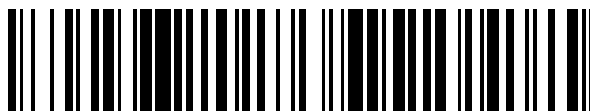


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 780**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A01N 65/00 (2009.01)

A01N 37/18 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2005 E 05810540 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 1827108**

54 Título: **Inducción de la neurogénesis y terapia con células madre en combinación con el Copolímero 1**

30 Prioridad:

29.11.2004 US 631163 P

15.06.2005 US 690498 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.07.2015

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD. (100.0%)
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

**EISENBACH-SCHWARTZ, MICHAL;
ARNON, RUTH;
BUTOVSKY, OLEG;
ZIV, YANIV;
KIPNIS, JONATHAN;
RON, NOGA;
EILAM, RAYA y
AHARONI, RINA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 541 780 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

Inducción de la neurogénesis y terapia con células madre en combinación con el Copolímero 1

Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos y a composiciones, en particular, usando el Copolímero 1 para la inducción y/o la mejora de la neurogénesis endógena y/o la oligodendrogénesis y para la terapia con células madre en lesiones, enfermedades, trastornos o afecciones, en particular, los asociados con el sistema nervioso central (SNC) o el sistema nervioso periférico (SNP).

Abreviaturas: A β , β -amiloide; DA, enfermedad de Alzheimer; BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro; BMS, puntuación motora Basso; BrdU, 5-bromo-2'-desoxiuridina; CFA, adyuvante completo de Freund; SNC, sistema nervioso central; Cop 1, Copolímero 1 igual a GA; DCX, doblecortina; GD, giro dentado; EAE, encefalomiелitis autoinmune experimental; EGF, factor de crecimiento epidérmico; FCS, suero de ternero fetal; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; i.c.v., intracerebroventricular; GA, acetato de glatiramero; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; GFP, proteína verde fluorescente; IB4, isolectina B4; IFA, adyuvante incompleto de Freund; IGF-1, factor de crecimiento similar a la insulina 1; IFN, interferón; IL, interleucina; LPS, lipopolisacárido; MBP, proteína básica de mielina; MG, microglía; MHC-II, moléculas de complejo de histocompatibilidad principal de clase II; MOG, glucoproteína de mielina de los oligodendrocitos; EM, esclerosis múltiple; MWM, laberinto de agua de Morris; NeuN, antígeno nuclear neuronal; NPC, células neuronales madre/progenitoras; BO, bulbo olfatorio; PBS, solución salina tamponada con fosfato; PDL, poli-D-lisina; SNP, sistema nervioso periférico; CMR, corriente migratoria rostral; LME, lesión de la médula espinal; ZSG, zona subgranular; ZSV, zona subventricular; TGF- β , factor de crecimiento transformante β ; TNF, factor de necrosis tumoral.

Antecedentes de la invención

El sistema nervioso central (SNC) es particularmente vulnerable a las lesiones que producen muerte celular o daño, en parte, porque las células del SNC tienen una capacidad limitada para repararse. Dado que el tejido cerebral dañado no se regenera, la recuperación debe venir del resto de cerebro intacto.

La mala recuperación de las lesiones agudas o de los trastornos degenerativos crónicos del SNC se ha atribuido a la falta de neurogénesis, a la regeneración limitada de los nervios lesionados y a la vulnerabilidad extrema a las afecciones degenerativas. La ausencia de neurogénesis se explica bajo la suposición de que, poco después del nacimiento, el SNC alcanza un estado permanentemente estable, necesario para mantener el equilibrio de la compleja red de tejidos del cerebro. Sin embargo, la investigación durante toda la vida, aunque en un grado limitado (Morshead *et al.*, 1994). En el cerebro inflamado, la neurogénesis se bloquea (Ekdahl *et al.*, 2003; Monje *et al.*, 2003). Este último hallazgo reforzó el punto de vista tradicional de que las células inmunitarias locales del SNC tienen un efecto adverso sobre la neurogénesis. Del mismo modo, la regeneración limitada y la vulnerabilidad excesiva de las neuronas del SNC en las afecciones inflamatorias o tras una lesión aguda se desestimaron frente a la poca capacidad del SNC para tolerar la actividad de defensa inmunológica que a menudo se asocia con la inflamación y la citotoxicidad locales mediadas, por ejemplo, por el factor de necrosis tumoral (TNF)- α o el óxido nítrico (Merrill *et al.*, 1993). Estudios más recientes han demostrado, sin embargo, que a pesar de que una respuesta inmune local incontrolada sí perjudica la supervivencia neuronal y bloquea los procesos de reparación, una respuesta inmune local controlada correctamente puede apoyar la supervivencia y potenciar la recuperación (Hauben y Schwartz, 2003; Schwartz *et al.*, 2003). Se ha demostrado, además, que tras una lesión del sistema nervioso central, una respuesta inmune local que esté bien controlada en el tiempo, en el espacio y en la intensidad por los procesos inmunes adaptativos periféricos (en los que los linfocitos T auxiliares CD4⁺ se dirigen contra antígenos propios que residen en el sitio de la lesión) es un requisito fundamental para la supervivencia neuronal y la reparación post-traumáticas (Moalem *et al.*, 1999; Butovsky *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2003; Shaked *et al.*, 2004). Estos y otros resultados llevaron al inventor M. Schwartz y a sus colegas a formular el concepto de "autoinmunidad protectora" (Moalem *et al.*, 1999).

La neurogénesis tiene lugar durante toda la vida en los individuos adultos, aunque en un grado limitado. La mayoría de las células recién formadas mueren en las primeras 2-3 semanas posteriores a la proliferación, y solo unas cuantas sobreviven como neuronas maduras. Poco se sabe sobre el/los mecanismo/s subyacente/s a la existencia de células madre/progenitoras neuronales (NPC) en el cerebro adulto y por qué estas células se restringen en cantidad y en ciertas zonas. Por otra parte, se sabe muy poco acerca de cómo se puede aumentar fisiológicamente la neurogénesis de una agrupación de NPC endógenas. El conocimiento de los factores que permiten que este tipo de células madre exista, prolifere y se diferencie en el individuo adulto es un requisito previo para la comprensión y la promoción de las condiciones propicias para la reparación del SNC. A su vez, cabe esperar que esto conduzca al desarrollo de intervenciones dirigidas a impulsar la renovación de las células neuronales a partir de la agrupación de células madre endógenas o de células madre aplicadas exógenamente.

Los experimentos con modelos de rata y de ratón en el laboratorio de los presentes inventores han demostrado que la implantación bien controlada de macrófagos transmitidos por la sangre activados específicamente (Rapalino *et al.*, 1998) o de células dendríticas (Hauben *et al.*, 2003) potencia la recuperación de la lesión de la médula espinal

(LME). Otros estudios mostraron que la actividad bien controlada de los linfocitos T autoinmunes reactivos con antígenos del SNC que residen en el sitio lesionado puede potenciar la recuperación de las lesiones axonales (Hauben *et al.*, 2000; Moalem *et al.*, 1999). También se demostró que la neuroprotección mediada por los linfocitos T dirigidos específicamente a autoantígenos relacionados con el SNC es la respuesta fisiológica del organismo a la lesión del SNC (Yoles *et al.*, 2001a, 2001b).

En las condiciones normales del cerebro adulto, las nuevas neuronas se forman en los nichos neurogénicos de la zona subventricular de los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (Kempermann *et al.*, 2004). En condiciones patológicas, también se puede inducir cierta neurogénesis en zonas del cerebro no neurogénicas. Varios estudios han demostrado, por ejemplo, que al daño del SNC en los animales, le sigue el reclutamiento de NPC endógenas, que pueden diferenciarse en neuronas y glía en el sitio lesionado (Nakatomi *et al.*, 2002; Imitola *et al.*, 2004a). Sin embargo, esta renovación celular desencadenada por la lesión de células progenitoras endógenas tiene un alcance limitado y es insuficiente para reemplazar completamente el tejido dañado. Para superar el déficit, actualmente, los científicos están buscando maneras de potenciar la recuperación mediante el trasplante de NPC adultas cultivadas (aNPC) (McDonald *et al.*, 2004). Las aNPC exógenas pueden contribuir a la recuperación, actuando como una fuente de nuevas neuronas y células gliales en el SNC lesionado (Cummings *et al.*, 2005; Lepore y Fischer, 2005) o mediante factores secretados que potencien directa o indirectamente la neuroprotección (Lu *et al.*, 2005) y la neurogénesis a partir de agrupaciones de células madre endógenas (Enzmann *et al.*, 2005).

Las opiniones actuales coinciden en que la neurogénesis persiste en el cerebro adulto, en el que puede contribuir a la reparación y la recuperación tras una lesión. Las lesiones cerebrales tales como la isquemia cerebral (Jin *et al.*, 2003), la apoptosis (Magavi *et al.*, 2000) o la desmielinización inflamatoria autoinmune (Picard-Riera *et al.*, 2002) mejoran la neurogénesis. Por lo tanto, las células multipotentes ubicadas en el hilio del hipocampo y la zona subventricular (ZSV) del ventrículo lateral manifiestan un aumento de la proliferación y la migración en situaciones patológicas. Además, se puede hacer que las células progenitoras de la ZSV que migran a través de la corriente migratoria rostral (CMR) hacia el bulbo olfatorio (BO) se diferencien en astrocitos y neuronas (Picard-Riera *et al.*, 2004). Sin embargo, la importancia terapéutica de la auto-neurogénesis en la patología del SNC es limitada, ya que no puede regenerar neuronas funcionales que compensen el daño.

En la esclerosis múltiple (EM) y su modelo animal experimental de la encefalomiелitis autoinmune (EAE), el sistema inmune provoca el proceso perjudicial a través de mecanismos inflamatorios autoinmunes (Hellings *et al.*, 2002; Behi *et al.*, 2005). Aún así, la degeneración neuronal y axonal, que se inician en la aparición de la enfermedad y que se hacen patentes cuando se agotan los recursos compensatorios del SNC, son el principal determinante de la discapacidad neurológica irreversible (Bjartmar *et al.*, 2003), particularmente en el modelo inducido de la glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) (Hobom *et al.*, 2003). Los tratamientos actuales para la EM son eficaces en mejorar el proceso inflamatorio inmune, pero no se ha demostrado su capacidad para mejorar el mecanismo intrínseco de reparación del SNC ni para inducir neuroprotección y neurogénesis eficaces.

Un enfoque potencial para el tratamiento del daño en el SNC incluye el uso de células madre neuronales adultas o cualquier tipo de células madre. Las células madre neuronales adultas son células progenitoras presentes en el cerebro de los mamíferos maduros que tienen la capacidad de autorrenovarse y que, dada la estimulación adecuada, se pueden diferenciar en neuronas cerebrales, astrocitos y oligodendrocitos. Las células madre (de otros tejidos) se han definido tradicionalmente como pluripotentes y que tienen la capacidad de autorrenovarse, proliferar y diferenciarse en múltiples linajes fenotípicos diferentes. Las células madre hematopoyéticas se definen como células madre que pueden dar lugar a células de al menos uno de los principales linajes hematopoyéticos, además de producir células hijas de potencial equivalente. Tres linajes principales de células sanguíneas incluyen el linaje linfóide, por ejemplo, linfocitos B y linfocitos T, el linaje mieloide, por ejemplo, monocitos, granulocitos y megacariocitos, y el linaje eritroide, por ejemplo, glóbulos rojos. Ciertas células madre hematopoyéticas son capaces de diferenciarse en otros tipos de células, incluyendo las células cerebrales.

El trasplante de células precursoras (madre) multipotentes es una estrategia prometedora para la terapia de diversos trastornos causados por la pérdida o el mal funcionamiento de un solo tipo o unos cuantos tipos de células. Estos incluyen trastornos neurológicos tales como la lesión de la médula espinal, neurodegeneraciones subcorticales, por ejemplo, Huntington y Parkinson, y enfermedades desmielinizantes, por ejemplo, EM, así como otras afecciones patológicas tales como diabetes, infarto de miocardio de insuficiencia cardíaca, lesión de tejidos y cicatrización de heridas insuficiente. Particularmente en la EM y su modelo animal de EAE, las células madre que se diferencian en oligodendrocitos y neuronas pueden conducir a la reparación del daño de la mielina y a reemplazar las neuronas degeneradas. Sin embargo, hasta la fecha, el trasplante de células madre en estos sistemas ha tenido malos resultados terapéuticos. Así pues, las células madre trasplantadas como tales en ratones con EAE se encontraron principalmente alrededor del sitio de la inyección (en los casos de administración local) o en la posición perivascular (cuando se empleó la administración sistémica), y su proliferación, migración y diferenciación fueron insuficientes para compensar el daño provocado por la enfermedad (Goldman, 2005; Pluchino y Martini, 2005). En 2003, se interrumpió un ensayo clínico en el que se trasplantaron células madre en zonas desmielinizantes del cerebro de pacientes con EM, ya que no se encontraron pruebas de supervivencia de las células madre en los pacientes implantados (Pluchino y Martini, 2005). Estos resultados se relacionaron con los procesos inflamatorios crónicos que destruyen las células trasplantadas, así como las células residentes. Se ha sugerido que las estrategias terapéuticas

basadas en células, especialmente aquellas destinadas a la EM, requerirán la modificación de la enfermedad junto con la administración de células. La terapia con células madre también se tiene en cuenta para muchas otras aplicaciones médicas, no relacionadas con los trastornos neurológicos.

Se han publicado la separación y la clonación de líneas de células madre neuronales del cerebro tanto murino como humano. Las células madre neuronales del SNC humano, como sus homólogos murinos, cuando se mantienen en un medio de cultivo exento de suero que contiene mitógenos (normalmente, factor de crecimiento epidérmico o factor de crecimiento epidérmico más factor de crecimiento de fibroblastos básico), crecen en cultivo en suspensión para formar agregados de células conocidas como neuroesferas. Tras la eliminación de los mitógenos y el suministro de un sustrato, las células madre se diferencian en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Cuando dichas células madre se reintroducen en el cerebro maduro o en desarrollo, pueden someterse a procesos de división, migración y crecimiento, y adoptar fenotipos neuronales, incluyendo la expresión de los neurotransmisores y factores de crecimiento normalmente elaborados por las neuronas. Así pues, el uso de células madre neuronales puede ser ventajoso para la recuperación de la lesión del SNC al menos de dos maneras: (1) mediante la repoblación parcial por parte de las células madre de las zonas muertas y el restablecimiento de las conexiones neuronales perdidas por la lesión del SNC; y (2) mediante la secreción de neurotransmisores y factores de crecimiento importantes requeridos por el cerebro para reconfigurarse después de daño en el SNC.

Recientemente, se ha descubierto una fuente renovable de células madre neuronales en el cerebro humano adulto. Estas células pueden ser candidatas para la terapia de reemplazo celular contra los trastornos del sistema nervioso. La capacidad de aislar estas células del cerebro humano adulto plantea la posibilidad de realizar un trasplante autólogo de células madre neuronales. Se ha informado que se han iniciado ensayos clínicos con células madre neuronales humanas adultas para el tratamiento de pacientes con la enfermedad de Parkinson. Si las células madre neuronales adultas se van a usar en ensayos clínicos, deben ser susceptibles a la expansión en cantidades clínicamente significativas. Desafortunadamente, estas células parecen tener una vida útil limitada en la placa de cultivo, y queda por determinar si son estables en los pasajes posteriores y capaces de generar números útiles de neuronas.

El cerebro siempre ha sido visto como un sitio privilegiado desde el punto de vista inmunológico. Sin embargo, los linfocitos T autoinmunes (controlados con respecto a la aparición, la duración y la intensidad de su actividad), recientemente han demostrado ejercer un efecto beneficioso sobre la supervivencia neuronal tras una lesión del SNC (Schwartz *et al.*, 2003), así como en los casos de disfunción mental (Kipnis *et al.*, 2004). Por otra parte, un profundo conocimiento de los mecanismos que subyacen al efecto beneficioso de los linfocitos T para el tejido neuronal degenerativo ha señalado que los linfocitos T instruyen a la microglía, en la zona lesionada, para adquirir un fenotipo de apoyo del tejido neuronal. Además, parecía que varias intervenciones basadas en el sistema inmunológico pueden potenciar esta respuesta protectora, convirtiéndose todo en la activación microglial (Shaked *et al.*, 2004). El tipo de daño no determina la elección de la metodología, es el sitio lo que la determina. Algunos antígenos reaccionan de manera cruzada con numerosos antígenos y, por lo tanto, pueden superar la barrera de la especificidad tisular. De acuerdo con la presente invención, los presentes inventores muestran que la misma manipulación que conduce a la supervivencia neuronal conduce a la neurogénesis y a la oligodendrogénesis. Parece que la propia microglía, activada por los linfocitos T o por sus citocinas, no solo apoya la supervivencia neuronal, sino que también apoya la oligodendrogénesis y la neurogénesis. Estos resultados indican que la manipulación basada en los linfocitos T creará condiciones en el tejido neuronal dañado que favorecerán la renovación celular no solo a partir de recursos de células madre endógenas, sino también de células madre aplicadas exógenamente.

El Copolímero 1 o Cop 1, un copolímero aleatorio sintético no patógeno, está compuesto por los cuatro aminoácidos: L-Glu, L-Lys, L-Ala y L-Tyr. El acetato de glatiramero (GA), una forma de Cop 1, es actualmente un fármaco aprobado para el tratamiento de la esclerosis múltiple con el nombre de Copaxone® (una marca comercial de Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Petah Tikva, Israel). Ejerce un notable efecto supresor sobre la EAE inducida por diversos encefalitógenos, en varias especies (Arnon y Sela, 2003).

El Cop 1 es un agente muy bien tolerado con reacciones adversas solo menores y un alto perfil de seguridad. El tratamiento con Cop 1 por ingestión o inhalación se desvela en el documento US 6.214.791.

Recientemente, se ha encontrado que, en modelos animales, el Cop 1 proporciona un efecto beneficioso para varios trastornos adicionales. Por lo tanto, el Cop 1 suprime el rechazo inmune manifestado en la enfermedad del injerto contra huésped (EICH) en el caso del trasplante de médula ósea (Schlegel *et al.*, 1996; Aharoni *et al.*, 1997; US 5.858.964), así como en el rechazo del injerto en caso de trasplante de órganos sólidos (Aharoni *et al.*, 2001, 2004) y en las solicitudes de patentes del solicitante WO 00/27417 y WO/009333A2).

Los documentos WO 01/52878 y WO 01/93893 de los mismos solicitantes desvelan que el Cop 1, los péptidos y polipéptidos relacionados con el Cop 1 y los linfocitos T activados con los mismos protegen las células del SNC de la toxicidad del glutamato, y previenen o inhiben la degeneración neuronal o potencian la regeneración nerviosa en el SNC y en el SNP. Así pues, por ejemplo, el Cop 1 está siendo evaluado como vacuna terapéutica para enfermedades neurodegenerativas tales como las neuropatías ópticas y el glaucoma (Kipnis y Schwartz, 2002).

Se ha demostrado que el Cop 1 actúa como un antígeno de baja afinidad que activa una amplia selección de

linfocitos T que autorreaccionan, lo que produce una autoinmunidad neuroprotectora que es eficaz contra la degeneración tanto de la materia gris como de la materia blanca del SNC (Schwartz y Kipnis, 2002). El efecto neuroprotector de la vacunación con Cop 1 se demostró en modelos animales de trastornos neurológicos agudos y crónicos tales como la lesión del nervio óptico (Kipnis *et al.*, 2000), el traumatismo craneal (Kipnis *et al.*, 2003), el glaucoma (Schori *et al.*, 2001; Bakalash *et al.*, 2003), la esclerosis lateral amiotrófica (Angelov *et al.*, 2003), y en las solicitudes de patente del solicitante WO 01/52878, WO 01/93893 y WO 03/047500.

En el documento WO 01/97785, se desvela el uso del Copolímero 1 para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con priones. Gendelman y colaboradores desvelan que la inmunización pasiva con esplenocitos de ratones inmunizados con Cop 1 confiere neuroprotección dopaminérgica en ratones tratados con MPTP (Benner *et al.*, 2004).

El Cop 1, y los copolímeros y péptidos relacionados se han desvelado en el documento WO 00/05250 (Aharoni *et al.*, 2000) para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, y en el documento WO 2004/064717 para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino (Aharoni *et al.*, 2004).

El efecto inmunomodulador del GA se atribuyó a su capacidad para inducir linfocitos Th2/3 que secretan altos niveles de citocinas antiinflamatorias (Aharoni *et al.*, 1998; Duda *et al.*, 2000). Estas células atraviesan la barrera hematoencefálica (BBB), se acumulan en el SNC (Aharoni *et al.*, 2000, 2002) y expresan *in situ* interleucina-10 (IL-10), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), así como factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Aharoni *et al.*, 2003). Además, las células específicas del GA inducen un efecto de espectador en las células vecinas del SNC para expresar estos factores beneficiosos y reducir la expresión de interferón (IFN)- γ . Una cuestión clave en la capacidad del GA para contrarrestar el proceso patológico es su efecto sobre el sistema neuronal, que es la diana real del proceso patológico.

Ninguna de las referencias anteriormente mencionadas desvela específicamente que el GA induzca la neurogénesis en el SNC, y no se desvelan datos ni protocolo para el ensayo del efecto del GA en la inducción de la neurogénesis en el SNC.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Así pues, se refiere a los siguientes artículos:

1. Un agente neuroprotector seleccionado entre Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el Copolímero 1, un péptido relacionado con el Copolímero 1 y linfocitos T activados que han sido activados por el Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el Copolímero 1 o un péptido relacionado con el Copolímero 1, en combinación con terapia de células madre con la condición de que dichas células madre no sean células madre embrionarias humanas, para su uso en el tratamiento de una lesión del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP), un trastorno de Parkinson tal como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple o esclerosis lateral amiotrófica (ELA), en el que dicho polipéptido relacionado con el Copolímero 1/péptido relacionado con el Copolímero 1 reacciona funcionalmente de forma cruzada con la proteína básica mielina (MPB) y es capaz de competir con la MBP en el MHC de clase II en la presentación de antígenos.

2. El agente neuroprotector para su uso de acuerdo con el artículo 1, en el que dicho agente neuroprotector es para la administración a un paciente antes, simultáneamente o después del trasplante de las células madre a dicho paciente.

3. El agente neuroprotector para su uso de acuerdo con los artículo 1 o 2, en el que dicho agente neuroprotector es Copolímero 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. El agente neuroprotector para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1 a 3, en el que las células madre son células madre de adulto, células madre embrionarias con la condición de que dichas células madre embrionarias no sean células madre embrionarias humanas, células madre de sangre del cordón umbilical, células madre hematopoyéticas, células madre de sangre periférica, células madre mesenquimales, células madre multipotentes, células madre neuronales, células progenitoras neuronales, células madre estromales, células progenitoras o precursores de las mismas, o células madre diseñadas por ingeniería genética.

5. El agente neuroprotector para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1 a 3, en el que dicha lesión del SNC se selecciona entre lesión de la médula espinal, traumatismo craneal cerrado, traumatismo contuso, traumatismo penetrante, apoplejía hemorrágica, apoplejía isquémica, isquemia cerebral, lesión del nervio óptico, infarto de miocardio y lesión causada por escisión tumoral.

Además, se desvela un procedimiento de inducción y potenciación de la neurogénesis y/o la oligodendrogénesis a partir de células madre endógenas, así como administradas exógenamente, que comprende administrar a un individuo en necesidad de ello un agente seleccionado del grupo que consiste en Copolímero 1, un polipéptido

relacionado con el Copolímero 1, un péptido relacionado con el Copolímero 1 y linfocitos T activados que han sido activados por el Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el Copolímero 1 o un péptido relacionado con el Copolímero 1.

5 Se desvela además un procedimiento de terapia con células madre que comprende el trasplante de células madre en combinación con un agente neuroprotector a un individuo en necesidad de ello, en el que dicho agente neuroprotector se selecciona del grupo que consiste en Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el Copolímero 1, un péptido relacionado con el Copolímero 1 y linfocitos T activados que han sido activados por el Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el Copolímero 1 o un péptido relacionado con el Copolímero 1.

10 La invención también se refiere al uso de un agente neuroprotector seleccionado del grupo que consiste en Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el Copolímero 1, un péptido relacionado con el Copolímero 1 y linfocitos T activados que han sido activados por el Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el Copolímero 1 o un péptido relacionado con el Copolímero 1, para la preparación de una composición farmacéutica para la inducción y potenciación de la neurogénesis y/o oligodendrogénesis a partir de células madre endógenas, así como administradas exógenamente a un paciente.

15 En una realización preferida, el agente es Copolímero 1 para su uso en combinación con terapia de células madre.

Breve descripción de las figuras

20 Las **Fig. 1A-1F** muestran que la diferenciación de las NPC en neuronas puede ser bien inducida o bloqueada por la microglía, dependiendo de cómo se activan. Se cultivaron conjuntamente células NPC que expresaban la proteína verde fluorescente (GFP) (verdes) con células microgliales activadas de forma diferente de ratones durante 5 días. En las Fig. 1A y 1B, se resume la cuantificación de células β -III-tubulina⁺ (expresada como un porcentaje de células GFP⁺) obtenida a partir de imágenes confocales, sin insulina (-Ins) o con insulina (+Ins), respectivamente. La Fig. 1C muestra los resultados del efecto de rTNF- α sobre el número de células β -III-tubulina⁺, expresado como porcentaje de células GFP⁺, en cultivos conjuntos de NPC y MG_(IFN- γ) en presencia de insulina. Las barras de error representan las medias $\pm$ DE. Los datos son de uno de al menos tres experimentos independientes en cultivos repetidos. Los asteriscos que hay sobre las barras expresan diferencias con respecto a las NPC sin tratar (Control) (**P* <0,05; ****P* <0,001; ANOVA). La Fig. 1D muestra imágenes confocales representativas de NPC que expresan GFP (verde), en ausencia de insulina sin microglía (control); con microglía sin tratar (MG₍₋₎); con microglía activada con LPS (MG_(LPS)); con microglía activada con IL-4 (MG_(IL-4)); y en presencia de insulina con microglía activada por IFN- γ (MG_(IFN- γ) + Ins) o microglía activada por IFN- γ (MG_(IFN- γ) + Ins) y anti-TNF. La Fig. 1E muestra NPC que expresan GFP que expresan conjuntamente β -III-tubulina y Nestina. La Fig. 1F muestra que las neuronas recién formadas de NPC se tiñen positivamente para la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) 67 (β -III-tubulina⁺/GFP⁺/GAD⁺). Nota, los canales confocales se presentan por separado.

35 Las **Fig. 2A-2D** muestran que la microglía activada con IFN- γ o IL-4 induce la diferenciación de las NPC en neuronas que expresan doblecortina (DCX) con diferente morfología. Se cultivaron conjuntamente células NPC que expresaban la GFP (verdes) con células microgliales activadas de forma diferente como se describe en la Fig.1, y se tiñeron para el marcador neuronal DCX. La Fig. 2A representa dos imágenes confocales representativas de NPC que expresan GFP (verde) cultivadas conjuntamente durante 5 días con MG_(IL-4) en ausencia de insulina (panel izquierdo) o con MG_(IFN- γ) en presencia de insulina (MG_(IFN- γ) + Ins, panel derecho). La Fig. 2B muestra imágenes confocales representativas de NPC que expresan GFP que expresan conjuntamente DCX. La Fig. 2C muestra imágenes confocales representativas de células β -III-tubulina⁺ que expresan conjuntamente DCX. Nota, los canales confocales se presentan por separado. La Fig. 2D muestra la cuantificación de células DCX⁺ (expresada como un porcentaje de células GFP⁺) obtenida a partir de imágenes confocales, sin insulina (-Ins) o con insulina (+Ins). Las barras de error representan las medias $\pm$ DE. Los datos son de uno de al menos tres experimentos independientes en cultivos repetidos. Los asteriscos que hay sobre las barras expresan diferencias con respecto a las NPC sin tratar (Control) (**P* <0,05; ****P* <0,001; ***P* <0,01 ANOVA).

