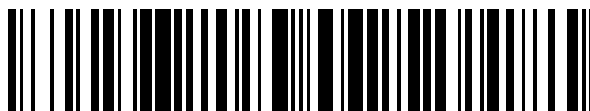


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 804**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/0797 (2010.01)

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2004 E 04812676 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 1709151**

54 Título: **Composiciones y métodos para la propagación de células progenitoras neurales**

30 Prioridad:

02.12.2003 US 526242 P

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

16.08.2016

73 Titular/es:

**CELAVIE BIOSCIENCES, LLC (100.0%)
722 Hiesters Lane
Reading PA 19605, US**

72 Inventor/es:

KOPYOV, OLEG, V.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 579 804 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para la propagación de células progenitoras neurales

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere en general a la propagación y uso de células madre pluripotentes y de células progenitoras neurales. La invención proporciona composiciones y métodos para el aislamiento, la preparación, el crecimiento, la crioconservación, la diferenciación y el trasplante de células madre y progenitoras neurales. Las células madre y las células progenitoras neurales pueden ser útiles para fines terapéuticos, diagnósticos y de investigación.

Antecedentes de la invención

15 Los trastornos del sistema nervioso central (SNC) incluyen una serie y una diversidad de afecciones, tales como enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer y de Parkinson), lesión cerebral aguda (por ejemplo, ictus, traumatismo craneoencefálico, parálisis cerebral) y disfunción neurológica (por ejemplo, depresión, epilepsia, esquizofrenia). A medida que aumenta la población anciana, las enfermedades neurodegenerativas se convierten en una importante preocupación creciente, ya que el riesgo para muchos de estos trastornos aumenta con la edad. Estas enfermedades neurodegenerativas, que incluyen la enfermedad de Alzheimer (EA), la esclerosis múltiple (EM), la enfermedad de Huntington (EH), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Parkinson (EP) se han vinculado a la degeneración de las células neurales en lugares identificados del SNC, dando como resultado la incapacidad de estas células o de la región relevante del cerebro para llevar a cabo su función prevista.

25 El tratamiento para los trastornos del SNC mediante la administración de compuestos farmacéuticos tiene inconvenientes, incluyendo la limitada gama de fármacos capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y el desarrollo de tolerancia a fármacos en pacientes que reciben tratamiento prolongado. Por ejemplo, los pacientes con Parkinson tratados con levodopa (L-dopa), un precursor de la dopamina que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, se hacen tolerantes a los efectos de la L-dopa y se necesita un aumento paulatino de las dosificaciones para mantener sus efectos. Además, existe una serie de efectos secundarios asociados con la L-dopa, tales como un movimiento aumentado e incontrolable.

Más de 1,5 millones de personas en los Estados Unidos padecen enfermedad de Parkinson (EP). Una vez agotado el tratamiento farmacológico de la EP, el paciente solo puede recurrir a intervenciones quirúrgicas. Las intervenciones actuales se centran en contener los síntomas de la EP, pero es imperativo intentar revertir el daño de la enfermedad. Dicha restauración podría ser posible mediante el trasplante de células progenitoras neurales.

40 El injerto de tejido neural fetal se ha aplicado al tratamiento de enfermedades neurológicas, tales como la enfermedad de Parkinson. Los injertos neurales fetales pueden evitar la necesidad de tener que administrar constantemente fármacos y también sistemas de administración de fármacos diseñados para evitar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, las células usadas para el trasplante pueden inducir una reacción inmunitaria en el hospedador receptor. Además, las células tienen que encontrarse en un estado de desarrollo en el que sean capaces de formar conexiones neurales normales con las células adyacentes.

45 El injerto también ofrece una estrategia terapéutica para las enfermedades desmielinizantes, tales como la esclerosis múltiple (EM). En las enfermedades desmielinizantes humanas, así como en modelos de roedor, existen pruebas sustanciales de que las neuronas desmielinizadas son capaces de remielinizarse *in vivo*. En la EM, por ejemplo, parece que a menudo se producen ciclos de desmielinización y remielinización. Se ha demostrado que las células aplicadas de manera exógena son capaces de remielinizar los axones desmielinizados en una serie de condiciones experimentales (véase Freidman et al., Brain Research, 378:142-146, 1986; Raine, et al., Laboratory Investigation 59:467-476, 1988). Se ha demostrado éxito usando suspensiones de células gliales disociadas preparadas a partir de médulas espinales (Duncan et al., J. Neurocytology, 17:351-360 (1988); cultivos de células de Schwann preparados a partir de nervio ciático (Bunge et al., 1992, documento WO 92/03536; Blakemore y Crang, J. Neurol. Sci., 70:207-223, 1985); cultivos de tejido cerebral disociado (Blakemore y Crang, Dev. Neurosci. 10:1-11, 1988); células precursoras de oligodendrocitos (Gumpel et al., Dev. Neurosci. 11:132-139, 1989); células O-2A (Wolswijk et al., Development 109:691-608, 1990; Raff et al., Nature 303:390-396; Hadry et al., Development 111:1061-1080, 1991); y líneas celulares O-2A inmortalizadas (Almazan y McKay, Brain Res. 579:234-245, 1992).

60 Las células O-2A son células progenitoras gliales que dan lugar únicamente *in vitro* a oligodendrocitos y astrocitos de tipo II. Las células inmunopositivas *in vivo* para el fenotipo O-2A han demostrado remielinizar satisfactoriamente neuronas desmielinizadas *in vivo* (Godfraind et al., J. Cell Biol. 109:2405-24156, 1989). La inyección de una gran cantidad de células O-2A es necesaria para remielinizar de manera adecuada todas las células diana *in vivo*. Aunque las células progenitoras O-2A pueden crecer en cultivo, solo son capaces de un número limitado de divisiones (Raff Science 243:1450-1455, 1989). Además, la técnica de aislamiento emplea una fuente de bajo rendimiento (nervio óptico) y requiere de una serie de etapas de purificación.

Se han desarrollado varias estrategias de neurotrasplante para mejorar enfermedades neurológicas, incluyendo el injerto de neuronas del SNP adulto para producir dopamina (Notter, et al., Cell Tissue Research 244:69-76, 1986), el trasplante de células que contienen monoamina aisladas de la glándula pineal y la médula adrenal de rata adulta en el córtex frontal de ratas para aliviar la indefensión aprendida, una forma de depresión (Patente de Estados Unidos n.º 4.980.174); el injerto de células de cromafina y medulares adrenales en el tronco cerebral o la médula espinal de ratas para producir analgesia cuando se indujo al tejido o célula implantados para liberar catecolaminas (Patente de Estados Unidos 4.753.635). Sin embargo, las células adrenales no adquieren un fenotipo neural normal tras su injerto en el SNC y por lo tanto tienen un uso limitado para trasplantes en donde tienen que formarse conexiones sinápticas.

Otra estrategia de neurotrasplante implica el uso de células genéticamente modificadas. Usando este método, un gen exógeno o transgén se introduce en una célula para permitir que la célula exprese el gen. Las células modificadas que contienen el gen transferido pueden trasplantarse en el lugar de la neurodegeneración y proporcionar productos, tales como neurotransmisores y factores de crecimiento (Rosenberg, et al., Science 242:1575-1578, 1988) que pueden actuar aliviando algunos de los síntomas de la degeneración. Las células modificadas se han usado generalmente para aliviar algunos de los síntomas de degeneración. Las células modificadas genéticamente se han usado en el injerto de tejido neurológico para reemplazar a células hospedadoras. Por ejemplo, se han modificado genéticamente fibroblastos con un vector retroviral que contiene un ADNc para tirosina hidroxilasa, lo que les permite producir dopamina y se han implantado en modelos animales de enfermedad de Parkinson (Patente de Estados Unidos n.º 5.082.670). Sin embargo, sigue presente el riesgo de inducir una reacción inmunitaria usando las líneas celulares disponibles en la actualidad y estas células pueden no lograr conexiones neuronales normales en el tejido hospedador.

Aunque se han hecho intentos de propagar células progenitoras neurales para su uso en neurotrasplante y para exploración de fármacos, estos esfuerzos han obtenido éxitos limitados. El medio neurobasal ha permitido tiempos de generación rápidos de las células progenitoras neurales, pero estos tiempos de generación se observan durante aproximadamente un mes, tras lo cual, las células se diferencian y pierden su fenotipo progenitor. Típicamente, con las condiciones de cultivo más óptimas, las células progenitoras neurales sobrevivirán en cultivo durante solo aproximadamente 10 pases. Además, solo aproximadamente un 1-2 % de las células progenitoras neurales sobreviven a la criopreservación. Además, los esfuerzos actuales para mantener a las células progenitoras *in vitro* requieren el uso de una capa alimentadora y/o la introducción de componentes animales. Incluso con el uso de una capa alimentadora, las células progenitoras neurales se han mantenido durante solo aproximadamente 6 meses. Para aplicaciones clínicas, es deseable obtener y mantener células progenitoras neurales humanas que no tengan componentes animales y que no requieran el uso de una capa alimentadora.

Sigue habiendo una necesidad de grandes cantidades de células progenitoras neurales y de células madre pluripotentes no diferenciadas para el trasplante y para la exploración de fármacos, en particular para células progenitoras y madre humanas. También existe la necesidad de células progenitoras neurales que sean capaces de proliferar a largo plazo *in vitro* y que sean susceptibles a una diferenciación y/o modificación genética controlada. En particular, se necesitan métodos para mantener y propagar células progenitoras neurales durante periodos de tiempo prolongados y métodos que optimicen el rendimiento después de la criopreservación.

Sumario de la invención

La divulgación proporciona composiciones y métodos para el cultivo, propagación, criopreservación y manipulación de células progenitoras neurales (CPN) y células madre pluripotentes. La invención proporciona un medio de cultivo en el que la concentración de calcio en el medio no es mayor de 0,15 mM y en algunas realizaciones, no es mayor de 0,06 mM. En algunas realizaciones, la concentración de calcio del medio es de 0,05 mM – 0,15 mM. El medio de cultivo comprende además 20 ng/ml (opcionalmente de 20 a 100 ng/ml) de factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10 ng/ml (opcionalmente de 10 a 50 ng/ml) de factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y 10 ng/ml (opcionalmente de 10 a 150 ng/ml) de factor de crecimiento transformante alta (TFG α) y opcionalmente de 7 a 30 ng/ml de factor inhibidor de leucemia (LIF). También se divulga un cultivo celular que comprende CPN suspendidas en el medio. El cultivo celular se mantiene satisfactoriamente en ausencia de una capa alimentadora y en ausencia de productos procedentes de fuentes animales no humanas.

En una realización, el cultivo celular comprende además de 0,03 a 0,09 mM de cloruro de calcio, en el que el medio se enrasa a volumen completo en un medio esencial medio sin calcio y tiene una concentración total de calcio de menos de 0,1 mM. En otra realización, la concentración total de calcio es de 0,05-0,06 mM. Para criopreservación, el medio bajo en calcio se complementa con B27 (típicamente al 2 %) y dimetil sulfoxido (típicamente al 10 %) y con los factores tróficos usados en el medio de cultivo de expansión. Las CPN criopreservadas de acuerdo con la invención muestran una tasa de viabilidad mayor del 50%. En una realización, la tasa de viabilidad después de congelación-descongelación es mayor del 75%. Se ha observado una viabilidad mayor del 90 %, siendo típica una viabilidad mayor del 95 %, para las CPN criopreservadas con el medio de la invención.

Preferentemente, el medio de cultivo no contiene suero ni productos animales no humanos. El medio puede comprender además complemento B27 al 2 %. Típicamente, los factores de crecimiento EGF, bFGF, LIF y TGF α

son factores de crecimiento recombinantes y la CPN y los factores de crecimiento son humanos.

La CPN puede proceder del prosencéfalo fetal. La CPN cultivada de acuerdo con la divulgación tiene una velocidad de generación de menos de 12 días, típicamente de aproximadamente 5 días. La CPN puede continuar proliferando durante al menos 1 año *in vitro*. Se ha observado que la CPN continúa proliferando durante más de 2,5 años y después de más de 250 pases.

La divulgación proporciona además un método para propagar células progenitoras neurales que comprende cultivar tejido cerebral primario humano en un medio de cultivo de la invención. La divulgación proporciona además un método para crioconservar CPN y para optimizar la supervivencia de las CPN tras su descongelación. También se divulga un método para trasplantar CPN humanas a un hospedador. Pueden añadirse L-glutamina y factor inhibidor de leucemia (LIF) al medio de cultivo antes del trasplante para promover el crecimiento neuronal sobre la glía. El cultivo celular puede trasplantarse en lugares múltiples en el hospedador. La CPN puede modificarse genéticamente antes del trasplante para que exprese un agente terapéutico.

La divulgación proporciona además un método para propagar células madre pluripotentes (CMP). EL método comprende cultivar tejido del prosencéfalo fetal humano primario en un medio de cultivo de la invención. Puede controlarse en los cultivos la expresión de Oct4, un marcador de células madre cuya expresión se ha demostrado que aumenta en prevalencia entre células cultivadas durante un periodo de meses.

Breve descripción de las figuras

La fig. 1 es una gráfica que muestra el crecimiento de CPN en EMEM bajo en calcio (0,06 mM) complementado con ("E+") varias combinaciones de EGF (E), bFGF (F), TGF α (T) y LIF (L). E+EFT proporcionó crecimiento óptimo para las CPN en suspensión.

La fig. 2 es una gráfica que muestra el crecimiento de CPN cultivadas en medio Neurobasal™ complementado con (N+) diversas combinaciones de EGF (E), bFGF (F), TGF α (T) y LIF (L). N+EFT proporcionó crecimiento óptimo de las células unidas. Sin embargo, las tasas de crecimiento se redujeron después de 3-4 meses *in vitro*.

La fig. 3 es una fotomicrografía que muestra la inmunohistoquímica de las líneas progenitoras cerebrales T y M. Se observó una fuerte reacción positiva a BrDU en las células de la línea M5 después de 138 pases. Ampliación 20x.

La fig. 4 es una fotomicrografía de contraste de fase que muestra un crecimiento confluyente de células CPN M5. Prácticamente todas las células mantienen su estado no diferenciado. Ampliación 10x.

La fig. 5 es una fotomicrografía de contraste de fase que muestra un "cuerpo embriode" típico formado por las células progenitoras cerebrales y característico para células madre/progenitoras. Ampliación 10x.

La fig. 6 es una fotomicrografía de contraste de fase que muestra células progenitoras cerebrales del 5º pase de la línea T5 que crecen en pequeñas agrupaciones flotantes. Ampliación 10x.

La fig. 7 es una fotomicrografía de contraste de fase que muestra una pequeña agrupación flotante de CPN y una serie de células CPN que se están uniendo al matraz de cultivo debido al aumento de la concentración de Ca⁺⁺ en el medio desde 0,05 mM hasta 0,1 mM. Ampliación 10x.

La fig. 8 es una fotomicrografía de contraste de fase que muestra las CPN de la línea T5 creciendo como cuerpos embrioides. 154º pase. Ampliación 10x.

La fig. 9 es una fotomicrografía que muestra una agrupación plana de las CPN de la línea M5. Concentración de Ca⁺⁺ del medio de cultivo a 0,1 mM. El 46 % de las células son positivas para BrDU. Ampliación 20x.

La fig. 10 es una fotomicrografía que muestra una gran agrupación flotante de células de la línea T5, con una figura mitótica en el centro. Tinción de Giemza. Ampliación 40x.

La fig. 11 es una fotomicrografía que muestra las CPN positivas para tirosina hidroxilasa (TH) en el cuerpo estriado de una rata 6-OHDA lesionada. Ampliación 20x.

La fig. 12 es una micrografía electrónica que muestra la ultraestructura de una CPN no diferenciada de la línea T5. Ampliación 13.000x.

La fig. 13 es una micrografía electrónica que muestra la ultraestructura de una CPN de la línea M5. Su citoplasma contiene varias mitocondrias. Ampliación 13.000x.

