplicar células extraídas de un donante mamífero a uno o más gradientes adecuados para seleccionar células que tienen una densidad inferior a 1,072 g/ml, y derivar la ECP sensible a la aplicación de las células al gradiente.

40 Para algunas aplicaciones, la ECP se caracteriza porque al menos el 2,5% de la ECP es CD34+CD45-/débil, y estimular la ECP incluye estimular la ECP que tiene al menos el 2,5% de la ECP que son CD34+CD45-/débil. Para algunas aplicaciones, la ECP se caracteriza porque al menos el 50% de la ECP es CD14+, y estimular la ECP incluye estimular la ECP que tiene al menos el 50% de la ECP que es CD14+. Para algunas aplicaciones, la ECP se caracteriza porque al menos el 30% de la ECP es CD14+, y estimular la ECP incluye estimular la ECP que tiene al menos el 30% de la ECP que es CD14+. Para algunas aplicaciones, la ECP se caracteriza porque al menos el 40% o al menos el 70% de la ECP es CD31+, y estimular la ECP incluye estimular la ECP que tiene al menos el 40% o al menos el 70% de la ECP que son CD31+.

45 Para algunas aplicaciones, estimular la ECP incluye estimular la ECP para que se diferencie en una clase de células progenitoras deseadas previamente designadas.

Para algunas aplicaciones, estimular la ECP incluye cultivar la ECP durante un período de entre 3 y 60 días in vitro.

50 Para algunas aplicaciones, el método incluye derivar la ECP de al menos una fuente seleccionada de la lista que consiste en: sangre del cordón umbilical, tejido del cordón umbilical, tejido neonatal, tejido adulto, tejido adiposo, tejido nervioso, médula ósea, sangre movilizada, sangre periférica, células mononucleares de sangre periférica y células de la piel. Alternativamente, el método incluye derivar la ECP de al menos una fuente seleccionada de la lista que consiste en: tejido fresco y tejido congelado. Para algunas aplicaciones, el método incluye identificar un receptor previsto de la PCP y derivar la ECP de al menos una fuente seleccionada de la lista que consiste en: tejido autólogo al tejido del receptor previsto, tejido singénico al tejido del receptor previsto, tejido alogénico al tejido del receptor previsto, y tejido xenogénico al tejido del receptor previsto.

55

Para algunas aplicaciones, estimular la ECP incluye incubar la ECP en un recipiente que tiene una superficie que incluye un anticuerpo.

5 Para algunas aplicaciones, la estimulación de la ECP incluye el cultivo de la ECP durante un período que dura entre 1 y 60 días en un medio de cultivo que no incluye suero o lo incluye en menos del 5%. Para algunas aplicaciones, estimular la ECP incluye cultivar la ECP durante un período que dura entre 1 y 60 días en un medio de cultivo que incluye al menos 10% de suero.

10 Para algunas aplicaciones, estimular la ECP incluye cultivar la ECP en presencia de al menos uno de los siguientes: un agente que mejora la proliferación-diferenciación, anti-CD34, anti-Tie-2, anti-CD133, anti-CD117, LIF, EPO, IGF, b-FGF, M-CSF, GM-CSF, TGF-alfa, TGF-beta, VEGF, BHA, B27, F12, BDNF, NGF, NT3, NT4/5, S-100, GDNF, CNTF, EGF, NGF3, CFN, ADMIF, estrógeno, prolactina, un adrenocorticoide, glutamato, serotonina, acetilcolina, NO, ácido retinoico (RA), heparina, insulina, forskolina y/o cortisona, y/o un derivado de cualquiera de estos.

Para algunas aplicaciones, el método incluye preparar la ECP y facilitar un diagnóstico que responda a una característica de la preparación de la ECP.

15 Para algunas aplicaciones, el método incluye congelar la ECP antes de estimular la ECP. Para algunas aplicaciones, el método incluye congelar la NPCP.

Para algunas aplicaciones, el método incluye transportar la ECP a un sitio al menos a 10 km de un sitio donde se creó la ECP por primera vez, y estimular la ECP en el sitio remoto. Para algunas aplicaciones, el método incluye transportar la NPCP a un sitio al menos a 10 km del sitio donde se creó la NPCP por primera vez.

20 El método puede incluir facilitar un diagnóstico que responda a la estimulación de la ECP para diferenciarse en la NPCP. Para algunas aplicaciones, facilitar el diagnóstico incluye evaluar en qué medida la estimulación de la ECP produce una característica particular de la NPCP.

El método puede incluir transfectar un gen en la ECP antes de estimular la ECP. Para algunas aplicaciones, el método incluye la preparación, como producto para la administración a un paciente, de la NPCP generada por la diferenciación de la ECP en la cual el gen ha sido transfectado.

25 En una realización, estimular la ECP incluye incubar la ECP en un recipiente con una superficie que incluye una molécula o sustancia que mejora el crecimiento que no sea colágeno o fibronectina o plasma autólogo. Para algunas aplicaciones, la incubación de las células de ECP incluye la incubación de ECP en un recipiente que tiene una superficie que incluye, además de la molécula que mejora el crecimiento, al menos uno de: colágeno, fibronectina y plasma autólogo. Para algunas aplicaciones, el método incluye mezclar la molécula que mejora el crecimiento con al menos una de: colágeno y fibronectina y plasma autólogo. Para algunas aplicaciones, el método incluye aplicar a la superficie una capa que incluye la molécula que mejora el crecimiento y una capa separada que incluye al menos una de: colágeno, fibronectina y plasma autólogo.

35 En una realización, la estimulación de la ECP incluye: durante un período de tiempo sin suero o bajo en suero, cultivar la ECP en un medio de cultivo que incluya menos del 10% de suero; y, durante un período de tiempo con mucho suero, cultivar la ECP en un medio de cultivo que incluya más o igual al 10% de suero.

40 Para algunas aplicaciones, el cultivo de la ECP durante el período de tiempo sin suero o bajo en suero incluye el cultivo de la ECP por una duración de entre 1 y 60 días. Para algunas aplicaciones, el cultivo de la ECP durante el período de tiempo con mucho suero incluye el cultivo de la ECP por una duración de entre 1 y 60 días. Para algunas aplicaciones, el cultivo de la ECP durante el período de tiempo sin suero o bajo en suero se realiza antes de cultivar la ECP durante el período de tiempo con mucho suero. Para algunas aplicaciones, el cultivo de la ECP durante el período de tiempo sin suero o bajo en suero se realiza después de cultivar la ECP durante el período de tiempo con mucho suero.

En una realización, estimular la ECP incluye:

cultivar la ECP en un primer recipiente durante una primera porción de un período de cultivo;

45 eliminar al menos algunas células de la ECP del primer recipiente al final de la primera parte del período; y

cultivar, en un segundo recipiente durante una segunda parte del período, las células retiradas del primer recipiente.

Para algunas aplicaciones, la eliminación de al menos algunas células de la ECP incluye la selección de células de eliminación que se adhieren a una superficie del primer recipiente. Para algunas aplicaciones, eliminar al menos algunas células de la ECP incluye seleccionar células de eliminación que no se adhieran a una superficie del primer recipiente.

50 Para algunas aplicaciones, el primer recipiente incluye en una de las superficies del mismo una molécula que mejora el crecimiento, y el cultivo de la ECP en el primer recipiente incluye el cultivo de la ECP en el primer recipiente que incluye la molécula que mejora el crecimiento.

Para algunas aplicaciones, el segundo recipiente incluye en una de sus superficies una molécula que mejora el crecimiento, y el cultivo de la ECP en el segundo recipiente incluye el cultivo de la ECP en el segundo recipiente que incluye la molécula que mejora el crecimiento.

5 En una realización, la estimulación incluye cultivar la ECP con al menos un factor derivado de un tejido diana. Para algunas aplicaciones, el método incluye preparar un medio acondicionado para el cultivo de la ECP en éste, incluyendo el medio acondicionado el factor, siendo el factor derivado de un tejido seleccionado de la lista que consiste en: tejido nervioso periférico, tejido del sistema nervioso central (SNC), tejido retiniano, tejido epitelial pigmentario, tejido fotorreceptor, tejido retiniano fetal y tejido retiniano embrionario, tejido retiniano maduro.

10 En una realización, la estimulación incluye el cocultivo de la ECP con un tejido diana. Para algunas aplicaciones, el cocultivo incluye congelar el tejido diana y/o procesar el tejido diana por ultrasonido u otro tipo de radiación. Para algunas aplicaciones, el cocultivo incluye la preparación del tejido diana mediante un método seleccionado de la lista que consiste en: cortar el tejido diana y homogeneizar el tejido diana. Para algunas aplicaciones, el cocultivo incluye la utilización del tejido diana para producir un medio condicionado y el cocultivo de la ECP con el tejido diana en el medio condicionado. Para algunas aplicaciones, el cocultivo incluye la separación del tejido diana de la ECP por una membrana semipermeable.

Por lo tanto, se proporciona un método que incluye estimular in vitro una población de células centrales (CCP) de al menos 5 millones de células que tienen una densidad de menos de 1,072 g/ml, y al menos 1,5% de los cuales son CD34+CD45-/débil, para diferenciarse en una población de células progenitoras/precursoras neurales (NPCP).

20 En una realización, la CCP incluye al menos 5 millones de células que tienen una densidad de menos de 1,062 g/ml, de las cuales al menos el 2% son CD34+CD45-/débil, y estimular la CCP incluye estimular la CCP que tiene al menos 5 millones de células que tienen una densidad de menos de 1,062 g/ml.

25 En una realización, al menos 1,5 millones de células en la NPCP y al menos el 1,5% de las células en la NPCP incluyen al menos una molécula o estructura molecular seleccionada de la lista que consiste en: CD34, CD117, CD44, Neu-N, nestina, proteína asociada a microtúbulos-1 (MAP-1), MAP Tau, proteína-2 asociada a microtúbulos (MAP-2), neurofilamento NF200, enolasa específica de neurona (NSE), colina acetiltransferasa (ChAT), beta-tubulina neuronal clase III, ácido glutámico descarboxilasa (GAD), ácido glutámico, ácido gamma-aminobutírico (GABA), marcador de oligodendrocitos (O4), proteína básica de mielina (MBP), galactocerebrosida (GalC), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), CD211b, dopamina, norepinefrina, epinefrina, glutamato, glicina, acetilcolina, serotonina y endorfina. El sobrenadante también puede incluir uno o más de los anteriores, o neurotrofinas, tales como S-100, GDNF, CNTF, BDNF, NGF, NT3, NT4/5, que pueden ser secretadas por la NPCP.