50 Las **Fig. 3A-3E** muestran que la diferenciación de las células NPC en oligodendrocitos puede ser bien inducida o bloqueada por la microglía, dependiendo de cómo se activan. Se cultivaron células NPC que expresaban la GFP (verdes) solas o conjuntamente con células microgliales activadas de forma diferente según lo descrito en la Fig. 1. Los histogramas muestran la cuantificación de células NG2⁺ o RIP⁺ (expresada como un porcentaje de células GFP⁺) obtenida a partir de imágenes confocales, cultivos conjuntos tras 5 días (3A) en medio exento de insulina (-Ins) o (3B) en medio que contenía insulina (+Ins). Los datos mostrados proceden de uno de los tres experimentos independientes en cultivos repetidos, representando las barras las medias $\pm$ DE. Los asteriscos que hay sobre las barras expresan diferencias con respecto a las NPC sin tratar (Control) (***P* <0,01; ****P* <0,001; ANOVA). La Fig. 3C muestra 4 imágenes confocales representativas de NPC que expresan GFP (verdes) y células NG2⁺ (rojas), sin microglía (control); cultivadas conjuntamente con microglía sin tratar (MG₍₋₎); cultivadas conjuntamente con microglía activada por IFN- γ en presencia de insulina (MG_(IFN- γ) + Ins); cultivadas conjuntamente con microglía activada por IL-4 (MG_(IL-4)) durante 5 días. La Fig. 3D muestra imágenes confocales que muestran la ubicación conjunta de células con GFP, NG2 y nestina). Nota, los canales confocales se presentan por separado. La Fig. 3E muestra que se observan células NG2⁺ adyacentes a células MAC1⁺.

Las **Fig. 4A-4G** muestran la diferenciación y la maduración de células NPC en presencia de $MG_{(IFN-\gamma)}$ o $MG_{(IL-4)}$ después de 10 días de cultivo. Se analizaron los cultivos de células NPC sin tratar (control) o de NPC cultivadas conjuntamente con $MG_{(IFN-\gamma)}$ o $MG_{(IL-4)}$ después de 10 días. La Fig. 4A representa los números de células $NG2^+$, RIP^+ , $GalC^+$, $GFAP^+$ o β -III-tubulina $^+$ expresados como porcentajes células GFP^+ . Los valores son las medias $\pm$ DE (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; ANOVA). La Fig. 4B-4F son imágenes confocales representativas de células NPC en presencia de $MG_{(IL-4)}$ después de 10 días de cultivo. La Fig. 4B muestra que se observó el aumento de la ramificación de los procesos teñidos con NG2 tras 10 días (compárense la Fig. 4B con la Fig. 3C, $MG_{(IL-4)}$). Se observa la formación del contacto entre un proceso $NG2^+$ y una célula adyacente (alta ampliación de la zona encuadrada). La Fig. 4C muestra que la tinción de los mismos cultivos para los oligodendrocitos maduros ($GalC^+$) y las neuronas (β -III-tubulina $^+$) muestra los contactos entre las neuronas y los oligodendrocitos muy ramificados (alta ampliación de la zona encuadrada). La Fig. 4D muestra que no se observa superposición entre el marcaje para las neuronas (DCX^+) y para los oligodendrocitos (RIP^+). La Fig. 4E y 4F muestran que no se observa la superposición entre el marcaje con GFAP y NG2 ni entre el marcaje con GFAP y DCX, respectivamente. La Fig. 4G muestra la longitud de las neuritas de las células $MG_{(IFN-\gamma)}$ y $MG_{(IL-4)}$. Los valores son las medias $\pm$ DE (*** $P < 0,001$; ANOVA).

Las **Fig. 5A-5D** muestran el papel de IGF-I y TNF- α en la inducción de la oligodendrogénesis por la microglía activada por IL-4 e IFN- γ . (5A) Se cultivaron células NPC que expresaban GFP (verdes) solas (control), en presencia de anti-IGF-I, en cultivos conjuntos con $MG_{(IL-4)}$ en ausencia o presencia de anti-IGF-I (5 μ g/ml), o en presencia de anti-TNF- α (1 ng/ml). (5B) En un experimento independiente, se cultivaron NPC en presencia de rIGF-I (500 ng/ml). En las Fig. 5A y 5B, no se añadió nada de insulina a los medios. (5C) Se cultivaron NPC solas (control), con anti-TNF- α (1 ng/ml) o con $MG_{(IFN-\gamma)}$ en ausencia o presencia de anti-TNF- α . (5D) En un experimento independiente, se cultivaron NPC con $MG_{(IFN-\gamma)}$ en presencia de insulina y rTNF- α (10 ng/ml). Las barras de error representan las medias $\pm$ DE. Los asteriscos que hay sobre las barras expresan diferencias relativas a las NPC sin tratar (control) (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ANOVA).

Las **Fig. 6A-6C** muestran que el IFN- γ , a diferencia de la IL-4, indujo transitoriamente TNF- α y redujo la expresión de IGF-I en la microglía. (6A) Se analizaron microglías tratadas con IL-4 (10 ng/ml), IFN- γ (20 ng/ml) o LPS (100 ng/ml) durante 24 h en busca de ARNm de TNF- α e IGF-I mediante RT-PCR semicuantitativa. Se muestran los resultados representativos de uno de los tres experimentos independientes. (6B) Cursos de tiempo de la expresión de ARNm de TNF- α e IGF-I por $MG_{(IL-4)}$ o $MG_{(IFN-\gamma)}$. Se realizó la PCR en cada punto temporal con las mismas mezclas de transcripción inversa para todas las especies de ADNc. Los valores representan cantidades relativas de ARNm amplificado normalizadas frente a β -actina en la misma muestra, y se representan como las veces de inducción con respecto al control (medias $\pm$ DE). Se determinó el intervalo de trabajo lineal de las amplificaciones antes de llevar a cabo los experimentos. Cada muestra se ensayó en tres repeticiones, y se obtuvieron resultados similares en tres cultivos microgliales diferentes. (6C) El análisis estadístico de la expresión de IGF-I demuestra la intensidad de fluorescencia por célula, calculada como un porcentaje del aumento de la intensidad relativa con respecto a $MG_{(-)}$ (control) (medias $\pm$ DE; obtenidas en dos experimentos independientes, cada uno repetido cuatro veces). Nota, con respecto al control sin tratar, la $MG_{(IL-4)}$ mostró un aumento significativo de IGF-I. Los asteriscos encima de la barra expresan las diferencias con respecto a $MG_{(-)}$ (* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$; Prueba t de Student de dos colas).

Las **Fig. 7A-7H** muestran que una respuesta autoinmune específica de la mielina funciona sinérgicamente con el trasplante de aNPC trasplantadas en la potenciación de la recuperación funcional de una lesión de la médula espinal (LME). Recuperación de la función motora tras la LME (2 N durante 1 s) en ratones C57B1/6J macho ($n = 6-9$ en cada grupo). (7A) Se inmunizaron los ratones con péptido MOG o PBS emulsionada en CFA que contenía *Mycobacterium tuberculosis* al 1 % (MOG-CFA y PBS-CFA, respectivamente). Una semana después de la LME, se trasplantaron células aNPC en sus ventrículos laterales (MOG-CFA/aNPC o PBS-CFA/aNPC). Los ventrículos laterales de ratones de grupos de control inmunizados o lesionados de manera similar se trataron con PBS (MOG-CFA/PBS o PBS-CFA/PBS). Se presentan los valores de la escala de calificación de la puntuación motora Basso (BMS). (7B) Puntuaciones BMS de ratones individuales descritos en (7A) en el día 28 del experimento. (7C) Recuperación de la función motora tras una LME (2 N durante 1 s) en ratones C57B1/6J macho ($n = 6-9$ en cada grupo) inmunizados con péptido MOG 45D emulsionado en CFA que contenía *Mycobacterium tuberculosis* al 2,5 %. Una semana después de la LME, se trasplantaron aNPC en los ventrículos laterales. Del mismo modo, los grupos de control lesionados e inmunizados, en lugar de recibir el trasplante de aNPC, fueron inyectados con PBS. Se presentan los valores de BMS. (7D) Puntuaciones BMS registradas de ratones individuales descritos en (7C) el día 28 del experimento. (7E) Las lesiones y el trasplante de aNPC fueron como en (7A), pero la inmunización se llevó a cabo 7 días antes de la LME, y los ratones fueron inmunizados con MOG-IFA o inyectados con PBS (control). (7F) Las lesiones y el trasplante de aNPC fueron como en (7A), pero la inmunización se llevó a cabo 7 días antes de la LME, y los ratones fueron inmunizados con OVA/CFA. (7G, 7H) Las lesiones y el trasplante de aNPC fueron como en (7A), pero la inmunización se llevó a cabo 7 días antes de la LME, y los ratones fueron inmunizados con el péptido MOG y CFA que contenía *Mycobacterium tuberculosis* al 2,5 %. Los resultados en todos los grupos son las medias $\pm$ ETM. Los asteriscos muestran las diferencias en los puntos temporales indicados, analizados por la prueba de t de Student de dos colas. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Las **Fig. 8A-8F** muestran que las aNPC marcadas con GFP se encuentran en el parénquima de la médula espinal después del tratamiento doble con la inmunización de MOG y el trasplante de aNPC. Tinción inmunohistoquímica de secciones de parafina longitudinales de la médula espinal extirpada 7 o 60 días después

del trasplante de aNPC a los ventrículos laterales. Se tiñeron las secciones con anticuerpo anti-GFP y se contratiñeron con Hoechst para detectar los núcleos. Luego se rastrearon por microscopía de fluorescencia para detectar la presencia de células GFP⁺. Se muestran micrografías representativas de células inmunomarcadas con GFP en zonas adyacentes al sitio de la lesión 7 días después del trasplante (8A-8F) y 60 días después del trasplante de aNPC (8A-8F).

Las **Fig. 9A-9F** muestran el análisis histológico de la médula espinal de ratones C57B1/6J lesionados después del tratamiento doble con la inmunización MOG/CFA y el trasplante de aNPC. Las médulas se extirparon 1 semana después del trasplante celular. Se sometieron ratones C57B1/6J con LME (n = 3-4 en cada grupo) a LME (2 N durante 1 s) y se inmunizaron el día de la LME con péptido MOG emulsionado en CFA que contenía *Mycobacterium tuberculosis* al 1 %. Una semana después de la LME, se trasplantaron aNPC o se inyectó PBS en los ventrículos laterales de ratones inmunizados con MOG-CFA. (9 A, 9B), La tinción con GFAP de secciones longitudinales de médula espinal lesionada muestra superficies significativamente más pequeñas de tejido de cicatriz tras el tratamiento con MOG-CFA/aNPC que en cualquiera del resto de los grupos. (9A) Se muestran micrografías representativas de la médula espinal de ratones tratados con MOG-CFA/aNPC, MOG-CFA/PBS, PBS-CFA/aNPC o PBS-CFA/PBS. (9B) Cuantificación de la zona demarcada por tinción con GFAP (*P < 0,05, **P < 0,01, P*** < 0,001, prueba t de Student de dos colas; n = 4 cortes analizados de cada ratón). (9C, 9D) Las secciones de parafina longitudinales de médula espinal extirpada y teñida con IB4 7 días después del trasplante de células y 14 días después de la LME contusa muestran significativamente menos tinción en los ratones tratados con MOG-CFA/aNPC que en cualquiera del resto de grupos. (9D) Cuantificación de la superficie ocupada por tinción con IB4 (*P < 0,05, **P < 0,01, P*** < 0,001, prueba t de Student de dos colas). (9E, 9F) Tinción con anticuerpo anti-CD3 para identificar linfocitos T infiltrantes en el sitio de la lesión. (9E) Micrografías representativas de la médula espinal de ratones tratados con MOG-CFA/aNPC, MOG-CFA/PBS, PBS-CFA/aNPC o PBS-CFA/PBS. El recuento manual de las células en cuatro cortes de cada ratón, obtenidos de cuatro zonas que rodean el sitio de la lesión reveló significativamente más células CD3⁺ en el grupo tratado con MOG-CFA/aNPC que en cualquiera del resto de los grupos (*P < 0,05, **P < 0,01, P*** < 0,001, prueba t de Student de dos colas).

Las **Fig. 10A-10D** muestran el análisis histológico de BDNF y la expresión de nogina en médulas espinales de ratones C57B1/6J lesionados después del tratamiento doble con la inmunización con MOG/CFA y el trasplante de aNPC. Los ratones C57B1/6J se sometieron a LME (n = 3-4 en cada grupo) y se inmunizaron con pMOG 35-55 emulsionado en CFA (*Mycobacterium tuberculosis* al 1 %) el día de la LME. Una semana después de la lesión, los ventrículos laterales de ratones inmunizados con MOG-CFA se trasplantaron con aNPC o se inyectaron con PBS. Se tiñeron secciones longitudinales de médula espinal extirpada 7 días después del trasplante de las células y 14 días después de la LME (n = 3-4 en cada grupo) con BDNF. (10A) Cuantificación de la zona manchada con BDNF (*P < 0,05, **P < 0,01, P*** < 0,001, prueba t de Student de dos colas). La tinción con BDNF es significativamente más intensa en los ratones tratados con MOG-CFA/aNPC que en cualquiera de los otros grupos. (10B) La tinción doble con BDNF e IB4 muestra que la microglía/los macrófagos IB4⁺ son una fuente importante de BDNF. (10C) Se encontró una tinción significativamente más intensa de nogina en los ratones tratados con MOG-CFA/aNPC que en cualquiera de los otros grupos. (10D) Cuantificación de la zona teñida con nogina (*P < 0,05, **P < 0,01, P*** < 0,001, prueba t de Student de dos colas). La doble tinción para la nogina e IB4 muestra que las células microgliales IB4⁺ son una fuente importante de nogina.

Las **Fig. 11A-11E** muestran el aumento de la doble tinción con BrdU/DCX en las proximidades del sitio de la lesión después del tratamiento doble con la inmunización y el trasplante de aNPC. LME y trasplante de aNPC como en la Fig. 7. Una semana después, los ratones con trasplante de aNPC recibieron la inyección dos veces al día durante 3 días de BrdU. Se tiñeron secciones longitudinales de médula espinal extirpadas 14 días después del trasplante de células y 28 días después de la lesión contusa (n = 3-4 en cada grupo) con BrdU y DCX. Se encontraron significativamente más células BrdU⁺/DCX⁺ en ratones tratados con MOG-CFA/aNPC que en cualquiera de los otros grupos.

Las **Fig. 12A-12F** muestran que los linfocitos T inducen la diferenciación neuronal de aNPC *in vitro*. (Fig. 12A) Cuantificación de células β -III-tubulina⁺ (expresada como un porcentaje de células DAPI) después de 5 días en cultivo solo (control) o en cultivo conjunto con linfocitos T CD4⁺ previamente activados, o con linfocitos T CD4⁺ en reposo (**P < 0,01, P*** < 0,001; ANOVA). (Fig. 12B) Imágenes representativas que muestran la expresión de β -III-tubulina en aNPC después de 5 días de cultivo solo (control) o en cultivo conjunto con linfocitos T CD4⁺ previamente activados. (Fig. 12C) Cuantificación de células β -III-tubulina⁺ (expresada como un porcentaje de células DAPI) después de 5 días en cultivo de aNPC en presencia de medio acondicionado por linfocitos T activados. (Fig. 12D) Imágenes representativas que muestran fibras marcadas con β -III-tubulina ramificadas, en alargamiento. (Fig. 12E) Cuantificación de células β -III-tubulina⁺ en aNPC después de 5 días en cultivo con diferentes concentraciones de IFN- γ o IL-4 (***P < 0,001; ANOVA). (Fig. 12F). RT-PCR cuantitativa que muestra una reducción de cinco veces en la expresión de Hes-5 en células aNPC cultivadas con medio acondicionado durante 24 h por linfocitos T CD4⁺ activados.

Las **Fig. 13A-13C** muestran que las células aNPC inhiben la proliferación de los linfocitos T y modulan la producción de citocinas. (Fig. 13A) Se ensayó la proliferación 96 h después de la activación mediante la incorporación de [³H]-timidina en linfocitos T CD4⁺ cultivados conjuntamente con aNPC. Los valores registrados son de uno de los tres experimentos representativos, y se expresan como las medias $\pm$ DE de cuatro repeticiones. (Fig. 13B) Proliferación de linfocitos T CD4⁺ cultivados solos o en presencia de aNPC (cultivo conjunto) o con aNPC en la cámara superior de un transpocillo. (Fig. 13C) Concentraciones de citocinas (pg/ml)

en el medio de crecimiento 72 h después de la activación de linfocitos T CD4⁺ solos o en cultivo conjunto con aNPC.

Las **Fig. 14A-14C** muestran que la vacunación con acetato de glatiramero (GA) contrarresta la pérdida cognitiva en el modelo de ratón APP/PS1 Tg de la enfermedad de Alzheimer (EA). Se ensayó la actividad cognitiva dependiente del hipocampo en el MWM. (Fig. 14A-14C) Los ratones Tg vacunados con GA (*diamante*; n = 6) mostraron una capacidad de aprendizaje/memoria significativamente mejor que los ratones Tg sin tratamiento (*cuadrado*; n = 7) durante las fases de adquisición y de inversión, pero no en la fase de extinción del ensayo. Los ratones Tg no tratados mostraron deficiencias constantes y de larga duración en las tareas de memoria espacial. Por el contrario, el rendimiento de la prueba MWM por los ratones Tg vacunados con GA fue bastante similar, como media, a la de sus compañeros de camada no Tg preinmune de la misma edad (*triángulo*; n = 6) (ANOVA de 3 vías, medidas repetidas: grupos, df (2,16), $\bar{F}$ = 22,3, P < 0,0002; ensayos, df (3,48), F = 67,9, P < 0,0001; días, df (3,48), F = 3,1, P < 0,035, para la fase de adquisición, y grupos, df (2,16), F = 14,9, P < 0,0003; ensayos, df (3,48), F = 21,7, P < 0,0001; días, df (1,16), F = 16,9, P < 0,0008, para la fase de inversión).

Las **Fig. 15A-15J** muestran que la vacunación basada en linfocitos T con GA conduce a una reducción del β -amiloide (A β) y contrarresta la pérdida neuronal del hipocampo en el cerebro de ratones Tg: papel clave de la microglía. (Fig. 15A) Imágenes microscópicas confocales representativas de cortes de hipocampo del cerebro de compañeros de camada no Tg, Tg sin tratar y Tg vacunados con GA teñidos con NeuN (neuronas maduras) y A β humano. El ratón no Tg no muestra tinción para A β humano. El ratón Tg sin tratamiento muestra una abundancia de placas A β extracelulares, mientras que, en el ratón Tg vacunado con GA, la inmunorreactividad con A β es baja. Se observa una tinción débil con NeuN⁺ en las regiones CA1 y del GD del hipocampo del ratón Tg sin tratar con respecto a su compañero de camada no Tg, mientras que la tinción con NeuN⁺ en el ratón Tg vacunado con GA es casi normal. (Fig. 15B) Tinción para la microglía activada usando anticuerpos anti-CD11b. Las imágenes muy y poco aumentadas muestran una alta incidencia de células inmunoteñidas doblemente para A β y CD11b en las regiones CA1 y del GD del hipocampo de un ratón Tg sin tratamiento, pero solo una pequeña presencia de microglía CD11b⁺ en el ratón Tg vacunado con GA. Las flechas indican las zonas muy aumentadas, que se muestran abajo. (Fig. 15C) Microglía CD11b⁺, asociada con una placa A β , que expresa altos niveles de TNF- α en un ratón Tg sin tratamiento. (Fig. 15D) La tinción para MHC-II (un marcador de la presentación de antígenos) en una criosección tomada de un ratón Tg vacunado con GA en una zona que se tiñe positivamente para A β muestra una alta incidencia de microglía MHC-II⁺ y casi nada de microglía TNF- α ⁺. (Fig. 15E) La microglía MHC-II⁺ en el ratón vacunado con GA expresa conjuntamente IGF-I. (Fig. 15F) Se observan linfocitos T CD3⁺ en las proximidades de la microglía MHC-II⁺ asociada con la inmunorreactividad de A β . La zona del recuadro muestra una alta amplificación de una sinapsis inmunológica entre un linfocito T (CD3⁺) y una célula microglial que expresa MHC-II. (Fig. 15G) Histograma que muestra el número total de placas A β (en un corte de hipocampo de 30 μ m). (Fig. 15H) Histograma que muestra las células inmunorreactivas con A β teñidas totales. Cabe señalar las diferencias significativas entre los ratones Tg vacunados con GA y los no tratados, y verifica la disminución de la presencia de placas A β en los ratones Tg vacunados. (Fig. 15I) Histograma que muestra una reducción notable de las células teñidas con CD11b, indicativa de la microglía activada y la inflamación, en los ratones Tg vacunados con GA en relación con los ratones Tg no tratados. Cabe señalar el aumento de la microglía CD11b⁺ con la edad en los compañeros de camada no Tg. (Fig. 15J) Histograma que muestra el aumento de la tasa de supervivencia de las neuronas NeuN⁺ del GD de los ratones Tg vacunados con GA en relación con ratones Tg no tratados. Las barras de error indican la media $\pm$ ETM. Los asteriscos sobre las barras expresan la relevancia de las diferencias en la inmunotinción (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; prueba t de Student de dos colas). Nota, todos los ratones en este estudio se incluyeron en el análisis (6-8 secciones por ratón).

Las **Fig. 16A-16E** muestran el aumento de la renovación celular inducido por la vacunación a base de linfocitos T con acetato de glatiramero (GA) en el hipocampo de ratones Tg adultos. Tres semanas después de la primera vacunación con GA, los ratones de cada grupo experimental fueron inyectados i.p. con BrdU dos veces al día durante 2,5 días. Tres semanas después de la última inyección, se extirparon los cerebros y se analizaron los hipocampus en cuanto a BrdU, DCX y NeuN. (Fig. 16A-16C) Histogramas que muestran la cuantificación de las células proliferantes (BrdU⁺) (Fig. 16A), neuronas maduras recién formadas (BrdU⁺/NeuN⁺) (Fig. 16B) y todas las neuronas prematuras (teñidas con DCX⁺) (Fig. 16C). Se calcularon los números de células BrdU⁺, BrdU⁺/NeuN⁺ y DCX⁺ por GD, a partir de seis secciones coronales igualmente espaciadas (30 μ m) de ambos lados de los cerebros de todos los ratones ensayados en este estudio. Las barras de error representan las medias $\pm$ ETM. Los asteriscos encima de las barras denotan la relevancia de las diferencias relativas con los compañeros de camada no Tg (** P < 0,01; *** P < 0,001; Prueba de t de Student de dos colas). Las líneas horizontales con los valores de P por encima de los mismos muestran diferencias entre los grupos indicados (ANOVA). (Fig. 16D) Imágenes microscópicas confocales representativas del GD que muestra inmunotinción para BrdU/DCX/NeuN en un ratón Tg vacunado con GA y en un compañero de camada no Tg con respecto a las de un ratón Tg sin tratamiento. (Fig. 16E) Se encuentran células DCX⁺ ramificadas cerca de la microglía MHC-II⁺ situada en la zona subgranular del GD del hipocampo de un ratón Tg vacunado con GA.

Las **Fig. 17A-17D** muestran que la IL-4 puede contrarrestar el efecto adverso del A β agregado en la toxicidad microglial y la promoción de la neurogénesis. (Fig. 17A) Paradigma de tratamiento *in vitro*. (Fig. 17B) Imágenes confocales representativas de NPC que expresan GFP y β -III-tubulina, cultivadas conjuntamente durante 10 días sin microglía (control) o con microglía sin tratar, o con microglía previamente activada con un A β ₍₁₋₄₀₎ (5 μ M) (MG_(A β -40)) durante 48 h y posteriormente activada con IFN- γ (10 ng/ml) (MG_{(A β 1-40)/IFN- γ , 10 ng/ml)) o con IL-4 (10 ng/ml) (MG_{(A β 1-40)/IL-4)), o tanto con IFN- γ (10 ng/ml) como con IL-4 (10 ng/ml) MG_{(A β 1-40)/IFN- γ + IL-4)). Cabe señalar}}}

que el A β agregado induce a la microglía a adoptar una morfología de tipo ameboide, pero que tras añadir IL-4, esta microglía muestra una estructura de tipo ramificado. (Fig. 17C) Imágenes confocales separadas de NPC que expresan conjuntamente GFP y β -III-tubulina adyacentes a la microglía CD11b⁺. (Fig. 17D) Cuantificación de las células marcadas doblemente con GFP y β -III-tubulina (expresada como un porcentaje de células GFP⁺) obtenida a partir de imágenes confocales. Los resultados son de tres experimentos independientes en cultivos repetidos; las barras representan las medias $\pm$ ETM. Los asteriscos encima de las barras denotan la relevancia de las diferencias con respecto a las células NPC no tratadas (control) (* P < 0,05; *** P < 0,001; prueba t de Student de dos colas). Las líneas horizontales con los valores de P por encima de los mismos muestran diferencias entre los grupos indicados (ANOVA).

La **Fig. 18** muestra el efecto de la administración de células madre en combinación con acetato de glatiramer a un modelo de ratones de esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Las **Fig. 19A-19B** muestran manifestaciones clínicas de la EAE inducida por el péptido MOG 35-55. (Fig. 19A) en ratones C57BL/6 y YFP2.2. (Fig. 19B) El efecto del tratamiento con GA en ratones C57BL/6 tratados con 5-8 inyecciones diarias de GA en las diferentes etapas de la enfermedad, es decir, comenzando inmediatamente después de la inducción de la enfermedad-tratamiento de prevención; comenzando después de la aparición de las manifestaciones de la enfermedad el día 20-tratamiento de supresión; o durante la fase crónica 6 semanas después de la aparición de la enfermedad-supresión retrasada. El período de inyección de cada tratamiento se ilustra a lo largo del eje X (n = 6).

Las **Fig. 20A-20E** muestran las manifestaciones histológicas de la EAE inducida por péptido MOG 35-55. (Fig. 20A-20D) El efecto del tratamiento con GA en secciones cerebrales sagitales de ratones YFP2.2 que expresan YFP (verde) sobre su población neuronal: (Fig. 20A) Deterioro y transacción de fibras que expresan YFP en el cerebelo y correlación con la infiltración perivascular. Las inserciones indican la zona con infiltraciones perivasculares, demostradas por la tinción con anticuerpos para el marcador de linfocitos T -CD3. (Fig. 20B) Eliminación de las fibras de las lesiones del cuerpo estriado. (Fig. 20C) Morfología típica de células piramidales de la capa 5 de la corteza cerebral. Las flechas y la inserción indican cuerpos celulares neuronales anómalos con núcleos marginados en ratones con EAE. Se encontraron considerablemente menos daños en el cerebro de ratones con EAE + GA que en los cerebros de los ratones con EAE no tratados, es decir, menos fibras en deterioro, número reducido de lesiones con menor magnitud y núcleos celulares menos hinchados. Cabe señalar la capa delgada de fibra positiva en YFP, que se encuentra con frecuencia en las lesiones de ratones tratados con GA. (Fig. 20D) Tinción con fluoro-Jade B (verde), que se une a las neuronas en degeneración, de la corteza de ratones C57BL/6, 25 días después de la inducción de la enfermedad. La barra de escala indica: 500 μ m en (Fig. 20A), 50 μ m en (Fig. 20b, 20C) y 20 μ m en (Fig. 20E) L-2, L-5 y L-6, la capa dos, cinco y seis de la corteza cerebral.

Las **Fig. 21A-21B** muestran la activación microglial en ratones YFP2.2 con EAE. (Fig. 21A) Correlación de la expresión del marcador MAC-1 (rojo) de la microglía y macrófagos con el deterioro y la lesión de fibra que expresa YFP (verde) en la materia blanca del cerebelo. En el recuadro I, se observan células microgliales altamente activadas, acompañadas de una reducción en la densidad de las fibras, mientras que, en la zona cercana del recuadro II, hay una baja expresión de MAC-1 y un aspecto normal de las fibras. (Fig. 21B) Efecto de GA sobre la expresión de MAC-1 y sobre la morfología de las células microgliales en diversas regiones del cerebro de ratones con EAE: cuerpo estriado, tálamo (núcleo geniculado lateral dorsal) e hipocampo (capas granulares y moleculares). Se presentó el aumento de la tinción de MAC-1 y una morfología celular típica de la microglía activada en los cerebros de ratones con EAE (inserciones). Por el contrario, la expresión de MAC-1 en los cerebros de ratones con EAE + GA se redujo ampliamente, presentando una morfología celular similar a la de la microglía desactivada de ratones preinmunes. Se indujo la EAE en ratones YFP2.2 35 días antes de la perfusión. Se aplicó el tratamiento con GA mediante 8 inyecciones diarias, comenzando inmediatamente después de la inducción de la EAE. Secciones sagitales. La barra de escala indica: (Fig. 21A) 500 μ m, (Fig. 21B) 100 μ m en el cuerpo estriado y el tálamo, 50 μ m en el hipocampo.