La fig. 14. es una fotomicrografía que muestra CPN positivas para bromodesoxiuridina (BrDU) en una suspensión de la línea M5. Células inmunorreactivas teñidas con diaminobencidina (DAB). Ampliación 40x.

La fig. 15 es una fotomicrografía que muestra CPN positivas para bromodesoxiuridina (BrDU) en una suspensión de células individuales de M3. Células inmunorreactivas marcadas con fluoresceína. Ampliación 20x.

5 La fig. 16 es una fotomicrografía que muestra CPN positivas a nestina en una suspensión de células individuales de M3. Células inmunorreactivas marcadas con fluoresceína. Ampliación 20x.

La fig. 17 es una fotomicrografía que muestra la coexpresión de nestina y Oct-4 en las mismas CPN, la fluorescencia de color verde representa Oct-4 y la de color rojo representa nestina. 20x.

10 La fig. 18 es una fotomicrografía que muestra una neurona humana de color ámbar-marrón con las extensiones de ramificación en el centro de la imagen y una célula glial en la esquina inferior derecha en el putamen de rata. Estas células migraron desde el ventrículo cerebral del animal, que mostró una mejora del 70 % en su comportamiento rotacional 4 meses después de la inyección intraventricular de 500.000 células progenitoras cerebrales no diferenciadas. Anticuerpos anti-mitocondrias humanas. 40x.

15

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se basa en el descubrimiento de un medio de cultivo optimizado para el crecimiento prolongado de células progenitoras neurales (CPN) humanas y para la crioconservación satisfactoria de las CPN. Las CPN cultivadas de acuerdo con la divulgación son capaces de sobrevivir *in vitro* durante más de un año e incluso tres años. La crioconservación de las CPN de acuerdo con la divulgación da como resultado una viabilidad de más del 95 % tras su descongelación. Además, la divulgación proporciona variaciones en el medio de cultivo que permiten la manipulación de las CPN para que adquieran unión y diferenciación cuando se desee. Las CPN cultivadas de acuerdo con la divulgación se han trasplantado satisfactoriamente en el cerebro, proporcionando la restauración de la estructura y función en un modelo animal de enfermedad de Parkinson. Además, las mismas condiciones de cultivo usadas para propagar las CPN se han demostrado también para cultivar células madre pluripotentes (CMP) que expresan el marcador de células madre, Oct4.

25

Definiciones

30

Todos los términos científicos y técnicos usados en la presente solicitud tienen significados usados comúnmente en la técnica, a menos que se especifique lo contrario. Tal como se usa en la presente solicitud, las siguientes palabras o frases tienen los significados especificados.

35

Tal como se usa en el presente documento, medio "bajo en calcio" se refiere a menos de 0,15 mM de calcio (concentración final) y típicamente aproximadamente 0,03-0,09 mM. El medio bajo en calcio no incluye medio sin calcio. Medio "alto en calcio" se refiere a más de 0,15 mM de calcio.

40

Tal como se usa en el presente documento, una "célula progenitora neural" (CPN) se refiere a células que son inmunopositivas para nestina, capaces de crecer de manera continua en cultivos en suspensión y, tras su exposición a condiciones adecuadas, pueden diferenciarse en neuronas o células gliales. Una célula progenitora neural, tal como se cita en el presente documento, es capaz de sobrevivir durante al menos 2-3 años *in vitro*.

45

Tal como se usa en el presente documento, "célula madre pluripotente" (CMP) se refiere a células que son inmunopositivas para el marcador de células madre, Oct4.

50

Tal como se usa en el presente documento, "genéticamente modificado" se refiere a células que se han manipulado para que contengan un transgén mediante métodos naturales o recombinantes. Por ejemplo, las CPN o su descendencia pueden modificarse genéticamente mediante la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido deseado.

55

Tal como se usa en el presente documento, "transgén" significa ADN que se inserta en una célula y que codifica una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína funcional. Típicamente, la proteína codificada es capaz de ejercer un efecto terapéutico o regulador en las células del SNC.

60

Tal como se usa en el presente documento, "proteína" o "polipéptido" incluye proteínas, fragmentos funcionales de proteínas y péptidos, ya sean aislados de fuentes naturales, producidos mediante técnicas recombinantes o sintetizados químicamente. Los polipéptidos de la invención comprenden típicamente al menos aproximadamente 6 aminoácidos y son lo suficientemente largos como para ejercer un efecto biológico o terapéutico.

65

Tal como se usa en el presente documento, "vector" significa una construcción que es capaz de suministrar y, preferentemente, expresar uno o más genes o secuencias de interés en una célula hospedadora. Los ejemplos de vectores incluyen, pero sin limitación, vectores víricos, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, vectores de plásmidos, cósmidos o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes condensadores catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y determinadas células eucariotas, tales como células productoras.

Tal como se usa en el presente documento, una "secuencia de control de la expresión" significa una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de la expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o inducible o un potenciador. La secuencia de control de la expresión está unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir.

La expresión "ácido nucleico" o el término "polinucleótido" se refieren a un polímero de desoxirribonucleótidos o de ribonucleótidos en forma mono o bicatenaria y, a menos que se limite de otro modo, abarca análogos conocidos de nucleótidos naturales que hibridan con ácidos nucleicos de una manera similar a la de los nucleótidos de origen natural.

Tal como se usa en el presente documento, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que, cuando se combina con un ingrediente activo, permite que el ingrediente conserve la actividad biológica y que no sea reactivo con el sistema inmunitario del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales, tales como solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Los diluyentes preferidos para administración en aerosol o parenteral son el suero salino tamponado con fosfato o el suero salino normal (al 0,9 %).

Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan mediante métodos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990).

Tal como se usa en el presente documento "un", "uno" o "una" significa al menos uno/a, a menos que se indique claramente lo contrario.

Células progenitoras neurales

La divulgación proporciona células progenitoras neurales (CPN) que pueden mantenerse de manera indefinida en cultivo, teñirse positivamente para bromodesoxiuridina (BrDU) y nestina y son multipotentes. Las CPN son capaces de generar neuronas (por ejemplo, células positivas a MAP2, a enolasa específica de neuronas o a neurofilamentos) y glía (por ejemplo, células positivas a GFAP o galactocerebrósido). Las CPN pueden mantenerse en cultivo celular, típicamente como un cultivo en suspensión, durante al menos un año. Las CPN descritas en el presente documento se han mantenido durante hasta 2,5 años, habiéndose cultivado algunas CPN durante tres años.

Las CPN muestran un 50 % de crecimiento en los primeros 2 días en cultivo y tiempos de generación de menos de 10 días, típicamente de aproximadamente 6 días. Se han observado tiempos de generación tan breves como de 5 días. Además, estas células continúan creciendo en cultivo durante periodos de tiempo prolongados. Sin embargo, a diferencia de las CPN cultivadas en medio convencional, tal como medio Neurobasal™, estos cultivos no muestran una reducción después de 3-4 meses, sino que sobreviven y se expanden durante años y a lo largo de cientos de pases.

Además, las CPN muestran una estructura y función normal que es típica de las células progenitoras. Tal como se muestra en la figura 5, las CPN forman cuerpos embrioides en cultivo. La figura 4 muestra un crecimiento confluyente de CNP que permanecen no diferenciadas y la figura 6 muestra CPN que crecen en agrupaciones flotantes. Las figuras 12 y 13 son micrografías electrónicas que muestran la ultraestructura normal de los CPN de la invención.

Las CPN pueden prepararse a partir del mesencéfalo y/o telencéfalo de cerebro fetal, tal como se describe en el ejemplo de referencia 1 más adelante. Típicamente, el tejido se disecciona en un medio aséptico de propósito general, tal como solución salina equilibrada de Hank (HBSS) con 0,25 µg/ml de fungizona y 10 µg/ml de gentamicina, en condiciones estériles.

Células madre pluripotentes

La divulgación proporciona células madre pluripotentes (CMP) que pueden mantenerse en cultivo de manera indefinida y que pueden teñirse positivamente para el marcador de células madre Oct4. Las CMP coexpresan Oct4 y nestina, lo que indica que estas células son capaces de generar neuronas y glía. Las CMP pueden mantenerse en cultivo celular, típicamente como un cultivo en suspensión, durante al menos un año. Los cultivos de células progenitoras/madre descritos en el presente documento incluirán inicialmente un pequeño porcentaje de células positivas a Oct4 y principalmente células CPN positivas a nestina. A lo largo de un periodo de meses en cultivo, aumenta significativamente la proporción de células positivas a Oct4. Por ejemplo, un cultivo típico cambiará de tener un 5 % de células positivas a Oct4 a hasta un 30 % de células positivas a Oct4 en cuatro meses.

Las CMP pueden usarse en todos los modos descritos en el presente documento para las CPN. El estado positivo a Oct4 de estas células indica que son capaces de muchos usos adicionales más allá del ambiente neural. La naturaleza pluripotente de estas células las hace atractivas para su disposición en una diversidad de ambientes tisulares, en los que las citocinas locales (naturales y/o suministradas de manera exógena) u otras señales inducen la diferenciación y migración adecuadas. En la descripción de métodos, más adelante, se entiende que CPN se

refiere a CPN y/o a CMP.

Medios y métodos de cultivo celular

5 La estructura y función de las CPN en cultivo se somete a manipulación mediante el medio de cultivo. Por ejemplo, elevar la concentración de calcio en el medio de 0,05 mM a 0,1 mM causa la unión de las células progenitoras al matraz de cultivo (véase la fig. 7). La adición de LIF al medio de cultivo alarga el tiempo de generación, pero permite una mayor población de neuronas. La adición de LIF también ayuda a prevenir la formación de grandes agrupaciones de CPN. El TGF α en el medio sirve para reducir significativamente el tiempo de generación (por ejemplo, desde 14 días hasta 5 días). Por consiguiente, el medio de cultivo se selecciona de acuerdo con los objetivos concretos, favoreciendo algunos ingredientes el crecimiento y la expansión y favoreciendo otros ingredientes la unión y la diferenciación.

15 Para propósitos generales, el cultivo celular requiere un medio basal bajo en calcio (por ejemplo, EMEM sin Ca⁺⁺ complementado con cloruro cálcico), típicamente un complemento de B27 o equivalente y factores de crecimiento (por ejemplo, EGF, FGF, TGF α). Los ingredientes opcionales incluyen L-glutamina y LIF, que promueven el crecimiento de las neuronas.

20 El ejemplo de referencia 3, más adelante, proporciona una descripción detallada de la optimización del medio de cultivo para la expansión y para la diferenciación de CPN. En general, el crecimiento y la expansión prolongados requieren una baja concentración de calcio. Esto se consigue típicamente usando un medio esencial mínimo sin calcio (EMEM) al que se añade calcio. Se han observado crecimiento y expansión óptimos a concentraciones de calcio de 0,05-0,06 mM. A medida que aumenta la concentración de calcio, por ejemplo, por encima de 0,15 mM, se observa la formación de redes entre las neuronas en cultivo ya que adoptan un fenotipo neuronal más diferenciado. En estos cultivos altos en calcio, solo un 1-2 % de las células son inmunopositivas para el marcador astrocítico GFAP, incluso sin la adición de LIF al medio de cultivo.

30 Las CPN se cultivan típicamente en cultivos en suspensión. El empujamiento inicial de células primarias fue óptimo a de 30.000 a 50.000 células/cm². Pueden efectuarse los cambios de medio cada 6 días extrayendo las células a un tubo de ensayo y centrifugando (por ejemplo, 5 min a 1.500 rpm). Típicamente, se desecha la totalidad salvo los 2 ml del medio original y el sedimento se resuspende en los restantes 2 ml de medio original combinados con 3 ml adicionales de medio nuevo. Cuando la densidad supera las 400.000 células/ml, pueden separarse las células en dos vasos de cultivo (por ejemplo, matraces T75). La trituración de las células en el momento de la alimentación ayuda a romper las agrupaciones de CPN y mantener su suspensión en el medio de cultivo. Los expertos en la materia apreciarán que se toleran variaciones de estos parámetros y que pueden optimizarse para ajustarse a objetivos y condiciones particulares.

40 Las CPN pueden usarse en aplicaciones terapéuticas y diagnósticas, así como para la exploración de fármacos y manipulación genética. Las NPC y/o los medios de cultivo de la invención pueden proporcionarse en forma de kit, incluyendo opcionalmente envases y/o jeringas y otros materiales, haciendo que estén listas para su uso en cualquiera de estas aplicaciones.

Crioconservación de CPN

45 La divulgación proporciona métodos y medios optimizados para la congelación y descongelación de las CPN. La capacidad para conservar y descongelar satisfactoriamente las CPN es valiosa para su utilidad en aplicaciones clínicas y asegurar un suministro continuo y constante de NPC adecuadas. Mientras que la mayoría de los expertos que trabajan con poblaciones de células progenitoras observan una supervivencia de solo el 1-2 % de células después de congelación-descongelación, la presente invención ofrece medios y métodos que dan como resultado una supervivencia de más del 50 % después de la congelación-descongelación, con una viabilidad típicamente mayor del 95 %.

55 Para su crioconservación, las CPN se suspenden en un medio bajo en calcio complementado con B27 y DMSO y los factores tróficos usados en el medio de cultivo de expansión. Típicamente, los factores de crecimiento en el medio de crioconservación comprenden 20-100 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF); 10-50 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y 1-150 ng/ml de factor de crecimiento transformante alfa (TGF α). Para la descongelación, se calientan precalientan tanto el medio de cultivo como el matraz, u otro vaso en el que se cultiven las CPN, a 15-40 °C, preferentemente a 37 °C. Típicamente, se precalientan los matraces de cultivo (u otros vasos) en una incubadora con las mismas condiciones o similares de gas, humedad y temperatura a las que se usarán para cultivar las células. Por ejemplo, la temperatura típica es de aproximadamente 37 °C y el nivel típico de CO₂ es de aproximadamente el 5 % (y el 95 % restante O₂).

Uso terapéutico de CPN

65 Las CPN pueden implantarse en el sistema nervioso central (SNC) de un hospedador usando técnicas convencionales. El trasplante o "injerto" neural implica el trasplante de células en el parénquima, en las cavidades

ventriculares o por vía subdural sobre la superficie de un cerebro hospedador. Las condiciones para un trasplante satisfactorio incluyen: 1) viabilidad de las células implantadas; 2) formación de las conexiones adecuadas y/o la expresión fenotípica adecuada; y 3) cantidad mínima de reacción patológica en el lugar del trasplante.

5 El uso terapéutico de las CPN puede aplicarse a afecciones degenerativas, desmielinizantes, excitotóxicas, neuropáticas y traumáticas del SNC. Los ejemplos de afecciones que pueden tratarse mediante injertos de CPN incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (EH), enfermedad de Alzheimer (EA), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), epilepsia, ictus, isquemia y otros traumatismos del SNC.

10 Se han descrito métodos para trasplantar diversos tejidos neurales en cerebros hospedadores en Neural Transplantation: A Practical Approach, S. B. Dunnett y A. Bjorklund (Eds.) Irl Pr; 1992, incorporado en el presente documento por referencia. Estos procedimientos incluyen el trasplante intra-parenquimal, es decir, dentro del cerebro hospedador (en comparación con fuera del cerebro o trasplante extra-parenquimal), logrado mediante inyección o deposición de tejido en el cerebro hospedador para que se encuentre opuesto al parénquima cerebral en el momento del trasplante.

15 El procedimiento para el trasplante intra-parenquimal implica inyectar las células donantes en el parénquima del cerebro hospedador de manera estereotáctica. Esto es importante si se necesita que el injerto se convierta en una parte integral del cerebro hospedador y para que sobreviva durante la vida del hospedador. Típicamente, el trasplante intra-parenquimal implica la pre-diferenciación de las células. Sin embargo, la diferenciación de las células limita su capacidad para migrar y formar conexiones. Típicamente, se prefiere el trasplante intra-parenquimal de células pre-diferenciadas cuando el objetivo es lograr la producción neuroquímica en el lugar del implante.