30 El método puede incluir preparar la NPCP como una herramienta de investigación.

Estimular la CCP incluye solo estimular la CCP si la CCP se deriva de un donante mamífero.

El método puede incluir aplicar células extraídas de un donante mamífero a uno o más gradientes adecuados para seleccionar células que tienen una densidad inferior a 1,072 g/ml.

35 En una realización, la CCP se caracteriza porque al menos el 2% de la CCP es CD34+CD45-/débil.

En una realización, la CCP se caracteriza porque al menos el 2,5% de la CCP es CD34+CD45-/débil.

En una realización, la CCP se caracteriza porque al menos el 50% de la CCP es CD14+.

En una realización, la CCP se caracteriza porque al menos el 30% de la CCP es CD14+.

En una realización, la CCP se caracteriza porque al menos el 70% de la CCP es CD31+.

40 En una realización, la CCP se caracteriza porque al menos el 40% de la CCP es CD31+.

En una realización, estimular la CCP incluye estimular la CCP para que se diferencie en una clase de células progenitoras neurales deseadas previamente designadas.

En una realización, estimular la CCP incluye cultivar la CCP durante un período de entre 3 y 60 días in vitro.

45 En una realización, el método puede incluir derivar la CCP de al menos una fuente seleccionada de la lista que consiste en: sangre del cordón umbilical, tejido del cordón umbilical, tejido neonatal, tejido adulto, tejido adiposo, tejido nervioso, médula ósea, sangre movilizada, sangre periférica, células mononucleares de sangre periférica y tejido de la piel.

El método puede incluir derivar la CCP de al menos una fuente seleccionada de la lista que consiste en: tejido fresco y tejido congelado.

El método puede incluir identificar un receptor previsto de la NPCP y derivar la CCP de al menos una fuente seleccionada de la lista que consiste en: tejido autólogo al tejido del receptor previsto, tejido singénico al tejido del receptor previsto, tejido alogénico al tejido del receptor previsto, y tejido xenogénico al tejido del receptor previsto.

5 En una realización, estimular la CCP incluye incubar la CCP en un recipiente que tiene una superficie que incluye al menos uno de: un anticuerpo y plasma autólogo.

En una realización, estimular la CCP incluye cultivar la CCP durante un período que dura entre 1 y 5 días en un medio de cultivo que incluye menos del 0,01% de suero.

En una realización, estimular la CCP incluye cultivar la CCP durante un período que dura entre 1 y 5 días en un medio de cultivo que incluye menos del 5% de suero.

10 En una realización, estimular la CCP incluye cultivar la CCP durante un período que dura entre 1 y 5 días en un medio de cultivo que incluye al menos 10% de suero.

15 En una realización, estimular la CCP incluye cultivar la CCP en presencia de al menos uno de los siguientes: B27, F12, un agente potenciador de la diferenciación y proliferación, anti-CD34, anti-CD117, LIF, IGF, b-FGF, M-CSF, GM-CSF, TGF-alfa, TGF-beta, BHA, BDNF, NGF, NT3, NT4/5, S-100, GDNF, CNTF, EGF, NGF3, CFN, ADMIF, estrógeno, prolactina, un adrenocorticoide, glutamato, serotonina, acetilcolina, ácido retinoico (RA), heparina, insulina, forskolina, cortisona y un derivado de cualquiera de estos.

El método puede incluir preparar la CCP y facilitar un diagnóstico que responda a una característica de la preparación de la CCP.

El método puede incluir congelar la CCP antes de estimular la CCP.

20 El método puede incluir congelar la NPCP.

El método puede incluir transportar la CCP a un sitio al menos a 10 km de un sitio donde se creó la CCP por primera vez, y estimular la CCP en el sitio remoto.

El método puede incluir transportar la NPCP a un sitio al menos a 10 km de un sitio donde se creó la NPCP por primera vez.

25 El método puede incluir preparar la NPCP como un producto para su administración a un paciente.

30 El paciente puede tener una afección seleccionada de la lista que consiste en: una consecuencia neural de un ataque isquémico transitorio (AIT), una consecuencia neural de un accidente cerebrovascular isquémico, una enfermedad circulatoria, neuropatía hipertensiva, trombosis venosa, un trastorno cerebrovascular, un trastorno cerebrovascular causado por sangrado, una consecuencia neural de hemorragia intracerebral, una consecuencia neural de hemorragia subdural, una consecuencia neural de hemorragia epidural, una consecuencia neural de hemorragia subaracnoidea, una consecuencia neural de una malformación arteriovenosa, demencia relacionada con Alzheimer, demencia no relacionada con Alzheimer, demencia vascular, demencia por SIDA, degeneración hereditaria, síndrome de Batten, lesión traumática del SNC, una consecuencia neural de una neoplasia del SNC, una consecuencia neural de una cirugía del sistema nervioso periférico, una consecuencia neural de una cirugía del sistema nervioso central, una lesión por radiación al SNC, una consecuencia neural de una infección del SNC, la enfermedad de Parkinson, un síndrome coreoatetoide, una parálisis supranuclear progresiva, degeneración espinocerebelosa, esclerosis múltiple, enfermedades desmielinizantes, encefalomiелitis diseminada aguda, adrenoleucodistrofia, neuromielitis óptica, un déficit neural debido a parálisis cerebral, una consecuencia neurológica de hidrocefalia, atrofia óptica de Leber, enfermedad de miocndrosis, epilepsia mioclónica asociada con las fibras rojas rotas (MERRF), encefalomiopátia mitocondrial, enfermedad de las neuronas motoras, atrofia muscular progresiva, esclerosis lateral amiotrófica, lesión del nervio craneal, síndrome de Homer, oftalmoplejía internuclear, síndrome de Parinaud, parálisis de la mirada, consecuencia neural por intoxicación, consecuencia neural por envenenamiento, degeneración retiniana adquirida, degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), retinopatía miope, enfermedad de Best, coroidoretinopatía serosa central, retinopatía vascular, retinopatía diabética, retinopatía hipertensiva, glaucoma, retinitis pigmentosa, retinopatía hereditaria, un agujero retinal, una lesión mecánica oftálmica que afecta a la retina, una lesión por radiación que afecta a la retina, una oclusión vascular retiniana, un déficit retiniano causado por desprendimiento de retina, una enfermedad del oído interno, degeneración del sistema nervioso periférico, lesión del sistema nervioso periférico y una lesión vascular del sistema nervioso periférico.

50 El método puede incluir facilitar un diagnóstico sensible a la estimulación de la CCP para diferenciarse en la NPCP.

El método puede incluir facilitar el diagnóstico e incluye evaluar hasta qué punto la estimulación de la CCP produce una característica particular de la NPCP.

En una realización, estimular la CCP incluye incubar la CCP en un recipiente con una superficie que incluya una molécula que mejore el crecimiento que no sea colágeno ni fibronectina.

En una realización, incubar la CCP incluye incubar la CCP en un recipiente que tiene una superficie que incluye, además de la molécula potenciadora del crecimiento, al menos uno de: colágeno, fibronectina y plasma autólogo.

El método puede incluir mezclar la molécula potenciadora del crecimiento con al menos una de: colágeno, fibronectina y plasma autólogo.

- 5 El método puede incluir aplicar a la superficie una capa que incluya la molécula que mejora el crecimiento y una capa separada que incluya al menos uno de: colágeno, fibronectina y plasma autólogo.

En una realización, la estimulación de la CCP incluye:

durante un período de tiempo con poco suero, cultivar la CCP en un medio de cultivo que incluye menos del 10% de suero; y

- 10 durante un período de tiempo con mucho suero, cultivar la CCP en un medio de cultivo que incluye más o igual al 10% de suero

En una realización, el cultivo de CCP en el medio de cultivo, que incluye menos del 10% de suero, incluye el cultivo de CCP en un medio de cultivo que incluye menos del 0,01% de suero.

- 15 En una realización, el cultivo de CCP durante el período de tiempo con poco suero incluye el cultivo de CCP durante entre 1 y 5 días.

En una realización, el cultivo de CCP durante el período de tiempo con mucho suero incluye el cultivo de CCP durante entre 1 y 30 días.

En una realización, el cultivo de CCP durante el período de tiempo con poco suero se realiza antes de cultivar la CCP durante el período de tiempo con mucho suero.

- 20 En una realización, el cultivo de CCP durante el período de tiempo con poco suero se realiza después de cultivar la CCP durante el período de tiempo con mucho suero.

En una realización, estimular la CCP incluye:

cultivar la CCP en un primer recipiente durante una primera porción de un período de cultivo;

eliminar al menos algunas células de la CCP del primer recipiente al final de la primera parte del período; y

- 25 cultivar, en un segundo recipiente durante una segunda parte del período, las células retiradas del primer recipiente.

En una realización, la eliminación de al menos algunas células de la CCP incluye la selección de células de eliminación que se adhieren a una superficie del primer recipiente.

En una realización, eliminar al menos algunas células de la CCP incluye seleccionar células de eliminación que no se adhieren a ninguna superficie del primer recipiente.

- 30 En una realización, el primer recipiente incluye en una superficie del mismo una molécula que mejora el crecimiento, donde el cultivo de la CCP en el primer recipiente incluye el cultivo de la CCP en el primer recipiente que incluye la molécula que mejora el crecimiento.

En una realización, la molécula potenciadora del crecimiento se selecciona de la lista que consiste en: colágeno, fibronectina, plasma autólogo, un factor de crecimiento y un anticuerpo para un receptor de superficie de células madre.

- 35

En una realización, el segundo recipiente incluye en una superficie del mismo una molécula que mejora el crecimiento, y en donde el cultivo de la CCP en el segundo recipiente incluye el cultivo de la CCP en el segundo recipiente que incluye la molécula que mejora el crecimiento.