Las **Fig. 22A-22E** muestran la proliferación de neuronas recién generadas visualizadas mediante la inmunotinción para el marcador de la proliferación BrdU (rojo) y el marcador neuronal inmaduro DCX (verde) en las zonas neuroproliferativas de ratones C57BL/6. Aumento de la expresión de BrdU y DCX en ratones con EAE y, en mayor medida, en ratones con EAE + GA, (Fig. 22A) en la ZSV, imágenes confocales y (Fig. 22C) en la ZSG del hipocampo, 25 días después de la inducción de EAE, 1 día después de la última inyección de GA. Cabe destacar las células DCX⁺ del hipocampo que emigraron hacia la CCG y formaron un árbol dendrítico denso y ramificado. (Fig. 22B) Expresión de DCX en la ZSV en diferentes puntos temporales: 1 día (I), 10 (II) y 30 (III) días después de la última inyección de GA. La neuroproliferación se redujo con el tiempo, aunque la expresión de DCX en los ratones tratados con GA fue superior a la de los ratones con EAE 1 y 10 días después del tratamiento. Secciones coronales. La barra de escala indica: 50 μ m en (Fig. 22A), 200 μ m en (Fig. 22B) y (Fig. 22C), y 20 μ m en los paneles de la derecha de (Fig. 22C). st, cuerpo estriado; VL, ventrículo lateral; ZSG, zona subgranular; CCG, capa de células granular; CMI, CME, capa molecular interna y externa. (Fig. 22D) Análisis cuantitativo de la incorporación de BrdU y la expresión de DCX en ratones con EAE (rojo) y EAE + GA (azul), en varios puntos temporales después de la inducción de la EAE y el tratamiento con GA. Se observa un aumento de la proliferación neuronal en ambas zonas neuroproliferativas tras la aparición de la enfermedad; tras el declive por debajo del de los ratones preinmunes y el aumento de la neuroproliferación mediante las diversas pautas de tratamiento con GA. La cuantificación se realizó en la ZSV contando las células positivas en BrdU, (aquellas con doble tinción de BrdU/DCX), y midiendo la superficie teñida con DCX, comenzando en el nivel del septo medial y

640 μm hacia atrás, y en el GD del hipocampo, contando las células $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+$ (en ambas hojas) y células DCX^+ (en la hoja superior del dentado), a través de su eje septo-temporal. Se promedió el número de células teñidas con BrdU/DCX para cada estructura cerebral a partir de 8 niveles unilaterales por ratón, a 80 μm de distancia, 3-4 ratones por grupo de tratamiento. Los resultados se expresan como las veces de cambio con respecto a los controles preinmunes. Los valores de control para la incorporación de BrdU : en la ZSV, 211 ± 31 y 23 ± 6 , en el hipocampo, 45 ± 13 y 17 ± 8 , células BrdU/DCX^+ , un día y un mes después de la última inyección de BrdU , respectivamente; para la tinción con DCX : en la ZSV, $19.464 \pm 3.550 \mu\text{m}^2$ y en el hipocampo, $78 \pm 12 \mu\text{m}^2$ células positivas medias de 10 ratones preinmunes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de LSD de Fisher cuando fue apropiado. * Efecto significativo sobre el control preinmune; # efecto significativo sobre los ratones con EAE no tratados, ($p < 0,05$). (Fig. 22E) Programa de experimentos: Duración desde la inducción de la EAE (día 0) hasta la perfusión; Inyecciones de GA como tratamiento de prevención (P), de supresión (S) o de supresión retardada (SR), e inoculación de BrdU -simultánea o inmediatamente después del tratamiento con GA.

Las Fig. 23A-23H muestran la movilización y la migración potenciadas de las células progenitoras neuronales en ratones con EAE tratados con GA a través de corrientes migratorias. (Fig. 23A) Representación sagital esquemática de las rutas migratorias desde la zona subventricular (ZSV) a través tanto de la corriente migratoria rostral (CMR-en rojo) como de la corriente cortical lateral (CCL-en amarillo). (Fig. 23B) Sección sagital a través de la CMR que muestra la ruta de las células positivas en DCX (rojo) desde la ZSV al BO. (Fig. 23C) Neuroprogenitores en la CCL, generalmente funcionales en el cerebro anterior embrionario y que reaparecen después del tratamiento con GA en ratones adultos con EAE. Las células positivas en DCX (rojo) migran junto con las fibras que expresan YFP (verde) de la superficie de contacto entre el hipocampo y el cuerpo calloso hacia diversas regiones corticales principalmente de la corteza occipital. (Fig. 23D-23E) Aumento de la movilización de las neuronas recién generadas visualizadas por inmunotinción de BrdU (naranja) y DCX (verde), en la CMR de ratones con EAE + GA, en comparación con ratones con EAE y controles preinmunes, en el segmento de CMR adyacente a la ZSV (Fig. 23D) y en una sección más medial del arco de CMR (Fig. 23E). Secciones sagitales. La barra de escala indica: 1.000 μm en (Fig. 23B), 25 en (Fig. 23C), 500 en (Fig. 23D), 50 μm en (Fig. 23E). VL, ventrículo lateral; Ctx, corteza; st, cuerpo estriado; BO, bulbo olfatorio; CA, comisura anterior; cc, cuerpo calloso; Hip, hipocampo; L-5 y L-6, capa cinco y seis de la corteza cerebral. (Fig. 23F-23H), Análisis cuantitativo de BrdU (que expresa conjuntamente DCX) o DCX en la CMR, un día (Fig. 23F, 23G) y un mes (Fig. 23H) después de la finalización de las inyecciones de BrdU y GA, lo que indica un aumento significativo de células neuroprogenitoras en la CMR de ratones con EAE frente al control y una mayor elevación en ratones con EAE + GA. Cabe señalar que, en un ratón con EAE que presentaba enfermedad leve a corto plazo y recuperación espontánea (EAE-rec, Fig. 23H), se observó una mayor migración neuronal. La cuantificación se realizó contando las células $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+$ y midiendo la superficie teñida con DCX (en $0,2 \text{ mm}^2$), a lo largo del borde estriado. Se promedió la cantidad de células teñidas con BrdU/DCX de 8 secciones por ratón, a 80 μm de separación. Se contaron tres ratones por grupo de tratamiento, a excepción del grupo de EAE-rec, que muestra un solo ratón. Los resultados se expresan como las veces de cambio frente a los controles preinmunes. Los valores de control para la incorporación de BrdU : 146 ± 31 células $\text{BrdU}^+/\text{DCX}^+$, un día después de la última inyección de BrdU , y para la tinción con DCX : $2.193 \pm 305 \mu\text{m}^2$, un promedio de 6 ratones preinmunes. * $p < 0,05$ frente al control preinmune. Los ratones con EAE de (Fig. 23B, 23C, 23H) se trataron con GA tras la inducción de la enfermedad, un mes antes de la perfusión-prevención, en (Fig. 23D, 23E y 23F, 23G), los ratones inducidos con EAE recibieron BrdU y GA por inyección 20 días después de la inducción de la enfermedad, 1-5 días antes de la perfusión-supresión.

Las Fig. 24A-24F muestran la migración de células progenitoras neuronales en ratones inducidos con EAE tratados con GA. Las células progenitoras neuronales que expresan DCX (naranja) divergen de las zonas neuroproliferativas clásicas o las corrientes migratorias y se extienden a regiones atípicas a lo largo de las fibras que expresan YFP (verde). (Fig. 24A) Desde la CMR hacia el interior del cuerpo estriado. (Fig. 24B, 24C) Hacia la región del núcleo accumbens, desde la ZSV (Fig. 24B) y desde la CMR (Fig. 24C). (Fig. 24D) Desde la CMR hacia la parte interior de la corteza a (Fig. 24E), la capa 5, y (Fig. 24F), la capa 6. Cabe destacar las características morfológicas de las células que expresan DCX -somata fusiforme con procesos iniciales y finales (inserción de Fig. 24C y Fig. 24E, 24F), característicos de las neuronas que migran, y su orientación-la migración de la corriente migratoria, a lo largo de las fibras nerviosas (Fig. 24A 24D-24F). Secciones sagitales. La barra de escala indica: 200 μm en Fig. 24A-24D, 100 μm en Fig. 24E y 10 μm en Fig. 24F. En las Fig. 24A-24C, se representa la superficie del recuadro ampliado en el panel de la derecha. CMR, corriente migratoria rostral; ZSV, zona subventricular; st, cuerpo estriado; CA, comisura anterior; cc, cuerpo calloso; L-5 y L-6, capa cinco y seis de la corteza cerebral.

Las Fig. 25A-25K muestran el seguimiento del destino de las células progenitoras neuronales generadas durante el tratamiento con GA en ratones con EAE. Las células con BrdU (rojo), nacidas durante las inyecciones concurrentes de BrdU y GA, emigraron a diferentes regiones del cerebro y expresaron marcadores neuronales. (Fig. 25A, 25B) Células positivas en BrdU que expresan conjuntamente el marcador neuronal inmaduro DCX (verde), 10 días después de la última inyección, en el cuerpo estriado (Fig. 25A), y en el núcleo accumbens (Fig. 25B). Cabe destacar las agrupaciones de células doble positivas que sugieren divisiones locales. (Fig. 25C) Tinción de células que expresan DCX en el núcleo accumbens con el marcador de la proliferación endógena fosfohistona (azul), que muestran células positivas en DCX que habían proliferado *in situ* antes del sacrificio del ratón. (Fig. 25D-25G) Células positivas en BrdU que expresan conjuntamente el marcador neuronal maduro NeuN (verde), un mes después de finalizarse las inyecciones de GA/ BrdU , en el cuerpo estriado (Fig. 25D, 25F),

en el núcleo accumbens (Fig. 25E), y en la imagen confocal de la capa 5 de la corteza cingulada (Fig. 25G). Las flechas indican las células que expresan conjuntamente BrdU y NeuN representativas. (Fig. 25H, 25K) Células positivas en BrdU, un mes después de la inyección de GA/BrdU en ratones YFP, que expresan conjuntamente YFP (verde) en la capa 5 cingulada (Fig. 25H, 25I), la capa 6 occipital (Fig. 25J) y la capa 5 motora (Fig. 25K) de la corteza. Células piramidales con dendritas y axones apicales alargados característicos, que indican que es posible observar neuronas funcionales maduras. La Fig. 25G y Fig. 25K son imágenes confocales. Secciones sagitales. La barra de escala indica: 200 μ m en (Fig. 25A, 25B, 25H), 100 μ m en Fig. 25C, 25D, 50 μ m en Fig. 25E, 25I-25K, 15 μ m en Fig. 25F, 25G.

Las **Fig. 26A-26F** muestran la migración de células progenitoras neuronales a los sitios de lesión. Se encontraron células que expresaban DCX (naranja) en las regiones lesionadas con deterioro de fibras que expresan YFP (verde). (Fig. 26A), En ratones con EAE (no tratados con GA), 35 días después de la inducción de la enfermedad, en el cuerpo estriado. (Fig. 26B-26F). En ratones con EAE, 35 días después de la inducción de la enfermedad, tratados con GA (8 inyecciones diarias, comenzando inmediatamente después de la inducción de la enfermedad-prevención). Células que expresan DCX que divergen de la CMR hacia una lesión en el cuerpo estriado (Fig. 26B), que rodean una lesión en el cuerpo estriado (Fig. 26C), en el interior de una lesión en la capa 5/6 de la corteza frontal (Fig. 26D, 26E) y en una agrupación que rodea una lesión en el núcleo accumbens (Fig. 26F). Las lesiones de los ratones tratados con GA resultaron ser menos extensas que en los ratones no tratados. Sin embargo, la cantidad de células progenitoras contiguas a estas lesiones resultó ser ampliamente superior. Cabe destacar las fibras que expresan YFP que se extienden dentro de las lesiones y el brote axonal de las lesiones ocupadas por células que expresan DCX (Fig. 26D-26F). Secciones sagitales. La barra de escala indica: 100 μ m en Fig. 26A, 26B, 50 μ m en Fig. 26C, 26D, 26F, y 20 μ m en la Fig. 26E.

Las **Fig. 27A-27F** muestran que las células progenitoras neuronales inducidas con GA migran a las zonas de cicatriz gliótica y expresan BDNF *in situ*. Fig. 27A-27C, Células que expresan DCX (verde), en las regiones pobladas con astrocitos que expresan GFAP (rojo), en el cuerpo estriado. Fig. 27D-27F, las células que expresan DCX (verde) manifiestan una amplia expresión de BDNF (naranja) en el núcleo accumbens (Fig. 27D, 27E) y el giro dentado del hipocampo (Fig. 27F). Secciones coronales. La barra de escala indica: 100 μ m en Fig. 27A-27C, 50 μ m en Fig. 27D, 12 μ m en Fig. 27E y 30 μ m en Fig. 27F.

Descripción detallada de la invención

Al tratar de dilucidar el efecto de la inducción de la EAE sobre la neurogénesis y la diferenciación hacia el linaje neuronal, y para investigar si el tratamiento inmunomodulador periférico con la inyección de GA en diversas etapas de la enfermedad tiene algún efecto sobre la neurogénesis y los procedimientos neuroprotectores, algunos de los inventores encontraron que, en ratones con EAE, la neuroproliferación se elevó tras la aparición de la enfermedad, pero que posteriormente se redujo por debajo de la de los ratones preinmunes. Por el contrario, el tratamiento con GA condujo a una reducción sostenida del daño neuronal/axonal, y al aumento de la proliferación y la movilización de las células neuroprogenitoras. Las células neuroprogenitoras recién nacidas manifestaron una migración masiva a través de vías de migración de excitación e inactivas, a los sitios lesionados de las regiones del cerebro que normalmente no sufren neurogénesis, y se diferenciaron en fenotipo neuronal maduro, endosando un enlace directo entre la inmunomodulación, la neurogénesis y la consecuencia terapéutica en el SNC.

La investigación en la última década ha desvelado que el cerebro es potencialmente capaz de realizar la renovación celular durante toda la vida, aunque sea de forma limitada (Morshead *et al.*, 1994). Sin embargo, no se conocen los mecanismos que podrían restringir o favorecer la renovación de las células neuronales adultas. Estudios recientes de laboratorio de los presentes inventores han demostrado que después de una lesión en el SNC, una respuesta inmune local que se controle adecuadamente en el tiempo, el espacio y la intensidad de la inmunidad adaptativa periférica es un requisito fundamental para la supervivencia neuronal postraumática (Moalem *et al.*, 1999; Butovsky *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2003; Shaked *et al.*, 2004). Por lo tanto, los presentes inventores prevén la posibilidad de que la falta de la neurogénesis y la recuperación restringida se podrían atribuir a un factor común, que, a su vez, puede estar relacionado con la respuesta inmune local.

La presente invención se basa en la suposición de algunos de los inventores de que se necesita una inmunidad adaptativa bien regulada para la renovación celular en el cerebro. Así pues, se postula que la neurogénesis y la oligodendrogénesis son inducidas y respaldadas por las células microgliales que encuentran citocinas asociadas con la inmunidad adaptativa, pero no están respaldadas por las células microgliales preinmunes y son bloqueadas por las células microgliales que se encuentran con endotoxinas.

De hecho, en el presente documento, se muestra que ciertas células microgliales activadas específicamente pueden inducir y apoyar la renovación celular neuronal. Así pues, se indujeron y mantuvieron tanto la neurogénesis como la oligodendrogénesis en células NPC cultivadas conjuntamente con células microgliales activadas por las citocinas IL-4 e IFN- γ , ambas asociadas con la inmunidad adaptativa. Por el contrario, las células microgliales expuestas a LPS bloquearon tanto la neurogénesis como la oligodendrogénesis, en consonancia con los informes anteriores de que MG_(LPS) bloquean la renovación celular (Monje *et al.*, 2003).

Los mecanismos de defensa en forma de células microgliales activadas a menudo se observan en condiciones neurodegenerativas agudas y crónicas, y el SNC está mal preparado para tolerarlas (Dijkstra *et al.*, 1992). Como resultado de ello, las células microgliales activadas se han considerado, en general, como una población de células

uniformemente hostiles que provoca inflamación, interfiere en la supervivencia celular (Popovich *et al.*, 2002) y bloquea la renovación celular (Monje *et al.*, 2002, 2003).

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el tipo de activación determina la actividad microglial, y que al igual que sus efectos pueden ser hostiles para la supervivencia celular en algunas circunstancias, en otros casos, pueden ser protectores. Así pues, por ejemplo, las células microgliales que encontraron inmunidad adaptativa (linfocitos T CD4⁺), demostraron adquirir un fenotipo de protección (Butovsky *et al.*, 2001). Entre las citocinas que son producidas por dichos linfocitos T y que pueden dotar a las células microgliales de un fenotipo neuroprotector están IFN- γ e IL-4, característicos de los linfocitos Th1 y Th2, respectivamente. Por lo tanto, las células microgliales expuestas a linfocitos Th1 activados o a IFN- γ muestran una mayor captación del glutamato, un participante clave en los trastornos neurodegenerativos (Shaked *et al.*, observación no publicada), mientras que su exposición a IL-4 produce la regulación negativa de TNF- α , un participante común en el fenotipo microglial destructor, y regulación positiva del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) (que se muestra en los ejemplos del presente documento), que potencia la diferenciación de los oligodendrocitos a partir de células progenitoras neuronales adultas multipotentes (Hsieh *et al.*, 2004). Además, IGF-1 evita el efecto destructor agudo de la toxicidad mediada por el glutamato en los oligodendrocitos *in vitro* (Ness *et al.*, 2002) e inhibe la apoptosis de los oligodendrocitos maduros durante la desmielinización primaria (Mason *et al.*, 2000). Estos y otros hallazgos sugieren con fuerza que el resultado de la respuesta inmune local (en términos de su efecto sobre las células microgliales) en el SNC dañado será beneficioso o perjudicial, dependiendo de cómo interprete la amenaza la células microgliales.

En general, la reparación de tejidos es un proceso que está bien sincronizado en el tiempo y en el espacio, y en el que se necesita la actividad inmune para limpiar el sitio de la lesión y crear las condiciones para la migración, la proliferación y la diferenciación de las células progenitoras para la renovación. A la luz del hecho bien conocido de que la renovación celular constitutiva es limitada en el SNC, así como las observaciones publicadas de que el tratamiento con MG_(LPS) provoca pérdida neuronal (Boje *et al.*, 1992) e interfiere en la búsqueda y la diferenciación de las células NPC (Monje *et al.*, 2003), y de que las células microgliales activadas adaptativamente pueden apoyar la supervivencia neuronal, no es sorprendente descubrir que las condiciones inmunológicas que favorecen la supervivencia neuronal también apoyarán la renovación celular. MG_(LPS) producen cantidades excesivas de NO (que causa el estrés oxidativo) y TNF- α , así como otros elementos citotóxicos, lo que conduce a una espiral de empeoramiento de la neurotoxicidad (Boje *et al.*, 1992). Se ha encontrado que el NO actúa como un importante regulador negativo de la proliferación celular y la neurogénesis en el cerebro adulto de los mamíferos (Packer *et al.*, 2003), y que TNF- α tiene un efecto inhibitor sobre la oligodendrogénesis (Cammer *et al.*, 1999).

Los resultados de la presente invención muestran que MG_(LPS) son de hecho perjudiciales para la supervivencia y la diferenciación de NPC, pero que cuando las células microgliales son activadas por células o citocinas que poseen función inmune adaptativa, no solo no son citotóxicas, sino que incluso ejercen un efecto positivo sobre la proliferación de las NPC, induciendo y apoyando su diferenciación en neuronas o oligodendrocitos. *In vivo*, la inyección de MG_(IL-4) en los ventrículos laterales del cerebro de rata no produjo ninguna pérdida neuronal, y generó una migración mínima de las células microgliales hacia el parénquima del SNC y la aparición de nuevas neuronas y oligodendrocitos (indicada por la doble tinción de células BrdU⁺ con marcadores de neuronas u oligodendrocitos). La tinción para las células microgliales reveló la invasión significativa del SNC sano por MG_(LPS), con la consiguiente pérdida masiva de tejido, a diferencia del caso de MG_(IL-4) o MG₍₋₎. Curiosamente, en el hipocampo no inyectado, se encontraron células microgliales residentes adyacentes a la zona subventricular. Es tentador especular que estas podrían ser las células responsables del control de la neurogénesis, restringiéndola cuando está en su estado de reposo (según lo encontrado en el presente trabajo usando MG₍₋₎), pero induciéndola y manteniéndola cuando se activa de forma adecuada.

Los presentes hallazgos son apoyados por la observación de que en ratones con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), las células NPC migran a los sitios de lesión del SNC (Pluchino *et al.*, 2003). También coinciden con la experiencia común de que la renovación celular se ve favorecida por una lesión, ya que implican que, en ausencia de lesión, no existen las condiciones que podrían favorecer la renovación.

La renovación de las células y su reposición mediante el nuevo crecimiento es el proceso común para la reparación de tejidos en la mayoría de los tejidos del organismo. Se pensaba que, en el cerebro, no se producían estos procesos, y por lo tanto, cualquier pérdida de neuronas, siendo insustituible, daba lugar a déficits funcionales que iban de leves a devastadores. Dado que una lesión en el SNC, ya sea aguda o crónica, a menudo viene seguida de la propagación posterior a la lesión del daño neuronal, se ha investigado mucho sobre la búsqueda de formas de minimizar esta degeneración secundaria rescatando tantas neuronas como sea posible.

Los resultados de la presente invención llevan a una conclusión intrigante. En primer lugar, en condiciones patológicas (cuando la renovación celular es fundamental), no solo las células microgliales no favorecen la renovación celular, sino que interfieren en la misma. En segundo lugar, esta situación paradójica se puede remediar mediante la inmunidad adaptativa bien controlada, que da forma a las células microgliales de manera que su actividad no sea citotóxica, sino que tanto proteja como conduzca a la renovación. Esto indica que, en los casos en que la autoinmunidad protectora conduce a una mejor recuperación, es probable que se produzcan tanto la neurogénesis como la gliogénesis. Estos datos también pueden explicar la falta de renovación celular en las enfermedades autoinmunes; en dichos casos, es probable que la cantidad de linfocitos T autoinmunes en circulación

supere el umbral por encima del cual la producción de $\text{TNF-}\alpha$, debida a un exceso de $\text{IFN-}\gamma$, no permite que las células microgliales adquieran un fenotipo de protección. También pueden explicar por qué los esteroides no son útiles, ya que su actividad antiinflamatoria enmascara no solo la inmunidad destructora, sino también la inmunidad adaptativa beneficiosa. Por lo tanto, la terapia de elección tanto para las enfermedades autoinmunes como para las afecciones neurodegenerativas parecería ser la inmunomodulación en la que, tras la fase aguda de la enfermedad, el tejido superviviente se puede mantener con cantidades relativamente bajas de linfocitos T.

Los hallazgos de la presente invención indican que la limitación de la neurogénesis y la oligodendrogénesis endógenas espontáneas en el cerebro adulto se producen, al menos en parte, como consecuencia de la actividad inmunitaria local, y que el aprovechamiento de la inmunidad adaptativa, en lugar de la inmunosupresión, es la ruta a elegir en el diseño de las formas de potenciar la renovación celular en el SNC.

La renovación celular en el SNC de mamíferos adultos es limitada. Estudios recientes sugieren que es detenida por la inflamación. Ese punto de vista se ve desafiado por los hallazgos de la presente invención de que las células microgliales, en función de la estimulación ambiental, pueden bien inducir y apoyar o bloquear dicha renovación. En el presente documento, se muestra que, *in vitro*, la neurogénesis y la oligodendrogénesis a partir de células progenitoras neuronales fueron potenciadas por células microgliales de ratón que encontraron citocinas asociadas a los linfocitos T ($\text{IFN-}\gamma$, IL-4), pero fueron bloqueadas por las células microgliales que encontraron endotoxina. Los anticuerpos anti-IGF-1 neutralizaron el efecto de IL-4, mientras que los anticuerpos anti- $\text{TNF-}\alpha$ aumentaron el efecto de $\text{IFN-}\gamma$. La inyección de células microgliales activadas por IL-4 en ventrículos cerebrales de ratas adultas indujo una neurogénesis significativa en el hipocampo y oligodendrogénesis cortical, mientras que las células microgliales activadas por endotoxina causaron la pérdida neuronal, y bloquearon la neurogénesis y la oligodendrogénesis. Estos resultados refuerzan la hipótesis de los presentes inventores de que la inmunidad adaptativa controlada, a diferencia de la inflamación no controlada (por ejemplo, la inducida por endotoxina), activa las células microgliales para inducir y apoyar la supervivencia y la renovación neuronal y de los oligodendrocitos. Por lo tanto, para potenciar la renovación celular en el SNC, es necesaria la inmunidad bien controlada y no debe ser suprimida.

Se ha informado que la actividad controlada de los linfocitos T dirigidos a autoantígenos en el SNC es necesaria para la supervivencia y la reparación tras una lesión (Moalem *et al.*, 1999; Yoles *et al.*, 2001; Kipnis *et al.*, 2002). Estos resultados condujeron a los presentes inventores a sospechar que un papel fundamental de los linfocitos T autoinmunes, que se sabe que están presentes en individuos sanos, es el de ayudar a mantener la integridad del SNC, y que su efecto reparador en un entorno neurodegenerativo es una manifestación de la misma función reparadora en condiciones extremas. Por otra parte, la acumulación de pruebas que acreditan la participación de dichos linfocitos T autoinmunes en la supervivencia neuronal después de la lesión condujo a postular a los presentes inventores que si tienen un papel similar en el SNC sano, bien podrían tener que ver con la neurogénesis en la vida adulta, posiblemente mediante el mantenimiento de las condiciones necesarias para dicha renovación celular.

De acuerdo con la presente invención, se examinaron cómo la naturaleza de la activación microglial afecta a la neurogénesis en el hipocampo de la rata adulta en condiciones fisiológicas y patológicas asociadas con la inflamación del cerebro. Las condiciones inflamatorias transitorias asociadas con la acumulación transitoria de linfocitos Th1 específicos de la mielina potenciaron la neurogénesis. La inyección de células microgliales (MG) activadas por $\text{IFN-}\gamma$ ($\text{MG}_{(\text{IFN-}\gamma)}$) o por IL-4 ($\text{MG}_{(\text{IL-4})}$) en los ventrículos laterales del cerebro de ratas sanas promueve la neurogénesis. En las ratas que desarrollaron EAE (transitoria) monofásica, la neurogénesis inducida fue promovida además por $\text{MG}_{(\text{IL-4})}$. Los resultados de los presentes inventores mostraron *in vitro* que $\text{MG}_{(\text{IFN-}\gamma)}$ mantuvo la neurogénesis de NPC de rata adulta, siempre y cuando la concentración de $\text{IFN-}\gamma$ fue baja. El impedimento para la neurogénesis impuesto por las altas dosis de $\text{IFN-}\gamma$ podría ser contrarrestado por la IL-4. Sin embargo, la neurogénesis inducida por la IL-4 fue más débil que la inducida por dosis bajas o por dosis altas administradas en combinación con IL-4.

En el presente documento, se han identificado los elementos celulares del SNC que pueden responder a los cambios y a las necesidades ambientales locales, y que, por tanto, pueden mantener la formación de nuevas células a partir de aNPC adultas. Se ha demostrado que, una vez que las células microgliales han sido adecuadamente activadas por citocinas derivadas de linfocitos T en circulación, pueden inducir la diferenciación neuronal y oligodendrogliol de las aNPC. En vista de dicha observación y de la demostración previa de los presentes inventores en roedores de que una vacuna a base de linfocitos T potencia la recuperación de la lesión de la médula espinal (LME) contusa, se postula que la traducción de dichos hallazgos en una metodología terapéutica podría beneficiar al proceso de reparación mediante la creación de un ambiente neurogénico/gliogénico de tipo nicho en el sitio de la lesión. Por lo tanto, se espera encontrar que la suplementación de la vacunación con el trasplante de aNPC homólogas podría potenciar aún más la recuperación funcional tras una LME. De hecho, en la presente invención, se ha demostrado, usando un modelo de ratón, la interacción sinérgica entre la activación inmune a base de linfocitos T y las aNPC trasplantadas en la promoción de la recuperación motora funcional tras una lesión contusa de la médula espinal.