20 Como alternativa, el injerto puede colocarse en un ventrículo, por ejemplo, un ventrículo del cerebro o por vía subdural, es decir, sobre la superficie del cerebro hospedador, en donde se separa del parénquima del cerebro hospedador mediante la piamadre o el aracnoides y la piamadre. Para el injerto subdural, las células pueden inyectarse alrededor de la superficie del cerebro. EN algunas realizaciones, las CNP se inyectan por vía intravenosa. Las CPN introducidas por vía intraventricular o intravenosa migrarán a la región adecuada del cerebro hospedador. Se prefiere el trasplante intraventricular (o intravenoso) cuando el objetivo es restaurar un circuito y su función.

25 Pueden efectuarse inyecciones en regiones seleccionadas del cerebro hospedador practicando un orificio y perforando la dura para permitir la inserción de la aguja de una microjeringuilla. La microjeringuilla se monta preferentemente en un marco estereotáctico y se seleccionan las coordenadas tridimensionales estereotácticas para colocar la aguja en la ubicación deseada del cerebro o la médula espinal. Para el injerto, se carga la suspensión celular en la jeringa y se administra a los receptores del injerto anestesiado. Pueden efectuarse múltiples inyecciones usando este procedimiento. Los ejemplos de lugares del SNC en los que pueden introducirse las CPN incluyen el putamen, el núcleo basal, el córtex del hipocampo, las regiones estriadas o caudadas del cerebro, así como la médula espinal.

30 El procedimiento de suspensión celular que permite injertar CPN en cualquier lugar predeterminado del cerebro o de la médula espinal, es relativamente no traumático, permite injertos múltiples simultáneamente en varios lugares diferentes o en el mismo lugar usando la misma suspensión de células y permite mezclas de células que tienen diferentes características. Los injertos múltiples pueden consistir en una mezcla de tipos celulares y/o una mezcla de transgenes insertados en las células. Preferentemente, se introducen de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^8 células por injerto. Opcionalmente, las CPN pueden injertarse como agrupaciones de células no diferenciadas. Como alternativa, la diferenciación de las CPN puede inducirse antes del implante.

35 Para el trasplante en cavidades, que puede preferirse para el injerto en la médula espinal, se retira tejido de regiones próximas a la superficie externa del SNC para formar una cavidad de trasplante, por ejemplo, retirando la cicatriz glial que recubre la médula espinal y detener el sangrado con un material, tal como una espuma de gel. Puede usarse succión para crear la cavidad. Después, se coloca en la cavidad la suspensión de células madre.

40 El injerto de CPN en un cerebro con traumatismo requerirá de procedimientos distintos. Por ejemplo, debe limpiarse el lugar de la lesión y detenerse el sangrado antes de intentar el injerto. Además, las células donantes deben poseer suficiente potencial de crecimiento para rellenar cualquier lesión o cavidad en el cerebro hospedador para evitar el aislamiento del injerto en el ambiente patológico del cerebro con traumatismo.

60 CPN genéticamente modificadas

La presente divulgación proporciona métodos para modificar genéticamente CPN para su injerto en un lugar de tejido diana. En una realización, las células se injertan en el SNC para tratar células defectuosas, enfermas y/o lesionadas del SNC. Los métodos de la divulgación también contemplan el uso del injerto de CPN transgénicas en combinación con otros procedimientos terapéuticos para tratar enfermedades o traumatismos en el SNC u otro tejido diana. Por lo tanto, las CPN y/o CMP de genéticamente modificadas pueden injertarse conjuntamente con otras células, células tanto genéticamente modificadas como no genéticamente modificadas, que ejercen efectos

beneficiosos en las células del SNC. Por lo tanto, las células genéticamente modificadas pueden servir para apoyar la supervivencia y función de las células injertadas conjuntamente no genéticamente modificadas.

5 Además, las células genéticamente modificadas pueden administrarse conjuntamente con agentes terapéuticos útiles para tratar defectos, traumatismos o enfermedades del SNC (u otro tejido diana), tales como factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento nervioso (NGF), gangliósidos, antibióticos, neurotransmisores, neuropéptidos, toxinas, moléculas promotoras de neuritas y antimetabolitos y precursores de estas moléculas, tales como el precursor de la dopamina, L-dopa.

10 Pueden usarse vectores que portan insertos génicos funcionales (transgenes) para modificar CPN y/o CMP para producir moléculas que son capaces de afectar directa o indirectamente a las células en el SNC para reparar el daño soportado por las células a causa de defectos, enfermedades o traumatismos. En una realización, para tratar defectos, enfermedades o daño de las células en el SNC, las CPN se modifican mediante la introducción de un vector retroviral que contiene un transgén o transgenes, por ejemplo, un gen que codifica la proteína del factor de crecimiento nervioso (NGF). Las CPN genéticamente modificadas se injertan en el sistema nervioso central, por ejemplo, el cerebro, para tratar defectos, enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson o lesiones a causa de un traumatismo físico mediante la restauración o la recuperación de la función en las neuronas lesionadas como resultado de la producción de los productos transgénicos por las CPN genéticamente modificadas. Las CPN también pueden usarse para introducir un producto o productos transgénicos en el SNC que potencian la producción de moléculas endógenas que tienen efectos de mejora *in vivo*.

20 Los expertos en la materia apreciarán una diversidad de vectores, tanto víricos como no víricos, que pueden usarse para introducir el transgén en las CPN y/o CMP. El suministro de transgenes puede lograrse mediante técnicas bien conocidas, incluyendo transfección directa de ADN, tal como mediante electroporación, lipofección, transfección por fosfato de calcio y DEAE-dextrano. Los sistemas de suministro vírico incluyen, por ejemplo, vectores retrovirales, vectores lentivirales, adenovirus y virus adeno-asociados.

25 El ácido nucleico del transgén puede prepararse mediante métodos recombinantes o sintetizarse usando técnicas convencionales. El transgén puede incluir uno o más genes de longitud completa o porciones de genes. Los polipéptidos codificados por los transgenes para su uso en la invención incluyen, pero sin limitación, factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, neurotransmisores, neuropéptidos, enzimas, gangliósidos, antibióticos, toxinas, moléculas promotoras de neuritas, antimetabolitos y precursores de estas moléculas. En particular, los transgenes para su inserción en las CPN incluyen, pero sin limitación, tirosina hidroxilasa, triptófano hidroxilasa, ChAT, serotonina, GABA Descarboxilasa, Dopa Descarboxilasa (AADC), encefalina, afirregulina, EGF, TGF (α o β), NGF, PDGF, IGF, factor trófico neuronal ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina (NT)-3, NT-4 y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF).

30 En general, los polipéptidos (incluyendo proteínas de fusión) y los polinucleótidos tal como se describen en el presente documento están aislados. Un polipéptido o polinucleótido "aislado" es uno que se retira de su ambiente original. Por ejemplo, una proteína de origen natural se aísla si está separada de parte o la totalidad de los materiales coexistentes en el sistema natural. Preferentemente, dichos polipéptidos son al menos aproximadamente un 90 % puros, más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % puros y más preferentemente al menos aproximadamente un 99 % puros. Se considera que un polinucleótido está aislado si, por ejemplo, se clona en un vector que no forma parte del ambiente natural.

40 El tratamiento incluye profilaxis y terapia. La profilaxis o la terapia pueden efectuarse mediante una sola inyección directa en un solo momento o en momentos múltiples en un solo lugar o en lugares múltiples. La administración también puede ser casi simultánea en lugares múltiples. Los pacientes o sujetos incluyen mamíferos. El sujeto es preferentemente un ser humano.

50 Administración y dosificación

Las composiciones se administran de cualquier modo adecuado, a menudo con vehículos farmacéuticamente aceptables. Se dispone de métodos adecuados para administrar a un sujeto células en el contexto de la presente invención y aunque puede usarse más de una vía para administrar una composición celular particular, a menudo una vía particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra vía.

60 La dosis administrada a un paciente debe ser suficiente para efectuar una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente con el paso del tiempo o para inhibir la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, la composición se administra a un sujeto en una cantidad suficiente para desencadenar una respuesta inmunitaria eficaz contra los antígenos específicos y/o para aliviar, reducir, curar o al menos detener parcialmente los síntomas y/o complicaciones a causa de la enfermedad o afección. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz".

65 Las vías y frecuencia de administración de las composiciones divulgadas en el presente documento, así como la dosificación, variarán de un individuo a otro y pueden establecerse fácilmente usando técnicas convencionales.

Típicamente, las composiciones farmacéuticas se administran mediante inyección. Preferentemente, pueden administrarse entre 1 y 10 dosis durante un periodo de 52 semanas. Para pacientes individuales, pueden ser adecuados protocolos alternativos.

5 Una dosis adecuada es una cantidad de un compuesto que, cuando se administra tal como se describe anteriormente, es capaz de promover una respuesta terapéutica y constituye una mejora de al menos un 10-50 % en
 10 relación al nivel no tratado. En general, una dosis y un régimen de tratamiento adecuados, proporcionan el material en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico y/o profiláctico. Dicha respuesta puede controlarse estableciendo un resultado clínico mejorado (por ejemplo, remisiones más frecuentes, completas o
 15 parciales o una mayor supervivencia sin enfermedad) en pacientes tratados, en comparación con pacientes no tratados. Los aumentos en la respuesta inmunitaria preexistente a una proteína tumoral se correlacionan generalmente con un resultado clínico mejorado. Dichas respuestas inmunitarias pueden evaluarse generalmente usando ensayos de proliferación, citotoxicidad o de citocinas convencionales, que pueden llevarse a cabo usando muestras obtenidas de un paciente antes y después del tratamiento.

15 Composiciones farmacéuticas

La divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden CPN y/o CMP y, opcionalmente, un
 20 vehículo fisiológicamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener otros compuestos que pueden ser biológicamente activos o inactivos. Por ejemplo, en la composición puede haber uno o más modificadores de la respuesta biológica, ya sea incorporados en un polipéptido de fusión o en forma de un compuesto distinto.

Aunque en las composiciones farmacéuticas puede emplearse cualquier vehículo conocido para los expertos
 25 habituales en la materia, el tipo de vehículo variará dependiendo del modo de administración. Las composiciones pueden formularse para cualquier modo de administración adecuado, incluyendo, por ejemplo, administración intracraneal, intraventricular o subdural. También pueden emplearse microesferas biodegradables (por ejemplo, de polilactato, poliglicolato) como vehículos para las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Se divulgan microesferas biodegradables adecuadas, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.897.268 y
 30 5.075.109. Dichas composiciones también pueden comprender tampones (por ejemplo, suero salino tamponado neutro o suero salino tamponado con fosfato), carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos, tales como glicina, antioxidantes, agentes quelantes, tales como EDTA o glutatión, adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio) y/o conservantes.

35 **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención y para ayudar al experto a efectuarla y
 usarla. Los ejemplos no pretenden en modo alguno limitar el alcance de la invención.

40 Ejemplo de referencia 1: Preparación de células progenitoras

Este ejemplo demuestra la preparación de células progenitoras cerebrales (CPC), también citadas como células
 45 progenitoras neurales (CPN). Las CPC procedieron de telencéfalo (líneas T) y de mesencéfalo (líneas M) de cerebro fetal. Los médicos obtuvieron el tejido fetal en el área local usando las directrices recomendadas por los National Institutes of Health. Se estableció contacto con el donante con la petición de donación de tejido únicamente después de practicarse un aborto voluntario y después se obtuvo el consentimiento con total conocimiento de causa. No se ofreció compensación económica u otro incentivo al paciente, ginecólogo o clínica. Se obtuvo una muestra de sangre materna y se llevaron a cabo las siguientes pruebas serológicas: VIH, hepatitis A, B y C, HTLV-1, VDRL y CMV. El tejido cerebral fetal se obtuvo mediante una técnica de aspiración a baja presión en condiciones estériles.
 50 No hubo cambios en cuanto a indicación, tiempo o metodología del aborto entre procedimientos. El tejido fetal inmediatamente adyacente al mesencéfalo se cultivó respecto de bacterias aeróbicas y anaeróbicas, HSV y CMV. También se llevó a cabo un diagnóstico microscópico usando tinción de Gram. Se excluyó el tejido fetal de donantes con historial de herpes genital, cáncer, asma, lupus, artritis reumatoide, alergias, vasculitis de origen autoinmunitario, abuso de fármacos o prostitución.

55 La gestación del cadáver fetal se determinó según la longitud craneocaudal (CRL) medida con ultrasonido. La edad gestacional varió de 6 a 8 semanas (CRL de 20 a 24 mm). Las muestras de telencéfalo y mesencéfalo se obtuvieron de 2 donantes (CRL: 20 y 24 mm). Las disecciones se llevaron a cabo a 4 °C en una campana de flujo laminar (Environmental Air Control, Inc.) bajo un microscopio de disección (Leica, Wild MJZ, Meerbrugg, Suiza). Se usó un medio asérico de propósito general (Ultraculture, Whittaker Bioproducts) con la adición de 5 mmol de L-glutamina y 10 µg/ml de kanamicina y 0,25 µg/ml de fungizona. El tejido fetal se aclaró diez veces con el medio de cultivo y después se retiraron del cerebro el cráneo cartilaginoso y las meninges y se transfirieron a solución salina equilibrada de Hank (HBSS) complementada con 10 µg/kg de sulfato de kanamicina y 0,25 µg/kg de fungizona para la microdisección. Se retiró el córtex dorsal de ambos hemisferios (teloencéfalo) por vía parasagital. Además, se
 60 diseccionaron la mitad rostral del mesencéfalo ventral y el tectum. Las muestras recogidas se cortaron exhaustivamente con microtijeras y se trituraron usando pipetas estériles pulidas a la llama. No se usó tripsinización

previa. Antes de emplacar las células en matraces de cultivo o sobre portaobjetos de vidrio con cámara, se evaluó la viabilidad (prueba de exclusión de Trypan Blue) y la densidad celular. La viabilidad media fue del 96 %. Se observó que la densidad de emplacado óptima era de 30.000 a 50.000 células/cm².

5 Ejemplo de referencia 2: Caracterización de la fuente de tejido

Este ejemplo describe la caracterización del tejido diseccionado para la preparación anterior de CPC. Las áreas del tejido cerebral fetal adyacente al tejido diseccionado se trataron de manera similar y se fijaron para inmunohistoquímica y microscopía electrónica y óptica. La viabilidad y especificidad funcional de estas secciones adyacentes se analizaron retrospectivamente.

Para el análisis morfológico, se recogieron el córtex y el mesencéfalo del feto y se procesaron para inmunohistoquímica o morfología ultraestructural. Después de la disección, parte del tejido se fijó en PFA fijador tamponado al 4 % (pH 7,4), se incluyó en parafina y se seccionó en un microtomo rotativo. Las muestras de este tejido se procesaron en un procedimiento histoquímico para visualizar los diversos marcadores neuronales y gliales (AChE, TH, NSE, MAP2, BrDU, Nestina, etc.).

Se llevó a cabo el marcado inmunocitoquímico con reacción de peroxidasa con anticuerpos para el marcador glial, proteína ácida fibrilar glial (GFAP, Lipshaw, Philadelphia, PA), el neurotransmisor GABA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y un marcador dopaminérgico, la enzima de síntesis catecolaminérgica TH (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). En resumen, se desparafinaron las secciones y se rehidrataron en una serie descendente de baños de etanol, después se incubaron en solución de bloqueo de peróxido de hidrógeno al 3 % (Signet Laboratories, Dedham, MA). El anticuerpo primario se aplicó sobre los portaobjetos y después se retiró con dos aclarados de suero salino tamponado con fosfato. Después, los portaobjetos se incubaron en reactivo de unión y después en reactivo de marcaje, posteriormente se visualizaron con cromógeno AEC (Signet Laboratories, Dedham, MA). Para microscopía electrónica, el tejido se fijó en fijador de Karnovsky, se fijó posteriormente en tetróxido de osmio al 1 %, se deshidrató mediante una serie de etanoles y óxido de propileno y después se incluyeron en resina Medcast (Ted Pella, Redding, CA). Se recogieron secciones ultrafinas sobre rejillas de cobre, se tiñeron con plomo y uranio y se visualizaron con un microscopio electrónico JEOL-100CX.