- 40 En una realización, la molécula potenciadora del crecimiento se selecciona de la lista que consiste en: colágeno, fibronectina, plasma autólogo, un factor de crecimiento y un anticuerpo para un receptor de superficie de células madre.

En una realización, la estimulación incluye cultivar la CCP con al menos un factor derivado de un tejido diana.

El método puede incluir preparar un medio acondicionado para cultivar la CCP en él, incluyendo el medio acondicionado el factor, estando el factor derivado de un tejido seleccionado de la lista que consiste en: tejido nervioso periférico, tejido del sistema nervioso central (SNC), tejido retiniano, tejido epitelial pigmentado, tejido fotorreceptor, tejido retiniano fetal, tejido retiniano embrionario y tejido retiniano maduro.

- 45

En una realización, la estimulación incluye el cocultivo de la CCP con un tejido diana.

En una realización, el cocultivo incluye preparar el tejido diana mediante un método seleccionado de la lista que consiste en: cortar el tejido diana, homogeneizar el tejido diana, congelar el tejido diana, procesar el tejido diana por ultrasonido y procesar el tejido diana mediante radiación sin ultrasonido.

En una realización, el cocultivo incluye:

- 5 utilizar el tejido diana para producir un medio acondicionado; y  
cocultivar la CCP con el tejido diana en el medio acondicionado.

En una realización, el cocultivo incluye separar el tejido diana de la CCP por una membrana semipermeable.

- 10 El método puede incluir designar el tejido diana para incluir un tejido seleccionado de la lista que consiste en: tejido nervioso periférico, tejido del sistema nervioso central (SNC), tejido retiniano, tejido epitelial pigmentado, tejido fotorreceptor, tejido retiniano fetal, tejido retiniano embrionario y tejido retiniano maduro.

La presente invención se entenderá más completamente a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones de la misma, tomadas junto con los dibujos, en los que:

**Breve descripción de los dibujos**

- 15 Las Figuras 1A-F son fotografías de células, tomadas en los días 4, 8, 12, 15, 19 y 20, respectivamente, que muestran cambios morfológicos durante la generación de un NPCP derivado de CCP, de acuerdo con una realización de la presente invención;

La Figura 2 es una fotografía que muestra la morfología de un grupo de células NPCP derivadas de CCP, de acuerdo con una realización de la presente invención;

- 20 Las Figuras 3A-E son fotografías que muestran resultados de inmunotinción para un NPCP derivado de CCP, de acuerdo con una realización de la presente invención;

La Figura 4 es un gráfico que muestra el porcentaje de células que dan positivo para los marcadores neurales Nestina y beta-tubulina, de acuerdo con una realización de la presente invención;

- 25 La Figura 5 es un gráfico que muestra los niveles de calcio generados por células NPCP derivadas de CCP en respuesta a la estimulación por los neurotransmisores glutamato y GABA, de acuerdo con una realización de la presente invención; y

Las Figuras 6A-B son fotografías que muestran una sección del ojo de una rata, 20 días después de la implantación de células NPCP derivadas de CCP humano, de acuerdo con una realización de la presente invención.

**Descripción detallada de las realizaciones**

Ejemplo 1. Caracterización de CCP antes de la incubación

- 30 Se llevaron a cabo diez experimentos de acuerdo con una realización de la presente invención, y los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación. Se extrajo sangre periférica de voluntarios humanos para su uso en diez experimentos respectivos. En cada experimento, se usó un gradiente de Ficoll para generar una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Se generó una CCP de acuerdo con los protocolos descritos en el presente documento usando un gradiente de Percoll, enriqueciendo aún más la población celular. Los  
35 resultados en la Tabla 1 muestran los porcentajes de células CD14+ y CD34+CD45-/débil en las células CCP, así como su viabilidad.

Tabla 1

Exp. N°.	% Viabilidad	% CD45+	% CD14+	% CD34+% CD45-/débil
1	97,86	93,46	79,98	4,07
2	97,61	87,10	57,14	3,48
3	100	96,44	61,57	2,31
4	98,18	92,77	65,52	2,69
5	98,53	84,30	62,82	2,77
6	98,33	76,16	40,99	2,37
7	97,78	94,46	62,48	3,7

Exp. N°.	% Viabilidad	% CD45+	% CD14+	% CD34+% CD45-/débil
8	97,93	92,39	50,24	6,14
9	97,64	96,55	57,02	2,24
10	99,37	98,44	66,30	1,67
Promedio	98,32	91,41	60,41	3,14

Ejemplo 2. Caracterización de CCP antes de la incubación

Se llevaron a cabo siete experimentos independientes de acuerdo con una realización de la presente invención, y los resultados se muestran en la Tabla 2 a continuación. Se extrajo sangre periférica de voluntarios humanos para su uso en diez experimentos respectivos. En cada experimento, se usó un gradiente de Ficoll para generar una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Se generó una CCP de acuerdo con los protocolos descritos en el presente documento usando un gradiente de Percoll, enriqueciendo aún más la población celular. Los resultados en la Tabla 2 muestran los porcentajes de CD31+ en las células CCP.

Tabla 2

Exp. No.	%CD31+
1	87,28
2	85,25
3	82,22
4	81,91
5	75,77
6	86,8415
7	90,90
Promedio	84,31

Ejemplo 3. Seguimiento morfológico de NPCP generado en presencia de factores de crecimiento.

En un conjunto separado de experimentos, se realizó un seguimiento morfológico de la generación in vitro de NPCP. La generación in vitro de la NPCP se llevó a cabo de acuerdo con una realización de la presente invención, y los resultados se muestran en la Figura 1.

Las Figuras 1A-F son fotografías de células, tomadas en los días 4, 8, 12, 15, 19 y 20, respectivamente, que muestran cambios morfológicos durante la generación de un NPCP derivado de CCP, de acuerdo con una realización de la presente invención. Se realizaron nueve experimentos separados, cada experimento usando sangre periférica de un donante separado. En cada experimento, se usó un gradiente de Ficoll para generar una población de PBMC. Se generó una CCP de acuerdo con los protocolos descritos en el presente documento usando un gradiente de Percoll.

Las imágenes en la Figura 1 muestran los cambios morfológicos durante la generación de NPCP derivado de CCP a partir de un experimento representativo. Típicamente, se observan células en forma de círculo y células alargadas durante los primeros días del cultivo (Figura 1A). Posteriormente, (Figura 1B-E) las células aumentan de tamaño y se observan células circulares tipo neuroesferas, células irregulares y células con picos y pseudopodios. Algunas células tienen cuerpos celulares y espigas y/o pseudopodios que son más largos que la longitud del cuerpo celular (a veces tres veces o más). Además, parece que estos picos y/o pseudopodios son atraídos por otras células en el cultivo, y que las células pueden estar generando una red en una etapa temprana y/o uniones celulares entre ellas. Las imágenes se obtuvieron a partir de una ampliación de x200 de cultivos celulares.

Ejemplo 4. Capacidad de formación de colonias de NPCP

La Figura 2 es una fotografía que muestra la morfología de un grupo de células NPCP derivadas de CCP, de acuerdo con una realización de la presente invención. La capacidad de generar grupos de células NPCP se probó en el mismo conjunto de experimentos que produjeron los resultados que se muestran en la Figura 1. Se realizó una evaluación morfológica de la generación de grupos in vitro a partir de un NPCP. La generación in vitro de grupos de NPCP se realizó de acuerdo con una realización de la presente invención, y los resultados se muestran en la Figura 2. La imagen en la Figura 2 muestra la morfología típica de los conglomerados, y se obtuvo a partir de un aumento de x200 en cultivos celulares.

Ejemplo 5. Inmunotinción celular de los marcadores de linaje neural NPCP

Las Figuras 3A-E son fotografías que muestran resultados de inmunotinción para un NPCP derivado de CCP, de acuerdo con una realización de la presente invención. En el mismo conjunto de experimentos que produjeron los resultados mostrados en la Figura 1, se realizó la inmunotinción de marcadores de linaje neural. Las células NPCP fijadas con portaobjetos se tiñeron con: Figura 3A - Anti-Neu-N-Alexa 488; Figura 3B - Anti-nestina detectada por IgG anti-ratón FITC; Figura 3C - Anti-tubulina detectada por IgG-FITC anti-ratón; Figura 3D - Anti-O4 detectada por IgG-Cy3 anti-ratón; y Figura 3E. Anti-GFAP detectada por IgG-Cy3 anti-ratón. Las células teñidas con IgG de ratón no específica se detectaron mediante IgG-FITC anti-ratón o por IgG-Cy3 anti-ratón utilizados como controles negativos.

Se extrajo sangre periférica de nueve donantes humanos normales para su uso en nueve experimentos respectivos. La generación in vitro de la NPCP se realizó de acuerdo con una realización de la presente invención. Las imágenes de la Figura 3 muestran que las células NPCP expresaron Neu-N, una proteína nuclear específica de neurona (Figura 3A), y los marcadores progenitores neurales nestina y  $\beta$ -tubulina, expresados por células neuronales recién diferenciadas (Figuras 3B y 3C). Otras células de estos cultivos expresaron antígenos específicos de la glía, como O4 y GFAP, que son característicos de los oligodendrocitos y astrocitos, respectivamente (Figuras 3D y 3E). Las imágenes se obtuvieron a partir de la ampliación x100 de las células fijadas por portaobjetos.