Estudios previos realizados por el inventor M. Schwartz han demostrado que las manipulaciones sistémicas del sistema inmune, basadas en el aumento de los números de linfocitos T dirigidos a agonistas débiles de autoantígenos, afectan beneficiosamente a las condiciones neurodegenerativas mediante la promoción de la

supervivencia neuronal (Moalem *et al.*, 1999; Hauben *et al.*, 2001; Schwartz y Kipnis, 2002). Las mismas manipulaciones, por ejemplo, la vacunación a base de linfocitos T, se proponen en el presente documento para aumentar la neurogénesis, produciendo formas novedosas para mantener la integridad del cerebro envejecido y la mente enferma.

Por lo tanto, parece que el mantenimiento y la reparación de las células del cerebro necesitan un diálogo entre los linfocitos T autorreactivos del SNC y las células microgliales que residen en el cerebro. No obstante, dicho diálogo no puede tener lugar, a menos que las células microgliales sean capaces de actuar como células APC, presentando los antígenos relevantes a los linfocitos T buscadores. Por lo tanto, los presentes inventores postulan que, para detener la progresión de la enfermedad de Alzheimer (EA), se deben dirigir linfocitos T que reconocen antígenos específicos del SNC distintos del amiloide β ($A\beta$) agregado a sitios de placas de $A\beta$ agregadas en el cerebro. Al llegar a estos sitios, se activan por el encuentro con sus antígenos específicos, que son presentados a los mismos por células microgliales que actúan como APC. Dicha activación permite a dichos linfocitos T compensar el efecto negativo del $A\beta$ agregado en las células microgliales que residen localmente, evitando así que estas últimas se vuelvan citotóxicas para las neuronas y bloqueen la neurogénesis. Los presentes inventores han ensayado dicha hipótesis mediante la vacunación de ratones con EA con acetato de glatiramero (GA, conocido también como copolímero 1 o Cop-1), un copolímero sintético aprobado por la FDA para el tratamiento de la esclerosis múltiple, y capaz de reaccionar de forma cruzada débilmente con una amplia selección de autoantígenos que residen en el SNC (Kipnis *et al.*, 2000). Los linfocitos T activados por GA, tras infiltrarse en el SNC, tienen el potencial de activarse localmente sin riesgo de una proliferación abrumadora que es probable que cause una enfermedad autoinmune. Los estudios realizados por los presentes inventores y otros han demostrado que el GA puede simular los efectos protectores y reparadores de los linfocitos T autorreactivos (Kipnis *et al.*, 2000; Benner *et al.*, 2004).

En la presente invención, los ratones con EA doble transgénicos APP/PS1 (que expresan conjuntamente presenilina 1 humana mutada y proteína precursora de amiloide- β) que sufren un deterioro cognitivo y la acumulación de placas de $A\beta$, una vacuna a base de linfocitos T, alterando el fenotipo microglial, mejoró el rendimiento cognitivo, redujo la formación de placa, rescató neuronas corticales y del hipocampo, e indujo la neurogénesis del hipocampo.

En el presente documento, se muestra que la vacunación de ratones Tg con GA redujo la formación de placa, y evitó e incluso invirtió parcialmente el deterioro cognitivo, incluso cuando la vacunación se administró tras una cierta pérdida cognitiva y habiéndose producido ya cierta formación de placa. Cabe señalar que la vacunación con GA fue eficaz no solo en la prevención de la progresión de la enfermedad, sino también (cuando se administró después de la aparición de los síntomas clínicos de pérdida de aprendizaje/memoria y la aparición patológica de las placas) en la promoción de la reparación tisular. Los hallazgos anteriores coinciden con la observación de los presentes inventores de que en ratones deficientes en linfocitos T autorreactivos con el SNC, se deteriora la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), que se sabe que está asociada tanto con la actividad cognitiva como con la renovación celular. También coinciden con la observación de los presentes inventores de que se necesitan linfocitos T para el mantenimiento del funcionamiento cognitivo en el cerebro sano, así como en el cerebro enfermo (Kipnis *et al.*, 2004). Dado que es evidente que el $A\beta$ agregado interfiere con la capacidad de las células microgliales para participar en el diálogo con los linfocitos T, cabe esperar que su presencia en el cerebro provoque la pérdida de la capacidad cognitiva y el deterioro de la neurogénesis. En estos casos, la dirección de los linfocitos T autorreactivos con el SNC hacia el sitio de la enfermedad o lesión es fundamental, pero solo será eficaz si dichos linfocitos T pueden contrarrestar la actividad destructora del $A\beta$ agregado. Las células microgliales presentadoras de mielina, con las que los linfocitos T específicos de la mielina pueden mantener fácilmente un diálogo, tienden a estar presentes en abundancia. Por lo tanto, es probable que los antígenos relacionados con la mielina o los antígenos (tales como el GA) que reaccionan de forma cruzada débilmente con la mielina sean los antígenos seleccionados para la vacunación terapéutica. Los linfocitos T específicos de la mielina se dirigirán entonces al SNC y, al encontrarse con sus células APC pertinentes, se activarán de forma local para suministrar las citocinas y los factores de crecimiento necesarios para la modulación adecuada de las células microgliales nocivas como las activadas por el $A\beta$ agregado. La sinapsis resultante entre los linfocitos T y las células microgliales creará un nicho de apoyo para la renovación celular mediante la promoción de la neurogénesis desde la agrupación de células madre adultas, superando de esta manera el deterioro relacionado con la edad inducido en el cerebro inflamatorio.

Las características conocidas del acetato de glatiramero (GA, Copolímero 1) también son esenciales en relación con el trasplante de células madre para el tratamiento de trastornos neurológicos y otros trastornos. Por lo tanto, se propone usar GA para mejorar el resultado terapéutico del trasplante de células madre para diversos trastornos, incluyendo enfermedades neurológicas, especialmente la EM. La justificación para el uso de GA con este fin se basa en los resultados anteriores de los inventores R. Aharoni y R. Arnon relativos a su mecanismo de acción, así como en sus hallazgos sobre su eficacia en la reducción del rechazo de injertos y médula ósea, y los efectos de autoneurorregeneración. Por lo tanto, se prevé que el GA será eficaz no solo en el aumento de la neurogénesis endógena de las células autoneuroprogenitoras, sino también en la neurogénesis exógena de células progenitoras (madre) multipotentes trasplantadas. Estas manifestaciones de la función del GA tomadas junto con su perfil de seguridad muy alto, apoyan su aplicación en la terapia de combinación para la mejora del trasplante de células madre progenitoras para muchas aplicaciones clínicas, además de las específicamente relacionadas con los trastornos neurológicos.

- Por lo tanto, se desvela un procedimiento para inducir y mejorar la neurogénesis y/o la oligodendrogénesis a partir de células madre endógenas, así como células madre administradas exógenamente, que comprende administrar a un individuo en necesidad de ello un agente seleccionado del grupo que consiste en Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el Copolímero 1, un péptido relacionado con el Copolímero 1, y linfocitos T activados que han sido
- 5 activados por el Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el Copolímero 1 o un péptido relacionado con el Copolímero 1.
- El procedimiento desvelado en el presente documento incluye además la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de neuronas u oligodendrocitos recién formados, e incluye la proliferación de células progenitoras neuronales, la migración neuronal y/o la diferenciación neuronal de neuronas recién formadas en neuronas maduras.
- 10 También se desvela un procedimiento para inducir y aumentar la neurogénesis a partir de células madre endógenas o aplicadas de manera exógena.
- También se desvela que el procedimiento es para inducir y aumentar la autoneurogénesis en las regiones cerebrales dañadas o lesionadas, tanto en las regiones del cerebro que normalmente sufren neurogénesis como en las regiones del cerebro que normalmente no sufren neurogénesis, tales como el cuerpo estriado, el núcleo accumbens
- 15 y/o la corteza.
- También se desvela un procedimiento para inducir y aumentar la autoneurogénesis incluyendo la proliferación de células progenitoras neuronales, la migración neuronal y/o la diferenciación neuronal de las neuronas recién formadas en neuronas maduras, en el sistema nervioso central (SNC), que comprende administrar a un individuo que lo necesita un agente seleccionado del grupo que consiste Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el
- 20 Copolímero 1 y un péptido relacionado con el Copolímero 1.
- También se desvela un procedimiento para inducir y aumentar la autoneurogénesis a partir de células madre endógenas o aplicadas de manera exógena.
- También se desvela un procedimiento para inducir y aumentar la oligodendrogénesis a partir de células madre endógenas o aplicadas de manera exógena, mediante la modulación inmune, que comprende administrar a un
- 25 individuo que lo necesita de un agente neuroprotector seleccionado del grupo que consiste en Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el Copolímero 1, un péptido relacionado con el Copolímero 1, y linfocitos T activados que han sido activados por el Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el Copolímero 1 o un péptido relacionado con el Copolímero 1.
- Se desvela que el agente para su uso en el contexto de la presente invención son linfocitos T que han sido activados por Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el Copolímero 1 o un péptido relacionado con el Copolímero 1. Los linfocitos T pueden ser endógenos y activarse *in vivo* mediante la administración del antígeno o péptido, produciendo de este modo una población de linfocitos T que se acumulan en un sitio de lesión o enfermedad del SNC o SNP, o los linfocitos T se preparan a partir de linfocitos T aislados de la sangre y luego se sensibilizan al antígeno. Los linfocitos T son preferentemente autólogos, más preferentemente de los fenotipos CD4 y/o CD8, pero también
- 30 pueden ser linfocitos T alogénicos de donantes relacionados, por ejemplo, hermanos, padres, hijos o donantes compatibles o parcialmente compatibles en HLA, semialogénicos o totalmente alogénicos. Los procedimientos para la preparación de dichos linfocitos T se describen en el documento WO 99/60021 mencionado anteriormente.
- Los procedimientos desvelados en el presente documento son útiles para inducir y aumentar la neurogénesis y/o la oligodendrogénesis a partir de células madre tanto endógenas como administradas exógenamente, y pueden ayudar a resolver los problemas que se encuentran hoy en día con los malos resultados del trasplante de células madre, en particular, en los casos de lesiones, enfermedades, trastornos y afecciones del sistema nervioso, tanto en el SNC como en el SNP.
- 40 Se desvela que el procedimiento desvelado en el presente documento se aplica para inducir y mejorar la neurogénesis y/o la oligodendrogénesis a partir de agrupaciones endógenas de células madre/progenitoras neuronales. Por lo tanto, el Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el Copolímero 1, un péptido relacionado con el Copolímero 1, y los linfocitos T activados con los mismos potenciarán por sí mismos la neurogénesis y la oligodendrogénesis endógenas en los tejidos dañados, manteniendo también la supervivencia de las nuevas neuronas y los nuevos oligodendrocitos.
- 45 También se desvela que el procedimiento desvelado en el presente documento se aplica para inducir y mejorar la neurogénesis y/o la oligodendrogénesis de células madre tanto endógenas como administradas de manera exógena al paciente. La administración de dicho agente neuroprotector ayudará a mejorar el injerto con éxito de las células madre implantadas, la renovación celular y la diferenciación de las células madre en neuronas y/o oligodendrocitos, mientras que al mismo tiempo inducirá la neurogénesis y oligodendrogénesis endógenas en los tejidos dañados y mantendrá la supervivencia de las nuevas neuronas y los nuevos oligodendrocitos.
- 50 Por lo tanto, también se desvela un procedimiento de terapia de células madre que comprende el trasplante de células madre en combinación con un agente neuroprotector a un individuo en necesidad de ello, en el que dicho agente neuroprotector se selecciona del grupo que consiste en Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el
- 55

Copolímero 1, un péptido relacionado con el Copolímero 1, y linfocitos T activados que han sido activados por el Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el Copolímero 1 o un péptido relacionado con el Copolímero 1.

Se desvela que los procedimientos desvelados en el presente documento se aplican a individuos que sufren una lesión, enfermedad, trastorno o afección del sistema nervioso central (SNC) o sistema nervioso periférico (SNP).

- 5 La lesión del SNC o SNP que se va a tratar de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento, preferentemente mediante la terapia de células madre, incluyen lesión de la médula espinal, traumatismo craneal cerrado, traumatismo contuso, traumatismo penetrante, apoplejía hemorrágica, apoplejía isquémica, isquemia cerebral, lesión del nervio óptico, infarto de miocardio o lesión causada por la extirpación de un tumor. Las células madre trasplantadas migrarán a la región de la lesión donde las células se hayan muerto (por ejemplo, debido a la isquemia) y se diferenciarán en neuronas y/u oligodendrocitos.

10 Las enfermedades, los trastornos o las afecciones del SNC o SNP que se van a tratar de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento, preferentemente mediante la terapia de células madre, incluyen la enfermedad de Parkinson y trastornos de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple o esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Otras enfermedades, trastornos o afecciones incluyen parálisis del nervio facial (de Bell), glaucoma, enfermedad de Alper, enfermedad de Batten, síndrome de Cockayne, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de cuerpos de Lewy, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob o una neuropatía periférica tal como una mononeuropatía o polineuropatía seleccionada del grupo que consiste en adrenomieloneuropatía, neuropatía alcohólica, neuropatía amiloide o polineuropatía, neuropatía axonal, neuropatía atáxica sensorial crónica asociada con el síndrome de Sjogren, neuropatía diabética, neuropatía por atrapamiento, 20 síndrome de compresión del nervio, síndrome del túnel carpiano, compresión de la raíz nerviosa que puede seguir a la hernia de disco intervertebral cervical o lumbar, neuropatía axonal gigante, neuropatía hepática, neuropatía isquémica, polineuropatía nutricional debida a la deficiencia de vitaminas, síndromes de mala absorción o alcoholismo, polineuropatía porfírica, neuropatía tóxica causada por organofosfatos, polineuropatía urémica, una neuropatía asociada con una enfermedad o un trastorno seleccionado del grupo que consiste en acromegalia, ataxia telangiectasia, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, enfermedad de Fabry, ataxia de Friedreich, síndrome de Guillain-Barré, hipoglucemia, gammopatía monoclonal de IgG o IgA (no maligna o asociada con mieloma múltiple o con mieloma osteosclerótico), lipoproteinemia, policitemia vera, síndrome de Refsum, síndrome de Reye y síndrome de Sjögren-Larsson, una polineuropatía asociada con diversos fármacos, con hipoglucemia, con infecciones tales como la infección por el VIH o con cáncer; epilepsia, amnesia, ansiedad, 25 hiperalgesia, psicosis, convulsiones, estrés oxidativo, tolerancia y dependencia de opiáceos, y para el tratamiento de una psicosis o un trastorno psiquiátrico seleccionado del grupo que consiste en un trastorno de ansiedad, un trastorno del estado de ánimo, esquizofrenia o un trastorno relacionado con la esquizofrenia, uso de drogas, y la dependencia y el síndrome de abstinencia, y una pérdida de memoria o trastorno cognitivo.

30 Se desvela que el procedimiento de la terapia celular desvelado en el presente documento se aplica a lesiones, enfermedades, trastornos o afecciones no relacionados con el sistema nervioso. En una realización preferida, el procedimiento es adecuado para el trasplante de células madre derivadas de médula ósea para el tratamiento de una lesión, una enfermedad, un trastorno o una afección seleccionado entre diabetes, insuficiencia de la reparación tisular, infarto de miocardio, insuficiencia renal, cirrosis hepática, distrofia muscular, quemadura cutánea, leucemia, lesión por artritis o lesión por osteoporosis.

40 Las células madre para su uso en los procedimientos desvelados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, células madre adultas, células madre embrionarias con la condición de que dichas células madre embrionarias no sean células madre embrionarias humanas, células madre de la sangre del cordón umbilical, células madre hematopoyéticas, células madre de sangre periférica, células madre mesenquimales, células madre multipotentes, células madre neuronales, células progenitoras neuronales, células madre del estroma, células progenitoras, o precursores de las mismas, y células madre diseñadas por ingeniería genética, y cualquier otra célula madre que se pueda encontrar adecuada para el fin de la presente invención. Los ejemplos de dichas células incluyen las células madre neuronales del SNC desveladas en los documentos US 6.777.233 y US 6.680.198; las células madre neuronales y células hematopoyéticas desveladas en el documento US 6.749.850 para la administración con estimulantes neuronales; y las células del estroma desveladas en el documento US 6.653.134 50 para el tratamiento de enfermedades del SNC.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula madre neuronal" se usa para describir una sola célula derivada de tejido del sistema nervioso central, o del sistema nervioso en desarrollo, que puede dar lugar *in vitro* y/o *in vivo* a al menos uno de la siguiente linajes neuronales fundamentales: neuronas (de varios tipos), oligodendroglia y astrogliá, así como nuevas células madre neuronales con un potencial similar. Las células madre neuronales "multipotentes" o "pluripotentes" son capaces de dar lugar a todos los linajes neuronales anteriores, así como a células de potencial de desarrollo equivalente.

Se desvela que las células madre neuronales pueden ser células madre neuronales humanas que se pueden aislar tanto del SNC en desarrollo como adulto, y pueden cultivarse con éxito en cultivo, son autorrenovables y pueden generar progenie neuronal y glial madura. Las células madre neuronales humanas embrionarias pueden ser inducidas a diferenciarse en fenotipos neuronales específicos. Las células madre neuronales humanas se integran 60

en el entorno del hospedador después del trasplante en el SNC en desarrollo o adulto. Las células madre neuronales humanas trasplantadas en modelos animales de la enfermedad de Parkinson y la lesión de la médula espinal han inducido la recuperación funcional. Sin embargo, todavía hay problemas con el injerto de dichas células, y la presente invención mejorará con éxito el injerto, la supervivencia y una mayor diferenciación de las células implantadas. En una realización más preferida, las células madre neuronales son autólogas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "células madre hematopoyéticas" se refiere a células madre que pueden dar lugar a células de al menos uno de los principales linajes hematopoyéticos, además de producir células hijas de potencial equivalente. Ciertas células madre hematopoyéticas son capaces de dar lugar a muchos otros tipos de células, incluyendo células cerebrales.

Las células madre, una vez aisladas, se cultivan mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en los documentos US 5.958.767, US 5.270.191 y US 5.753.506.

El régimen de tratamiento de acuerdo con la presente divulgación se lleva a cabo, en términos de modo de administración, momento de la administración y dosis, dependiendo del tipo y de la gravedad de la lesión, de la enfermedad o del trastorno, y la edad y el estado del paciente. El inmunomodulador se puede administrar junto con, antes o después de la inyección o de la implantación de las células.

La administración de las células se puede llevar a cabo mediante diversos procedimientos. En ciertas realizaciones, las células se administran preferentemente directamente en la cavidad de la apoplejía, el líquido cefalorraquídeo, por ejemplo, intraventricular, intratecal o intracisternalmente. Las células madre se pueden formular en un medio líquido farmacéuticamente aceptable, que puede contener el Copolímero 1 o los linfocitos T también. Las células también se pueden inyectar en la región del cerebro que rodea las zonas dañadas, y las células se pueden administrar sistémicamente, dada la capacidad de ciertas células madre para migrar a la posición apropiada del cerebro.

Se desvela que el procedimiento desvelado en el presente documento comprende la terapia de células madre mediante la administración de células madre en combinación con Copolímero 1. Se desvela que las células madre se inyectan/trasplantan en el paciente, seguido de la vacunación con Copolímero 1. También se desvela que es posible inyectar/trasplantar una combinación de las células madre con el Copolímero 1 en el paciente. También se desvela que las células madre se pueden cultivar *in vitro* (artificialmente) con el Copolímero 1 y diferenciarse antes del trasplante.

Como se usa en el presente documento, en la solicitud, los términos y expresiones "Cop 1", "Copolímero 1", "acetato de glatiramer" y "GA" se usan indistintamente.

Con el fin de la presente invención, "Copolímero 1 o un péptido o polipéptido relacionado con el Copolímero 1" pretende incluir cualquier péptido o polipéptido, incluyendo un copolímero aleatorio que reaccione de forma cruzada funcionalmente con MBP y sea capaz de competir con MBP en el MHC de clase II en la presentación de antígenos.

La composición para su uso en la invención puede comprender como agente activo un Cop 1, o un péptido o polipéptido relacionado con el Cop 1 representado por un copolímero aleatorio que consiste en una proporción adecuada de un aminoácido cargado positivamente tal como lisina o arginina, en combinación con un aminoácido cargado negativamente (preferentemente, en una cantidad inferior), tal como ácido glutámico o ácido aspártico, opcionalmente en combinación con un aminoácido neutro no cargado tal como alanina o glicina, sirviendo como carga y, opcionalmente, con un aminoácido adaptado para conferir al copolímero propiedades inmunogénicas, tal como un aminoácido aromático tipo tirosina o triptófano. Dichas composiciones pueden incluir cualquiera de los copolímeros desvelados en el documento WO 00/05250, cuyo contenido se incorpora completamente en el presente documento por referencia.

Más concretamente, la composición para su uso en la presente invención comprende al menos un copolímero seleccionado del grupo que consiste en copolímeros aleatorios que comprenden un aminoácido seleccionado entre cada uno de al menos tres de los grupos siguientes: (a) lisina y arginina; (b) ácido glutámico y ácido aspártico; (c) alanina y glicina; y (d) tirosina y triptófano.

Los copolímeros para su uso en la presente invención pueden estar compuestos de aminoácidos L o D o sus mezclas. Como es conocido por los expertos en la materia, los aminoácidos L están presentes en la mayoría de las proteínas naturales. Sin embargo, los aminoácidos D se encuentran disponibles en el mercado y pueden sustituir a algunos o la totalidad de los aminoácidos usados para crear los copolímeros usados en la presente invención. La presente invención contempla el uso de copolímeros que contienen aminoácidos D y L, así como copolímeros que consisten esencialmente en aminoácidos L o D.

En una realización de la invención, el copolímero contiene cuatro aminoácidos diferentes, cada uno de uno diferente de los grupos (a) a (d).

En una realización más preferida, una composición farmacéutica o vacuna de la invención comprende el Copolímero 1, una mezcla de polipéptidos aleatorios que consisten esencialmente en los aminoácidos L-ácido glutámico (E), L-alanina (A), L-tirosina (Y) y L-lisina (K) en una proporción aproximada 1,5:4,8:1:3,6, que tienen una carga eléctrica

positiva global neta y un peso molecular de aproximadamente 2 KDa a 40 KDa.

En una realización preferida, el Cop 1 tiene un peso molecular medio de aproximadamente 2 KDa a aproximadamente 20 KDa, más preferentemente de aproximadamente 4,7 KDa a aproximadamente 13 KDa y todavía más preferentemente de aproximadamente 4 KDa a aproximadamente 8,6 KDa, de aproximadamente 5 KDa a 9 KDa o de aproximadamente 6,25 KDa a 8,4 KDa. En otra realización preferida, el Cop 1 tiene un peso molecular medio de aproximadamente 13 KDa a aproximadamente 20 KDa, más preferentemente de aproximadamente 13,5 KDa a aproximadamente 18 KDa, con una media de aproximadamente 15 KDa a aproximadamente 16 KDa. Otros pesos moleculares medios para el Cop 1, inferiores a 40 KDa, también están englobados por la presente invención. El copolímero 1 de dichos intervalos de pesos moleculares se puede preparar mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante los procedimientos descritos en la patente de Estados Unidos N° 5.800.808.

El Copolímero 1 puede ser un polipéptido que comprenda de aproximadamente 15 a aproximadamente 100, preferentemente de aproximadamente 40 a aproximadamente 80, aminoácidos de longitud.

En una realización preferida de la invención, el agente es Cop 1 en forma de su sal de acetato conocida con el nombre genérico de acetato de glatiramero o su nombre comercial Copaxone® (una marca registrada de Teva Pharmaceuticals Ltd., Petach Tikva, Israel).

Se espera que la actividad del Copolímero 1 para la composición desvelada en el presente documento permanezca si se realiza una o más de las siguientes sustituciones: ácido aspártico por ácido glutámico, glicina por alanina, arginina por lisina y triptófano por tirosina.

En otra realización de la invención, el péptido o polipéptido relacionado con Cop 1 es un copolímero de tres aminoácidos diferentes, cada uno de ellos de uno diferente de tres grupos de los grupos (a) a (d). Estos copolímeros se denominan en el presente documento terpolímeros.

En una realización, el péptido o polipéptido relacionado con Cop 1 es un terpolímero que contiene tirosina, alanina y lisina, denominado de aquí en adelante YAK, en el que la fracción molar media de los aminoácidos puede variar: la tirosina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,05 a 0,250; la alanina, en una fracción molar de aproximadamente 0,3 a 0,6, y la lisina, en una fracción molar de aproximadamente 0,1 a 0,5. Más preferentemente, las relaciones molares de tirosina, alanina y lisina son de aproximadamente 0,10:0,54:0,35, respectivamente. Es posible sustituir la arginina por lisina, glicina por alanina y/o triptófano por tirosina.

En otra realización, el péptido o polipéptido relacionado con el Cop 1 es un terpolímero que contiene tirosina, ácido glutámico y lisina, denominado de aquí en adelante YEK, en el que la fracción molar media de los aminoácidos puede variar: el ácido glutámico puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,005 a 0,300, la tirosina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,005 a 0,250, y la lisina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,3 a 0,7. Más preferentemente, las relaciones molares de ácido glutámico, tirosina y lisina son de aproximadamente 0,26:0,16:0,58, respectivamente. Es posible sustituir el ácido aspártico por ácido glutámico, la arginina por lisina y/o el triptófano por tirosina.

En otra realización preferida, el péptido o polipéptido relacionado con el Cop 1 es un terpolímero que contiene lisina, ácido glutámico y alanina, denominado de aquí en adelante KEA; en el que la fracción molar media de los aminoácidos puede variar: el ácido glutámico puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,005 a 0,300, la alanina, en una fracción molar de aproximadamente 0,005 a 0,600, y la lisina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,2 a 0,7. Más preferentemente, las relaciones molares de ácido glutámico, alanina y lisina son de aproximadamente 0,15:0,48:0,36, respectivamente. Es posible sustituir el ácido aspártico por ácido glutámico, la glicina por alanina y/o la arginina por lisina.

En una realización preferida, el péptido o polipéptido relacionado con el Cop 1 es un terpolímero que contiene tirosina, ácido glutámico y alanina, denominado de aquí en adelante YEA, en el que la fracción molar media de los aminoácidos puede variar: la tirosina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,005 a 0,250, el ácido glutámico, en una fracción molar de aproximadamente 0,005 a 0,300, y la alanina, en una fracción molar de aproximadamente 0,005 a 0,800. Más preferentemente, las relaciones molares de ácido glutámico, alanina y tirosina son de aproximadamente 0,21:0,65:0,14, respectivamente. Es posible sustituir triptófano por tirosina, ácido aspártico por ácido glutámico, glicina por alanina y/o glicina por alanina.

El peso molecular medio de los terpolímeros YAK, YEK, KEA y YEA puede variar entre aproximadamente 2 KDa y 40 KDa, preferentemente entre aproximadamente 3 KDa y 35 KDa, y más preferentemente entre aproximadamente 5 KDa y 25 KDa.

El copolímero 1 y los péptidos y polipéptidos relacionados se puede preparar mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, en condiciones de condensación usando la relación molar deseada de aminoácidos en solución o mediante procedimientos sintéticos en fase sólida. Las condiciones de condensación incluyen las condiciones adecuadas de temperatura, pH y disolvente para condensar el grupo carboxilo de un aminoácido con el grupo amino de otro aminoácido para formar un enlace peptídico. Se pueden usar agentes de condensación, por ejemplo, dicitclohexilcarbodiimida, para facilitar la formación del enlace peptídico. Se pueden usar grupos de bloqueo

para proteger grupos funcionales, tales como restos de cadenas laterales y algunos de los grupos amino o carboxilo contra reacciones secundarias no deseadas.

Por ejemplo, los copolímeros se pueden preparar mediante el procedimiento desvelado en la patente de EE.UU. Nº 3.849.550, en el que los *N*-carboxianhídridos de tirosina, alanina, γ -bencil-glutamato y *N*- ϵ -trifluoroacetil-lisina se polimerizan a temperaturas ambiente (20 °C – 26 °C) en dioxano anhidro con dietilamina como iniciador. El grupo γ -carboxilo del ácido glutámico puede desbloquearse por bromuro de hidrogeno en ácido acético glacial. Los grupos trifluoroacetilo se eliminan de la lisina mediante piperidina 1 M. El experto en la materia entiende fácilmente que el procedimiento se puede ajustar para obtener péptidos y polipéptidos que contengan los aminoácidos deseados, es decir, tres de los cuatro aminoácidos del Copolímero 1, eliminado, de forma selectiva, las reacciones que se relacionan con uno cualquiera de entre ácido glutámico, alanina, tirosina o lisina.