Después de dos a cuatro pases, la mayoría de las células cultivadas se recogieron y se congelaron en nitrógeno líquido. El medio para criogenización contiene el medio de cultivo de expansión con DMSO al 10 %, complemento B-27 al 4 % y de 5 a 7 µl/ml de solución de aminoácidos no esenciales MEM (Gibco, NY).

35 Ejemplo de referencia 2A: Tinción para proteína asociada fibrilar glial (GFAP)

Las células se emplacaron sobre portaobjetos Superfrost Plus usando Cytospin® (ThermoShandon, Pittsburgh, PA) y después se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 20 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces durante 5 min con PBS 1X, pH 7,4 (Gibco). Las células se permeabilizaron durante toda la noche con metanol al 70 % a 4 °C. Se lavaron las células dos veces durante 5 min en PBS 1X, después se bloquearon, con respecto a la unión no específica, con tampón de bloqueo SuperBlock™ (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) durante 60 min a temperatura ambiente. El SuperBlock se retiró sacudiendo los portaobjetos y las preparaciones de células se incubaron durante toda la noche con anticuerpos monoclonales primarios procedentes de ratón contra la proteína ácida fibrilar glial específica (GFAP) humana (VectorLaboratories, Inc., Burlingame, CA) diluido en tampón SuperBlock™ con Triton-X-100 al 0,1 %. Las células se lavaron dos veces durante 5 min en PBS 1X. La actividad peroxidasa endógena celular se bloqueó con ImmunoPure Peroxidase Suppressor™ (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) durante 20 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces durante 5 min en PBS 1X y se incubaron durante 120 min a temperatura ambiente con anticuerpo secundario biotinilado (VectorLaboratories, Inc., Burlingame, CA) específico para anticuerpos primarios derivados de un hospedador de ratón (anti-IgG de ratón biotinilado, purificado por afinidad, adsorbido en rata) diluido en tampón SuperBlock™ con Triton-X-100 al 0,1 %. Después, las células se lavaron dos veces durante 5 min en 0,1 M y se incubaron con estreptavidina conjugada con peroxidasa terciaria específica para biotina (reactivo Vectastain Elite ABC, VectorLaboratories) durante 60 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces durante 5 min en PBS 1X y se incubaron con diaminobencidina (VectorLaboratories, Inc.) durante 2 min a temperatura ambiente. Todas estas etapas se llevaron a cabo usando una cámara de humedad. Las células se lavaron tres veces durante 1 min en agua corriente a temperatura ambiente y se tiñeron con hematoxilina QS (VectorLaboratories, Inc., Burlingame, CA) de contraste durante 30 s. Las células se lavaron tres veces durante 1 min en agua corriente a temperatura ambiente, se trataron con reactivo añil (Richard-Allen Scientific) durante 30 s a temperatura ambiente, se lavaron tres veces durante 1 min en agua corriente templada y se cubrieron con glicergel (DakoCytomation, Carpinteria, CA) y se conservaron a temperatura ambiente en la oscuridad.

Ejemplo de referencia 2B: Tinción para 5-bromodesoxiuridina (BrDU)

Las células se emplacaron sobre portaobjetos Superfrost Plus™ usando Cytospin® (ThermoShandon, Pittsburgh, PA) y después se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 20 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces durante 5 min con PBS 1X, pH 7,4 (Gibco), se permeabilizaron durante toda la noche con metanol al 70 % a

4 °C, se lavaron dos veces durante 5 min en PBS 1X y se trataron con tampón de bloqueo SuperBlock™ (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) durante 60 min a temperatura ambiente para prevenir la unión no específica. El SuperBlock se retiró sacudiendo cada portaobjetos, que después se incubaron durante toda la noche con PBS 1X. La actividad endógena de peroxidasa se inactivó con ImmunoPure Peroxidase Suppressor™ (Pierce Biotechnologies) durante 20 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron dos veces durante 5 min en 1X a temperatura ambiente con anticuerpos monoclonales procedentes de ratón para BrDU (VectorLaboratories, Inc.) diluido en tampón SuperBlock™ con Triton-X-100 al 0,1 %. Después se lavaron los portaobjetos dos veces durante 5 min en PBS y se incubaron durante 120 min a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón purificados por afinidad adsorbidos en rata (VectorLaboratories, Inc.) diluidos en tampón SuperBlock™ con Triton-X-100 al 0,1 % y específicos para los anticuerpos primarios. Después de esta etapa, se lavaron dos veces las células durante 5 min en PBS 1X y se incubaron con estreptavidina terciaria conjugada a peroxidasa específica para biotina (reactivo Vectastain Elite ABC de VectorLaboratories) durante 60 min a temperatura ambiente. Después se lavaron las células dos veces durante 5 min en PBS 1x y se incubaron con diaminobencidina (VectorLaboratories, Inc.) durante 2 min a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron dos veces las células durante 1 min en agua corriente a temperatura ambiente, se contratiñeron con hematoxilina QS (Vector) durante 30 s, se lavaron tres veces durante 1 min en agua corriente a temperatura ambiente con reactivo añil (Richard-Allen Scientific) durante 30 s a temperatura ambiente, se lavaron tres veces durante 1 min en agua corriente templada, se cubrieron con glicergel (DakoCytomation, Carpinteria, CA) y se conservaron a temperatura ambiente en la oscuridad.

20 Ejemplo de referencia 2C: Tinción para enolasa específica de neuronas (NSE)

Las células se emplacaron sobre portaobjetos Superfrost Plus usando Cytospin® (ThermoShandon, Pittsburgh, PA) y después se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 20 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron dos veces durante 5 min con PBS 1X, pH 7,4 (Gibco), se permeabilizaron durante toda la noche con metanol al 70 % a 4 °C, se lavaron dos veces durante 5 min en PBS 1X y se trataron con tampón de bloqueo SuperBlock™ (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) durante 60 min a temperatura ambiente. Se dejó escurrir SuperBlock de los portaobjetos, que después se incubaron anticuerpos primarios monoclonales procedentes de ratón para NSE humano (Chemicon) diluido en tampón SuperBlock™ con Triton-X-100 al 0,1 % durante 30 min a temperatura ambiente.

Las células se aclararon dos veces durante 5 min con PBS 1X, después se suprimió la actividad endógena de peroxidasa con ImmunoPure Peroxidase Suppressor™ (Pierce Biotechnology) durante 20 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces durante 5 min en PBS 1X y se incubaron con anticuerpos secundarios biotinilados específicos para anticuerpos primarios procedentes de un hospedador de ratón (anti-IgG de ratón biotinilado, purificado por afinidad, adsorbido en rata) diluido en tampón SuperBlock™ con Triton-X-100 al 0,1 % durante 120 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces durante 5 min en PBS 1X y se incubaron con estreptavidina conjugada a peroxidasa terciaria específica para biotina (reactivo Vectastain Elite ABC de VectorLaboratories) durante 60 min a temperatura ambiente. Después de esto, las células se lavaron dos veces durante 5 min en PBS 1X, se incubaron con diaminobencidina (VectorLaboratories, Inc.) durante 2 min a temperatura ambiente, se lavaron tres veces durante 1 min en agua corriente a temperatura ambiente, se contratiñeron con hematoxilina QS (VectorLaboratories, Inc.) durante 30 s, se lavaron de nuevo tres veces durante 1 min en agua corriente a temperatura ambiente, se trataron con reactivo añil (Richard-Allen Scientific) durante 30 s a temperatura ambiente, se lavaron tres veces durante 1 min en agua corriente templada, se cubrieron con glicergel (DakoCytomation, Carpinteria, CA) y se conservaron a temperatura ambiente en la oscuridad.

45 Ejemplo de referencia 2D: Tinción para CD34

Las células se emplacaron sobre portaobjetos Superfrost Plus mediante Cytospin® (ThermoShandon, Pittsburgh, PA) y después se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 20 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces durante 5 min con PBS 1X, pH 7,4 (Gibco). Las células se permeabilizaron durante toda la noche con metanol al 70 % a 4 °C. Se lavaron las células dos veces durante 5 min en PBS 1X. Las células se bloquearon respecto de unión no específica con tampón de bloqueo SuperBlock™ (Pierce) durante 60 min a temperatura ambiente y se cubrieron. Se dejó escurrir el SuperBlock y se incubaron las preparaciones de células con anticuerpo primario para CD34 humano (anticuerpo monoclonal de ratón para CD34 específico de humano; DakoCytomation, Carpinteria, CA) diluido en tampón SuperBlock™ con Triton-X-100 al 0,1 % durante toda la noche a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces durante 5 min en PBS 1X.

Se suprimió la actividad endógena de peroxidasa con ImmunoPure Peroxidase Suppressor™ (Pierce) durante 20 min a temperatura ambiente, después se lavaron dos veces durante 5 min en PBS 1X. Las preparaciones de células se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado específico para los anticuerpos primarios derivados de un hospedador de ratón (anti-IgG de ratón biotinilado, purificado por afinidad, adsorbido en rata; Vector) diluido en tampón SuperBlock™ con Triton-X-100 al 0,1 % durante 120 min a temperatura ambiente. Se lavaron las células dos veces durante 5 min en PBS 1X. Las preparaciones de células se incubaron con estreptavidina conjugada a peroxidasa terciaria específica para biotina (reactivo Vectastain Elite ABC, Vector) durante 60 min a temperatura ambiente y se cubrieron. Las células se lavaron dos veces durante 5 min en PBS 1X. Las preparaciones de células se incubaron con solución de sustrato enzimático de peroxidasa (diaminobencidina, Vector) durante 2 min a

temperatura ambiente. Se lavaron tres veces las células durante 1 min en agua corriente a temperatura ambiente. Las células se contratiñeron con hematoxilina QS (Vector) durante 30 s. Las células se lavaron tres veces durante 1 min en agua corriente a temperatura ambiente. Por nitidez, las células se incubaron con reactivo añil (Richard-Allen Scientific) durante 30 s a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces durante 1 min en agua corriente templada. Las preparaciones de células se cubrieron con glicergel (DakoCytomation, Carpinteria, CA) y se conservaron a temperatura ambiente en la oscuridad.

Ejemplo de referencia 2E: Tinción para antígeno común de leucocitos (CD45)

Las células se emplacaron sobre portaobjetos Superfrost Plus usando Cytospin® (ThermoShandon, Pittsburgh, PA) y después se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 20 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces durante 5 min con PBS 1X, pH 7,4 (Gibco), se permeabilizaron durante toda la noche con metanol al 70 % a 4 °C y se lavaron dos veces durante 5 min en PBS 1X. La unión no específica se bloqueó con tampón de bloqueo SuperBlock™ (Pierce) durante 60 min a temperatura ambiente, después se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con anticuerpos monoclonales primarios específicos para humano anti-antígeno común de leucocitos procedente de ratón (DakoCytomation) para CD45 humano diluido en tampón SuperBlock™ con Triton-X-100 al 0,1 %.

Las células se lavaron dos veces durante 5 min en PBS 1X, entonces se suprimió la actividad endógena de peroxidasa con ImmunoPure Peroxidase Supresor™ (Pierce) durante 20 min a temperatura ambiente. Después de esto las células se lavaron dos veces durante 5 min en PBS 1X y se incubaron durante 120 min a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios biotinilados diluidos en tampón SuperBlock™ con Triton-X-100 al 0,1 % (anti-IgG de ratón biotinilado, purificado por afinidad, adsorbido en rata de VectorLaboratories, Inc.) específicos para los anticuerpos primarios derivados de un hospedador de ratón. Se lavaron las células dos veces durante 5 min en PBS 1X, se incubaron con estreptavidina conjugada a peroxidasa terciaria específica para biotina (reactivo Vectastain Elite ABC de VectorLaboratories, Inc.) durante 60 min a temperatura ambiente, se lavaron dos veces durante 5 min en PBS 1X y se incubaron con diaminobencidina (VectorLaboratories, Inc.) durante 2 min a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron tres veces las células durante 1 min en agua corriente a temperatura ambiente, con hematoxilina QS (VectorLaboratories, Inc.) durante 30 s, se lavaron tres veces durante 1 min en agua corriente a temperatura ambiente, se trataron por nitidez con reactivo añil (Richard-Allen Scientific) durante 30 s a temperatura ambiente, se lavaron tres veces durante 1 min en agua corriente templada, se cubrieron con glicergel (DakoCytomation, Carpinteria, CA) y se conservaron a temperatura ambiente en la oscuridad.

También se usó este protocolo de tinción con anticuerpos para Oct-4 (Chemicon), beta tubulina de clase III (Serotec), nestina (R&D Systems), tirosina hidroxilasa (Chemicon) y mitocondrias humanas (Chemicon).

Ejemplo de referencia 3: Optimización de los medios de cultivo

Este ejemplo describe los diversos componentes de los medios, probados respecto su influencia en la expansión y diferenciación de CPC. Se compararon las velocidades de crecimiento de CPC procedentes de telencéfalo y mesencéfalo en tres medios de cultivo convencionales: medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM); medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) sin calcio (Biowhittaker), Neurobasal (GibcoBRL), Ultraculture (Biowhittaker) y PFMR-4+8F (BRF) con al menos 25 combinaciones variables de los mitógenos bFGF, EGF, TGFα, LIF; inhibidores de caspasa 3 y 8; y complemento B-27. Se probó la eficacia de cada combinación según la viabilidad celular y el tiempo de generación durante la expansión a corto y largo plazo, así como los efectos de comportamiento en el modelo de EP de rata después de trasplante intra-estriatal. El medio de cultivo basado en EMEM bajo en calcio con adición de bFGF, EGF, TGFα, LIF y B-27 presentó los mejores resultados.

Después de haber probado los numerosos ingredientes, el resultado quizá más sorprendente fue la ausencia de beneficios tras la adición del inhibidor de caspasa 1, ya sea acetil-Tyr-Val-Ala-Asp (Ac-YVAD) o acetil-Tyr-Val-Ala-Asp clorometilcetona (Ac-YVAD-CMK) (Calbiochem). De hecho, la presencia del inhibidor de caspasa en el medio de cultivo se asoció con recuentos celulares reducidos. Además, no se observó beneficio con el uso de interleucina-1 (IL-1). Se observó que, tanto el factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GDNF) como el factor neurotrófico ciliar (CNTF), promovían una rápida diferenciación y muerte celular.

Se observó que el factor de crecimiento transformante alfa (TGFα) acortaba el tiempo de generación de manera significativa (por ejemplo, de 14 días a 5 días). El factor inhibidor de leucemia (LIF) promovió las células neuronales y previno la formación de grandes agrupaciones de CPN. El factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) dio como resultado buena proliferación, incluso cuando se usó en ausencia de otros factores tróficos. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) en solitario, no mantuvo un crecimiento fuerte, pero cuando se combinó con bFGF y TGFα, se observó un crecimiento óptimo.

Las células cultivadas en bFGF como único factor trófico se compararon con CPN cultivadas en medio que contenía EGF + bFGF + TGFα (E+F+T). Se trasplantaron dos millones de células por animal en ratas con PD (un modelo animal para enfermedad de Parkinson). A los 6 días después del trasplante, las células solo con bFGF mostraron una reducción del 12 % en la densidad, mientras que las células de E+F+T mostraron un aumento en la densidad

del 167 %.

MEDIO DE EXPANSIÓN PROGENITOR

5 Medio basal:

Medio esencial mínimo Eagle (EMEM) sin calcio, BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD, n.º de cat. 06-1746.