Ejemplo 6. Análisis de citometría de flujo de los marcadores neuronales NPCP Nestina y beta-tubulina

La Figura 4 es un gráfico que muestra el porcentaje de células que dan positivo (+/- 1 S.E.) para los marcadores neuronales Nestina y beta-tubulina, de acuerdo con una realización de la presente invención. En el mismo conjunto de experimentos que produjeron los resultados mostrados en las Figuras 1, 2 y 3, la inmunotinción celular de los marcadores neuronales nestina y beta-tubulina se realizó en varios puntos temporales (días 0, 5, 12, 19 y 26) durante el período de cultivo. La tinción se realizó aplicando anticuerpos específicos o IgG1 de ratón normal (control de isotipo negativo) detectado por anticuerpos anti-ratón conjugados con PE. La generación in vitro de la NPCP se realizó de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura muestra que las células que exhiben nestina se pueden detectar antes durante el período de cultivo (a partir del día 5) mientras que los niveles de  $\beta$ -tubulina se elevan en las células a partir del día 12. Los porcentajes de células que exhiben beta-tubulina son algo más bajos que nestina, un fenómeno que podría explicarse porque la nestina es un marcador de células madre más general, que también es exhibido por otras células madre hematopoyéticas. Para el día 26, ambos marcadores sufrieron una reducción drástica. La reducción de este marcador puede indicar que el cultivo se está reorganizando hacia colonias celulares más específicas. (Las colonias derivadas de NPCP se observan claramente en estos cultivos; ver Figura 2.)

Ejemplo 7. Las células NPCP responden fisiológicamente a la estimulación de neurotransmisores in vitro

La Figura 5 es un gráfico que muestra los niveles de calcio promedio típicos generados por células NPCP derivadas de CCP en respuesta a la estimulación por los neurotransmisores glutamato y GABA, de acuerdo con una realización de la presente invención. En el mismo conjunto de experimentos que produjeron los resultados mostrados en las Figuras 1-4, se midió la respuesta fisiológica de las células NPCP a los neurotransmisores. La generación in vitro de la NPCP se realizó de acuerdo con una realización de la presente invención. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de calcio dependientes de voltaje en respuesta a la estimulación de neurotransmisores con 100  $\mu\text{M}$  de glutamato y 100  $\mu\text{M}$  de GABA se midió. Las células cosechadas se cargaron con éster acetoximetílico Fura-2 5 mM y se montaron en una cámara que permitía la superfusión de células en analitos. Se tomaron imágenes de Fura-2 y se obtuvieron mediciones de imágenes fluorescentes. La respuesta de las células NPCP a la estimulación con los neurotransmisores glutamato y GABA proporciona evidencia de la diferenciación de las células CCP en neuronas.

Ejemplo 8. células NPCP autoguiadoras e injerto en modelo de rata de lesión por láser en ojos de ratas

Las Figuras 6A-B son fotografías que muestran una sección del ojo de una rata, 20 días después de la implantación de células NPCP derivadas de CCP humano, de acuerdo con una realización de la presente invención. En parte del mismo conjunto de experimentos que produjeron los resultados mostrados en las Figuras 1-5, se evaluó el potencial terapéutico de las células NPCP. La generación in vitro de la NPCP se realizó de acuerdo con una realización de la presente invención. Las células NPCP se usaron para la implantación en un modelo de rata de retina lesionada con láser. Se produjeron seis quemaduras retinianas en ojos de rata mediante un láser de argón, a dos diámetros de disco del disco óptico. Inmediatamente después de la inducción de la lesión, se inyectaron  $0,45 \times 10^6$  células NPCP en la cavidad vítreo del ojo. Las secciones de tejido fijadas en parafina se tiñeron dos veces para rastrear células NPCP humanas injertadas en las retinas lesionadas. La Figura 6 muestra una sección típica tomada del ojo de una rata 20 días después de la implantación de NPCP humano. Se detectaron mitocondrias antihumanas mediante Cy-3 anti-ratón y con el marcador nucleico neuronal anti-Neu-N Alexa 488. Las células con doble tinción están marcadas con flechas. Los portaobjetos se contratiñeron con una solución de montaje fluorescente que contenía la tinción nuclear DAPI. Las secciones de tejido teñidas con IgG de ratón no específica y detectadas por FITC anti-ratón y por Cy-3 anti-ratón se usaron como controles negativos. La Figura 6 muestra una sección de tejido teñida con

mitocondrias antihumanas de ratón que se detectó con Cy-3 anti-ratón (Figura 6A) y con el marcador nucleico neuronal anti-Neu-N Alexa 488 (Figura 6B). Las células con doble tinción están marcadas con flechas. Las imágenes se obtuvieron a partir de la ampliación x100 de la sección del tejido.

- 5 Los resultados presentados en este documento demuestran que las células NPCP humanas pueden albergar con éxito las retinas dañadas como se detecta al rastrear células injertadas específicas en ojos de rata.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la extracción de PBMC se realiza usando el siguiente protocolo:

Ejemplo 1. Extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Reciba la bolsa de sangre y esterilícela con alcohol al 70%.

- 10 Cargue las células sanguíneas en un gradiente Ficoll.

Gire los tubos durante 20 minutos a 1050 g a temperatura ambiente (RT), sin frenos.

Recoja la mayor parte del plasma de la capa superior.

Recoja la fracción de glóbulos blancos de cada tubo.

Transfiera las células recolectadas a un nuevo tubo de 50 ml, ajuste el volumen a 30 ml por tubo usando PBS.

- 15 Centrifugue los tubos durante 15 minutos a 580 g, RT, y deseche el sobrenadante.

Cuente las células en azul Tripano.

Vuelva a suspender en medio de cultivo que comprende, por ejemplo, X- vivo 15 (TM).

De acuerdo con una realización de la presente invención, la generación de una CCP se lleva a cabo usando el siguiente protocolo:

- 20 Ejemplo 1. Generación de una CCP humana a partir de PBMC utilizando un gradiente de Percoll

Prepare el gradiente mezclando una proporción de 5.55 Percoll (1,13 g/ml): 3,6 ddH<sub>2</sub>O:1 PBSx10.

Por cada tubo de 50 ml de Percoll: mezcle 20 ml de caldo Percoll, 13 ml de ddH<sub>2</sub>O y 3,6 ml de PBSx10.

Mezcle vigorosamente, agitando vorticialmente, durante al menos 1 minuto.

Cargue 34 ml de mezcla en cada tubo de 50 ml.

- 25 Centrifugue los tubos, en un rotor de ángulo fijo, durante 30 minutos a 17.000 g, 21°C, sin freno.

Coloque 150 millones - 400 millones de PBMC en 3,0 ml de medio.

Coloque suavemente 3,0 ml de suspensión celular en la parte superior del gradiente.

Prepare un segundo tubo con perlas marcadoras de densidad: coloque suavemente 3,0 ml de medio sobre el gradiente.

- 30 Cargue suavemente las perlas marcadoras de densidad -10 µl de cada tipo de perla.

Centrifugue los tubos, en un rotor de cubeta oscilante, durante 30 minutos a 1260 g a 13°C, sin freno.

Recoja suavemente todas las bandas ubicadas sobre las cuentas rojas.

Centrifugue las células durante 15 minutos a 580 g a 21°C.

Deseche el sobrenadante y vuelva a suspender el sedimento en medio.

- 35 Cuente las células en azul Tripano.

Centrifugue las células durante 10 minutos a 390 g, 21°C.

Deseche el sobrenadante y vuelva a suspender el sedimento en medio.

Tome las células CCP para la tinción de FACS.

- 40 De acuerdo con una realización de la presente invención, el recubrimiento de un recipiente de cultivo de tejidos se lleva a cabo utilizando el siguiente protocolo:

Los recipientes de cultivo no están recubiertos o están recubiertos con un material o una combinación de materiales como colágeno, fibronectina, plasma autólogo, CD34, BDNF, b-FGF o NGF.

Ejemplo 1. Recubrimiento de matraces T75 con 25 µg/ml de fibronectina y 5 ng/ml de BDNF

Prepare 50 ml de solución de fibronectina 25 µg/ml en PBS.

- 5 Llene cada matraz con 2-5 ml de fibronectina 25 µg/ml.

Incube a 37°C durante al menos 30 min.

Recoja la solución de fibronectina.

Lave el matraz dos veces en 10 ml de PBS.

Prepare 50 ml de solución de BDNF de 5 ng/ml en PBS.

- 10 Llene cada matraz con 2-5 ml de BDNF 10 ng/ml.

Incube a 37°C durante 1 hora.

Recoja la solución.

Lave el matraz dos veces en 10 ml de PBS.

Ejemplo 3. Recubrimiento de matraces T75 con plasma autólogo

- 15 Llene cada matraz con 2-5 ml de plasma autólogo.

Incube a 37°C durante al menos 30 min.

Recoja el plasma no unido.

Lave el matraz dos veces en 10 ml de PBS.

- 20 De acuerdo con una realización de la presente invención, la preparación del suero se lleva a cabo usando el siguiente protocolo:

El suero puede obtenerse directamente o prepararse a partir de plasma.

Ejemplo 1. Preparación de suero a partir de plasma humano:

Tome 100 ml de plasma

Agregue 0,5-1,0 ml de CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O 0,8M para cada 50 ml de plasma.

- 25 Incube durante 0,5-3 horas a 37°C.

Centrifugue el plasma coagulado 5 min a 2500 g.

Recoja el suero en un tubo nuevo, evitando la coagulación.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la preparación del medio se lleva a cabo usando el siguiente protocolo:

- 30 Use el medio en los 10 días siguientes desde su fecha de preparación. El medio debe estar libre de suero o contener 1-20% de suero autólogo y/o 1-20% de medio acondicionado.

El medio puede contener uno o más aditivos, como LIF, EPO, IGF, b-FGF, M-CSF, GM-CSF, TGF-alfa, TGF-beta, VEGF, BHA, BDNF, B27, F12, NGF, S-100, GDNF, CNTF, EGF, NT3, NT4/5, NGF3, CFN, ADMIF, estrógeno, prolactina, un adrenocorticoide, glutamato, serotonina, acetilcolina, NO, ácido retinoico (RA), heparina, insulina, forskolina y/o cortisona, y/o un derivado de cualquiera de estos, en varias concentraciones, que típicamente varían de aproximadamente 100 pg/ml a aproximadamente 100 µg/ml (o equivalentes molares) y en varias relaciones en volúmenes de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:25 o de aproximadamente 1:25 a aproximadamente 1:500 del volumen medio total.

- 35

Ejemplo 1. Medio para potenciar la NPCP derivada de CCP

- 40 Medio sin suero (por ejemplo, X-vivo 15 (TM))

10% suero autólogo

10 ng/ml bFGF

50 ng/ml NGF

25 ng/ml BDNF

Ejemplo 2. Medio para mejorar la NPCP derivada de CCP

- 5 Prepare el medio como se describe en el Ejemplo 1.