El peso molecular de los copolímeros se puede ajustar durante la síntesis de los polipéptidos o una vez obtenidos los copolímeros. Para ajustar el peso molecular durante la síntesis de los polipéptidos, se ajustan las condiciones sintéticas o las cantidades de aminoácidos de modo que se interrumpa la síntesis cuando el polipéptido alcance la longitud aproximada que se desea obtener. Tras la síntesis, se pueden obtener polipéptidos con el peso molecular deseado mediante cualquier procedimiento de selección de tamaño disponible, tal como cromatografía de los polipéptidos en un gel o una columna de dimensionamiento del peso molecular y la recogida de los intervalos de pesos moleculares deseados. Los copolímeros también se pueden hidrolizar parcialmente para eliminar las especies de alto peso molecular, por ejemplo, mediante hidrólisis enzimática o ácida, y luego purificarse para eliminar el ácido o las enzimas.

En una realización, se pueden preparar los copolímeros con un peso molecular deseado mediante un procedimiento que incluye hacer reaccionar un polipéptido protegido con ácido bromhídrico para formar un polipéptido de trifluoroacetilo que tenga el perfil de peso molecular deseado. La reacción se realiza durante un tiempo y a una temperatura que se predetermina mediante una o más reacciones de ensayo. Durante la reacción de ensayo, se varían el tiempo y la temperatura, y se determina el intervalo de pesos moleculares de un lote dado de polipéptidos de ensayo. Las condiciones de ensayo que proporcionan el intervalo de pesos moleculares óptimo para ese lote de polipéptido se usan para el lote. Así pues, se puede obtener un polipéptido de trifluoroacetilo, que tenga el perfil de peso molecular deseado, mediante un procedimiento que incluye la reacción del polipéptido protegido con ácido bromhídrico durante un tiempo y a una temperatura que se predeterminan mediante una reacción de ensayo. A continuación, se trata el polipéptido de trifluoroacetilo con el perfil molecular deseado con una solución acuosa de piperidina para formar un polipéptido de baja toxicidad que tenga el peso molecular deseado.

En una realización preferida, se hace reaccionar una muestra de ensayo de polipéptido protegido, procedente de un lote dado, con ácido bromhídrico durante de aproximadamente 10 a 50 horas a una temperatura aproximada de 20 a 28 °C. Las mejores condiciones para ese lote se determinan realizando varias reacciones de ensayo. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido protegido se hace reaccionar con ácido bromhídrico durante aproximadamente 17 horas a una temperatura de aproximadamente 26 °C.

Como se conocen los motivos de unión del Cop 1 con las moléculas de HLA-DR asociadas con la EM (Fridkis-Hareli *et al*, 1999), se pueden preparar fácilmente polipéptidos derivados de Cop 1 que tengan una secuencia definida y ensayarse para determinar la unión con el surco de unión a péptidos de las moléculas de HLA-DR según lo descrito en Fridkis-Hareli *et al* (1999). Los ejemplos de dichos péptidos son aquellos desvelados en los documentos WO 00/05249 y WO 00/05250, e incluyen los péptidos de SEC ID Nº 1-32 que se presentan a continuación.

SEC ID Nº	Secuencia peptídica
1	AAAYAAAAAAKAAAA
2	AEKYAAAAAAKAAAA
3	AKEYAAAAAAKAAAA
4	AKKYAAAAAAKAAAA
5	AEAYAAAAAAKAAAA
6	KEAYAAAAAAKAAAA
7	AEEYAAAAAAKAAAA
8	AAEYAAAAAAKAAAA
9	EKAYAAAAAAKAAAA
10	AAKYEAAAAAAKAAAA
11	AAKYAEAAAAKAAAA
12	EAAYAAAAAAKAAAA
13	EKKYAAAAAAKAAAA
14	EAKYAAAAAAKAAAA
15	AEKYAAAAAAAAAAAA
16	AKEYAAAAAAAAAAAA

(Continuación)	
SEC ID Nº	Secuencia peptídica
17	AKKYEAAAAAAAAA
18	AKKYAEAAAAAAAAA
19	AEAYKAAAAAAAAA
20	KEAYAAAAAAAAA
21	AEYKAAAAAAAAA
22	AAEYKAAAAAAAAA
23	EKAYAAAAAAAAA
24	AAKYEAAAAAAAAA
25	AAKYAEAAAAAAAAA
26	EKKYAAAAAAAAA
27	EAKYAAAAAAAAA
28	AEYAKAAAAAAAAA
29	AEKAYAAAAAAAAA
30	EKYAAAAAAAAA
31	AYKAEAAAAAAAAA
32	AKYAEAAAAAAAAA

Cabría esperar que dichos péptidos y otros péptidos similares derivados de Cop 1 tuvieran una actividad similar a la de Cop 1. Dichos péptidos, y otros péptidos similares, también se consideran dentro de la definición de péptidos o polipéptidos relacionados con Cop 1, y su uso se considera parte de la presente invención.

- 5 La definición de "péptido o polipéptido relacionado con el Cop 1" de acuerdo con la invención pretende englobar otros copolímeros de aminoácidos sintéticos tales como los copolímeros de cuatro aminoácidos aleatorios descritos por Fridkis-Hareli *et al.*, 2002 (como candidatos para el tratamiento de la esclerosis múltiple), en concreto, copolímeros (14-, 35- y 50-meros) que contienen los aminoácidos fenilalanina, ácido glutámico, alanina y lisina (poli FEAK) o tirosina, fenilalanina, alanina y lisina (poli YFAK), y cualquier otro copolímero similar por descubrirse que se pueda considerar como un antígeno universal similar al Cop 1.

- 10 La dosis de Cop 1 por administrarse será determinada por el médico en función de la edad del paciente y de la etapa de la enfermedad, y puede seleccionarse de un intervalo de 1-80 mg, preferentemente 20 mg, aunque cualquier otra dosis adecuada está englobada la invención. El tratamiento se debería llevar a cabo preferentemente mediante la administración de dosis repetidas a intervalos de tiempo adecuados, de acuerdo con la enfermedad neurodegenerativa por tratar, la edad y el estado del paciente. En una realización, el Cop 1 se puede administrar diariamente. En otra realización, la administración puede realizarse de acuerdo con una pauta adecuada para la inmunización, por ejemplo, al menos una vez al mes o al menos una vez cada 2 o 3 meses, o menos frecuentemente, pero la invención prevé cualquier otro intervalo adecuado entre las inmunizaciones de acuerdo con el estado del paciente.

- 20 Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. El/los vehículo/s debe/n ser "aceptable/s" en el sentido de ser compatible/s con el resto de ingredientes de la composición, y no perjudiciales para el receptor de los mismos.

- 25 Los procedimientos de administración incluyen, pero sin limitación, la vía parenteral, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, mucosa (por ejemplo, oral, intranasal, bucal, vaginal, rectal, intraocular), intratecal, tópica e intradérmica, con o sin adyuvante. La administración puede ser sistémica o local.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

- 30 **Las células microgliales inducen la renovación de las células neuronales – las células microgliales activadas por IL-4 o IFN- γ inducen de manera diferencial la neurogénesis y la oligodendrogénesis a partir de células madre/progenitoras adultas**

Materiales y procedimientos

- 35 (i) **Animales.** Los ratones C57B1/6J recién nacidos (P0-P1) fueron suministrados por el Centro de Cría de Animales del Instituto de Ciencia Weizmann (Rehovot, Israel). Todos los animales fueron tratados de acuerdo con las normativas formuladas por Comité de Cuidado y Uso de Animales del Instituto Weizmann.

(ii) **Reactivos.** El lipopolisacárido (LPS) (que contenía < 1 % de proteínas contaminantes) se obtuvo a partir de *Escherichia coli* 0127:B8 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El factor de necrosis tumoral recombinante (TNF)- α y el

factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)-I (conteniendo ambos la endotoxina a una concentración inferior a 1 UE por μg de citocina), el interferón recombinante de rata y ratón (IFN- γ y la interleucina (IL)-4 (conteniendo ambos la endotoxina a una concentración inferior a 0,1 ng por μg de citocina), los anticuerpos anti-TNF- α neutralizantes anti-ratón de cabra (anti-TNF- α ; que contenían endotoxina a una concentración inferior a 0,001 UE por μg de Ac) y anti-IGF-I neutralizantes anti-ratón de cabra (anti-IGF-I; que contenía endotoxina a una concentración inferior a 0,1 UE por μg de Ac) se obtuvieron en R & D Systems (Minneapolis, MN).

(iii) Cultivo de células progenitoras neuronales (NPC). Se obtuvieron secciones coronales (2 mm de espesor) de tejido que contiene la zona subventricular del ventrículo lateral de los cerebros de ratones C57B16/J adultos. Se picó el tejido y después se incubó para la digestión a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 45 min en solución salina equilibrada de Earle que contenía 0,94 mg/ml de papaína (Worthington, Lakewood, NJ) y 0,18 mg/ml de L-cisteína y EDTA. Después de la centrifugación a 110 xg durante 15 min a temperatura ambiente, se disoció el tejido mecánicamente por trituración con pipeta. Se sembraron las células obtenidas de suspensiones de una sola célula (3.500 células/cm²) en matraces de cultivo de tejidos Falcon de 75 cm² (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), en medio de cultivo de NPC [medio de Eagles modificados por Dulbecco (DMEM)/medio F12 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía L-glutamina 2 mM, glucosa al 0,6 %, 9,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de putrescina, 6,3 ng/ml de progesterona, 5,2 ng/ml de selenito de sodio, 0,02 mg/ml de insulina, 0,1 mg/ml de transferrina, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de heparina (todos de Sigma-Aldrich, Rehovot, Israel), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (recombinante humano, 20 ng/ml) y factor de crecimiento epidérmico (recombinante humano, 20 ng/ml; ambos de Peprotech, Rocky Hill, NJ)]. Se hicieron pasar esferas cada 4-6 días y se volvieron a sembrar como células individuales. Las células progenitoras neuronales (NPC) que expresaban la proteína verde fluorescente (GFP) se obtuvieron como se ha descrito previamente (Pluchino *et al.*, 2003).

(iv) Cultivos microgliales primarios. Se despojaron los cerebros de ratones C57B1/6J recién nacidos (P0-P1) de sus meninges y se picaron con tijeras bajo un microscopio de disección (Zeiss, Stemi DV4, Alemania) en medio Leibovitz-15 (Biological Industries, Beit Ha-Emek, Israel). Después de la tripsinización (tripsina al 0,5 %, 10 min, 37 °C/CO₂ al 5 %), se trituró el tejido. Se lavó la suspensión de células en medio de cultivo para células gliales [DMEM suplementado con suero de ternera fetal al 10 % (FCS; Sigma-Aldrich, Rehovot), L-glutamina (1 mM), piruvato de sodio (1 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 mg/ml)] y se cultivó a 37 °C/CO₂ al 5 % en matraces de cultivo de tejidos Falcon de 75 cm² (BD Biosciences) recubiertos con poli-D-lisina (PDL) (10 mg/ml; Sigma-Aldrich, Rehovot) en tampón de borato (2,37 g de bórax y 1,55 g de ácido bórico disueltos en 500 ml de agua estéril, pH 8,4) durante 1 h, después se aclararon a fondo con agua estéril, destilada en vidrio. Tras 6 h de cultivo, se cambió la mitad del medio y, a partir de entonces, cada dos días, comenzando el día 2, para un tiempo de cultivo total de 10 a 14 días. Se separaron las células microgliales por agitación de los cultivos mixtos primarios de células gliales del cerebro (150 rpm, 37 °C, 6 h) con rendimientos máximos entre los días 10 y 14, se sembraron (10⁵ células/ml) sobre placas de 24 pocillos pretratadas con PDL (1 ml/pocillo; Corning, NY) y se cultivaron en medio de cultivo para las células microgliales [medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Rehovot) suplementado con FCS al 10 %, L-glutamina (1 mM), piruvato de sodio (1 mM), β -mercaptoetanol (50 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 mg/ml)]. Las células se dejaron adherir a la superficie de un matraz de cultivo recubierto de PDL (1 h, 37 °C/CO₂ al 5 %) y se enjuagaron las células no adherentes.

(v) Cultivo conjunto de células progenitoras neuronales (NPC) y células microgliales de ratón. Se trataron las células microgliales durante 24 h con citocinas (IFN- γ , 20 ng/ml; IL-4, 10 ng/ml) o LPS (100 ng/ml). Se lavaron los cultivos de células microgliales tratadas o no tratadas dos veces con medio de diferenciación de NPC recién preparado (igual que el medio de cultivo para las NPC, pero sin factores de crecimiento y con FCS al 2,5 %) para eliminar todos los rastros de reactivos ensayados, a continuación, se incubaron en hielo durante 15 min y se agitaron a 350 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. Se retiraron las células microgliales de los matraces y se cultivaron de inmediato (5 x 10⁴ células/pocillo) con NPC (5 x 10⁴ células/pocillo) durante 5 o 10 días en portaobjetos recubiertos con Matrigel (BD Biosciences) en placas de 24 pocillos, en presencia de medio de diferenciación de NPC, con o sin insulina. A continuación, se fijaron los cultivos con paraformaldehído al 2,5 % en PBS durante 30 min a temperatura ambiente, y se tiñeron con marcadores neuronales y gliales. Se determinaron las tasas de proliferación celular y la supervivencia celular *in vitro* mediante tinción con 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU, 2,5 μM ; Sigma-Aldrich, St. Louis). Para la cuantificación de las células vivas y muertas, se tiñeron los cultivos vivos con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de yoduro de propidio (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, St. Louis), y se contaron las células usando Image-Pro (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), como se describe (Hsieh *et al.*, 2004).

(vi) Inmunocitoquímica. Se lavaron los portaobjetos de los cultivos conjuntos de NPC y células microgliales de ratón con PBS, se fijaron como se ha descrito anteriormente, se trataron con una solución de permeabilización/bloqueo que contenía FCS al 10 %, albúmina de suero bovino de 2 %, glicina al 1 % y Triton X-100 al 0,1 % (Sigma-Aldrich, Rehovot), y se tiñeron con una combinación anticuerpos del terminal C de la isoforma anti-tubulina- β -III del ratón o de conejo (β -III-tubulina; 1:500), proteoglicano de sulfato de condroitina anti-NG2 de conejo (NG2; 1:500), anti-RIP de ratón (RIP; 1:2000), anti-galactocerebrósido de ratón (GalC; 1:250), anti-ácido glutámico descarboxilasa 67 de ratón (GAD; 1:1000), anti-nestina de ratón (nestina; 1:1000), anti-proteína básica de mielina de rata (MBP; 1:300) (todos de Chemicon, Temecula, CA), anti-cortina doble de cabra (DCX; 1:400, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y anti-proteína fibrilarmente ácida glial de ratón (GFAP; 1:100, Sigma-Aldrich, St. Louis). Para el marcaje de las células microgliales se usó bien anti-CD11b de rata (MAC1; 1:50, BD-Pharmingen, NJ) o isolectina B4 de *Bandeiraea simplicifolia* conjugada con FITC (IB4; 1:50, Sigma-Aldrich, Rehovot). La expresión de IGF-1 se detectó por anti-IGF-1 de cabra (01:20, R & D

Systems).

(vii) Purificación del ARN, síntesis de ADNc y análisis de PCR de transcripción inversa. Se lisaron las células con reactivo TRI (MRC, Cincinnati, OH) y se purificó el ARN celular total de los lisados usando el kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se eliminó el ADN genómico residual durante el procedimiento de purificación mediante la incubación con DNasa exenta de RNasa (Qiagen). Se almacenó el ARN en agua exenta de RNasa (Qiagen) a -80 °C. Se convirtió el ARN (1 µg) en ADNc usando Superscript II (Promega, Madison, WI), según las recomendaciones del fabricante. Se diluyó la mezcla de ADNc 1:5 con agua de calidad para PCR.

Los presentes inventores ensayaron la expresión de ARNm específicos usando la PCR de transcripción inversa semicuantitativa (RT-PCR) con pares de cebadores específicos de genes seleccionados, usando v6.4 OLIGO (Molecular Biology Insights, Cascade, CO).

Los cebadores usados fueron:

TNF- α , 5'-AGGAGGCGCTCCCCAAAAAGATGGG-3' sentido (SEC ID N° 33),
5'-GTACATGGGCTCATACCAGGGCTTG-3' antisentido (tamaño diana, 551 pb) (SEC ID N° 34);
IGF-I, 5'-CAGGCTCCTAGCATACCTGC-3' sentido (SEC ID N° 35),
5'-GCTGGTAAAGGTGAGCAAGC-3' sentido (tamaño diana, 244 pb) (SEC ID N° 36); y
 β -actina, 5'-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3' sentido (SEC ID N° 37),
5'-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3' antisentido (tamaño diana, 764 pb) (SEC ID N° 38).

Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo usando 1 µg de ADNc, 35 nmol de cada cebador y mezcla maestra de PCR ReadyMix (ABgene, Epsom, RU) en reacciones de 30 µl. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un sistema de PCR Eppendorf con ciclos (generalmente 25-30) de 95 °C durante 30 s, 60 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 min y 72 °C durante 5 min y, a continuación, se mantuvieron a 4 °C. Como patrón interno para la cantidad de ADNc sintetizado, se usó ARNm de β -actina. Los productos de PCR se sometieron a análisis en gel de agarosa y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Las señales se cuantificaron usando un analizador Gel-Pro 3.1 (Media Cybernetics). En todos los casos, se observó un producto con cada conjunto de cebadores, y el producto observado tenía un tamaño de amplicón que coincidía con el tamaño predicho a partir de las secuencias de ADNc publicadas.

(viii) Cuantificación. Para el análisis microscópico, se usó un microscopio de barrido láser confocal Zeiss LSM 510 (40 aumentos). Para los experimentos *in vitro*, se rastrearon campos de 0,053 mm² (n = 8-16 de al menos dos portaobjetos diferentes) para cada grupo experimental. Para cada marcador, se tomaron muestras de 500-1000 células. Se contaron las células que expresaban conjuntamente GFP y β -III-tubulina, NG2, RIP, GalC y GFAP.

(ix) Análisis estadístico. Los resultados se analizaron mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer (ANOVA) y se expresaron como medias $\pm$ DE (a menos que se indique de otra manera).

Ejemplo 1(1). Efecto de las células microgliales en la neurogénesis *in vitro* – las células microgliales previamente tratadas con IL-4 o IFN- γ inducen y mantienen la diferenciación neuronal de las células progenitoras neuronales (NPC) *in vitro*.

La inmunidad adaptativa, en forma de respuesta de Th1 o Th2 bien controlada a una lesión del SNC induce a que las células microgliales (MG) adopten un fenotipo que facilite la protección neuronal y la reparación del tejido neuronal (Butovsky *et al.*, 2001). En el presente documento, se examina la capacidad de la inmunidad adaptativa, a través de la activación de las células microgliales, para inducir o mantener la diferenciación de las células NPC. Según se ha publicado, la neurogénesis es bloqueada por la inflamación causada por las células microgliales activadas con endotoxina (tal como lipopolisacárido, LPS) (Ekdahl *et al.*, 2003). Por lo tanto, se compararon los efectos sobre las NPC de las células microgliales expuestas a LPS (MG_(LPS)) con los efectos de las células microgliales expuestas a bajos niveles de las citocinas características Th1 (proinflamatoria) y Th2 (antiinflamatoria), IFN- γ (MG_(IFN- γ)) e IL-4 (MG_(IL-4)), respectivamente, que han mostrado en el presente documento apoyar la supervivencia neuronal. Se usaron NPC que expresaban la proteína verde fluorescente (GFP) para verificar que cualquier diferenciación de las células neuronales observada en el cultivo procedía de las NPC en lugar de la contaminación de los cultivos microgliales primarios.

Se cultivaron células microgliales en su medio de crecimiento óptimo (Zielasek *et al.*, 1992) y luego se trataron durante 24 h con IL-4, IFN- γ (nivel bajo) o LPS. Se lavaron los residuos del medio de crecimiento y las citocinas, y cada una de las preparaciones microgliales tratadas, así como una preparación de células microgliales sin tratar (MG₍₋₎), se cultivó conjuntamente con esferas de NPC disociadas en presencia de medio de diferenciación. Se examinaron los efectos tanto de células microgliales activadas con IFN- γ como de células microgliales activadas con IL-4. Después de 5 días de cultivo, las células GFP⁺ que expresaban el marcador neuronal β -III-tubulina se identificaron como neuronas.

Dado que, recientemente, los presentes inventores han demostrado que las células microgliales activadas con IL-4 (MG_(IL-4)) producen un alto nivel de IGF-1 (Butovsky *et al.*, 2005), y dado que se ha publicado que IGF-1 es un factor

clave en la renovación de las células neuronales (O'Kusky *et al.*, 2000), se prevé una situación en la que el IGF-1 podría ser uno de los factores en el efecto de la células microgliales activadas por IL-4. Por lo tanto, se llevaron a cabo los siguientes experimentos en medio de diferenciación tanto exento de insulina (para permitir la detección, si existe, del efecto de los factores relacionados con la insulina secretados por las células microgliales activadas) como que contenía insulina.

El análisis cuantitativo reveló que la neurogénesis, en ausencia de insulina, fue solo mínimamente apoyada por $MG_{(IFN-\gamma)}$ y se vio afectada por $MG_{(LPS)}$, pero fue casi 3 veces superior en las NPC cultivadas conjuntamente con $MG_{(IL-4)}$ que en los controles (**Fig. 1A**). En presencia de insulina, el panorama fue algo diferente: $MG_{(IFN-\gamma)}$ fueron significativamente más eficaces que $MG_{(-)}$ en la inducción de la neurogénesis, mientras que el efecto inductor de $MG_{(IL-4)}$ y el efecto de bloqueo de $MG_{(LPS)}$ en la neurogénesis fueron similares a sus efectos en ausencia de insulina (Compárese la Fig. 1B). En ausencia de células microgliales, la adición de insulina (0,02 mg/ml) no aumentó el número de células GFP^{+}/β -III-tubulina⁺ en los cultivos de NPC (**Fig. 1A**).

En los cultivo conjuntos de NPC con $MG_{(-)}$, sin embargo, la adición de insulina aumentó el porcentaje de células GFP^{+}/β -III-tubulina⁺ (**Fig. 1B**) en relación con su porcentaje en dichos cultivos conjuntos sin insulina (**Fig. 1B**) o en los cultivos de control (exentos de células microgliales) en medio que contenía insulina (**Fig. 1B**). En presencia de insulina, el número de neuronas en las NPC cultivadas conjuntamente con $MG_{(IFN-\gamma)}$ (**Fig. 1B**) fue mayor que en las células NPC cultivadas conjuntamente con $MG_{(-)}$ (**Fig. 1B**), e incluso mayor cuando las células NPC se cultivaron conjuntamente con $MG_{(IFN-\gamma)}$ que contenía anticuerpos anti-TNF- α neutralizantes (anti-TNF- α) (**Fig. 1B**). Para verificar que el efecto beneficioso observado de anti-TNF- α en los cultivos conjuntos de $MG_{(IFN-\gamma)}$ (**Fig. 1B**) se debía a la neutralización del efecto adverso de TNF- α en la neurogénesis, se añadió TNF- α recombinante de ratón (rTNF- α) a NPC recién cultivadas conjuntamente con $MG_{(IFN-\gamma)}$. La **Fig. 1C** muestra que, en presencia de rTNF- α , el número de células GFP^{+}/β -III-tubulina⁺ fue similar al encontrado en los cultivos de NPC de control (sin tratar).

No se observaron diferencias morfológicas entre las neuronas recién diferenciadas en las NPC cultivadas conjuntamente con $MG_{(IFN-\gamma)}$ y aquellas generadas en cultivos conjuntos con $MG_{(IL-4)}$ (**Fig. 1D**). La expresión conjunta de GFP con β -III-tubulina se muestra en la **Fig. 1E**. Las neuronas recién diferenciadas se marcaron positivamente con GAD67 (ácido glutámico descarboxilasa 67), una enzima responsable de la síntesis de GABA, el principal transmisor inhibidor en las regiones superiores del cerebro, y también se encontraron marcadas conjuntamente con GFP (β -III-tubulina⁺/GFP⁺/TAG⁺) (**Fig. 1F**). En otro conjunto de experimentos, se prepararon cultivos similares a los descritos anteriormente y se tiñeron con doblecortina (DCX; **Fig. 2**), un marcador de la diferenciación temprana del linaje neuronal. Esta tinción reveló un efecto de las diversas preparaciones microgliales similar al observado con la tinción de β -III-tubulina. Se observaron diferencias notables en la morfología de las neuronas recién diferenciadas entre las NPC cultivadas conjuntamente con $MG_{(IL-4)}$ y las cultivadas conjuntamente con $MG_{(IFN-\gamma)}$ (**Fig. 2A**); mostrando las primeras una ramificación significativa, mientras que, en las últimas, las neuronas estaban polarizadas y tenían procedimientos largos (**Fig. 2A**). Estas diferencias sugirieron que los mecanismos activados en las células microgliales por las dos citocinas no son idénticos. La expresión conjunta de GFP con DCX se muestra en la **Fig. 2B**. En los cultivos teñidos tanto con DCX como con β -III-tubulina, se encontraron estos dos marcadores neuronales ubicados conjuntamente (**Fig. 2C**). En todos los experimentos anteriores, la viabilidad microglial, ensayada mediante tinción con yoduro de propidio de células vivas (Hsieh *et al.*, 2004), no se vio afectada por las condiciones de cultivo conjunto. El análisis cuantitativo de células teñidas GFP^{+}/DCX^{+} , mostrado en la **Fig. 2D**, arrojó resultados similares a los obtenidos cuando se usó β -III-tubulina como marcador neuronal (**Fig. 1A, 1B**).

Ejemplo 1(2). Efecto de la células microgliales en la oligodendrogénesis *in vitro* – la diferenciación de las células NPC en oligodendrocitos es inducida por el cultivo conjunto con células microgliales tratadas previamente con IL-4 ($MG_{(IL-4)}$)

A continuación, se examinó si, en las mismas condiciones experimentales, las células microgliales también inducirían a las NPC a diferenciarse en oligodendrocitos. Con un gran aumento, los presentes inventores pudieron detectar los oligodendrocitos recién formados. Al tratar de detectar la posible diferenciación de las células NPC en los oligodendrocitos, primero se buscaron células marcadas con GFP que expresaran conjuntamente el marcador de progenitores de oligodendrocitos NG2. El análisis cuantitativo confirmó que tanto $MG_{(IL-4)}$ como (en menor medida) $MG_{(IFN-\gamma)}$ indujeron la diferenciación de las células NG2⁺ de NPC cultivados conjuntamente (**Fig. 3A, 3B**). Tanto en $MG_{(-)}$ como en $MG_{(IFN-\gamma)}$ cultivadas conjuntamente con NPC, se observaron significativamente menos células que expresaban NG2⁺ en ausencia de insulina (**Fig. 3A**) que en su presencia (**Fig. 3B**). A diferencia del caso de la neurogénesis (**Fig. 1**), $MG_{(IFN-\gamma)}$ - incluso en presencia de insulina - fue significativamente menos eficaz que $MG_{(IL-4)}$ en la inducción de la aparición de oligodendrocitos recién diferenciados (NG2⁺). Una proporción significativa de las células NG2⁺ también se marcaron con RIP [un anticuerpo monoclonal que marca específicamente el citoplasma del cuerpo celular y procesa los oligodendrocitos prematuros y maduros en la etapa previa de envoltura (Hsieh *et al.*, 2004)] tanto en cultivo conjuntos de $MG_{(IFN-\gamma)}$ como de $MG_{(IL-4)}$ (**Fig. 3A, 3B**). En ausencia de insulina, apenas se observaron células $GFP^{+}/NG2^{+}$ en medio de control que no contenía células microgliales (**Fig. 3A**). Se observaron algunas células $GFP^{+}/NG2^{+}$ en cultivos conjuntos de NPC con $MG_{(-)}$ (**Fig. 3A**), pero ninguna en cultivos conjuntos con $MG_{(LPS)}$ (**Fig. 3A**). Se observó un aumento espectacular en el número de estas células en los cultivo conjuntos con $MG_{(IL-4)}$ (**Fig. 3A, 3C**).