Complementos:

10

B27 (2 %), Gibco BRL, n.º de cat. 17504
 r-hEGF (20 ng/ml), Peprotech, n.º de cat. 100-15
 r-hFGF básico (bFGF, FGF2), (20 ng/ml), Peprotech, n.º de cat. 100-18B

15

Piruvato de sodio (0,11 mg/ml), Sigma, n.º de cat. S-8636
 Cloruro de calcio 2H₂O, (0,1 mM), Sigma, n.º de cat. C-7902

Opcional:

20

Gentamicina (50 µg/ml), Sigma, n.º de cat. G-1272
 Amfotericina B (1,25 µg/ml), Sigma, n.º de cat. A-2942 o
 o antibiótico/antimitótico 100x de Sigma, n.º de cat. A-9909

MEDIO DE DIFERENCIACIÓN PROGENITOR

25 Medio basal:

PFMR-4+8F, Biological Research Faculty and Facility, Inc (BRFF), n.º de cat. SF-240
 o DMEM, Neurobasal o EMEM sin calcio (enrasado hasta 0,1 mM de CaCl₂)

30 Factores de diferenciación:

Factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) (10 ng/ml), Sigma, n.º de cat. G-1777
 IL-1alfa, (100 pg/ml), Sigma, n.º de cat. I-2778
 IL-11 (1 ng/ml), Sigma, n.º de cat. I-3644
 Factor inhibidor de leucemia (LIF), (1 ng/ml), Sigma, n.º de cat. L-5283
 N⁶,2'-O-dibutiriladenosina 3'-5'-cíclica monofosfatasa (db-AMPC), (100 µM), Sigma, n.º de cat. D-0627
 Forskolina (5 µM), Calbiochem-Behring Corp, n.º de cat. 344270

Opcional:

40

0,25 µg/ml de fungizona
 10 µg/ml de sulfato de kanamicina

Preparación de medios:

45

El glutamato, cuando se añade al medio, se usa únicamente para proporcionar el emplacado inicial, las alimentaciones posteriores usan medio sin glutamato.

MEDIO DE EXPANSIÓN

50

Formulación	Receta	Notas
95,5 ml de medio basal	97,5 ml de medio basal	Se prefiere EMEM sin calcio para la expansión de células progenitoras; para la diferenciación, se puede usar EMEM, DMEM o Neurobasal Solo se añade a EMEM sin calcio; se ajusta la cantidad para expansión frente a diferenciación
CaCl ₂ 0,05 mM	120 µl/100 ml	
complemento B27 al 2 % L-glutamina 0,5 mM	2,0 ml de B27 0,25 ml de L-glutamina 200 mM (29,2 mg/ml)	
		Promueve el crecimiento de neuronas sobre glía, que prefieren L-glutamina 2 mM L-glutamina 0,5 mM = 74 mg/l x 100 ml med. = 7,3 mg = 0,25 ml de L-glutamina 200 mM

2 µg de EGF (20 ng/ml)	2 alícuotas x 25 µl (40 ng/µl de EGF)
1 µg de FGF (10 ng/ml)	2 alícuotas x 25 µl (40 ng/µl de FGF)
2 µg de TGFα (10 ng/ml)	2 alícuotas x 25 µl (40 ng/µl de TGFα)

MEDIO DE DIFERENCIACIÓN

Receta	Formulación	Notas
97,5 ml de medio basal	97,5 ml de EMEM sin calcio	BioWhittaker n.º de cat 06-174G
2,0 ml de B27	complemento B27 al 2 %	
1 ml de piruvato de Na 11 mg/ml	0,11 mg/ml de piruvato de sodio	
40 µl de CaCl ₂ 25 mM	CaCl ₂ 0,1 mM	
50 µl de EGF (2 alícuotas a 40 ng/µl)	2 µg de EGF; 20 ng/ml de EGF	
50 µl de bFGF (2 alícuotas a 40 ng/µl)	2 µg de FGF; 20 ng/ml de FGF	
25 µl de TGFα (1 alícuota a 40 ng/µl)	1 µg de TGF; 10 ng/ml de TGF	
100 µl de LIF	1 µg de LIF; 10 ng/ml de LIF	

5 Medio neurobasal:

Formulación	Receta	Notas
95,5 ml de medio neurobasal	97,5 ml de medio neurobasal	
complemento B27 al 2 %	2,0 ml de B27	
L-glutamina 0,5 mM	0,25 ml de L-glutamina 200 mM (29,2 mg/ml)	Promueve el crecimiento de neuronas sobre la glía, que prefieren L-glutamina 2 mM
25 µM de ácido L-glutámico	184 µl de ácido L-glutámico 2 mg/ml (20 mg de L-Glu + 10 ml de H ₂ O)	Ayuda en la adhesión celular
2 µg de EGF (20 ng/ml)	2 alícuotas x 25 µl a 40 ng/µl	
1 µg de FGF (10 ng/ml)	1 alícuota x 25 µl a 40 ng/µl	
1 µg de TGFα (10 ng/ml)	1 alícuota x 25 µl a 40 ng/µl	

Una vez producido, este medio se mantiene 1-2 semanas refrigerado.

10 Ejemplo de referencia 4: Características de CPN cultivadas en medios de la invención

Se ha demostrado que las CPN cultivadas en el medio de la invención tienen las características de las células progenitoras neurales: pueden mantenerse indefinidamente en cultivo EMEM, muestran tinción positiva para BrDU, expresan Nestina, en condiciones de baja [Ca⁺⁺] son capaces de generar neuronas dopaminérgicas (35-60 %) y serotoninérgicas (24-40 %) así como una serie de otras células positivas a MAP2 (10-12 %) y glía (células positivas a GFAP al 15-23 %). También generan esporádicamente glóbulos rojos nucleados (2-3 %) *in vitro* y mioblastos cuando se inyectan en el corazón isquémico de rata.

En cambio, las CPN permanecerán en suspensión y no diferenciadas cuando se cultivan en el medio EMEM bajo en calcio de la invención. A medida que se aumenta la concentración de calcio, por ejemplo, hasta 0,1 mM, las CPN forman entonces redes y muestran un fenotipo neuronal. Incluso sin la adición de LIF para favorecer a las neuronas sobre la glía, solo un 1-2 % de estas células cultivadas son inmunopositivas para el marcador glial GFAP, lo que sugiere que la población es principalmente neuronal.

25 Ejemplo de referencia 5: Trasplante de CPN en el cerebro en un modelo animal de enfermedad de Parkinson

Este ejemplo demuestra que las CPN preparadas de acuerdo con la invención pueden injertarse con éxito en el cerebro de rata. El ejemplo demuestra que las células injertadas pueden mostrar diferenciación normal en células positivas a tirosina hidroxilasa (TH). Además, los resultados demuestran que las CPN injertadas mejoran el déficit conductual característico de este modelo animal de enfermedad de Parkinson.

Para la implantación, se retiran CPN flotantes libres del matraz de cultivo y se centrifugaron del modo que se hace para los cambios de medio. El sedimento se resuspende en los 2 ml restantes de medio y se cuenta esta suspensión concentrada en un hemocitómetro. Se añade medio adicional para ajustar la concentración final a 350.000 células/µl.

Se lesionó la sustancia negra mediante inyección de 4 µl (8 µg) de 6-hidroxidopamina, 6-OHDA (Research Biomedicals International, MA) usando una jeringuilla Hamilton (Hamilton Co., NV). La inyección se llevó a cabo durante 2 minutos, con una espera de tres minutos después de la inyección para permitir la difusión antes de retirar

la aguja.

Dos semanas después de la lesión nigral, se aplicó anestesia general a las ratas (87 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilazina; o gas isoflurano al 4 %) y se fijaron en un aparato estereotáctico. Se practicó la incisión en el cuero cabelludo y se perforó un orificio en el cráneo en las coordenadas del cuerpo estriado. Las células progenitoras se implantaron usando una jeringuilla Hamilton (70.000 células/2 μ l por animal) en el cuerpo estriado ipsilateral en la lesión 6-OHDA, en las coordenadas estereotácticas A = 0,11; L = 3,8; V = 4,5. Después se cerró la incisión y se trató con Betadine. Todas las CPN se implantaron sin acondicionamiento previo.

Para la prueba de comportamiento rotacional, a las ratas se les inyectó, por vía subcutánea, anfetamina o vehículo. Inmediatamente después de la inyección, los animales se pusieron en una cámara locomotora con dimensiones de 30,48 cm x 30,48 cm (Columbus Instruments, Columbus, OH). Después de un periodo de ajuste de dos minutos, se registraron todas las rotaciones con una cámara CCD montada por encima de la cámara y se analizaron en el analizador de imágenes de vídeo Videomex V™ (Columbus Instruments, Columbus, OH). Durante 60 minutos, se registró la actividad locomotora y la rotación.

Ambos grupos de animales que recibieron células T5 o M5 mostraron una reducción significativa y comparable en su comportamiento rotacional. En ambos grupos de animales, aproximadamente un 14-24 % de las CPN se diferenciaron en células positivas a TH.

Ejemplo de referencia 6: Las CPN implantadas en la sustancia negra se convierten en positivas a tirosina hidroxilasa

Se implantaron CPN, células tanto M5 como T5, usando un método similar al descrito en el ejemplo 5 anterior. La población de células M5, derivada del tronco cerebral, fue un 24-30 % positiva para tirosina hidroxilasa (TH) antes de la implantación. Después de la implantación, un 54 % de las CPN de M5 fueron positivas para TH. Las células de T5, derivadas del prosencéfalo, fueron todas negativas para TH en cultivo. Una vez implantadas, el 32 % de las CPN implantadas fueron positivas para TH.

Ejemplo de referencia 7: Diferenciación de CPN

Se cambiaron las condiciones de cultivo tal como se han descrito anteriormente y se manipularon para determinar las condiciones óptimas para inducir diferenciación de CPN. El medio de diferenciación optimizado resultante contiene Ca^{++} 0,15 mM, L-glutamina 0,5 mM, 10 ng/ml de GDNF, 15 ng/ml de ácido retinoico.

Ejemplo de referencia 8: Crioconservación de CPN

Se cambiaron los ingredientes del medio y se manipularon para determinar las condiciones óptimas para la crioconservación de CPN. B27, además de DMSO, parece proporcionar un efecto protector significativo que contribuye a la viabilidad excepcionalmente alta observada en las CPN descongeladas.

Para la crioconservación, las CPN se suspendieron en un medio bajo en calcio (Ca^{++} 0,06 mM, EMEM) complementado con B27 al 2 %, LIF (15 ng/ml), EGF (50 ng/ml), FGF y TGF (25 ng/ml) y DMSO al 10 %. En primer lugar, las células se ponen en un congelador a una temperatura de aproximadamente -40 °C durante 1 a 1,5 horas, tras las cuales se conservan en nitrógeno líquido. Las células pueden conservarse a una temperatura de al menos aproximadamente -80 °C, típicamente a una temperatura de aproximadamente -200 °C. El tanque de conservación de nitrógeno líquido usado en estos estudios se mantiene a una temperatura de -197 °C.

Para la descongelación, tanto el medio de cultivo como el matraz, se precalientan a 37 °C en un baño de agua a dicha temperatura. Usando este medio de crioconservación, se observa regularmente más de un 95 % de viabilidad en las CPN tras la descongelación (usando recuento celular de exclusión por colorante). Típicamente, las células parecen encogidas y de morfología anormal durante los primeros 5-7 días después de la descongelación. A pesar de esta apariencia, las células son capaces de excluir el colorante azul de tripano. Después de aproximadamente una semana, las células recuperan su estado previo a la congelación, mostrando una morfología, crecimiento y tiempos de generación típicos.

Ejemplo de referencia 9: Células madre pluripotentes en cultivos de la invención

Las células cultivadas tal como se ha descrito anteriormente para CPN se han evaluado con respecto a la expresión del marcador de células madre Oct4. Oct4 es un factor de transcripción que se expresa específicamente en células madre adultas y embrionarias y en células tumorales, pero no en células de tejidos diferenciados (Tai et al., Carcinogenesis, publicado en línea el 28 de octubre de 2004). Las células positivas para Oct4 también son capaces de desarrollarse en cultivo en oogonios que entran en meiosis, reclutan células adyacentes para formar estructuras similares a folículos y posteriormente se desarrollan en blastocistos (Hubner, K, et al., Science, 2003, 300(5623):1251-6). Esta capacidad para la oogenesis en cultivo las hace útiles para transferencia nuclear y manipulación de la línea germinal así como para crear modelos para estudios de tratamientos para la fertilidad y la

interacción y diferenciación de células germinales y somáticas.

5 Las células cultivadas tal como se describe anteriormente para CPN, a las seis semanas en cultivo, mostrarán algunas células madre (positivas a OCT4) y principalmente células progenitoras positivas para nestina. Durante un periodo de cuatro meses en cultivo, la población cambió de contener aproximadamente un 5 % de células positivas a Oct4 a aproximadamente un 30 % de células positivas a Oct4. Esta observación podría indicar que estas células pierden la diferenciación en cultivo prolongado. Como alternativa, esto puede reflejar una supervivencia selectiva de las células madre en cultivo prolongado.

10 También se observó que las células positivas a Oct4 co-expresaban el marcador de CPN, nestina, tal como se muestra en la fig. 17. Las células positivas a nestina son por tanto capaces de diferenciarse en células neurales, pero no están necesariamente comprometidas con esta ruta.

15 Ejemplo de referencia 10: Las CPN intraventriculares restauran la función en un modelo animal de enfermedad de Parkinson

20 Se practicaron lesiones nigrales en ratas tal como se describe anteriormente en el ejemplo 5 para crear las características de déficit de comportamiento rotacional de este modelo de rata de enfermedad de Parkinson. Se inyectaron 500.000 CPN humanas, preparadas tal como se describe anteriormente, en el ventrículo cerebral. Después de completar los estudios de comportamiento rotacional, que confirmaron una mejoría satisfactoria del comportamiento rotacional, se prepararon secciones de tejidos para su examen inmunohistoquímico. Se observó que las células humanas de las CPN implantadas habían migrado a estructuras neurales, incluyendo el cuerpo estriado, la substancia negra y el hipocampo y se habían diferenciado en neuronas y glía.

25 La fig. 18 es una fotomicrografía que muestra una neurona humana de color ámbar-marrón con las extensiones de ramificación en el centro de la imagen y una célula glial en la esquina inferior derecha de la imagen en el putamen de rata. Estas células migraron desde el ventrículo cerebral del animal que mostró una mejora del 70 % en su comportamiento rotacional 4 meses después de la inyección intraventricular de 500.000 células progenitoras neurales no diferenciadas. Anticuerpos anti-mitocondrias humanas. 40x.

30

REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo que comprende:
- 5 (a) 20-100 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF);
(b) 10-50 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF); y
(c) 1-150 ng/ml de factor de crecimiento transformante alfa (TGF α),
- 10 en el que la concentración de calcio del medio no es mayor de 0,15 mM.
2. El medio de cultivo de la reivindicación 1, que además comprende:
- 15 (d) de 0,03 a 0,09 mM de cloruro de calcio, en el que el medio se enrasa hasta volumen completo en un medio esencial mínimo sin calcio y tiene una concentración total de calcio de menos de 0,1 mM.
3. El medio de cultivo de la reivindicación 1 o 2, que además comprende:
- 20 (e) 7-30 ng/ml de factor inhibidor de leucemia (LIF).
4. El medio de cultivo de la reivindicación 2 o 3, en el que la concentración total de calcio es de 0,05 mM.
5. El medio de cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el EGF se encuentra a 20 ng/ml.
6. El medio de cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el bFGF se encuentra a 10 ng/ml.
- 25 7. El medio de cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el TGF α se encuentra a 10 ng/ml.
8. El medio de cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en el que el LIF se encuentra a 10 ng/ml.
- 30 9. El medio de cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el medio de cultivo es asérico.
10. El medio de cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que además comprende complemento B27 al 2 %.
- 35 11. El medio de cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que los factores de crecimiento, EGF, bFGF y TGF α son factores de crecimiento recombinantes.
12. El medio de cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que los factores de crecimiento son humanos.
- 40 13. El medio de cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que además comprende 0,11 mg/ml de piruvato sódico.
14. Un medio de crioconservación que comprende:
- 45 (a) calcio 0,03-0,09 mM;
(b) 20-100 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF);
(c) 10-50 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF);
(d) 1-150 ng/ml de factor de crecimiento transformante-alfa (TGF α);
50 (e) B27 al 2 %; y
(f) dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 %.