Añada 200  $\mu$ M de BHA durante las últimas 24 horas de cultivo

Ejemplo 3. Medio para mejorar NPCP derivada de CCP

Medio para los días 1-5:

Medio sin suero (p. ej., X-vivo 15 (TM))

- 10 10% suero autólogo

5 UI/ml de heparina

10 ng/ml de bFGF

50 ng/ml NGF

25 ng/ml BDNF

- 15 Medio definido para los días 5-30:

Medio sin suero/(p. ej., X-vivo 15 (TM))

5 UI/ml de heparina

33,3% F12

2% B27

- 20 20 ng/ml bFGF

20 ng/ml EGF

Ejemplo 4. Medio para mejorar el NPCP derivado de CCP

Medio para los días 1 a 5:

Medio sin suero (p. ej., X-vivo 15 (TM))

- 25 suero autólogo al 10%

5 UI/ml de heparina

Medio definido para los días 5-30:

Medio sin suero/(por ejemplo, X-vivo 15 (TM))

33,3% F12

- 30 4% B27

20 ng/ml bFGF

20 ng/ml EGF

De acuerdo con una realización de la presente invención, el cultivo de una CCP para producir una NPCP se lleva a cabo usando el siguiente protocolo:

- 35 Ejemplo 1. Cultivo de la suspensión de células CCP en matraces T75.

Centrifugue la suspensión durante 15 minutos a 450 g, 21°C.

Deseche el sobrenadante.

## ES 2 763 357 T3

Vuelva a suspender el sedimento a 1-2,5 millones de células CCP/ml.

Siembre las células en matraces T75

Incube los matraces T75, placas y portaobjetos a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

Ejemplo 2. Vuelva a sembrar las células adherentes y/o separadas y/o flotantes

- 5 Para algunas aplicaciones, se puede lograr una mayor expansión y diferenciación de la CCP volviendo a sembrar las células recolectadas en nuevas placas recubiertas previamente en medio de cultivo.

Recoja todas las CCP cultivados.

Centrifugue los tubos durante 10 minutos a 450 g, 21°C.

Deseche el sobrenadante.

- 10 Vuelva a suspender las células en medio de cultivo y siembre en un nuevo matraz T75 recubierto previamente.

Continúe cultivando las células y realice todas las demás actividades (p. ej., cambie el medio, inspección visual y/o citometría de flujo), según corresponda, como se describe en este documento.

Este procedimiento puede realizarse semanalmente durante el período de cultivo y/o en las 24, 48 ó 72 horas antes de la terminación del cultivo.

- 15 De acuerdo con una realización de la presente invención, el cambio del medio en los cultivos de CCP en crecimiento continuo se lleva a cabo usando el siguiente protocolo:

El cambio del medio en matraces en crecimiento continuo debe ocurrir cada 3-4 días.

Ejemplo 1. El cambio del medio en matraces T-75.

Recoja las células no adherentes en tubos de 50 ml.

- 20 Llene cada matraz con 10 ml de medio de cultivo fresco enriquecido con medio acondicionado.

Centrifugue los tubos durante 10 minutos a 450 g, RT; deseche el sobrenadante.

Mezcle suavemente el sedimento celular, vuelva a suspender en 10 ml/matraz de medio de cultivo fresco y devuélvalo a los matraces.

- 25 De acuerdo con una realización de la presente invención, la recolección de la NPCP resultante se lleva a cabo usando el siguiente protocolo:

Ejemplo 1. Colección de cultivos enriquecidos de NPCP.

Recoja las células no adherentes en tubos de 50 ml.

Lave la superficie del matraz pipeteando con PBS frío.

Añada 5 ml de PBS frío.

- 30 Separe las células adherentes restantes con un raspador y, si es necesario, 5 ml de EDTA.

Recoja las células separadas y agréguelas al tubo.

Centrifugue el tubo durante 5 minutos, a 450 g, temperatura ambiente.

Vuelva a suspender el sedimento en 2-5 ml de PBS.

Cuente las células.

- 35 De acuerdo con una realización de la presente invención, la conservación del producto celular se lleva a cabo utilizando el siguiente protocolo:

El producto celular puede mantenerse en medios de conservación o congelarse en tampón de congelación hasta su uso para el trasplante a un paciente.

Ejemplo 1. Criopreservación de NPCP

- 40 Prepare un tampón de congelación que contenga 90% de suero autólogo humano y 10% de DMSO.

Ejemplo 2. Conservación a corto plazo de NPCP

Prepare un medio de conservación que incluya un medio de crecimiento que contenga 1-20% de suero autólogo con pocos aditivos o ninguno.

5 De acuerdo con una realización de la presente invención, la tinción FACS se lleva a cabo usando el siguiente protocolo:

Ejemplo 1. Protocolo de tinción FACS para células permeabilizadas fijas:

Nº. Tubo	Tinción 1ª etapa	Tinción 2ª etapa	Objetivo de la tinción
1.	-	-	Control no teñido
2.	CD45-FITC	-	Tinción individual para PMT y ajustes de compensación
3.	CD45-PE	-	
4.	mIgG1 FITC	-	Control isotipo
5.	mIgG1	Anti ratón-PE	Control isotipo
6.	Neu-N-Alexa488		
7.	Nestina	Anti ratón-PE	
8.	β-Tubulina	Anti ratón -PE	
9.	O4	Anti ratón-PE	
10.	GFAP	Anti ratón-PE	

De acuerdo con una realización de la presente invención, la tinción inmunofluorescente se lleva a cabo usando el siguiente protocolo:

Ejemplo 1. Tinción celular de NPCP fijo por portaobjetos

10 Protocolo de tinción

Nº. Tubo	Tinción 1ª etapa	Tinción 2ª etapa	Objetivo de la tinción
1.		NeuN-Alexa488	Control isotipo
2.	-mIgG1	mIgG1 -FITC	
3.	mIgG1	Anti ratón-PE	Control isotipo
4.	Nestina	Anti ratón-FITC	
5.	§-Tubulina	Anti ratón-FITC	
6.	GFAP	Anti ratón-PE	
7.	O4	Anti ratón-cy3	

Pruebas in vitro de la respuesta fisiológica de NPCP a neurotransmisores

Ejemplo 1. Ensayo de absorción de calcio

15 La entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de canales de calcio dependientes del voltaje en respuesta a la estimulación de neurotransmisores con glutamato 100 μM y GABA 100 μM (Sigma-Aldrich) se realizó como se describe en este documento.

Las células recuperadas fueron cultivadas durante la noche en portaobjetos de vidrio de 33 mm recubiertos con poli-L-lisina.

Las células se incubaron durante 30 minutos con éster acetoximetílico Fura-2 5 mM (AM; TEF-Lab) en 0,1% BSA en solución de NaCl Ringer.

20 Después de cargar el tinte, las células se lavaron en solución de Ringer y los portaobjetos se montaron en una cámara que permitía la superfusión de células.

## ES 2 763 357 T3

Se excitó Fura-2 a 340 nm y 380 nm y se fotografió con un filtro de paso largo de 510 nm. El sistema de imágenes consistió en un microscopio invertido Axiovert 100 (Zeiss), un monocromador Polychrome II (TILL Photonics) y un dispositivo acoplado a carga (PCO) refrigerado por SensiCam.

5 Las mediciones de imágenes fluorescentes se adquirieron con Imaging Workbench 2 (Axon Instruments). (Ver Hershinkel M, Moran A, Grossman N et al. A zinc-sensing receptor triggers the release of intracellular Ca<sup>2+</sup> and regulates ion transport. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 11749-11754).

Para algunas aplicaciones, las técnicas descritas en el presente documento se ponen en práctica en combinación con las técnicas descritas en una o más de las referencias citadas en la presente solicitud de patente.

10 Debe apreciarse que a modo de ilustración y no de limitación, las técnicas se describen en el presente documento con respecto a las células derivadas de una fuente animal.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición de materia, derivada por la estimulación in vitro de una población de células centrales (CCP) derivada de la sangre de al menos 5 millones de células que tienen una densidad de menos de 1,072 g/ml, y al menos 1,5% de las cuales son CD34+CD45-/débil, con factores de crecimiento para diferenciarse en una población de células progenitoras/precursoras neurales (NPCP) en donde la composición de la materia comprende la NPCP, en donde la NPCP comprende células que expresan uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: Neu-N, nestina y beta-tubulina y células que expresan uno o más de CD34 y CD117.
2. La composición de materia según la reivindicación 1, en la que al menos algunas de las células de la población de células progenitoras/precursoras neurales expresan O4.
- 10 3. La composición de materia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que al menos algunas de las células de la población de células progenitoras/precursoras neurales expresan GFAP.
4. La composición de materia según la reivindicación 1, en la que la población de células centrales se deriva de una o más fuentes seleccionadas del grupo que consiste en: sangre de cordón umbilical, médula ósea, sangre movilizada y células mononucleares de sangre periférica.
- 15 5. La composición de materia de acuerdo con la reivindicación 1, en la que al menos el 30% de la población de células centrales comprende células que son CD14+.
6. La composición de materia de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la NPCP comprende además uno o más tipos de células seleccionadas del grupo que consiste en: neuronas del SNC, oligodendrocitos, astrocitos, neuronas del sistema nervioso periférico (SNP) y células de la retina.
- 20 7. La composición de materia de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la NPCP comprende al menos 1 millón de células, y en donde más del 1,5% de las células de la NPCP expresan uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: neu-N, nestina, beta-tubulina, O4, GFAP, MAP Tau, S-100, enolasa neuronal específica (NSE), colina acetiltransferasa (ChAT), ácido gamma-aminobutírico (GABA), GDNF, BDNF, NGF, galactocerebrosida (GalC), dopamina, epinefrina, noradrenalina, glutamato, acetilcolina y serotonina.
- 25 8. La composición de materia según la reivindicación 1, en la que al menos algunas de las células de la NPCP tienen canales activados por voltaje, y en el que al menos algunas de las células de la NPCP responden a neurotransmisores.
9. La composición de materia según la reivindicación 1, en la que al menos algunas de las células de la población de células progenitoras/precursoras neurales expresan Neu-N, nestina y beta-tubulina.
- 30 10. La composición de materia de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la NPCP se genera cultivando la CCP con al menos un factor derivado de un tejido diana.
11. La composición de materia de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la NPCP se genera cultivando conjuntamente la CCP con un tejido diana.
- 35 12. La composición de materia según la reivindicación 1, en la que la NPCP se genera incubando la CCP en un recipiente que tiene una superficie que comprende al menos uno de: un anticuerpo, plasma autólogo y una molécula que mejora el crecimiento que no sea colágeno o fibronectina.
13. La composición de materia según la reivindicación 12, en la que la NPCP se genera aplicando a la superficie una capa que incluye la molécula que mejora el crecimiento y una capa separada que incluye al menos uno de: colágeno, fibronectina y plasma autólogo.