La adición de insulina a los cultivos de NPC no afectó a la incidencia de las células NG2⁺ en ausencia de células microgliales (control; **Fig. 3B**); sin embargo, sí causó un aumento en el número de células NG2⁺ en las NPC cultivadas conjuntamente con MG₍₋₎ (**Fig. 3B**). Por otra parte, en presencia de insulina, el efecto de bloqueo de MG_(LPS) en células NG2⁺ recién diferenciadas no vio alterado (**Fig. 3B**), mientras que los números de células NG2⁺ en los cultivos conjuntos con MG_(IFN- γ) se aumentaron (**Fig. 3B, 3C**). En cada uno de los cultivos conjuntos, también se encontraron que todas las células NG2⁺ estaban marcadas con GFP (**Fig. 3D**). Una observación interesante fue la estrecha asociación espacial entre las células microgliales y los oligodendrocitos recién diferenciados (**Fig. 3E**).

A la luz de las primeras diferencias observadas entre los efectos de MG_(IL-4) y MG_(IFN- γ) tanto en la neurogénesis como en la oligodendrogénesis, se han examinado cultivos conjuntos de células NPC con células microgliales activadas por citocinas después de 10 días de cultivo conjunto. Hacia el día 5, se observaron pocas células NG2⁺ en ausencia de células microgliales (**Fig. 4A**). El análisis cuantitativo de estos cultivos reveló diferencias notables: mientras que ambas preparaciones de células microgliales activadas por citocina indujeron la diferenciación tanto en oligodendrocitos (NG2⁺, RIP⁺, GalC⁺) como en neuronas (β -III-tubulina⁺), MG_(IL-4) mostró una tendencia positiva hacia los oligodendrocitos maduros, y MG_(IFN- γ), hacia las neuronas maduras. El análisis de la incidencia de los astrocitos (células GFAP⁺) en estos cultivos (tras 10 días de cultivo conjunto) desveló diferencias significativas entre los cultivos conjuntos de NPC con MG_(IL-4) y con MG_(IFN- γ). Sin embargo, en ambos, las células GFAP⁺ fueron más numerosas que en los cultivos de NPC sin células microgliales (**Fig. 4A**). Los resultados sugirieron que estos dos tipos de células microgliales activadas por citocinas afectan a los tres linajes de células neuronales, y que tienen diferentes efectos en los linajes neuronales y oligodendrocíticos, pero no en el linaje astrocítico (**Fig. 4A**).

En presencia de MG_(IL-4), las células GFP⁺/NG2⁺ eran más ramificadas a los 10 días (**Fig. 4B**) que a los 5 días (**Fig. 3C**). Las células en ramificación parecían estar formando contactos con las células que parecían neuronas (**Fig. 4B**). La tinción de estos cultivos con galactocerebrósido (GalC), un marcador de oligodendrocitos maduros, y con el marcador neuronal β -III-tubulina, verificó que las células formadoras de contactos eran oligodendrocitos y neuronas recién formados (**Fig. 4C**). El análisis de los mismos cultivos para DCX y RIP (**Fig. 4D**) reveló que ninguna de las células recién diferenciadas expresaba ninguno de estos marcadores juntos. Por otra parte, no hubo superposición en la expresión de la proteína fibrilarmente ácida glial (GFAP) marcadora de astrocitos y NG2 (**Fig. 4E**) o de GFAP y DCX (**Fig. 4F**). El análisis de la longitud de las neuritas inducidas por las células microgliales activadas por citocinas (después de 10 días de cultivo conjunto) reveló que las neuritas de las neuronas recién formadas en células NPC cultivadas conjuntamente con MG_(IFN- γ) eran significativamente más largas que en las células NPC cultivadas conjuntamente con MG_(IL-4) o en las células NPC solas, sin diferencias significativas entre las longitudes de las neuritas en los dos últimos casos (**Fig. 4G**). Curiosamente, no hubo diferencias significativas entre los números absolutos de células GFP⁺ contadas en estos tres grupos (células NPC solas: $90,2 \pm 32,0$; cultivadas conjuntamente con MG_(IFN- γ): $70,5 \pm 23,0$; cultivadas conjuntamente con MG_(IL-4): $66,1 \pm 10,4$). Esto plantea una cuestión: ¿Las células microgliales activadas, además de afectar a la diferenciación, también afectan a la proliferación y/o a la supervivencia de las células NPC?

La **Tabla 1** registra la proliferación de las células NPC cultivadas conjuntamente con células microgliales no activadas, activadas con IL-4 o activadas con IFN- γ . Se analizaron la proliferación y la muerte celular 24, 48 o 72 h después de la siembra de los cultivos de células NPC sin tratar (control) o células NPC cultivadas conjuntamente con MG₍₋₎ o MG_(IL-4) o MG_(IFN- γ) o MG_(LPS), con o sin insulina. Para el ensayo de proliferación, se aplicó un pulso de BrdU 12 h antes de cada punto temporal. Los números de células BrdU⁺ se expresan como porcentajes de células GFP⁺ (media $\pm$ ETM de tres experimentos independientes por duplicado) y se analizan por ANOVA. La muerte celular con y sin insulina se determinó mediante tinción *in vivo* con 1 μ g/ml de yoduro de propidio y 1 μ g/ml de Hoechst 33342 (media $\pm$ ETM de dos experimentos independientes por duplicado; * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; ANOVA).

Como se muestra en la Tabla 1, las comparaciones de la proliferación a las 24 h y 48 h de cultivo no revelaron diferencias. Tras 72 h, se observó una diferencia leve, pero no significativa, entre las células NPC solas y las células NPC cultivadas conjuntamente con MG₍₋₎ o MG_(IFN- γ), posiblemente debido a la disminución de la proliferación en el cultivo de las células NPC solas, en lugar de un aumento en los cultivos conjuntos. En ausencia de insulina, no hubo diferencias significativas en ningún momento en el cultivo entre las células NPC solas y las células NPC cultivadas conjuntamente con MG₍₋₎ o con MG_(IL-4). Se observó una reducción en la proliferación en las NPC cultivadas conjuntamente con MG_(LPS), con o sin insulina. Después de 5 días, no se detectó proliferación en ninguno de los cultivos conjuntos (datos no mostrados). Para identificar las células muertas o moribundas, se tiñeron los cultivos vivos con 1 μ g/ml de yoduro de propidio, que tiñe las células muertas, y 1 μ g/ml de Hoechst 33342, que tiñe las células tanto vivas como muertas (Hsieh *et al.*, 2004). Se observó una muerte celular significativa en las células NPC cultivadas conjuntamente con MG_(LPS), tanto en ausencia como en presencia de insulina, mientras que en las NPC cultivadas solas o con MG_(IFN- γ) o MG_(IL-4), el porcentaje de muerte celular fue bajo y no difirió significativamente del observado en cultivos de NPC solas (Tabla 1). Estos resultados sugirieron que el efecto primario de las células microgliales activadas por citocinas sobre el destino de las células NPC *in vitro* se produce a través de un mecanismo que es instructor en lugar de selectivo.

Tabla 1. Proliferación y supervivencia de las células progenitoras neuronales (NPC) en cultivos conjuntos con células microgliales

% de células BrdU ⁺ de las células GFP ⁺				% de células PI ⁺ de las células GFP ⁺			
Tratamiento	+ Insulina			Tratamiento	+ Insulina		
	24 h	48 h	72 h		24 h	48 h	72 h
Control	5,8 ± 0,6	5,4 ± 1,5	1,4 ± 0,9	Control	3,3 ± 0,9	1,7 ± 0,4	1,7 ± 0,7
MG ₍₋₎	6,2 ± 0,5	6,9 ± 1,9	5,6 ± 1,4	MG ₍₋₎	4,0 ± 0,5	2,8 ± 0,7	2,8 ± 0,9
MG _(IFN-γ)	5,8 ± 1,5	7,1 ± 2,5	5,6 ± 1,1	MG _(IFN-γ)	5,9 ± 0,6	4,2 ± 1,5	3,6 ± 2,1
MG _(LPS)	3,1 ± 0,8	1,7 ± 0,4	1,1 ± 0,1	MG _(LPS)	14,0 ± 0,1 ***	7,3 ± 1,9	4,1 ± 0,2
Tratamiento	- Insulina			Tratamiento	- Insulina		
	24 h	48 h	72 h		24 h	48 h	72 h
Control	4,1 ± 0,6	3,2 ± 0,5	1,2 ± 0,7	Control	3,7 ± 0,2	2,3 ± 0,8	2,2 ± 1,1,
MG ₍₋₎	6,5 ± 1,5	3,5 ± 0,7	3,3 ± 2,5	MG ₍₋₎	5,2 ± 3,0	3,7 ± 0,3	3,0 ± 1,0
MG _(IFN-γ)	6,2 ± 1,1	5,4 ± 1,9	3,3 ± 2,2	MG _(IFN-γ)	3,7 ± 2,0	2,9 ± 0,4	2,5 ± 0,3
MG _(LPS)	2,1 ± 0,2	1,7 ± 0,5	1,1 ± 0,6	MG _(LPS)	15,8 ± 1,9*	7,0 ± 5,0	4,8 ± 0,8

Proliferación y supervivencia de las células progenitoras neuronales (NPC) en cultivo conjuntos con células microgliales. Se analizaron la proliferación y la muerte celular 24, 48 o 72 h después de la siembra de los cultivos de células NPC sin tratar (control) o células NPC cultivadas conjuntamente con MG₍₋₎ o MG_(IL-4) o MG_(IFN-γ) o MG_(LPS), con o sin insulina. Para el ensayo de proliferación, se aplicó un pulso de BrdU 12 h antes de cada punto temporal. Los números de células BrdU⁺ se expresan como porcentajes de células GFP⁺ (media ± ETM de tres experimentos independientes por duplicado) y se analizan por ANOVA. La muerte celular con y sin insulina se determinó mediante tinción *in vivo* con 1 µg/ml de yoduro de propidio y 1 µg/ml de Hoechst 33342 (media ± ETM de dos experimentos independientes por duplicado; **P* < 0,05; ****P* < 0,001; ANOVA)

Ejemplo 1(3). Posible mecanismo de inducción de la oligodendrogénesis por células microgliales activadas por IFN-γ e IL-4

Según lo publicado el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)-I es un factor clave en la neurogénesis y la oligodendrogénesis (Carson *et al.*, 1993; Aberg *et al.*, 2000; O'Kusky *et al.*, 2000; Hsieh *et al.*, 2004). Para determinar si el efecto beneficioso de las células microgliales activadas por citocinas en la diferenciación de las NPC está mediado, al menos en parte, por la capacidad de las células microgliales para producir IGF-I, se añadieron anticuerpos neutralizantes específicos de IGF-I (anti-IGF-I) a las células NPC cultivadas conjuntamente con células microgliales activadas. El anti-IGF-I bloqueó el efecto inducido por MG_(IL-4) en la oligodendrogénesis (**Fig. 5A**), lo que indica que el efecto de las células microgliales activadas por IL-4 en la oligodendrogénesis depende de IGF-I. La adición directa de IGF-I recombinante (rIGF-I; 500 ng/ml) a las células NPC produjo su diferenciación significativa en células que expresaban NG2 (**Fig. 5B**). Dicha diferenciación, sin embargo, fue menos extensa que la observada en las NPC cultivadas conjuntamente con MG_(IL-4) (**Fig. 5A**), lo que sugiere que el efecto de MG_(IL-4) está mediado por factores adicionales (posiblemente solubles), o por la interacción célula-célula, o por ambos. anti-IGF-I no tuvo efecto sobre la oligodendrogénesis inducida por MG_(IFN-γ) (datos no mostrados). También se examinó el efecto de anti-IGF-I en la neurogénesis inducida por MG_(IL-4) mediante la evaluación de la expresión de β-III-tubulina. El porcentaje de células GFP⁺/β-III-tubulina⁺ fue de 21,9 ± 2,9 % en las células NPC cultivadas conjuntamente con MG_(IL-4) y de 19,7 ± 4,5 %, (*P* = 0,3) cuando se añadió anti-IGF-I a los cultivos conjuntos. Estos resultados sugieren que MG_(IL-4) produce potentes factores neurogénicos adicionales además de IGF-I.

A la luz del efecto beneficioso observado de un anti-TNF-α sobre el resultado de la neurogénesis inducida por MG_(IFN-γ) (**Fig. 1**), se examinó si la neutralización de TNF-α potenciaría también la oligodendrogénesis inducida por MG_(IFN-γ). De hecho, la oligodendrogénesis fue potenciada por anti-TNF-α en células NPC cultivadas conjuntamente con MG_(IFN-γ) (**Fig. 5C**). El efecto negativo implícito de TNF-α se justificó por la adición directa de TNF α a células NPC cultivadas conjuntamente con MG_(IFN-γ) (**Fig. 5D**).

El análisis de RT-PCR comparativo de ARNm microglial desveló que, en ausencia de activación, las células microgliales produjeron tanto IGF-I como bajos niveles de TNF-α. El análisis de la producción de TNF-α e IGF-I en función del tiempo reveló que IFN-γ, a diferencia de IL-4, causó un aumento transitorio de la producción de TNF-α y regulación negativa de IGF-I (**Fig. 6A, 6B**). A nivel de proteínas, el análisis inmunocitoquímico cuantitativo también reveló la regulación positiva de la expresión de IGF-I por MG_(IL-4). Los LPS bloquearon completamente la producción

de IGF-I (Fig. 6C).

Discusión

Los resultados de este estudio sugieren con fuerza que ciertas células microgliales activadas específicamente pueden provocar la renovación de las células neuronales en el SNC adulto. Los hallazgos mostraron que las células microgliales pueden determinar el destino de las células NPC adultas en diferenciación. Tanto la neurogénesis como la oligodendrogénesis fueron inducidas en células NPC cultivadas conjuntamente con $MG_{(IL-4)}$ y $MG_{(IFN-\gamma)}$, mientras que ambas fueron bloqueadas por $MG_{(LPS)}$ de acuerdo con los informes que sostienen que la inflamación asociada a los LPS bloquea la neurogénesis adulta (Ekdahl *et al.*, 2003; Monje *et al.*, 2003). Las células NPC cultivadas conjuntamente con $MG_{(IL-4)}$ mostraron una tendencia hacia la oligodendrogénesis, mientras que las células NPC cultivadas conjuntamente con $MG_{(IFN-\gamma)}$ tendieron hacia la neurogénesis.

Ejemplo 2

La sinergia entre los linfocitos T y las células progenitoras neuronales adultas potencia la recuperación funcional de una lesión de la médula espinal

Como es evidente, la recuperación de la lesión de la médula espinal requiere una respuesta inmune local que sea susceptible de ser generada de manera bien controlada mediante la inmunización con linfocitos T que reconozcan los antígenos asociados con la mielina en el sitio de la lesión. Los linfocitos T relevantes pueden activar las células microgliales locales para expresar un fenotipo que apoye la supervivencia y la renovación neuronales. Los presentes inventores han mostrado que la recuperación de ratones de una contusión de la médula es potenciada sinérgicamente por la vacunación a base de linfocitos T con un péptido derivado de la mielina y la inyección de células madre/progenitoras neuronales adultas (aNPC) en el líquido cefalorraquídeo. Significativamente más células aNPC se dirigieron al sitio de la lesión en los ratones vacunados que en los ratones no vacunados. La interacción sinérgica entre las células aNPC y los linfocitos T *in vitro* dependió fundamentalmente de la especificidad de los linfocitos T y del fenotipo. Los resultados sugieren que la actividad inmune controlada subyace a la regulación eficaz del nicho de células madre, y que la terapia de células madre requiere donantes autólogos o de histocompatibilidad coincidente, en lugar de fármacos antirrechazo inmunosupresores, que eliminarían cualquier efecto beneficioso de las células inmunes sobre la reparación de la médula espinal.

Materiales y procedimientos

(x) Animales. Los ratones C57B1/6J de tipo natural adultos endogámicos fueron suministrados por el Centro de Cría de Animales del Instituto de Ciencias Weizmann. Todos los animales fueron tratados de acuerdo con las normas formuladas por el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional (IACUC).

(xi) Antígenos. Los siguientes péptidos fueron sintetizados por la Unidad de Síntesis del Instituto Weizmann (Rehovot, Israel): MOG, restos 35-55 MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (SEC ID N°: 39) y un péptido MOG modificado (45D) MEVGWYRSPFDRWHLYRNGK (SEC ID N°: 40), un análogo de péptido de MOG 35-55 que contenía una sustitución de serina a ácido aspártico como se muestra. El OVA fue adquirido en Sigma.

(xii) Inmunización. Los ratones adultos fueron inmunizados con MOG, 45D u OVA (todos 100 µg), cada uno emulsionado en un volumen igual de CFA (Difco, Detroit, MI) que contenía *Mycobacterium tuberculosis* (5 mg/ml; Difco) o IFA. La emulsión (volumen total de 0,15 ml) se inyectó s.c. en una zona de la ijada. Los ratones de control fueron inyectados con PBS.

(xiii) Lesión de la médula espinal. Se anestesiaron los ratones, se dejaron al descubierto las médulas espinales por laminectomía en T12, y se aplicó una fuerza de 2 N durante 1 s sobre la médula sometida de laminectomía usando el impactador de la médula espinal Infinite Horizon (Precision Systems and Instrumentation, Lexington, KY), un dispositivo que muestra infligir una lesión contusa bien calibrada de la médula espinal.

(xiv) Evaluación de la recuperación funcional de la contusión de la médula espinal. La recuperación funcional de la contusión de la médula espinal en ratones se determinó por el rendimiento locomotor de los miembros posteriores. La recuperación se registró con la escala de valoración del aparato locomotor en campo abierto, la escala Basso para ratones (BMS), una escala recientemente desarrollada específicamente para los ratones, con puntuaciones que varían de 0 (parálisis completa) a 9 (movilidad normal) (Engesser-Cesar *et al.*, 2005). La puntuación ciega aseguró que los observadores no conocieran el tratamiento recibido por cada ratón. Dos veces a la semana, se monitorizaron las actividades locomotoras de los ratones en campo abierto colocando el ratón durante 4 minutos en el centro de un recinto circular (90 cm de diámetro, altura de la pared de 7 cm) de plástico moldeado con un suelo liso, antideslizante. Antes de cada evaluación, se examinaron cuidadosamente la infección perineal, las heridas en las patas traseras y la cola, y la autofagia de las patas de los ratones.

(xv) inyección estereotáxica de células progenitoras neuronales. Se anestesiaron los ratones y se colocaron en un dispositivo estereotáxico. Se dejó el cráneo al descubierto, y se mantuvo seco y limpio. Se identificó y se marcó el bregma. El punto de inyección designado estaba a una profundidad de 2 mm de la superficie del cerebro, 0,4 mm detrás del bregma, en el eje anteroposterior, y a 1,0 mm de la línea media. Se aplicaron células progenitoras neuronales con una jeringa Hamilton (5 x 10⁵ células en 3 µl, a una velocidad de 1 µl/min) y se cosió la piel sobre la herida.

(xvi) Cultivo de células progenitoras neuronales. Se obtuvieron cultivos de células progenitoras neuronales

adultas (aNPC) como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1.

(xvii) Cultivo conjunto de células progenitoras neuronales y linfocitos T. Se purificaron linfocitos T CD4⁺ de nódulos linfáticos de ratones C57B16/J de 8 semanas de vida como se ha descrito anteriormente (Kipnis *et al.*, 2004). Se activaron los linfocitos T en medio RPMI suplementado con L-glutamina (2 mM), 2-mercaptoetanol (5 x 10⁻⁵ M), piruvato de sodio (1 mM), penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 µg/ml), aminoácidos no esenciales (1 ml/100 ml) y suero autólogo al 2 % (v/v) en presencia de IL-2 recombinante de ratón (mrIL-2; 5 ng/ml) y anticuerpos anti-CD28 y anti-CD3 solubles (1 ng/ml). Las linfocitos T se cultivaron conjuntamente (5 x 10⁴ células/pocillo) con células aNPC (5 x 10⁴ células/pocillo) durante 5 d sobre portaobjetos recubiertos con Matrigel (BD Biosciences) en placas de 24 pocillos. A continuación, se fijaron los cultivos con paraformaldehído al 2,5 % en PBS durante 30 min a temperatura ambiente y se tiñeron con marcadores neuronales.

(xviii) Inmunohistoquímica. Se volvieron a anestesiarse ratones sometidos a LME 14 o 60 días más tarde y se perfundieron con PBS frío. Se extirparon las médulas espinales, se fijaron posteriormente con fijador de Bouin (ácido pícrico saturado al 75 %, formaldehído al 25 %, ácido acético glacial al 5 %; Sigma-Aldrich) durante 48 h, y luego se transfirieron a EtOH al 70 %. Los tejidos se hidrataron a través de un gradiente de EtOH al 70 %, 95 %, y 100 % en xileno y parafina, y luego se embebieron en parafina. Para cada mancha, se tomaron de cada ratón cinco secciones de tejido, cada una con 6 µm de espesor. Se retiró la parafina enjuagando sucesivamente los portaobjetos durante 15 min con cada uno de lo siguiente: xileno, EtOH al 100 %, 95 %, 70 %, 50 %, y PBS. Se maximizó la exposición de los portaobjetos al antígeno calentándolos hasta el punto de ebullición en citrato sódico 10 mM, pH 6,0, en un horno de microondas, y a continuación, calentándolos al 20 % de la potencia del microondas durante otros 10 min. Se bloquearon los portaobjetos con suero de caballo normal al 20 % durante 60 min antes de la incubación durante una noche a temperatura ambiente (GFAP, neurofilamentos y BDNF), o durante 48 horas a 4 °C (CD3), con el anticuerpo monoclonal en suero de caballo al 2 %. Se usó GFAP de conejo anti-ratón (1:200) (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) para GFAP; anti-neurofilamento de conejo (1:200), peso molecular bajo y alto (Serotec, Oxford, RU) para neurofilamentos; y CD3 anti-humano de rata (1:50) (Serotec) para CD3. Para BDNF, se usó el anticuerpo monoclonal anti-humano de pollo BDNF (1:100) (Promega, Madison, WI) con saponina al 0,05 %.

Tras enjuagarlas, se incubaron las secciones durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Cy3 anti-rata de burro (1:300) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) (tinción para CD3), Cy3 anti-pollo de burro (Jackson ImmunoResearch) (1:250) (tinción para BDNF) o Cy3 anti-conejo de burro (Jackson ImmunoResearch) (1:250) (tinción para GFAP y neurofilamentos). Para la tinción de IB4, las secciones se bloquearon durante 1 h con suero de caballo al 20 % y después se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con Cy2-IB4 (1:50) (Sigma-Aldrich). Todas las secciones se tiñeron con Hoechst (1:2000) (Molecular Probes-Invitrogen, Carlsbad, CA). Luego se prepararon para examinarlas con un microscopio óptico de fluorescencia Nikon E-600. Los resultados se analizaron mediante el recuento de las células (marcadas con CD3) en el sitio de la lesión, o mediante la determinación de la densidad (marcadas con IB4 o marcadas con BDNF), o mediante la medición de la superficie sin tefir (GFAP, neurofilamentos). Cada uno de los parámetros fue medido por un observador que desconocía el tratamiento recibido por los ratones.

Ejemplo 2(1). Las células progenitoras neuronales adultas requieren actividad inmune local para potenciar la recuperación motora

La hipótesis de trabajo del presente estudio fue que la respuesta inmune protectora generada en un sitio de lesión mediante la inmunización a base de linfocitos T crea un nicho que mantiene no solo la supervivencia celular, sino también la reparación tisular. Los presentes inventores sospechaban además que una respuesta inmune mediada por linfocitos T local podría atraer células aNPC administradas exógenamente y apoyar su contribución a la recuperación. Para ensayar dicha hipótesis, se vacunaron ratones C57B1/6J, inmediatamente después de la LME, con el péptido encefalitogénico pMOG 35-55 (SEC ID N°: 39) emulsionado en CFA que contenía *Mycobacterium tuberculosis* al 0,5 % (MOG/CFA), y 1 semana más tarde se les administraron células aNPC por vía intracerebroventricular (i.c.v.). Se compararon los ratones sometidos a este protocolo de tratamiento doble (MOG/CFA/aNPC) con un grupo de control de ratones que fueron inmunizados con el mismo péptido MOG emulsionado en el mismo adyuvante, pero sin trasplante de células aNPC, sino que recibieron PBS por inyección i.c.v. (MOG/CFA/PBS), o con los ratones que recibieron PBS y CFA (0,5 %) por inyección y el trasplante i.c.v. de células aNPC (PBS/CFA/aNPC) o un grupo de control de ratones que recibieron por inyección PBS/CFA y luego por inyección i.c.v. PBS (PBS/CFA/PBS). Para evaluar el resultado del comportamiento tras la LME, se usó la escala de valoración de puntuación motora Basso (BMS) (Engesser-Cesar *et al.*, 2005), en la que 0 indica una parálisis completa de las extremidades posteriores y 9 denota movilidad total. Las puntuaciones medias de recuperación motora (BMS) de los ratones que recibieron MOG/CFA/aNPC (4,21 ± 0,45; todos los valores son media ± ETM) fueron más altas que las de los ratones tratados con MOG/CFA/PBS. En los ratones tratados con PBS/CFA/aNPC, la recuperación no fue mejor que en los ratones de control tratados con PBS/CFA/PBS (1,5 ± 0,27). Una BMS de 4,21 indica un movimiento amplio del tobillo y la colocación plantar de la pata (tres animales mostraron, además, apoyo de peso ocasional y pasos plantares), mientras que una puntuación de 1,5 indica el movimiento del tobillo que varía de leve a muy amplio. Los ratones tratados con MOG/CFA/PBS tuvieron una puntuación de 2,71 ± 0,5, una puntuación significativamente mayor que la de los ratones de control tratados con PBS/CFA/aNPC (1,5 ± 0,4) o de ratones de control tratados con PBS/CFA/PBS (**Fig. 7A**). Estos resultados demostraron, por tanto, la interacción sinérgica entre las células aNPC administradas y la respuesta inmune a base de linfocitos T. El fracaso de las

células aNPC trasplantadas para mejorar la recuperación motora por sí mismas (es decir, en ausencia de inmunización con MOG/CFA) sugirió la necesidad de una respuesta inmune específica del sitio para la actividad de aNPC. La **Fig. 7B** muestra la puntuación BMS de ratones individuales de todos los grupos examinados el día 28 posterior a la lesión. Debido a que el trasplante de células aNPC en ausencia de inmunización no mejoró la recuperación de la LME, este grupo de control (PBS/CFA/aNPC) no se incluyó en los experimentos posteriores.

Los presentes inventores han demostrado anteriormente que el aumento de las cantidades de linfocitos T necesarios para promover la recuperación de la LME no requiere el uso de péptidos encefalitogénicos; los agonistas débiles de péptidos encefalitogénicos son igualmente eficaces y no tienen el riesgo de inducir EAE. Para ensayar si dicha vacunación "segura" se podía usar en combinación con el trasplante de células aNPC, se usó un ligando de péptido modificado derivado de MOG (pMOG 35-55 APL; péptido 45D, (SEC ID N°: 40), en el que el ácido aspártico se había reemplazado por serina. Los ratones fueron vacunados con el péptido 45D emulsionado en CFA que contenía *Mycobacterium tuberculosis* al 2,5 %. Una semana más tarde, se sometieron los ratones inmunizados a LME contusa, y después de otra semana, recibieron el trasplante i.c.v. de células aNPC. Se observó el aumento de la actividad motora (como se expresa por la puntuación BMS, media $\pm$ ETM) en estos ratones, en lugar de los ratones de control tratados i.c.v. con PBS/CFA/aNPC ($4,11 \pm 0,27$ frente a $1,94 \pm 0,22$; **Fig. 7C**). Sin trasplante de aNPC, la inmunización con el péptido 45D en CFA solo dio lugar a un ligero aumento de la recuperación motora en relación con el control tratado con PBS ($2,57 \pm 0,24$). La **Fig. 7D** muestra los valores BMS para ratones individuales el día 28 después de la lesión. Los hallazgos anteriores demostraron que la contribución de las células aNPC trasplantadas a la recuperación motora tras una LME contusa también podría verse potenciada por el uso de un agonista débil del péptido encefalitogénico.

Para determinar el fenotipo y la especificidad de los linfocitos T necesarios para la interacción sinérgica con células aNPC, se repitieron los experimentos anteriores usando diferentes protocolos de inmunización. El adyuvante incompleto de Freund (IFA), a diferencia del CFA, está exento de bacterias, y es conocido por provocar una respuesta de tipo Th2 hacia los péptidos encefalitogénicos. Se encontró que, aunque la inmunización con el análogo MOG (péptido 45D) emulsionado en IFA tuvo algún efecto beneficioso, no mostró sinergia con el posterior trasplante de células aNPC (BMS de $3,2 \pm 0,76$ para los ratones tratados con MOG/IFA/aNPC en comparación con $2,93 \pm 1,03$ para los ratones tratados con MOG/IFA/PBS, y $2,07 \pm 0,53$ en los ratones tratados con PBS/CFA/PBS; **Fig. 7E**). Estos hallazgos sugieren que para los ratones tratados con MOG/IFA/aNPC, los linfocitos T preferidos para la interacción sinérgica en el sitio de la lesión entre los linfocitos T vacunados y las células aNPC son los Th1.