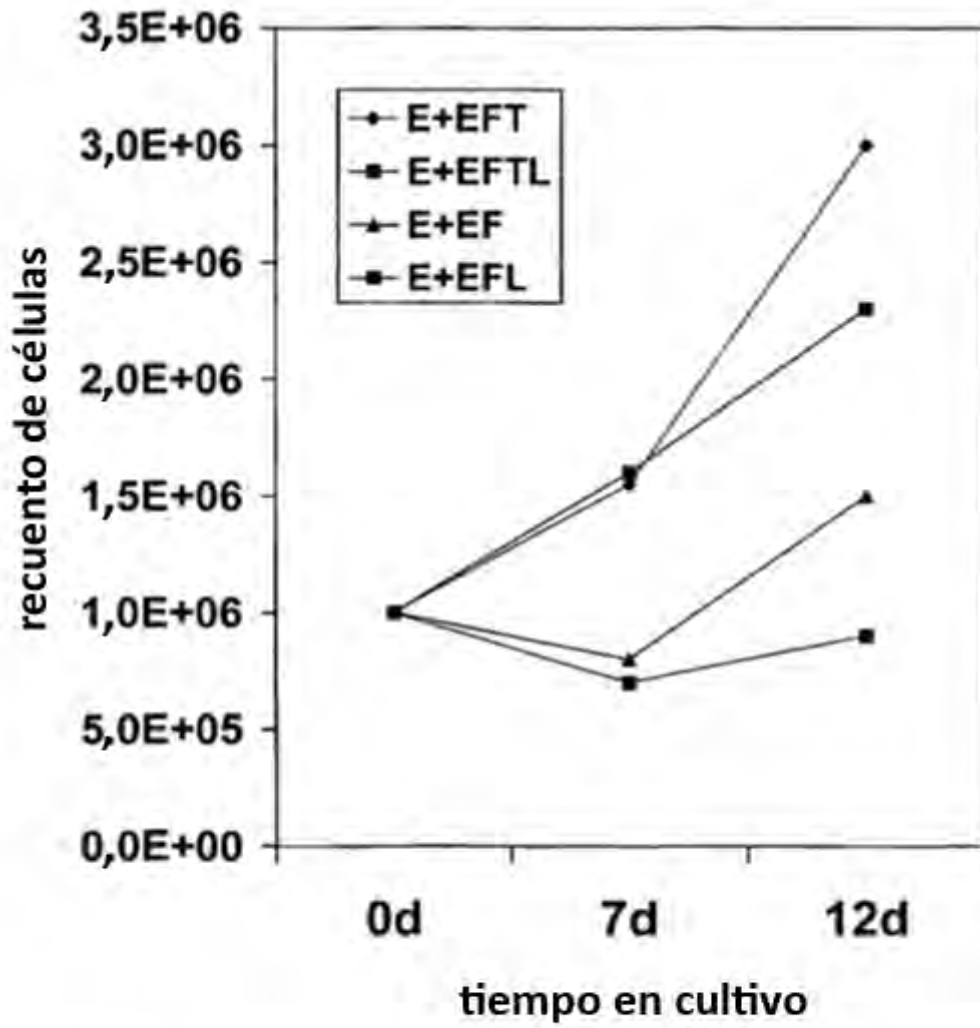


Fig. 1

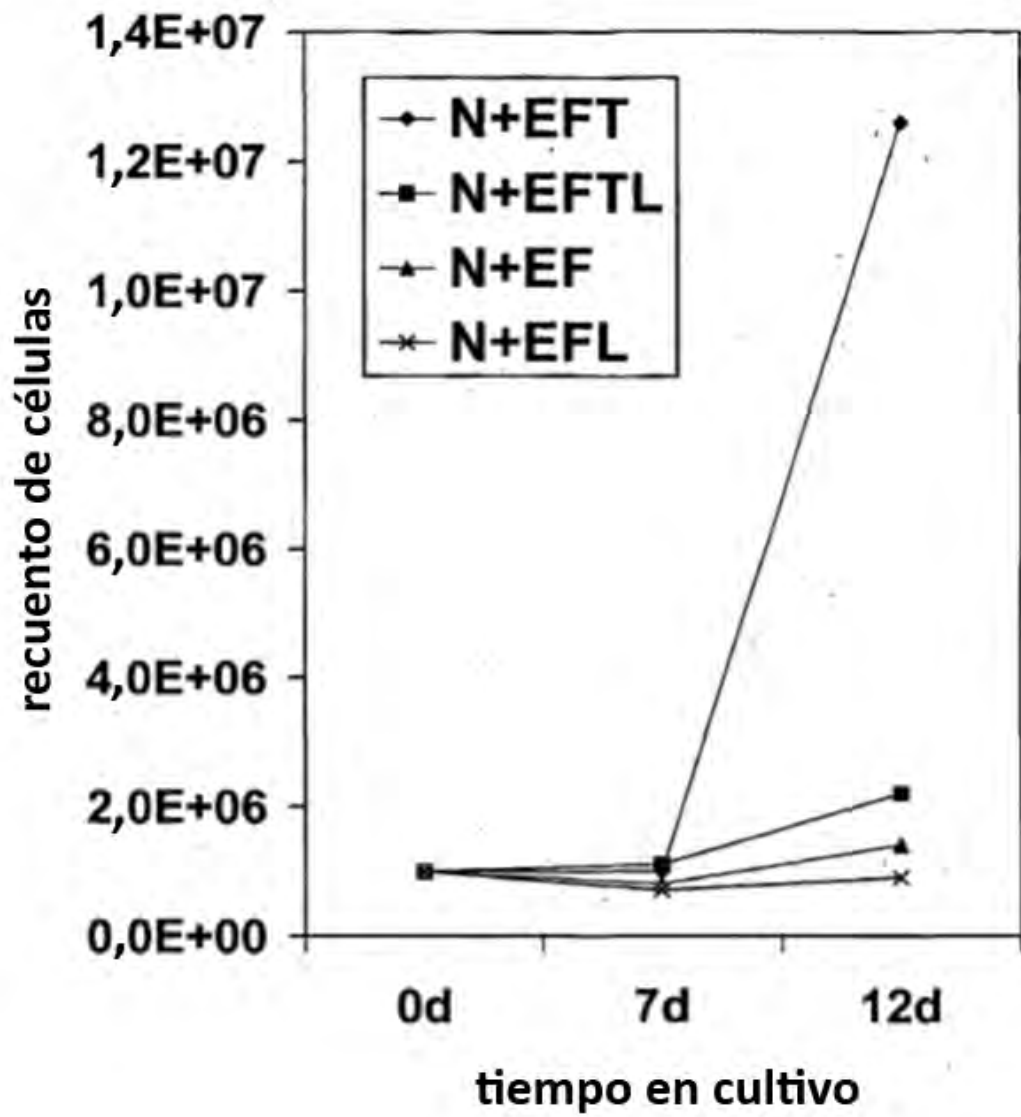


Fig. 2

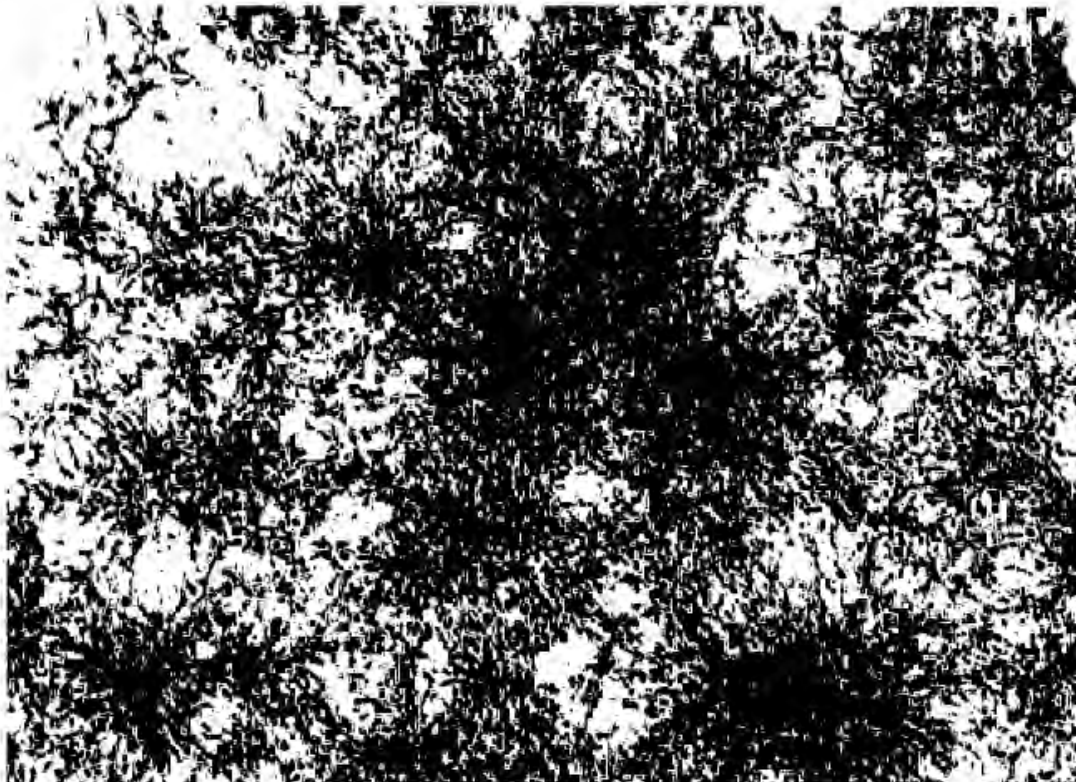


FIG. 3

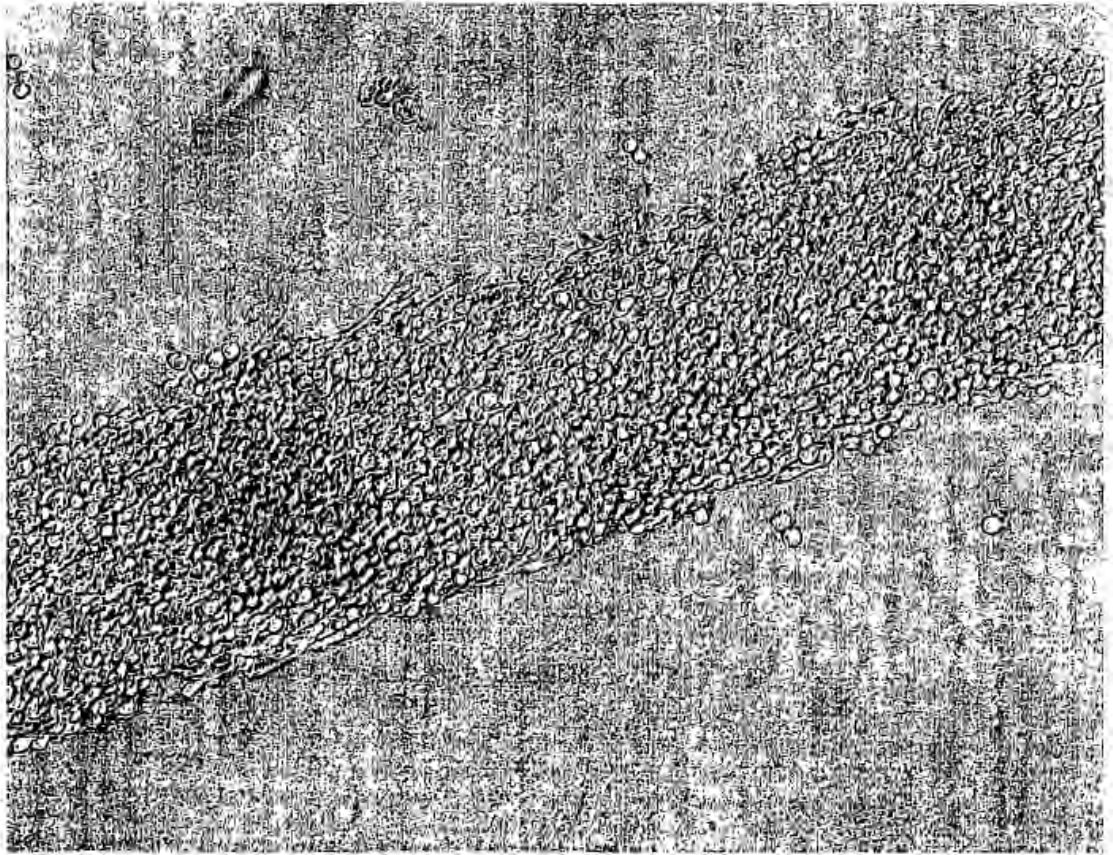


Fig. 4

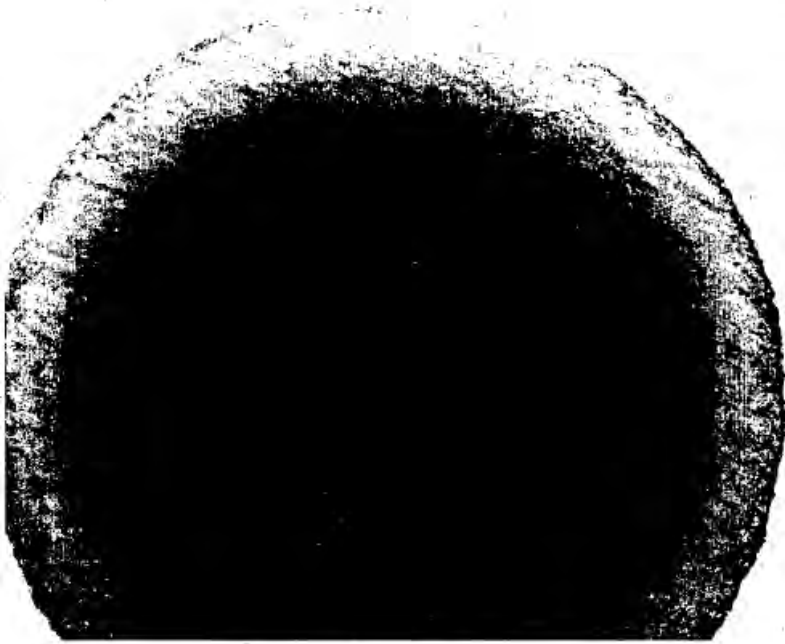


Fig. 5



Fig. 6

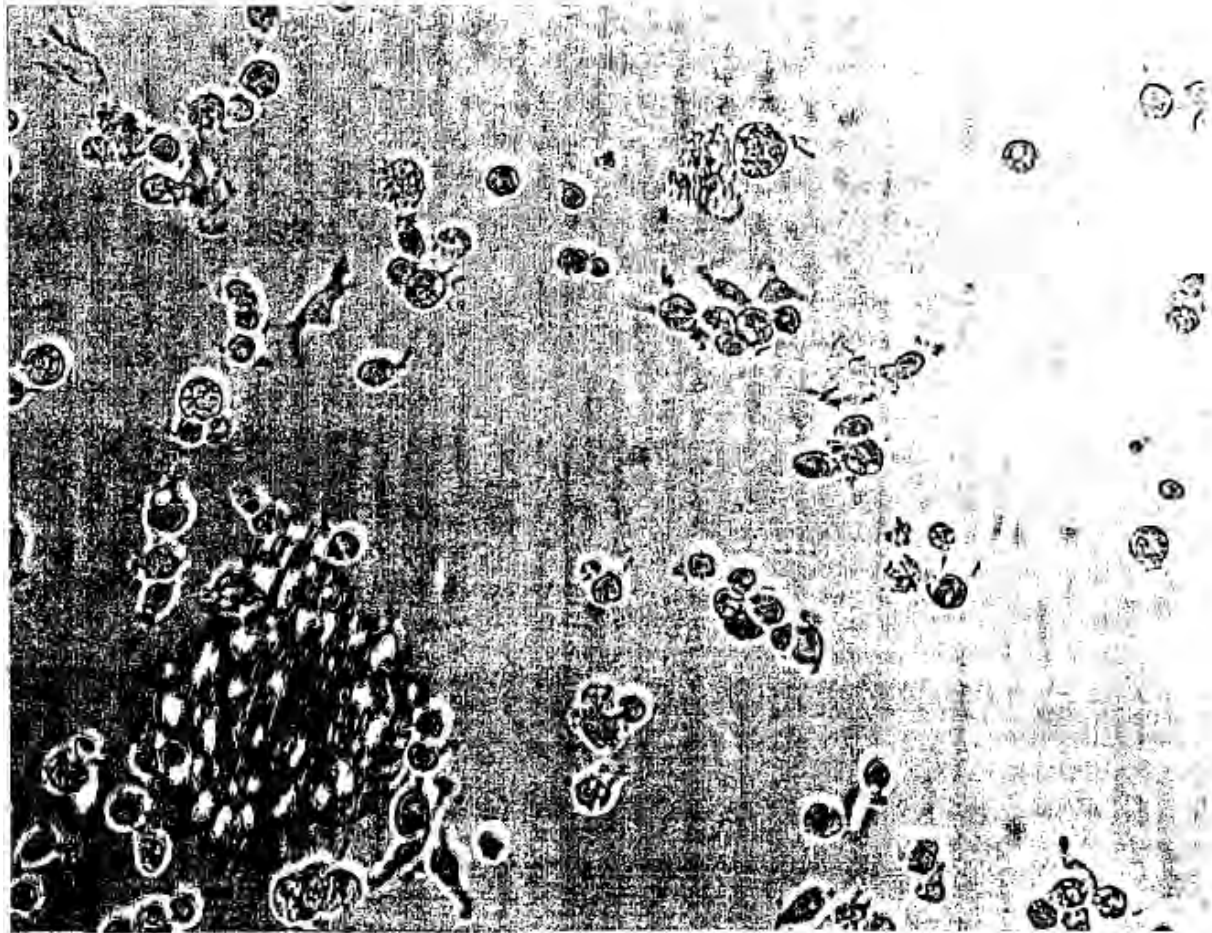


Fig. 7

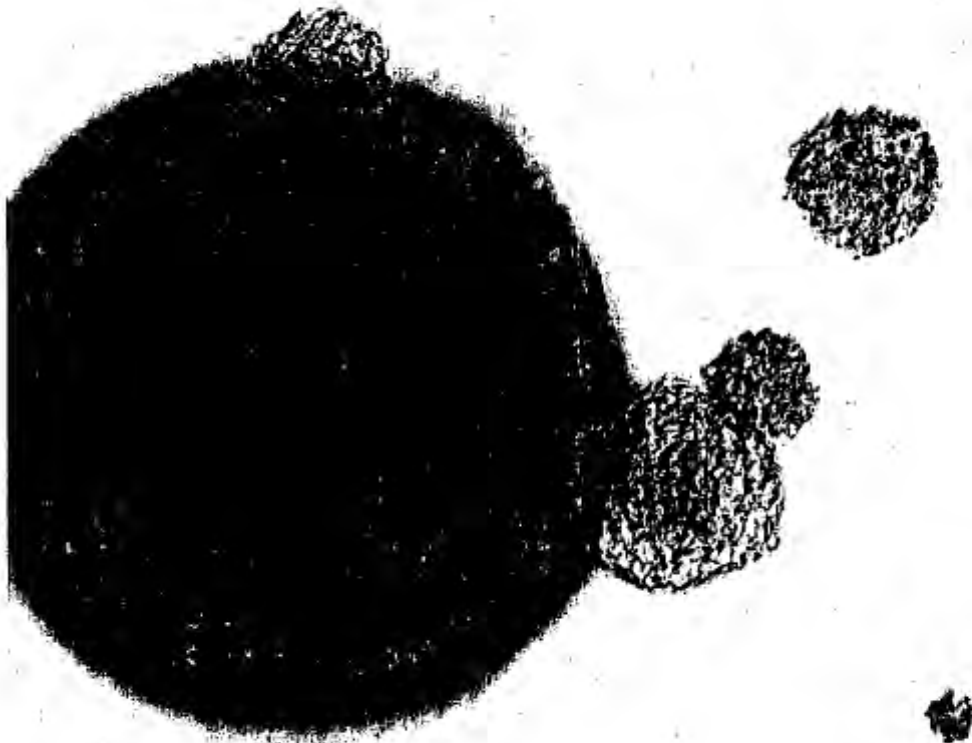