40

FIG. 1A

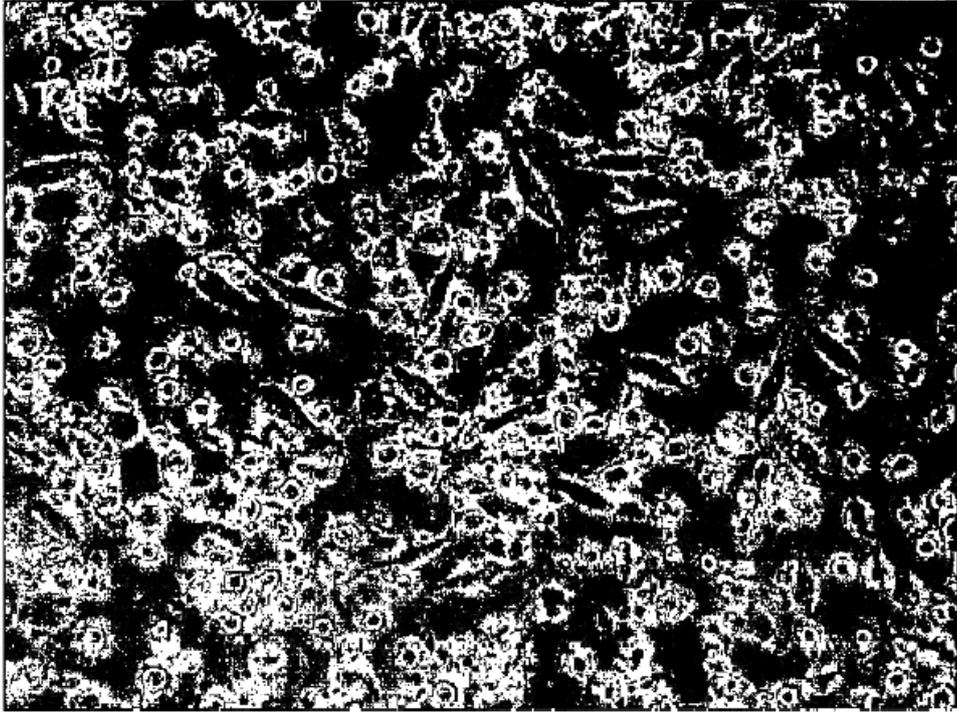


FIG. 1B

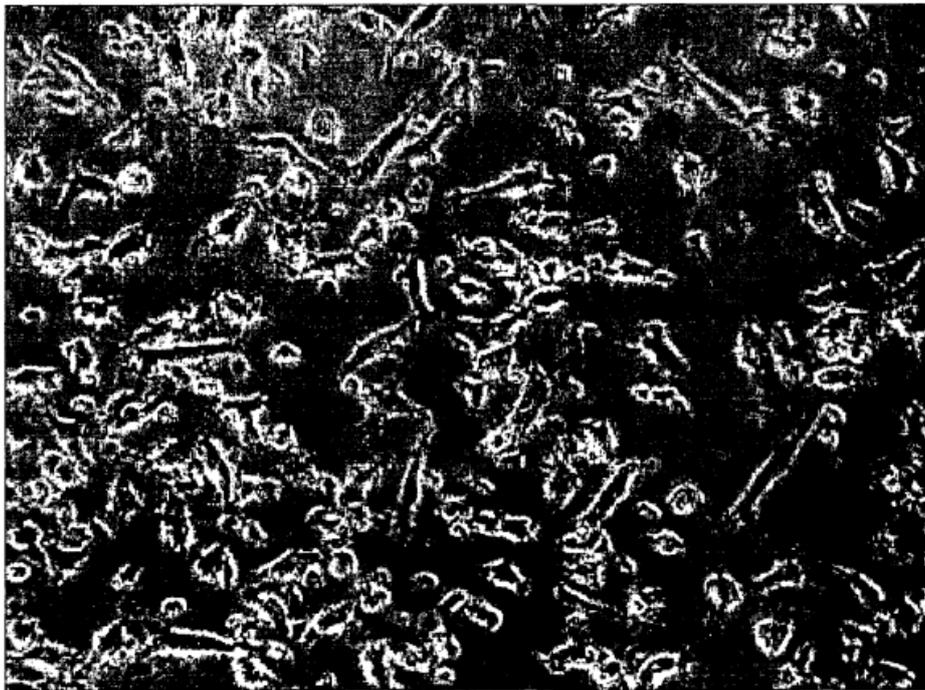


FIG. 1C

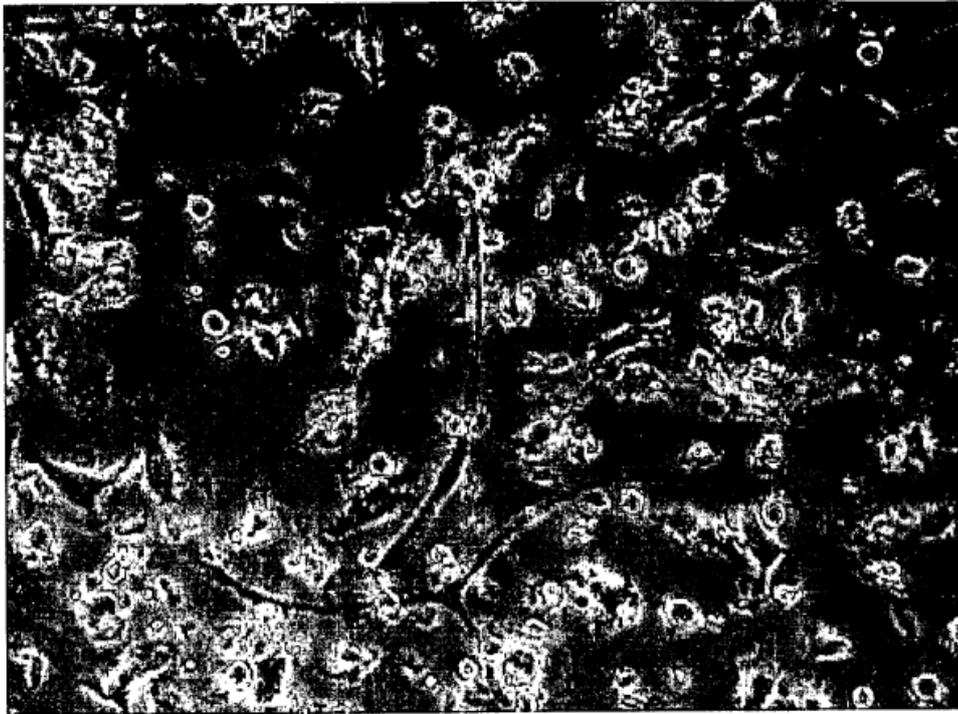


FIG. 1D



FIG. 1E



FIG. 1F

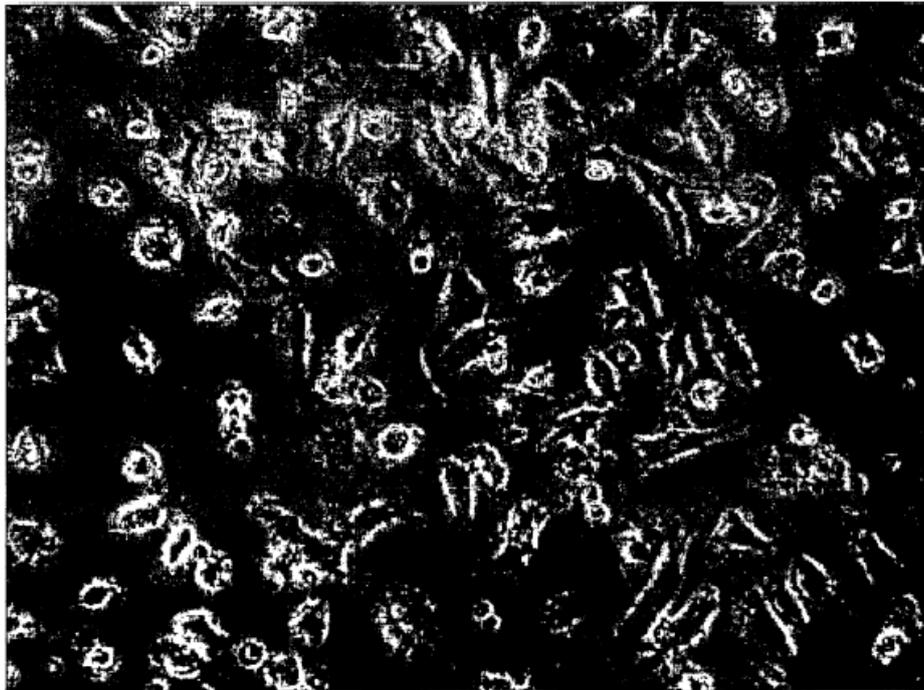