Para verificar que se requiere la especificidad hacia los antígenos del SNC para obtenerse un efecto sinérgico de la vacunación y el trasplante de células madre, los ratones fueron inmunizados con la proteína ovoalbúmina no propia (OVA) emulsionada en CFA (que contenía *Mycobacterium tuberculosis* al 2,5 %), y 1 semana más tarde, recibieron por inyección i.c.v. células aNPC o PBS como control. La inmunización con OVA/CFA produjo un aumento leve, no significativo de la puntuación BMS, y la implantación de células aNPC no aumentó la puntuación BMS más ($2,43 \pm 1,78$ para los ratones tratados con OVA/CFA/aNPC en comparación con $2,2 \pm 0,68$ para los ratones tratados con OVA/CFA/PBS y $1,5 \pm 0,29$ para el grupo de control tratado con PBS/CFA/PBS, **Fig. 7F**). Tomando todos los resultados anteriores en conjunto, la ausencia de un efecto beneficioso después del trasplante de aNPC sugiere que la sinergia entre los linfocitos T y las células aNPC depende tanto de la especificidad antigénica como del fenotipo de los linfocitos T.

La activación inmune en el SNC lesionado, y concretamente, en la médula espinal, ha sido un foco importante de atención en la investigación en los últimos años (Schwartz y Hauben, 2002). En algunos de los estudios, las respuestas inmunes basadas en linfocitos T mostraron ser protectoras solo si su intensidad y duración estaban bien reguladas. Una inmunización demasiado potente produjo una actividad inmune excesiva, que neutralizó el beneficio potencial de la respuesta inmune de la médula espinal lesionada, teniendo incluso un efecto perjudicial. Se consideró la posibilidad de que si se dirigían células aNPC hacia el sitio de la lesión, podrían contrarrestar el efecto negativo de la actividad inmune excesiva, contribuyendo de esta manera a la recuperación. Por lo tanto, se propuso determinar si la administración de células aNPC podía contribuir a la recuperación funcional incluso en caso de que la actividad inmune local fuera excesiva. Una semana antes de la LME, se inmunizaron los ratones con péptido MOG 35-55 emulsionado en CFA que contenía *Mycobacterium tuberculosis* al 2,5 %. En las condiciones en las que la recuperación motora a partir de una LME fue peor tras la inmunización con MOG/CFA que tras la inyección con PBS/CFA (BMS de $0,35 \pm 0,2$ y $1,94 \pm 0,32$, respectivamente), se encontró que la recuperación se mejoró tras la administración de células aNPC (BMS de $2,68 \pm 0,51$; **Fig. 7G, 7H**). Por tanto, parece que la administración i.c.v. de células aNPC puede contribuir a la recuperación funcional de la LME, incluso cuando la respuesta inmune adaptativa local es perjudicial.

55 Ejemplo 2(2). La integridad tisular se correlaciona con la actividad inmune local

En un intento por comprender mejor el mecanismo que subyace a la aparente sinergia entre las células aNPC y las células inmunes residentes, se examinó si alguna de las células aNPC inyectadas encontraba su camino hacia la médula espinal lesionada. Se repitió el experimento mostrado en la Fig. 7A, usando células aNPC marcadas con GFP. La tinción con anticuerpos anti-GFP reveló células GFP⁺ en el parénquima de la médula espinal lesionada solo en los ratones que fueron tratados con MOG-CFA/aNPC (**Fig. 8**). Se pudieron observar células aNPC GFP⁺ rodeando el epicentro de la lesión y lateralmente en el parénquima medular adyacente a las meninges tan pronto

como 7 días después de la lesión (**Fig. 8A-8C**), pudiéndose detectar todavía tan tarde como 60 días después de la lesión, el último punto temporal examinado (**Fig. 8D-8F**).

Una de las características morfológicas que caracterizan a la recuperación de la LME es el tamaño de la lesión. Para delimitar el sitio de la lesión, se tiñeron secciones longitudinales de la médula espinal con anticuerpos frente a la proteína fibrilarmente ácida glial (GFAP). Se evaluó el tamaño de la lesión mediante la medición de las superficies que no se habían manchado con GFAP. Este análisis desveló que tan pronto como 7 días después del trasplante de células aNPC en las ratas vacunadas con MOG/CFA, el tamaño medio de la zona de la lesión era significativamente menor en los ratones que habían recibido tanto la vacunación como el trasplante de aNPC que en los ratones que solo habían sido vacunados o que solo habían recibido las células aNPC (**Fig. 9A, 9B**).

A continuación, se examinó si las diferencias observadas en el grado de recuperación se podían correlacionar con los cambios inmunológicos locales. Se tiñeron secciones de tejido de médula espinal con marcadores de linfocitos T (CD3) y de la acumulación de células microgliales/macrófagos activados (IB4) (**Fig. 9C-9F**). Todas las secciones también fueron teñidas con Hoechst como marcador nuclear. Los tejidos se extirparon 7 días después del trasplante de células. La tinción con IB4 reveló un menor número de células microgliales/macrófagos en los ratones que habían recibido el protocolo de tratamiento doble (pMOG 35-55 en CFA al 0,5 %) que en los otros grupos experimentales (**Fig. 9C, 9D**). El análisis cuantitativo reveló significativamente más linfocitos T CD3⁺ en las superficies que rodeaban el sitio de la lesión de los ratones que habían recibido el tratamiento doble que en los controles tratados con MOG/CFA/PBS o tratados con PBS/CFA/PBS. Cabe destacar que la inmunización con pMOG 35-55 encefalitogénico sin trasplante de aNPC solo produjo ligeramente más células CD3⁺ en el sitio de la lesión que en los controles (**Fig. 9E, 9F**). Parece, por tanto, que el trasplante de células aNPC moduló la respuesta inmune local en el sitio de la lesión.

Tanto los linfocitos T activados como las células microgliales activadas por linfocitos T pueden servir como fuentes de factores de crecimiento tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). La inmunorreactividad de BDNF fue más intensa en las médulas espinales de los ratones tratados con MOG/CFA/aNPC que en los otros grupos (**Fig. 10A**). La doble tinción con BDNF y IB4 mostró que la fuente celular de BDNF en el sitio de la lesión fue la población microglial/macrófagos (**Fig. 10B**).

Estudios recientes han demostrado que la nogina, un inhibidor de la proteína de la morfogénesis ósea (BMP), puede inducir la diferenciación neuronal de células aNPC en la médula espinal lesionada (Setoguchi *et al.*, 2004). Esta proteína también ha demostrado ser necesaria para proporcionar un entorno neurogénico en la zona subventricular. Por lo tanto, se ensayó la inmunorreactividad de la nogina en los diversos grupos experimentales, y está fue significativamente mayor en los ratones que habían recibido el protocolo de tratamiento doble, pero permaneció invariable mediante la inmunización con MOG sola y se redujo ligeramente en un trasplante de aNPC solo (**Fig. 10C**). Como en el caso del BDNF producido en el sitio de la lesión, la nogina también se localizó en las células IB4⁺ (**Fig. 10D**).

Ejemplo 2(3). Diferenciación local de células madre endógenas

Los resultados anteriores plantearon una cuestión importante: ¿Puede una vacuna a base de linfocitos T, cuando se administra en combinación con el trasplante de aNPC, crear las condiciones favorables para la diferenciación neuronal de células aNPC endógenas o exógenas? Para examinar esta posibilidad, se repitió el experimento descrito en la **Fig. 7**, a la vez que también se inyectó el marcador de la proliferación celular BrdU dos veces al día durante 3 días, comenzando el día 7 después del trasplante de aNPC (es decir, 14 días después de la LME). La tinción con BrdU y el marcador de la diferenciación temprana doblecortina (DCX) 7 días después de la última inyección de BrdU desveló significativamente más neuronas recién formadas en los ratones que habían recibido el tratamiento doble (**Fig. 11A-11E**). La **Fig. 11B** demuestra la distribución de células DCX⁺ en el entorno/en las proximidades del sitio de la lesión. La tinción con la combinación de BrdU y GFP, y de GFP y DCX no reveló prácticamente células doble positivas, lo que indica que la mayoría de las células DCX⁺ de la médula espinal lesionada procedían de células aNPC endógenas. Cabe señalar que la vacunación sin trasplante de aNPC no aumentó la formación de nuevas neuronas en la médula espinal lesionada.

Ejemplo 2(4). La interacción de las células progenitoras neuronales adultas y linfocitos T *in vitro*

Los resultados anteriores indicaron que se estaba produciendo la comunicación entre las células inmunes y las células aNPC en el sitio de la lesión. Anteriormente, en el presente documento, se ha demostrado que las células microgliales previamente activadas con citocinas asociadas con Th1 y Th2, IFN- γ e IL-4, respectivamente, pueden inducir la diferenciación neuronal a partir de las células aNPC. Por lo tanto, los presentes inventores han tratado de determinar si la interacción directa entre las células aNPC y los linfocitos T también se traduciría en un patrón alterado de diferenciación de aNPC. Para abordar esta cuestión, se activaron linfocitos T CD4⁺ *in vitro* mediante un protocolo conocido (con anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD28 e IL-2) durante 24 h y después se permitió su activación para continuar en cultivos conjuntos con células aNPC en un sistema de cultivo de transpocillos. Como controles, se usaron cultivos de células aNPC solas (en presencia de anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD28 e IL-2) o células aNPC cultivadas con linfocitos T CD4⁺ en un estado de reposo (suplementados solamente con IL-2). Después de 5 días en cultivo, se fijaron las células aNPC de la cámara inferior y se analizó la aparición de neuronas

recién formadas. La tinción con el marcador neuronal temprano β -III-tubulina reveló un efecto espectacular de los linfocitos T sobre la diferenciación neuronal (**Fig. 12A**). En comparación con los cultivos de control de células aNPC solas, en los que solo aproximadamente el 7 % de las células fueron positivas en β -III-tubulina, aproximadamente el 90 % de las células expresó β -III-tubulina en los cultivos conjuntos de células aNPC con linfocitos T activados (**Fig. 12A, 12B**). Cabe señalar que la tinción con β -III-tubulina mostró un aumento del triple (18 %) con respecto al control en cultivos conjuntos de células aNPC con linfocitos T no activados. Por lo tanto, parece que los linfocitos T inducen la diferenciación neuronal a través de un factor soluble. La **Fig. 12B** muestra imágenes representativas de cultivos teñidos con β -III tubulina de células aNPC solas (control) o de cultivos conjuntos con linfocitos T activados. Estos hallazgos implican que los factores solubles derivados de linfocitos T podrían dar lugar a una de las vías de la diferenciación neuronal.

Para excluir la posibilidad de que los linfocitos T hubieran afectado a la diferenciación de las NPC como consecuencia de encontrarse con compuestos derivados de NPC, y para fundamentar aún más los presentes hallazgos de que el efecto observado se debía a las sustancias solubles derivadas de linfocitos T, se permitió la diferenciación de las células aNPC en presencia de medio acondicionado por linfocitos T activados. Después de 5 días, la tinción de estos cultivos con β -III-tubulina reveló resultados similares a los obtenidos en el sistema de cultivo conjunto (**Fig. 12C**), lo que confirma que la diferenciación neuronal fue inducida por linfocitos T en reposo y, aún más, por los linfocitos T activados. Además de su efecto sobre el número de células en diferenciación, los factores solubles derivados de linfocitos T también afectaron, como es evidente, a la morfología celular, como se manifiesta en las fibras marcadas con β -III-tubulina ramificadas, en alargamiento (**Fig. 12D**).

A continuación, se trató de determinar si la neurogénesis inducida por linfocitos T estaba mediada por citocinas secretadas por linfocitos T activados. Se cultivaron células aNPC en presencia de diferentes concentraciones de las citocinas derivadas de los linfocitos T características de IFN- γ e IL-4. El análisis reveló que IFN- γ , a concentraciones tan bajas como de 1 ng/ml, pudo inducir un aumento en la expresión de β -III-tubulina después de 5 días en cultivo (**Fig. 12E**). En los experimentos descritos en el presente documento, se encontró que la exposición breve a IFN- γ (24 h) no fue suficiente para lograr dicho efecto. Cabe señalar, sin embargo, que la morfología de las células que expresaron β -III-tubulina en cultivos suplementados con IFN- γ estaba menos desarrollada que la observada en las células aNPC cultivadas con linfocitos T activados o en el medio acondicionado con linfocitos T. Al contrario del efecto de IFN- γ , no se observó ningún cambio en la expresión de β -III-tubulina en las células aNPC tratadas con IL-4.

Estos hallazgos sugieren que el IFN- γ , a diferencia de la IL-4, podía explicar en parte la neurogénesis inducida por los linfocitos T. No obstante, incluso el efecto de IFN- γ , fue limitado con respecto al de los linfocitos T o los factores solubles derivados de linfocitos T. El análisis de PCR de la expresión del receptor-1 del IFN- γ en células aNPC desveló que este receptor fue expresado por las células aNPC en todas las condiciones examinadas en el presente documento (datos no mostrados).

La activación de la vía de Notch es esencial para el mantenimiento de las células aNPC, y el bloqueo de esta vía y sus factores de transcripción secuencia abajo de la familia de genes Hes subyacen a los primeros hechos de la diferenciación neuronal. Para determinar si la diferenciación neuronal mediada por linfocitos T induce cambios en la señalización de Notch, se buscaron posibles cambios en la expresión de los genes Hes en las células aNPC tras su interacción con sustancias derivadas de linfocitos T. La PCR en tiempo real reveló que, en comparación con los cultivos de control, las células aNPC cultivadas durante 24 h en presencia de medio acondicionado con linfocitos T sufrieron una reducción de cinco veces de la expresión de Hes-5 (**Fig. 12F**). Por lo tanto, la diferenciación inducida por los linfocitos T parece implicar la inhibición de la vía de Notch. La expresión de Notch 1-4 por células aNPC no se modificó en presencia de medio acondicionado con linfocitos T, lo que indica que la inhibición no se pudo atribuir a cambios en la expresión de Notch (datos no mostrados).

La observación de los presentes inventores de que las células aNPC expresan un receptor de IFN- γ , tomada junto con estudios recientes que muestran que estas células expresan moléculas relacionadas con la inmunidad tales como B-7 (Imitola *et al.*, 2004b) y CD44 (Pluchino *et al.*, 2003), que se sabe que participan en el diálogo entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno (APC), les llevó a examinar si las células aNPC podían afectar a la función de los linfocitos T. En primer lugar, se examinaron los efectos de las células aNPC sobre la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ mediante el ensayo de la incorporación de [³H]timidina por los linfocitos T. El cultivo conjunto de linfocitos T con células aNPC y APC (esplenocitos irradiados letalmente) durante 3 días generó una importante inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de los linfocitos T (**Fig. 13A**). Es importante tener en cuenta que, en estas condiciones, solo hubo una proliferación limitada de células aNPC. Para determinar si el efecto inhibidor sobre la proliferación de linfocitos T está mediado por un factor soluble o requiere el contacto célula-célula, se usó el sistema de transpocillos, sembrando las células aNPC en el pocillo superior. El cultivo conjunto de los linfocitos T y las células aNPC en el mismo pocillo produjo una reducción del doble en la proliferación de los linfocitos T, pero este efecto se redujo cuando las dos poblaciones de células se separaron en el transpocillo. Por lo tanto, parece que el contacto célula-célula es necesario para que las células aNPC inhiban la proliferación de los linfocitos T. Para determinar si las células aNPC podían afectar a la producción de citocinas por los linfocitos T, se midieron las concentraciones de seis citocinas inflamatorias en los medios de células aNPC y linfocitos T cultivados conjuntamente. Las concentraciones de IL-12, IFN- γ y TNF- α fueron similares en los cultivos de linfocitos T con y sin

células aNPC, pero la concentración de IL-10 se aumentó ligeramente (40 %) en el cultivo conjunto. En relación con los cultivos de linfocitos T solos, la concentración de IL-6 fue dos veces superior en el cultivo conjunto con células aNPC, y se observó una diferencia notable en la concentración de MCP-1, que fue superior en dos órdenes de magnitud en el cultivo conjunto (**Fig. 13C**). Tomados conjuntamente, estos resultados indican que las células aNPC pueden actuar directamente sobre los linfocitos T, inhibiendo su actividad proliferativa y cambiando su perfil de producción de citocinas/quimiocinas.

Discusión

La interacción local entre las células inmunes y las células aNPC subyace a la recuperación funcional. En el presente estudio, se combinaron las dos metodologías terapéuticas diferentes para las LME: vacunación a base de linfocitos T y trasplante de células progenitoras neuronales en el LCR. Cada una de estas metodologías ha demostrado ser potencialmente capaz de promover la recuperación funcional de las LME. Se muestra en el presente documento que cuando se combinan, funcionan en sinergia. Los presentes experimentos, tanto *in vivo* como *in vitro*, demostraron que se puede producir la comunicación entre las células inmunes y las células aNPC en el sitio de la lesión. La vacuna provoca una respuesta inmune local, que, si está bien controlada, proporciona los elementos celulares y moleculares necesarios para atenuar la degeneración y promover la reparación. La misma respuesta también desempeña un papel en el reclutamiento de células aNPC en el sitio de la lesión y en la creación de compartimentos de tipo nicho que apoyan la neurogénesis de las células aNPC endógenas. Se encontró que la interacción entre las células aNPC y las células inmunes era recíproca: las células aNPC podían modular la actividad inmune posterior a la lesión, garantizando la recuperación funcional incluso en condiciones de actividad inmune excesiva (que, en ausencia de células aNPC, tiene un efecto perjudicial en la recuperación).

Ejemplo 3

La vacunación a base de linfocitos T reestablece la cognición, elimina las placas e induce la neurogénesis en un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer

La acumulación de deposición β -amiloide ($A\beta$), la pérdida neuronal, el deterioro cognitivo y la activación microglial son rasgos característicos de la enfermedad de Alzheimer (EA). Usando ratones doble transgénicos con EA que expresaban genes humanos mutantes que codificaban la presenilina 1 y la proteína precursora amiloide de ratón/humana quimérica, se mostró que la vacunación con acetato de glatiramero previno y restauró el deterioro cognitivo, evaluado por el rendimiento en un laberinto de agua de Morris (MWM). La activación microglial modulada por vacunación eliminó la formación de placa e indujo la supervivencia neuronal y la neurogénesis. *In vitro*, las células microgliales activadas por $A\beta$ impidieron la neurogénesis de células madre/progenitoras neuronales adultas. Esto fue contrarrestado por la IL-4, y más aún al añadir $IFN\gamma$, pero no con $IFN\gamma$ solo.

Materiales y procedimientos

(xix) Animales. Se adquirieron diecinueve ratones APP_{K670N, M671L} + PS1 _{Δ E9} doble transgénicos adultos, de la cepa B6C3-Tg (APP_{swe}, PSEN1 Δ E9) 85Dbo/J en el Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME), y se criaron y mantuvieron en el Centro de Cría de Animales del Instituto de Ciencias Weizmann. Todos los animales fueron tratados conforme a las normas formuladas por el Comité de Cuidado y Uso de Animales del Instituto Weizmann. Los ratones Tg con EA se produjeron mediante la inyección conjunta de los vectores APP_{swe} de ratón/humano quimérico (APP695 [dominio $A\beta$ humanizado] que portaba la mutación sueca [K594M/N595L]) y PS1 Δ E9 humano (deleción del exón 9) controlados por los elementos del promotor de la proteína priónica de ratón independiente (MoPrP), como se describe (Borchelt *et al.*, 1997).

(xx) Reactivos. Se obtuvieron $IFN\gamma$ e IL-4 de ratón recombinantes (ambos conteniendo endotoxina a una concentración inferior a 0,1 ng/ μ g de citocina) en R & D Systems (Minneapolis, MN). Los péptidos β -amiloides [fragmento de proteína amiloide 1-40 y 1-42 ($A\beta_{1-40/1-42}$)] fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Los péptidos $A\beta$ se disolvieron en agua exenta de endotoxina, y se formaron agregados de $A\beta$ mediante la incubación de $A\beta$, como se describe (Ishii *et al.*, 2000).

(xxi) Genotipado. Todos los ratones usados en este experimento fueron genotipados para la presencia de los transgenes mediante amplificación por PCR de ADN genómico extraído de recortes de la cola de 1 cm (Jankowsky *et al.*, 2004). Las reacciones contenían cuatro cebadores: una secuencia coincidente con el cebador anti-sentido dentro del vector que también está presente en el PrP genómico de ratón (5'-GTG GAT ACC CCC TCC CCC AGC CTAGAC C) (SEC ID N°: 41); un segundo cebador sentido específico para la región genómica de codificación de PrP (que se eliminó del vector MoPrP) (5'-CCT CTT TGT GAC TAT GTG GAC TGA TGT CGG) (SEC ID N°: 42); y dos cebadores sentido y anti-sentido específicos del ADNc de transgén PS1 (-a PSI: 5'-AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA (SEC ID N°: 43), y PSL-b: 5'-GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT) (SEC ID N°: 44). Todas las reacciones dieron un producto de 750 pb del gen PrP endógeno como un control para la integridad y la amplificación correcta del ADN. Muestras positivas en el transgén PS1 tienen una banda adicional de aproximadamente 608 pb.

(xxii) Vacunación con acetato de glatiramero. Cada ratón recibió por inyección subcutánea cinco veces un total de 100 μ g de acetato de glatiramero (GA (TV-5010), PM: 13,5-18,5 kDa, media de 16 kDa, Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Petach Tikva, Israel), emulsionado en 200 μ l de PBSxI, desde el primer día

experimental 0 hasta el día 24, dos veces durante la primera semana y una vez a la semana a partir de entonces.

(xxiii) Ensayo de comportamiento. Se ensayó el aprendizaje/la memoria espacial mediante el rendimiento en una tarea de aprendizaje viso-espacial dependiente del hipocampo en el laberinto de agua de Morris (MWM) (Morris, 1984). Los ratones fueron sometidos a cuatro ensayos al día en 4 días consecutivos, durante los cuales fueron obligados a encontrar una plataforma escondida situada 1,5 cm por debajo de la superficie de agua de una piscina de 1,4 m de diámetro. Dentro de la sala de ensayo, solo había señales viso-espaciales distales para la ubicación de la plataforma sumergida. Se registró la latencia de escape, es decir, el tiempo requerido por el ratón para encontrar la plataforma y trepar a ella, para un máximo de 60 s. A cada ratón se le dejó permanecer en la plataforma durante 30 s y luego fue trasladado desde el laberinto a su jaula. Cuando el ratón no encontró la plataforma en el transcurso de 60 s, se colocó manualmente en la plataforma y se devolvió a su jaula después de 30 s. El intervalo entre ensayos fue de 300 s. El día 5, se retiró la plataforma de la piscina y se probó cada ratón mediante un ensayo de sonda durante 60 s. En los días 6 y 7, se colocó la plataforma en el cuadrante opuesto a la ubicación elegida los días 1-4, y se volvieron a probar los ratones en cuatro sesiones al día. Los datos se registraron usando un sistema de seguimiento automatizado EthoVision (Noldus).

(xxiv) Administración de BrdU y preparación de tejido. Se disolvió BrdU por sonicación en PBS y se inyectó i.p. en cada ratón (50 mg/kg de peso corporal; 1,25 mg de BrdU en 200 µl de PBS x 1). A partir del día 22 del experimento, después de la primera vacunación con GA, se inyectó BrdU i.p. dos veces al día, cada 12 h durante 2,5 días, para marcar las células proliferantes. Tres semanas después de la primera inyección de BrdU, los ratones fueron profundamente anestesiados y perfundidos transcardialmente, primero con PBS y después con paraformaldehído al 4 %. Se extirpó todo el cerebro, posteriormente, se fijó durante una noche, y luego se equilibró en sacarosa al 30 % tamponada con fosfato. Se recogieron secciones de 30 µm que flotaban libremente en un micrótopo de congelación (Leica SM2000R) y se almacenaron a 4 °C antes de la inmunohistoquímica.

(xxv) Cultivo de células progenitoras neuronales. Se obtuvieron secciones coronales (2 mm de espesor) de tejido que contenía la zona subventricular del ventrículo lateral de los cerebros de ratones C57B1/6J adultos. Se picó el tejido y después se incubó para la digestión a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 45 min en solución salina equilibrada de Earle que contenía 0,94 mg/ml de papaína (Worthington, Lakewood, NJ) y 0,18 mg/ml de L-cisteína y EDTA. Tras la centrifugación a 110 xg durante 15 min a temperatura ambiente, se disoció el tejido mecánicamente por trituración con pipeta. Se sembraron las células obtenidas de suspensiones de una sola célula (3.500 células/cm²) en matraces de cultivo de tejidos Falcon de 75 cm² (BD Biosciences, San Diego, CA), en medio de cultivo de NPC [medio de Eagles modificado por Dulbecco (DMEM)/medio F12 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía L-glutamina 2 mM, glucosa al 0,6 %, 9,6 µg/ml de putrescina, 6,3 ng/ml de progesterona, 5,2 ng/ml de selenito de sodio, 0,02 mg/ml de insulina, 0,1 mg/ml de transferrina, 2 µg/ml de heparina (todos de Sigma-Aldrich, Rehovot, Israel), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (recombinante humano, 20 ng/ml) y factor de crecimiento epidérmico (recombinante humano, 20 ng/ml; ambos de Peprotech, Rocky Hill, NJ)]. Se hicieron pasar esferas cada 4-6 días y se volvieron a sembrar como células individuales. Las NPC que expresaban la proteína verde fluorescente (GFP) se obtuvieron como se ha descrito previamente (Pluchino *et al.*, 2003).

(xxvi) Cultivo microglial primario. Se despojaron los cerebros de ratones C57B1/6J recién nacidos (P0-P1) de sus meninges y se picaron con tijeras bajo un microscopio de disección (Zeiss, Stemi DV4, Alemania) en medio Leibovitz-15 (Biological Industries, Beit Ha-Emek, Israel). Después de la tripsinización (tripsina al 0,5 %, 10 min, 37 °C/CO₂ al 5 %), se trituró el tejido. Se lavó la suspensión de células en medio de cultivo para células gliales [DMEM suplementado con suero de ternera fetal al 10 % (FCS; Sigma-Aldrich, Rehovot), L-glutamina (1 mM), piruvato de sodio (1 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 mg/ml)] y se cultivó a 37 °C/CO₂ al 5 % en matraces de cultivo de tejidos Falcon de 75 cm² (BD Biosciences) recubiertos con poli-D-lisina (PDL) (10 mg/ml; Sigma-Aldrich, Rehovot) en tampón de borato (2,37 g de borato y 1,55 g de ácido bórico disueltos en 500 ml de agua estéril, pH 8,4) durante 1 h, después se aclararon a fondo con agua estéril, destilada en vidrio. Tras 6 h de cultivo, se cambió la mitad del medio y, a partir de entonces, cada dos días, comenzando el día 2, para un tiempo de cultivo total de 10 a 14 días. Se separaron las células microgliales por agitación de los cultivos mixtos primarios de células gliales del cerebro (150 rpm, 37 °C, 6 h) con rendimientos máximos entre los días 10 y 14, se sembraron (10⁵ células/ml) sobre placas de 24 pocillos pretratadas con PDL (1 ml/pocillo; Corning) y se cultivaron en medio de cultivo para las células microgliales [medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con FCS al 10 %, L-glutamina (1 mM), piruvato de sodio (1 mM), β-mercaptoetanol (50 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 mg/ml)]. Las células se dejaron adherir a la superficie de un matraz de cultivo recubierto de PDL (30 min, 37 °C/CO₂ al 5 %) y se enjuagaron las células no adherentes.