Fig. 8

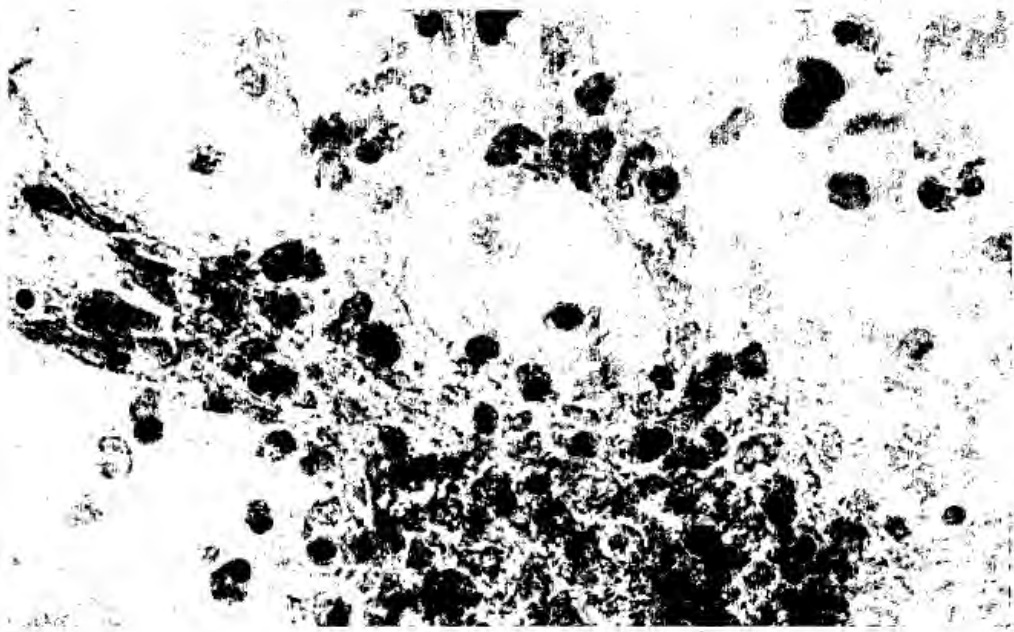


Fig. 9

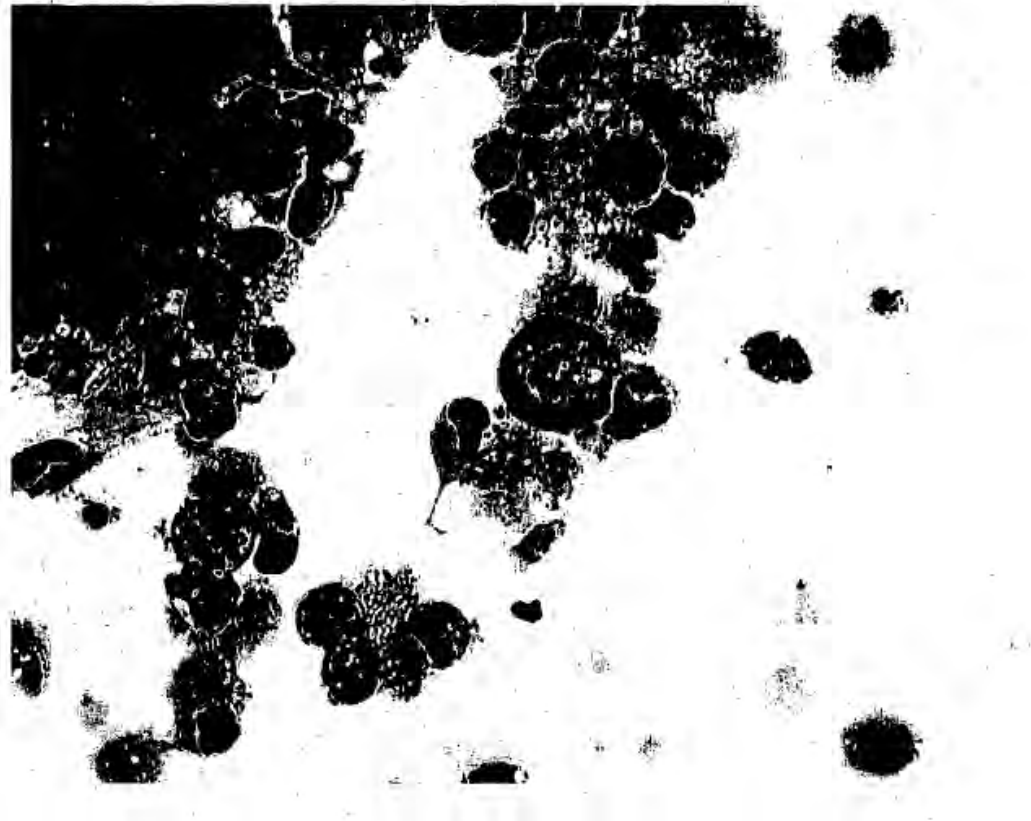


Fig. 10

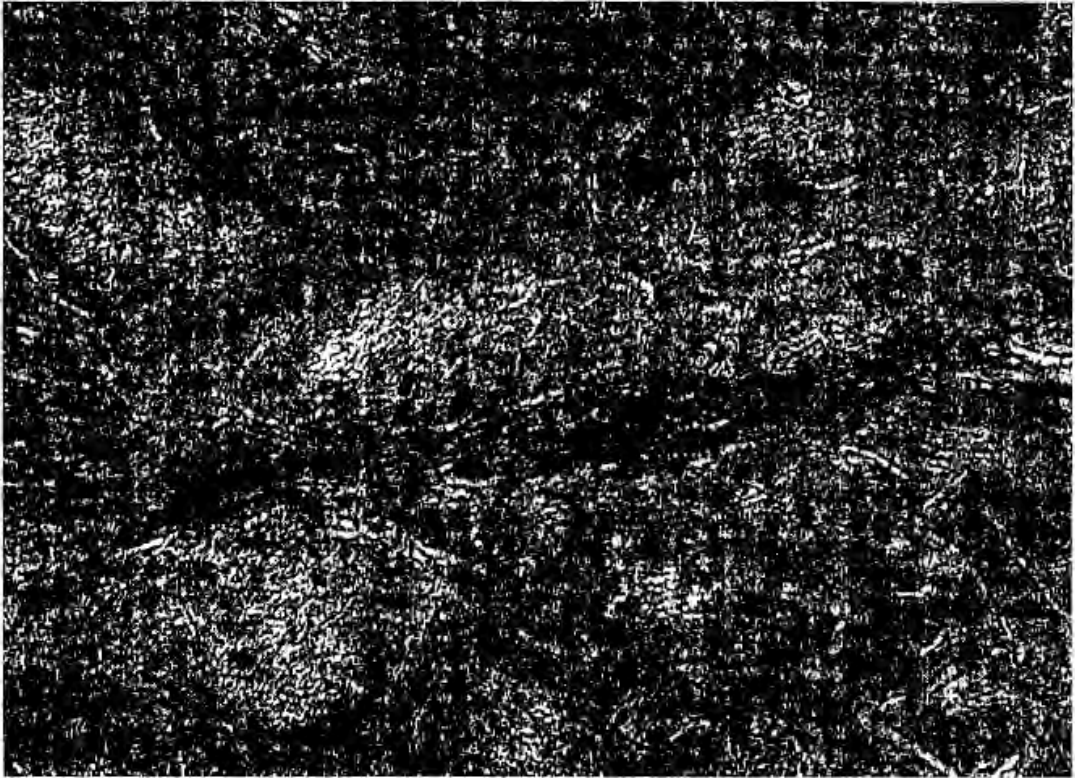


Fig. 11

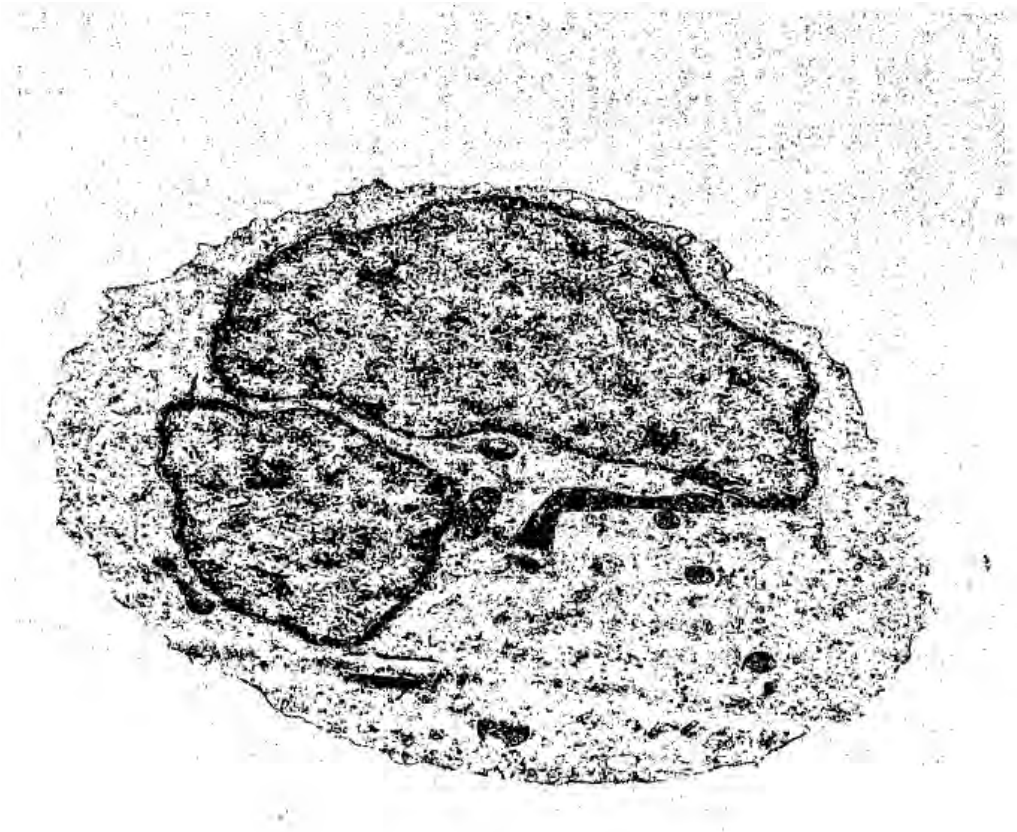


Fig. 12

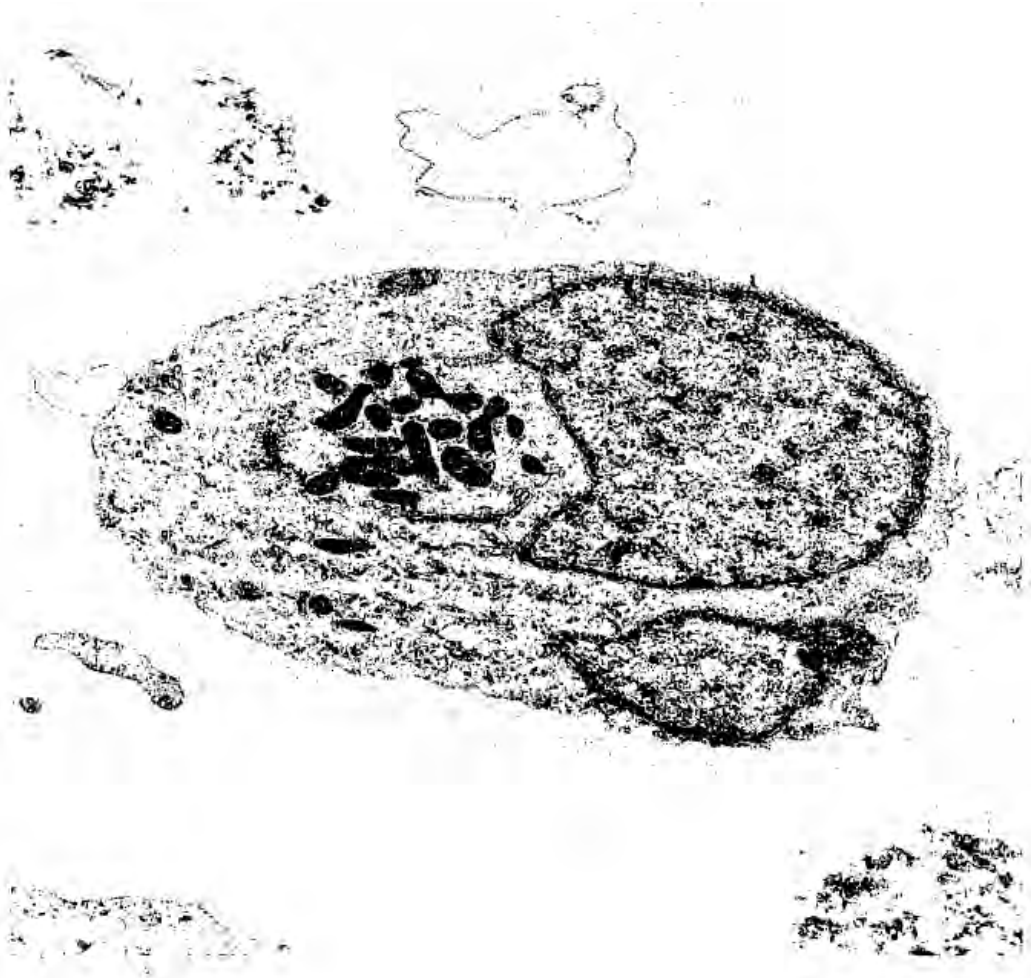
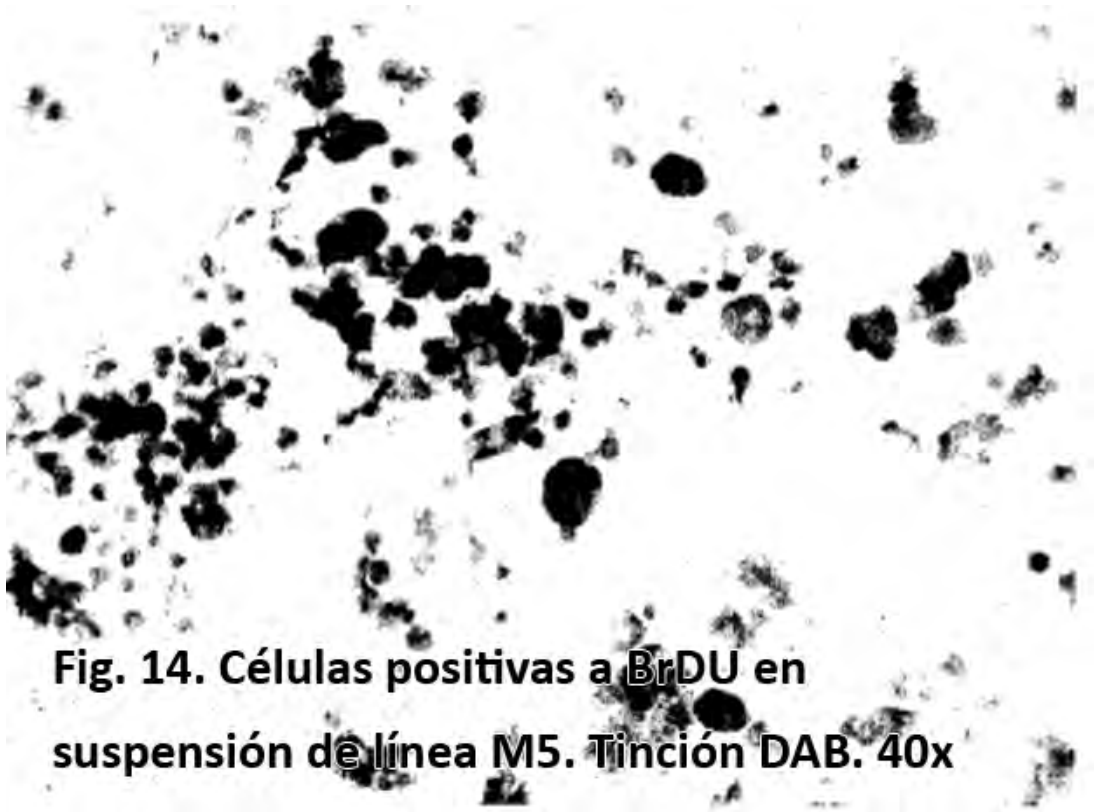


Fig. 13