FIG. 2

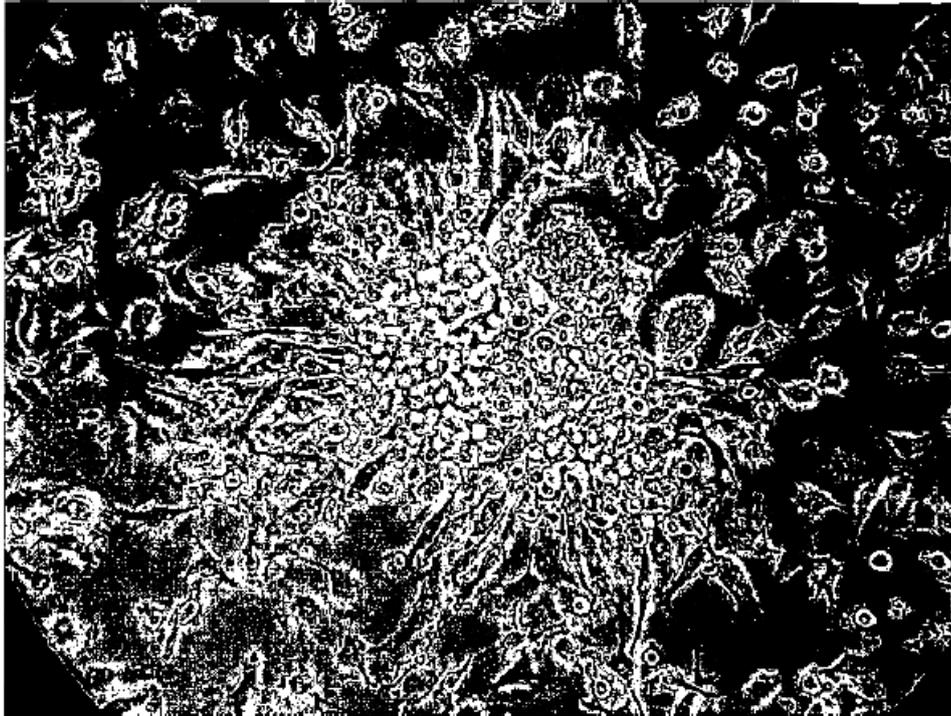


FIG. 3A

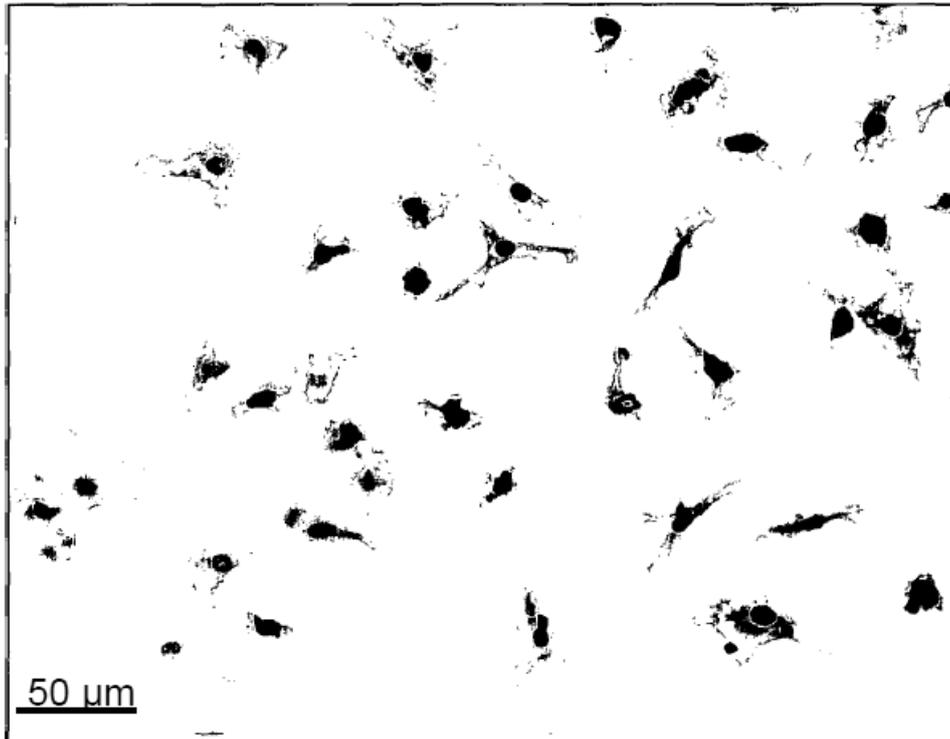


FIG. 3B

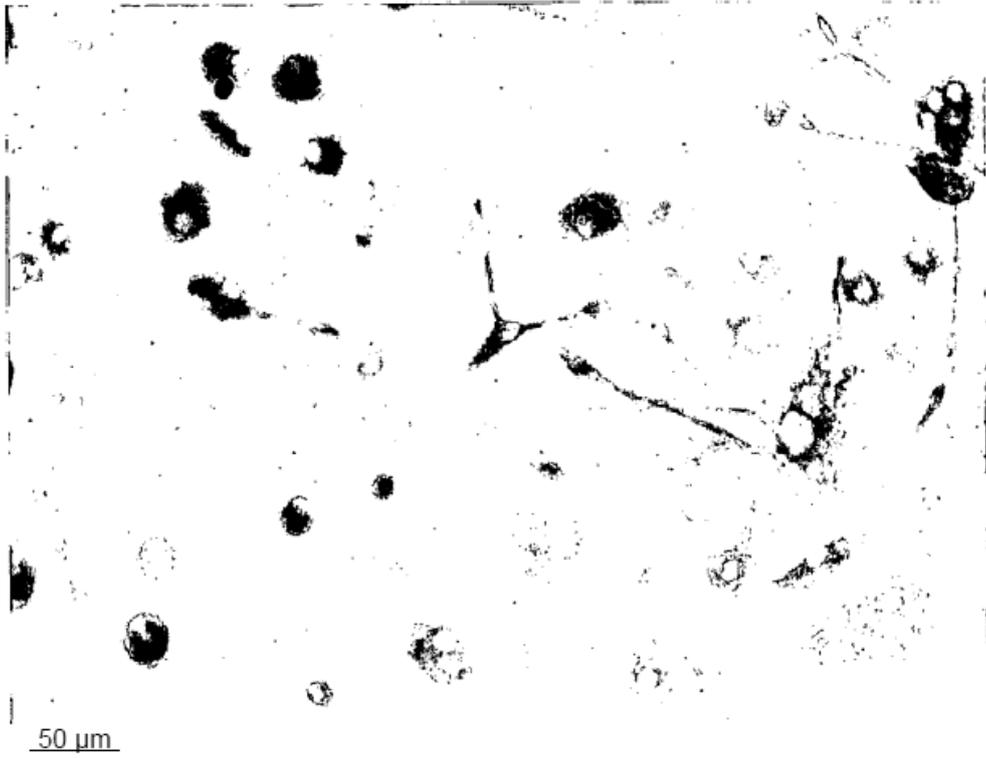


FIG. 3C

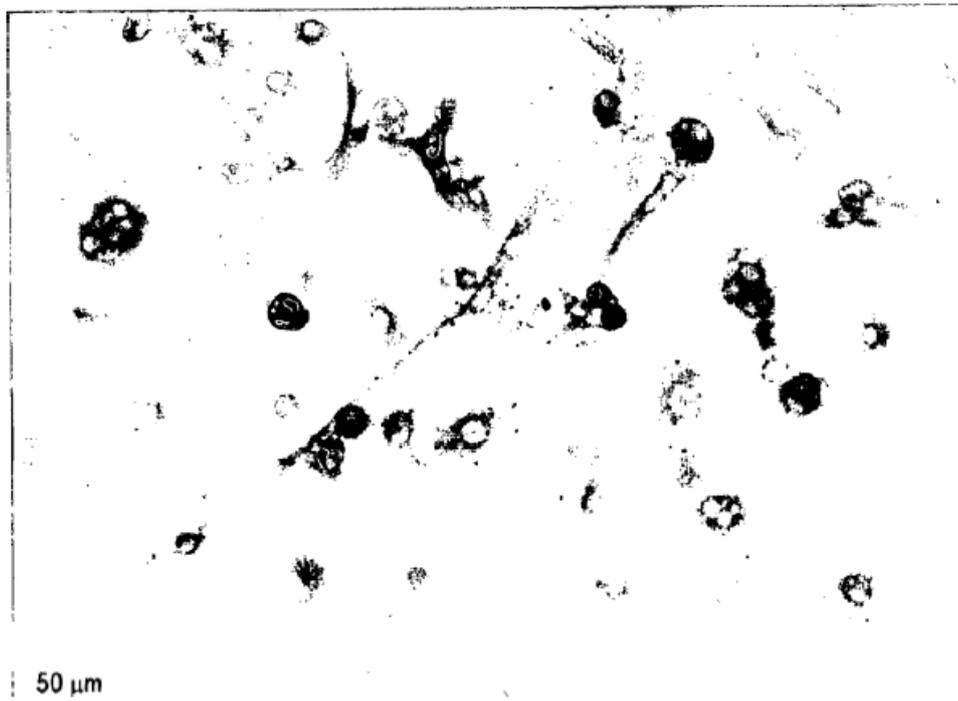


FIG. 3D

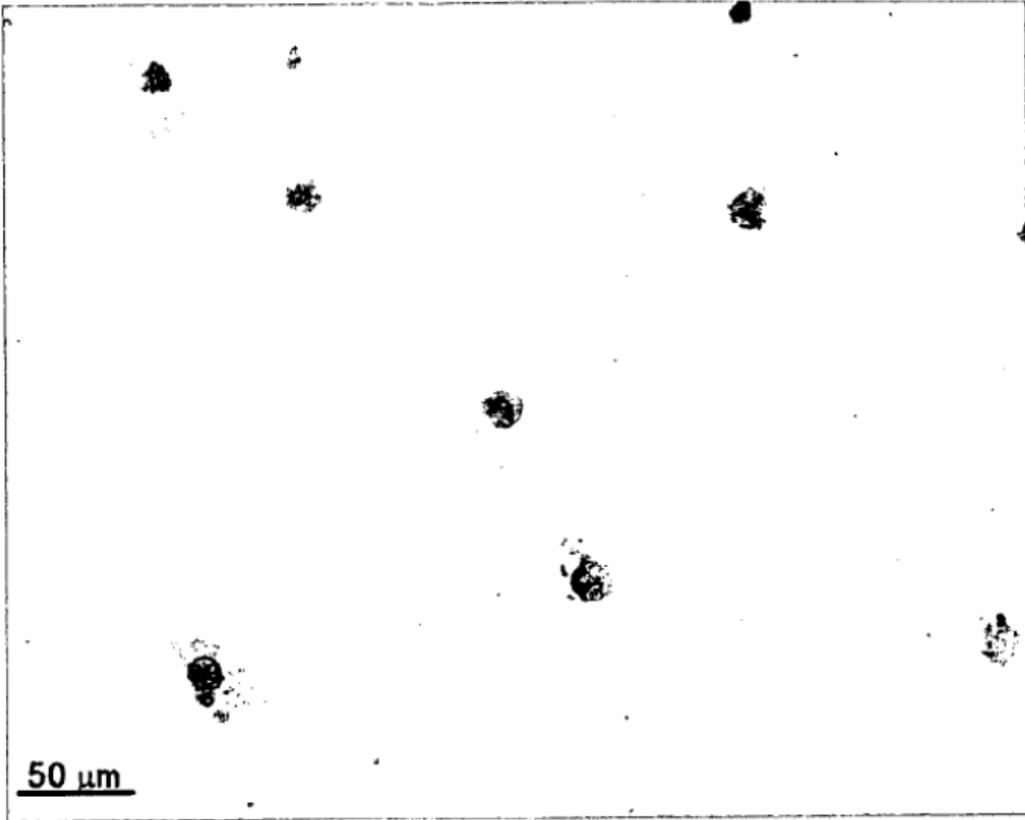


FIG. 3E

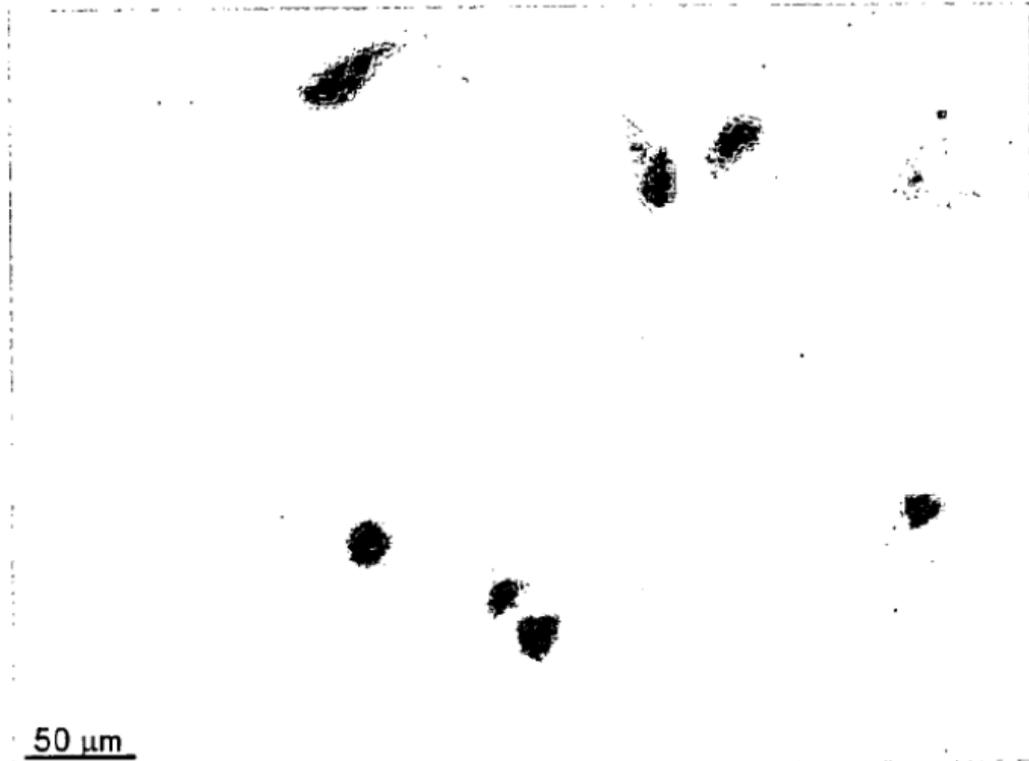


FIG. 4

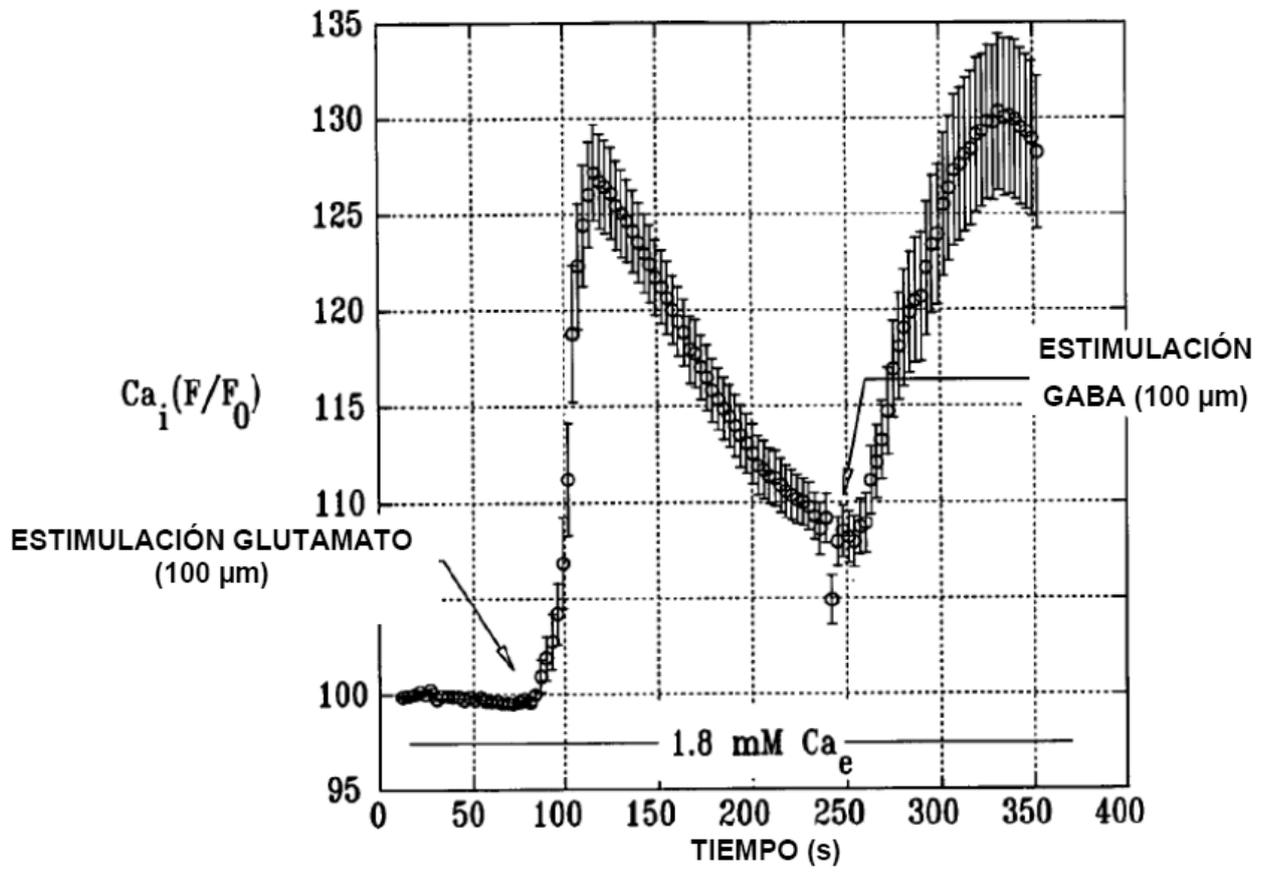


FIG. 5

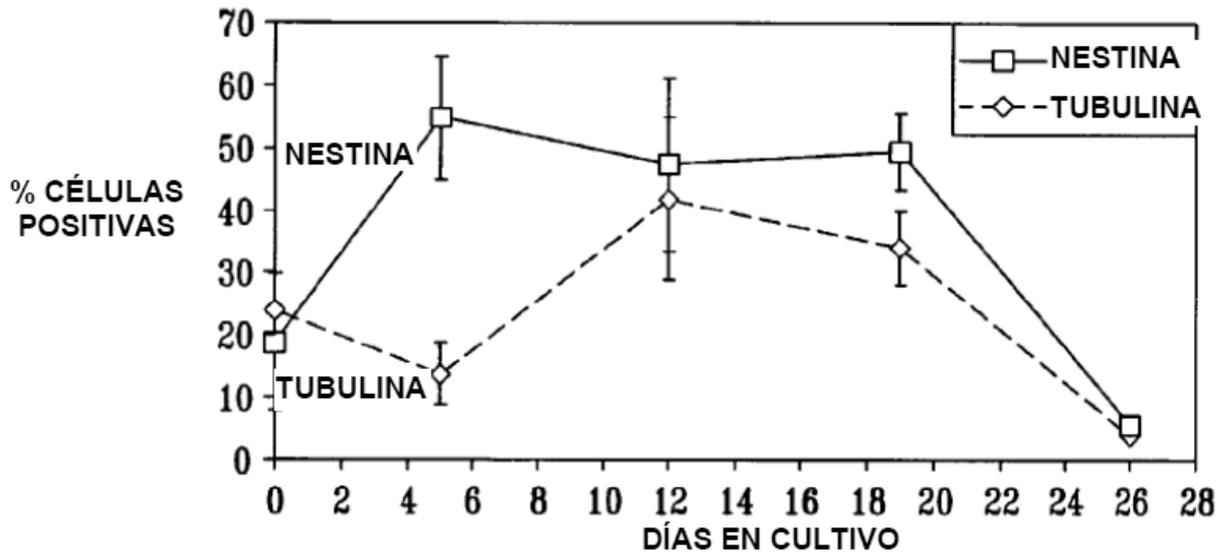


FIG. 6A



FIG. 6B