**Fig. 14. Células positivas a BrDU en
suspensión de línea M5. Tinción DAB. 40x**

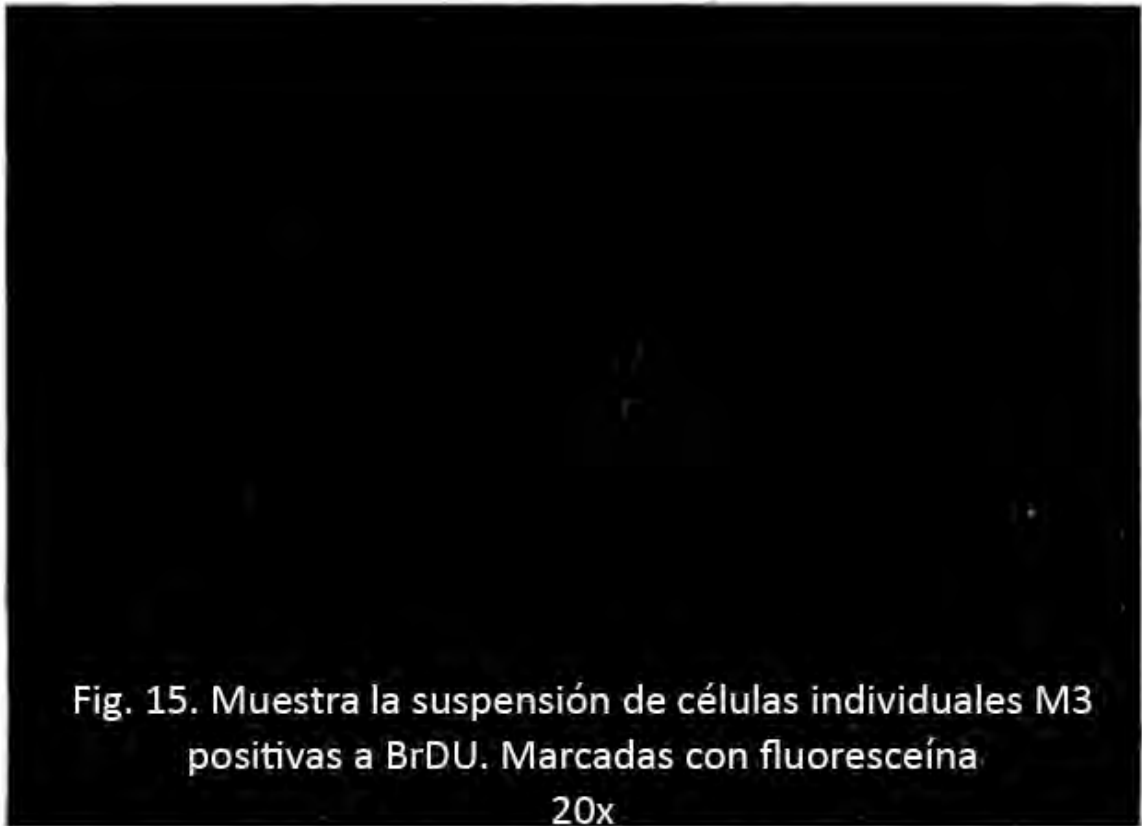
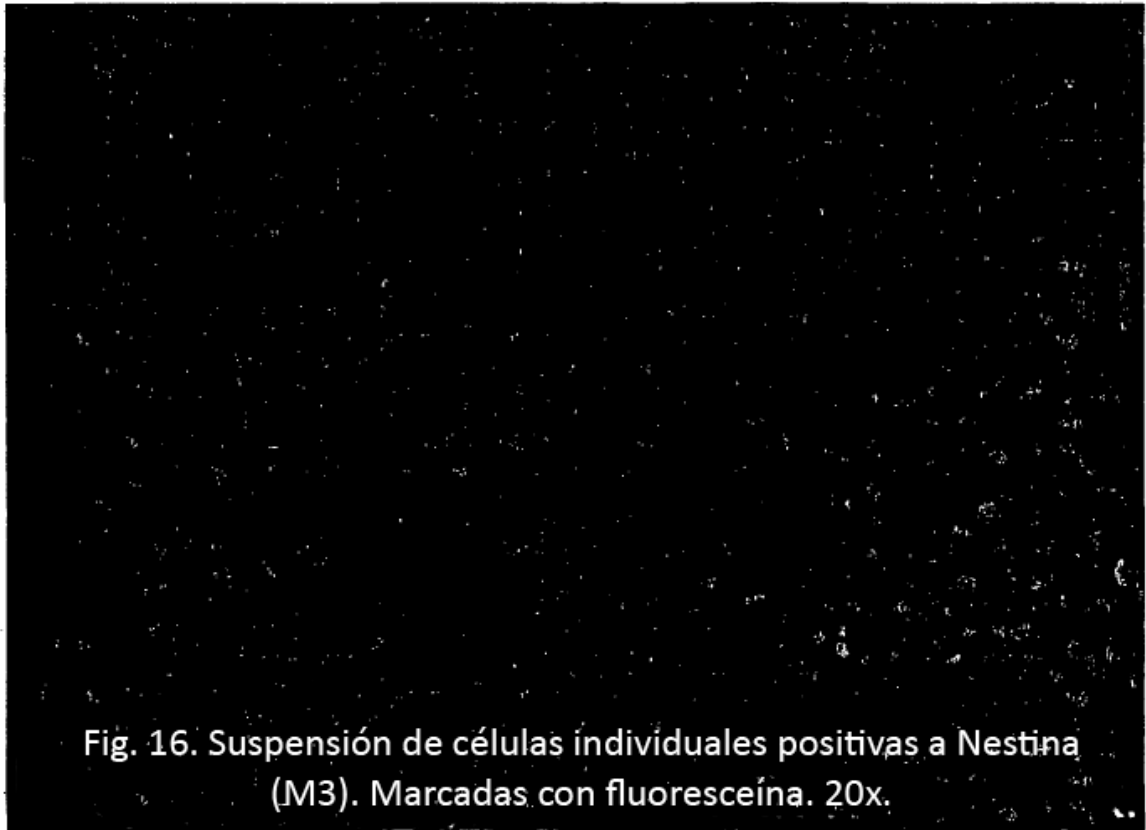


Fig. 15. Muestra la suspensión de células individuales M3
positivas a BrDU. Marcadas con fluoresceína

20x



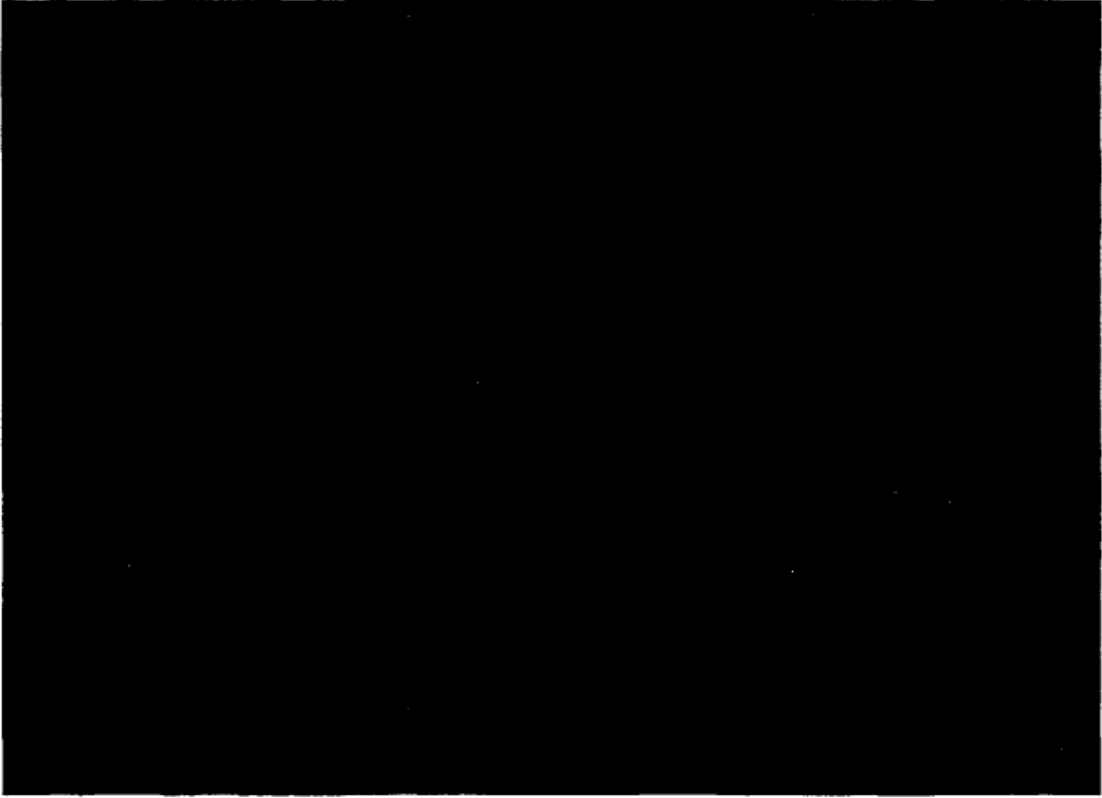


Fig. 17

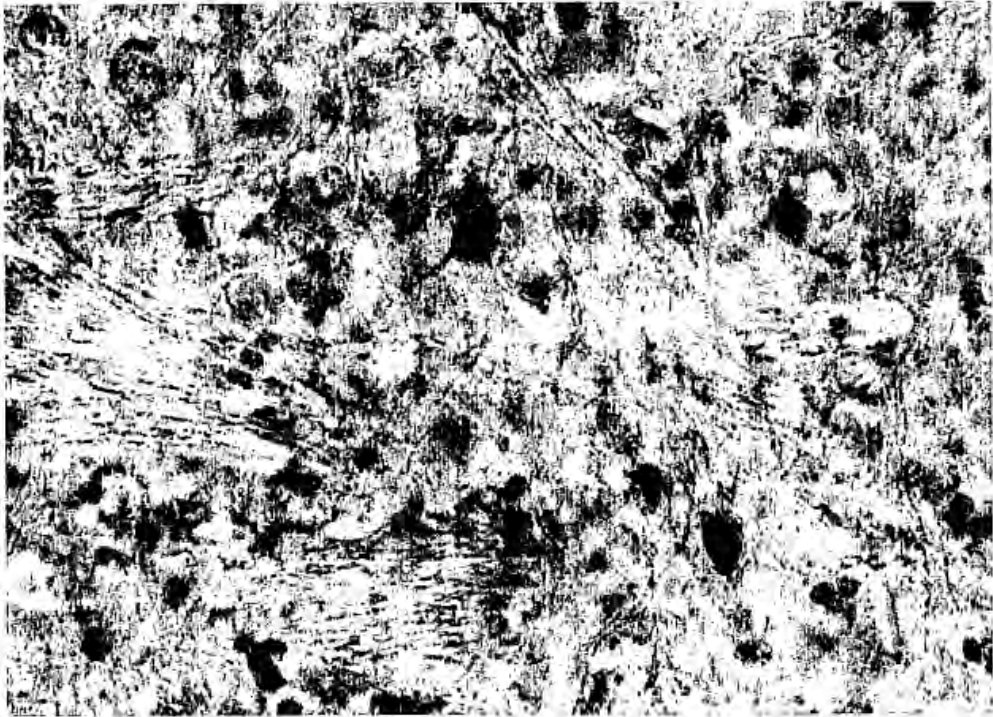


Fig. 18