(xxvii) Cultivo conjunto de células progenitoras neuronales de ratón y células microgliales de ratón. Se lavaron los cultivos de células microgliales tratadas o no tratadas dos veces con medio de diferenciación de NPC recién preparado (igual que el medio de cultivo para las NPC, pero sin factores de crecimiento y con FCS al 2,5 %) para eliminar todos los rastros de reactivos ensayados, a continuación, se incubaron en hielo durante 15 min y se agitaron a 350 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. Se retiraron las células microgliales de los matraces y se cultivaron de inmediato (5 x 10⁴ células/pocillo) con NPC (5 x 10⁴ células/pocillo) durante 10 días en portaobjetos recubiertos con MatrigelTM (BD Biosciences) en placas de 24 pocillos, en presencia de medio de diferenciación de NPC, con o sin insulina. A continuación, se fijaron los cultivos con paraformaldehído al 2,5 % en PBS durante 30 min a temperatura ambiente, y se tiñeron con marcadores neuronales y gliales.

(xxviii) Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica. Se lavaron los portaobjetos de los cultivos conjuntos de NPC y células microgliales de ratón con PBS, se fijaron como se ha descrito anteriormente, se trataron con una

solución de permeabilización/bloqueo que contenía FCS al 10 %, albúmina de suero bovino de 2 %, glicina al 1 % y Triton X-100 al 0,1 % (Sigma-Aldrich, Rehovot), y se tiñeron con una combinación anticuerpos del terminal C de la isoforma anti-tubulina- β -III del ratón (β -III-tubulina; 1:500; Chemicon, Temecula, CA) y CD11b (MAC1; 1:50; BD-Pharmingen, Franklin Lakes, NJ).

- 5 Para la tinción con BrdU, se lavaron las secciones con PBS y se incubaron en HCl 2 N a 37 °C durante 30 min. Se bloquearon las secciones durante 1 h con solución de bloqueo (PBS que contenía suero de caballo normal al 20 % y Triton X-100 al 0,1 %, o PBS que contenía reactivo de bloqueo de inmunoglobulina de ratón obtenido en Vector Laboratories (Burlingame, CA)).

- 10 Para la inmunohistoquímica, se trataron secciones de tejido con una solución de permeabilización/bloqueo que contenía FCS al 10 %, albúmina de suero bovino al 2 %, glicina al 1 % y Triton X-100 al 0,05 % (Sigma-Aldrich, St. Louis). Se tiñeron las secciones de tejido durante la noche a 4 °C con combinaciones específicas de los siguientes anticuerpos primarios: anti-BrdU de rata (1:200; Oxford Biotechnology, Kidlington, Oxfordshire, RU), anti-DCX de cabra [doblecortina] (1:400; Santa Cruz Biotechnology), y anti-NeuN de ratón [proteína nuclear neuronal] (1:200; Chemicon, Temecula, CA). Los anticuerpos secundarios fueron anti-cabra de burro conjugado con FITC, anti-ratón de burro conjugado con Cy-3, y anti-rata de burro conjugado con Cy-3 o Cy-5 (1:200; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Para marcar las células microgliales, se usó bien CD11b (MAC1; 1:50; BD-Pharmingen) o isoelectina B4 de *Bandeiraea simplicifolia* conjugada con FITC (IB4, 1:50; Sigma-Aldrich, Rehovot). Para detectar la expresión de las proteínas MHC-II de la superficie celular, se usaron anticuerpos anti-MHC-II (rata, clon IBL-5/22; 1:50; Chemicon, Temecula, CA). Para detectar la expresión de A β humano, se usó anti-A β (restos de aminoácidos humanos 1-17) (ratón, clon 6E10, Chemicon, Temecula, CA). La expresión de IGF-I se detectó mediante anticuerpos anti-IGF-I de cabra (1:20; R & D Systems). La expresión de TNF- α se detectó mediante anticuerpos anti-TNF- α de cabra (1:100; R & D Systems). Los linfocitos T se detectaron con anticuerpos policlonales anti-CD3 (conejo, 1:100; DakoCytomation, CA). Se usó yoduro de propidio (1 μ g/ml; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) para la tinción nuclear.

- 25 Se usaron secciones de control (no tratadas con el anticuerpo primario) para distinguir la tinción específica de la tinción de anticuerpos inespecíficos o componentes autofluorescentes. A continuación, se lavaron las secciones con PBS y se colocaron en portaobjetos en alcohol polivinílico con diazabicio-octano como agente anti-decoloración.

- 30 **(xxix) Cuantificación y procedimiento de recuento estereológico.** Para el análisis microscópico, se usó un microscopio de barrido láser confocal Zeiss LSM 510 (40 aumentos). Para los experimentos *in vitro*, se rastrearon campos de 0,053 mm² (n = 8-16 de al menos dos portaobjetos diferentes) para cada grupo experimental. Para cada marcador, se tomaron muestras de 500-1.000 células. Se contaron las células que expresaron conjuntamente GFP y β -III-tubulina.

- 35 Para los experimentos *in vivo*, se contó el número de placas A β ⁺ y células microgliales CD11b⁺/IB-4⁺ en el hipocampo a intervalos de 300 μ m de 6-8 secciones coronales (30 μ m) de cada ratón. Se evaluó la neurogénesis en el GD mediante el recuento de neuronas prematuras (DCX⁺), células proliferantes (BrdU⁺) y neuronas maduras recién formadas (BrdU⁺/NeuN⁺) en seis secciones coronales (30 μ m) de cada ratón. Se analizó la especificidad de la expresión conjunta de BrdU⁺/NeuN⁺ usando el microscopio confocal (LSM 510) en secciones ópticas a intervalos de 1 μ m. Se evaluaron automáticamente los recuentos celulares, números de placas A β ⁺, superficies de las placas e intensidad de la tinción de NeuN por unidad de superficie en el GD usando el programa informático Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics).

- 45 **(xxx) Análisis estadístico.** Se analizaron las puntuaciones de comportamiento en el MWM usando ANOVA de 3 vías, con el grupo de tratamiento y el bloque de ensayo como fuentes de variación, y se usaron para evaluar la significación de las diferencias entre las puntuaciones medias durante la prueba de adquisición blocksin MWM. Cuando el valor de *P* obtenido fue significativo, se realizó un ensayo de comparación múltiple de diferencia significativa mínima de Fisher por pares para determinar qué grupos eran significativamente diferentes.

Los resultados *in vitro* se analizaron mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer (ANOVA) y se expresaron como las medias $\pm$ ETM. Los resultados *in vivo* se analizaron mediante la prueba de t de Student o ANOVA de 1 vía, y se expresaron como las medias $\pm$ ETM.

Ejemplo 3(1). La vacunación a base de linfocitos T contrarresta el deterioro cognitivo en la EA

- 50 Se examinó el efecto del GA en ratones doble transgénicos con EA (ratones Tg) que expresaban un gen de presenilina 1 humano mutante (PS1dE9) y una proteína precursora amiloide de ratón/humana quimérica (APPswe), que condujo al deterioro del aprendizaje/de la memoria y a la acumulación de placas A β principalmente en la corteza y en el hipocampo, dos rasgos característicos de la aparición temprana de la EA familiar (Borchelt *et al.*, 1997). La expresión de ambos transgenes en cada ratón se verificó mediante amplificación por PCR de ADN genómico. A continuación, se vacunaron ratones Tg APP/PS1 de aproximadamente 8 meses de vida por vía subcutánea con GA (n = 6) dos veces durante la primera semana y una vez a la semana a partir de entonces. Los ratones Tg de la misma edad (n = 7) y los compañeros de camada no Tg que no portaban los transgenes (n = 6), no fueron tratados y sirvieron como controles Tg sin tratamiento y no Tg de tipo natural, respectivamente. Cinco semanas después de

la primera inyección de GA, se evaluaron todos los ratones en un laberinto de agua de Morris (MWM) en cuanto a la actividad cognitiva, como se refleja en el rendimiento de una tarea de aprendizaje/memoria espacial dependiente del hipocampo (revisado en van Praag *et al.*, 2000). El rendimiento en el MWM de los ratones Tg no tratados fue significativamente peor, como media, que el de los compañeros de camada no Tg de la misma edad (**Fig. 14**). Sin embargo, el rendimiento de los ratones Tg que fueron vacunados con GA fue superior al de los ratones Tg no tratados, y no difirió significativamente del de sus compañeros de camada no Tg (**Fig. 14**), lo que sugiere que la vacunación con GA había prevenido una mayor pérdida cognitiva e incluso revertido parte del déficit funcional antes. Las pérdidas o mejoras cognitivas se manifestaron tanto en las tareas de adquisición como en las tareas de inversión (**Fig. 14A-14C**).

Ejemplo 3(2). La vacunación a base de linfocitos T modula la actividad inmune de las células microgliales, elimina la formación de placa β -amiloide, apoya la supervivencia neuronal e induce la neurogénesis

Los resultados anteriores llevaron a los presentes inventores a examinar la posibilidad de que la detención y la inversión observadas de la pérdida cognitiva estuvieran relacionadas con la reducción de placas A β y la supervivencia de las neuronas en el hipocampo. La tinción de criosecciones de cerebro de ratones Tg con anticuerpos específicos de A β humano reveló numerosas placas en los ratones Tg sin tratamiento, pero muy pocas en los vacunados con GA (**Fig. 15A**). No se observaron placas en sus respectivos compañeros de camada no Tg (**Fig. 15A**). El examen de la inmunorreactividad de NeuN reveló la pérdida de neuronas en los ratones Tg no tratados, pero la preservación de las neuronas en los ratones Tg vacunados con GA (**Fig. 15A**).

Se sabe que las células microgliales activadas desempeñan un papel en la patogénesis de la EA. En los ejemplos anteriores del presente documento se ha mostrado que, a diferencia de las células microgliales vistas en asociación con las enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas, las células microgliales asociadas con la supervivencia del tejido neuronal expresan MHC-II, producen IGF-I y expresan poco o nada de TNF- α . Por lo tanto, se examinaron secciones del cerebro de ratones Tg vacunados con GA y no tratados para determinar la presencia de células microgliales teñidas positivamente para CD11b o TNF- α (marcadores de la activación asociada con un fenotipo inflamatorio citotóxico). Se encontró que la presencia de placas se correlaciona con la aparición de células microgliales CD11b⁺ (**Fig. 15B**) que expresan TNF- α (**Fig. 15C** y la película S1 (preparada por los inventores, pero que no se muestra en el presente documento), que representa una reconstrucción tridimensional de una placa A β y células microgliales CD11b⁺ que expresan TNF- α . Esta película presenta una imagen confocal tridimensional representativa de una célula microglial embebida dentro de una placa A β en el hipocampo de un ratón Tg sin tratamiento, que se muestra en la Fig. 15C, en la que cabe destacar la alta inmunorreactividad de TNF- α y el A β envuelto en el citoplasma), y fue abundante en los ratones Tg no tratados. Se detectó un número significativamente inferior de células microgliales CD11b⁺ en los ratones Tg vacunados con GA (**Fig. 15B**). La tinción con anticuerpos anti-MHC-II desveló que, en los ratones Tg no tratados, casi ninguna célula microglial expresó MHC-II (indicando su incapacidad para actuar como APC; datos no mostrados), mientras que en los ratones Tg vacunados con GA, la mayoría de las células microgliales adyacentes a placas A β ⁺ residuales expresó MHC-II, y casi ninguna de ellas expresó TNF- α (**Fig. 15D** y la película S2 (preparada por los inventores, pero no mostrada en el presente documento) que representa la reconstrucción tridimensional de una inmunorreactividad de A β asociada con células microgliales MHC-II⁺ en un ratón Tg vacunado con GA. Esta película también muestra una imagen confocal tridimensional representativa de células microgliales mostradas en la Fig. 15D, que expresan niveles marginales de TNF- α y altos niveles de MHC-II). Estas últimas células microgliales también expresaron IGF-I (**Fig. 15E** y la película S3 (preparada por los inventores, pero que no se muestra en el presente documento) que representa una reconstrucción tridimensional de una célula microglial que expresa conjuntamente IGF-1 y MHC-II⁺. Esta película muestra una imagen confocal tridimensional representativa de células microgliales MHC-II⁺ del ratón Tg vacunado con GA que expresa IGF-I que se muestra en la **Fig. 15E**), lo que indica su potencial para promover la neuroprotección y la neurogénesis, y para afectar beneficiosamente al aprendizaje y a la memoria. Todas las células MHC-II⁺ se marcaron conjuntamente con IB4, identificándolas como células microgliales (datos no mostrados). Es importante señalar que las células microgliales CD11b⁺ (observadas principalmente en los ratones Tg no tratados) mostraron relativamente pocos procesos ramificados, mientras que dichos procesos fueron abundantes en las células microgliales MHC-II⁺ en los ratones Tg vacunados con GA, dándoles un aspecto de arbusto (representado en las películas S1 y S2, que no se muestran).

Además, a diferencia de los ratones Tg no tratados, en los ratones Tg vacunados con GA, se observaron numerosos linfocitos T (identificados por anticuerpos anti-CD3) en las proximidades de las células microgliales MHC-II⁺. Cualquier inmunorreactividad con A β observada en estos ratones parecía estar asociada con las células microgliales MHC-II⁺, creando una sinapsis inmune con los linfocitos T CD3⁺ (**Fig. 15F** y Película S4 (preparada por los inventores, pero que no se muestra en el presente documento), que representa una reconstrucción tridimensional de una placa A β asociada con células CD3⁺ (linfocitos T) en las proximidades de células microgliales MHC-II⁺. Esta película muestra una imagen confocal tridimensional representativa de células microgliales MHC-II⁺ del ratón Tg vacunado con GA mostrado en la **Fig. 15F**, con una sinapsis inmunológica entre una célula CD3⁺ y un complejo de MHC-II y A β).

El análisis cuantitativo confirmó que los ratones vacunados con GA mostraron significativamente menos placas que los ratones Tg no tratados cuando se examinaron 6 semanas más tarde (**Fig. 15G**), y que la superficie ocupada por

las placas fue significativamente menor que en sus homólogos no tratados de la misma edad (**Fig. 15H**). Además, los ratones Tg vacunados con GA mostraron significativamente menos células microgliales CD11b⁺ y una tinción significativamente más intensa para NeuN que sus correspondientes grupos de ratones Tg no tratados (**Fig. 15I, 15J**).

Dado que las células microgliales que expresan MHC-II también se asocian con la neurogénesis *in vitro*, se examinaron las mismas secciones en cuanto a la formación de nuevas neuronas en el giro dentado (GD) del hipocampo. Esto fue posible porque todos los ratones fueron inyectados con BrdU, un marcador de células proliferantes, 3 semanas antes de la extirpación del tejido. El análisis cuantitativo reveló significativamente más células BrdU⁺ en los ratones Tg vacunados con GA (**Fig. 16A**) que en sus homólogos no tratados. Además, en comparación con el número de neuronas maduras recién formadas (BrdU⁺/NeuN⁺) en sus respectivos compañeros de camada no Tg, los números fueron significativamente menores en el grupo de Tg sin tratamiento, pero fueron similares en el grupo vacunado, lo que indica que las neuronas habían sido al menos parcialmente restablecidas por la vacunación con GA (**Fig. 16B**). El análisis de las secciones correspondientes para la doblecortina (DCX), un marcador útil para analizar el número absoluto de neuronas prematuras recién generadas en el GD adulto, desveló que, en relación con los compañeros de camada no Tg, hubo significativamente menos células DCX⁺ en el GD de ratones Tg no tratados, y ligera pero significativamente más en los GD de ratones Tg vacunados con GA (**Fig. 16C**). Las micrografías confocales ilustran las diferencias en los números de células BrdU⁺/NeuN⁺ o de células DCX⁺ y sus procesos dendríticos entre compañeros de camada no Tg, ratones Tg no tratados y ratones Tg vacunados con GA (**Fig. 16D**). Los resultados mostraron que la neurogénesis fue, de hecho, más abundante en los ratones vacunados con GA que en los ratones Tg no tratados. Curiosamente, sin embargo, tanto en los ratones Tg no tratados como en los ratones Tg vacunados con GA, los procesos de neuronas teñidas DCX⁺ en la zona subgranular del GD fueron cortos, excepto en aquellos ratones vacunados con GA, en los que las células DCX⁺ se situaron junto a las células microgliales MHC-II⁺ (**Fig. 16E**).

Ejemplo 3(3). El β -amiloide agregado induce células microgliales para expresar un fenotipo que bloquea la neurogénesis, y el bloqueo es contrarrestado por la IL-4

Los resultados *in vivo* presentados anteriormente apuntan a una relación entre la neurogénesis detenida, el A β agregado y el fenotipo de las células microgliales activadas. Para determinar si las células microgliales activadas por A β agregado bloquea la neurogénesis, y si las citocinas derivadas de linfocitos T pueden contrarrestar el efecto inhibitorio, se cultivaron conjuntamente células NPC que expresaban GFP con células microgliales que habían sido incubadas previamente durante 48 h en su medio de crecimiento óptimo en presencia o ausencia de un péptido A β agregado 1-40/1-42 (A β _(1-40/1-42); 5 μ M) y posteriormente tratadas con IFN- γ (10 ng/ml), o con IL-4 (10 ng/ml) junto con IFN- γ (10 ng/ml), durante otras 48 h. A continuación, se retiraron por lavado los medios de crecimiento y los restos de citocinas, y se cultivó de nuevo conjuntamente cada una de las preparaciones microgliales tratadas con esferas de NPC disociadas sobre portaobjetos recubiertos con MatrigelTM en presencia de medio de diferenciación (**Fig. 17A**). La expresión de GFP por las NPC confirmó que cualquier neurona en diferenciación observada en los cultivos derivaba de las células NPC en lugar de derivar de la contaminación del cultivo microglial primario. Después de 10 días, se pudieron discernir las células NPC positivas en GFP que expresaban el marcador neuronal β -III-tubulina (β IIIT) (**Fig. 17B, 17C**). No se observaron células β IIIT⁺ en las células microgliales cultivadas sin células NPC. Se observaron significativamente menos células GFP⁺/ β IIIT⁺ en las células NPC de control cultivadas sin células microgliales (control). En los cultivos conjuntos de NPC con células microgliales activadas previamente por incubación con IFN- γ (10 ng/ml), sin embargo, el aumento del número de células GFP⁺/ β IIIT⁺ fue espectacular. Por el contrario, las células microgliales activadas por A β ₍₁₋₄₀₎ agregado (5 μ M) bloquearon la neurogénesis y redujeron el número de NPC. Este efecto negativo no fue mostrado por las células microgliales activadas por A β ₍₁₋₄₂₎ (5 μ M) (datos no mostrados). Curiosamente, la adición de IL-4 (10 ng/ml) a células microgliales previamente tratadas con A β ₍₁₋₄₀₎ agregado contrarrestaron parcialmente el efecto adverso del A β agregado en la supervivencia y la diferenciación de las NPC, con el resultado de que estas células microgliales fueron capaces de inducir a las células NPC a diferenciarse en neuronas (**Fig. 17D**). Por lo tanto, parece que A β ₍₁₋₄₀₎ agregado deterioró la capacidad de soportar la neurogénesis, y que su efecto pudo ser contrarrestado, en cierta medida, por IL-4, y más fuertemente, por la combinación de IL-4 e IFN- γ .

Discusión

En dicho estudio de ratones doble transgénicos APP/PS1 con EA que sufren un deterioro cognitivo y la acumulación de placas A β , una vacuna a base de linfocitos T, mediante la alteración del fenotipo microglial, mejoró el rendimiento cognitivo, redujo la formación de placa, rescató neuronas corticales y del hipocampo, e indujo la neurogénesis del hipocampo.

Ejemplo 4

Combinación de vacunación con acetato de glatiramero y células madre en un modelo animal de esclerosis lateral amiotrófica (ELA)**Materiales y procedimientos**

- 5 **(xxxix) Animales.** Los ratones transgénicos que sobreexpresan el alelo SOD1 mutante humano defectuoso que contiene el gen Gly93→Ala(G93A) (B6SJL-TgN (SOD1-G93A)1Gur (en el presente documento "ratones con ELA") se adquirieron en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EE.UU.).
- 10 **(xxxix) Inmunización.** Los ratones adultos fueron inmunizados con Cop-1, 100 µg en 200 µl PBS s.c.
- 15 **(xxxix) Cultivo de células progenitoras neuronales.** Se obtuvieron cultivos de células progenitoras neuronales adultas (aNPC) como se describe en los ejemplos anteriores.
- 20 **(xxxix) Inyección estereotáxica de células progenitoras neuronales.** Se anestesiaron los ratones una semana después de la primera inmunización y se colocaron en un dispositivo estereotáxico. Se dejó el cráneo al descubierto, y se mantuvo seco y limpio. Se identificó y se marcó el bregma. El punto de inyección designado estaba a una profundidad de 2 mm de la superficie del cerebro, 0,4 mm detrás del bregma, en el eje anteroposterior, y a 1,0 mm de la línea media. Se aplicaron células progenitoras neuronales con una jeringa Hamilton (5 x 10⁵ células en 3 µl, a una velocidad de 1 µl/min) y se cosió la piel sobre la herida.
- 25 **(xxxix) Disfunción motora.** La disfunción motora de los ratones se evaluó usando la tarea de la barra giratoria dos veces a la semana de 60 días de edad en adelante. Se colocaron los animales en una barra de aceleración horizontal [barra giratoria de aceleración (Jones y Roberts) para ratones 7650] y se registró el tiempo que le llevó a cada ratón caerse de la barra. Se realizaron tres ensayos en cada punto temporal para cada animal y se registró el tiempo más largo empleado. Se estableció un punto de tiempo de corte en 180 segundos, y los ratones que permanecieron en la barra durante al menos 180 segundos se consideraron asintomáticos. El inicio de los síntomas de la enfermedad se determinó como una reducción en el rendimiento de la barra giratoria entre puntos temporales semanales. Los animales fueron sacrificados por eutanasia, cuando ya no eran capaces de levantarse en el transcurso de 30 segundos de haber sido colocados de lado.

Ejemplo 4. Se trataron los animales con Cop-1 a partir del día 59: en las dos primeras semanas, Cop-1 dos veces a la semana, a partir de entonces, recibieron una inyección semanal de Cop-1. Las células madre fueron administradas en el LCR: 500.000 células (una sola inyección de células madre neuronales adultas).

- 30 El experimento se llevó a cabo con el fin de explorar si la administración de una combinación de vacunación con Cop-1 y células madre tiene un efecto beneficioso en un modelo de ratones de ELA (de aquí en adelante "ratones con ELA"). Con este fin, los ratones con ELA de 59 días de vida se trataron de la siguiente manera: grupo 1 (**Fig. 18**, Cop-1 + NPC), se inmunizaron 4 machos s.c. con 100 µg/200 µl de Cop-1/PBS dos veces a la semana durante 2 semanas (la primera inmunización fue a la edad de 59 días) y, tras ello, recibieron una inmunización por semana hasta la eutanasia. Con la tercera inmunización, los ratones recibieron 100.000 NPC^{GFP} i.c.v. (CSF) en el ventrículo cerebral derecho; grupo 2 (**Fig. 18**, Cop-1) se inmunizaron 5 machos con 100 µg/200 µl de Cop-1/PBS dos veces a la semana durante 2 semanas, y después recibieron una inmunización por semana hasta la eutanasia; grupo 3 (**Fig. 18**, control) se inmunizaron 5 machos con 200 µl de PBS dos veces a la semana durante 2 semanas y, tras ello, recibieron una inmunización por semana hasta la eutanasia.

- 40 Se pesaron los ratones de cada grupo (dos veces a la semana) y se examinaron de forma rutinaria los signos vitales y los signos de la disfunción motora. Los resultados obtenidos en la Fig. 18 muestran la probabilidad de supervivencia de cada grupo de ratones con ELA. Los resultados muestran que el tratamiento combinado de vacunación con Cop-1 y NPC produce un aumento de la supervivencia de los ratones con ELA.

Ejemplo 5

- 45 **Neurogénesis y neuroprotección inducidas por el tratamiento inmunomodulador periférico de EAE con acetato de glatiramero**

Materiales y procedimientos

- 50 **(xxxvi) Animales.** Se adquirieron ratones C57BL/6 en Harlan (Jerusalén, Israel). Los ratones transgénicos 2.2 con proteína amarilla fluorescente (YFP) (procedentes de híbridos de C57BL/6 y CBA), que expresan selectivamente la YFP en su población neuronal motora y sensorial (Feng *et al.*, 2000), fueron amablemente proporcionados por J. R. Sanes (Universidad de Washington St. Louis, MO). En todos los experimentos, se usaron ratones hembra de 8-10 semanas de vida.
- 55 **(xxxvii) EAE.** Se indujo la enfermedad mediante la inmunización con el péptido p35-55 de MOG de rata (SEC ID N°: 39), (Sigma, St. Louis, MO). Los ratones recibieron por inyección subcutánea en la ijada 200 µl de emulsión que contenían 300 µg de MOG en CFA y 500 µg de *Mycobacterium tuberculosis* inactivada por calor (Sigma). Se administró un refuerzo idéntico en la otra ijada una semana más tarde. Se inyectó la toxina *Pertussis* (Sigma), 300 µg/ratón, por vía intravenosa inmediatamente después de la primera inyección de MOG y 48 h más tarde. Los ratones se examinaron diariamente. La EAE se puntuó de la siguiente manera: 0, sin enfermedad; 1, cola

lacia; 2, parálisis de las extremidades posteriores; 3, parálisis de las cuatro extremidades; 4, estado moribundo; 5, muerte.

(xxxviii) Acetato de glatiramero (GA, Copaxone[®], Copolímero 1) consiste en sales de acetato de polipéptidos sintéticos que contienen cuatro aminoácidos: L-alanina, L-glutamato, L-lisina y L-tirosina. Se usó GA del lote 242990599, con un peso molecular medio de 7.300 kDa, obtenido en Teva Pharmaceutical Industries (Petach Tikva, Israel) durante todo el estudio. El tratamiento con GA fue aplicado mediante 5-8 inyecciones subcutáneas diarias consecutivas (2 mg/ratón) en diferentes etapas de la enfermedad [es decir, (1) comenzando inmediatamente después de la inducción de EAE (tratamiento preventivo); (2) comenzando tras la aparición de las manifestaciones de la enfermedad el día 20 (tratamiento de supresión); o (3) comenzando durante la fase crónica de 45 días posterior a la inducción (supresión retardada)].

(xxxix) BrdU. Se inyectó 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU, Sigma), un análogo de timidina que se incorpora al ADN de células en división, por vía intraperitoneal (50 mg/kg), bien simultáneamente con el tratamiento con GA (una vez al día), o inmediatamente después de finalizarse las inyecciones de GA (dos veces al día).

(xi) Perfusión. Se anestesiaron los animales profundamente con Nembutal y se perfundieron transcardialmente paraformaldehído al 2,5 %. Se extrajeron los cerebros, se fijaron posteriormente en paraformaldehído al 1 % y se crioprotegieron con solución de sacarosa al 15 % en PBS. Se cortaron coronal y sagitalmente las secciones que flotaban libremente (16 µm de espesor) con un micrótopo deslizante (Leica SM 2000r) a través de todo el cerebro y se recogieron en serie en PBS.

(xli) Inmunohistoquímica. Para detectar las células con BrdU incorporado, se desnaturalizaron las secciones en HCl 2 M en PBS a 37 °C durante 30 min, y después se neutralizaron con tampón de borato 0,1 M (pH 8,5) durante 10 min a temperatura ambiente. Para detectar los tipos específicos de células, se incubaron previamente las secciones en solución de PBS que contenía suero al 20 % y Triton-X-100 al 0,5 % durante 1 h, y después se incubaron durante la noche a temperatura ambiente con anticuerpos primarios. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-doblecortina de cabra (DCX) C-18 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-NeuN de ratón (1:300, Chemicon, Temecula, CA), anti-GFAP de ratón (1:100, Pharmingen, San Jose, CA), anti-fosfohistona de conejo (1:200, Upstate Biotechnology, Charlottesville, VA), anti-BrdU de rata (1:200, Harlan, Indianapolis, IN), anti-CD11b de rata (1:50, Pharmingen) y anti-BDNF de pollo (1:50, Promega, Madison, WI). La segunda etapa de anticuerpos se realizó por medio del marcaje con anticuerpos conjugados con Cy2 y Cy3 muy absorbidos de forma cruzada a rata, ratón, conejo, cabra o pollo (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), para evitar la reactividad cruzada, (1:200; 20-40 mm). Los portaobjetos de control se incubaron solo con el anticuerpo secundario. En algunos casos, para mejorar la señal, se usaron anticuerpos secundarios biotinilados durante 90 min, seguidos por estreptavidina conjugada con Cy2 o Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Se tiñeron las secciones con Hoechst 33258 (Molecular Probes) para el marcaje nuclear. Para la detección de la apoptosis, se usaron bien anti-caspasa-3 escindida de conejo (1:75, Cell Signaling Technology, Beverly, MA) o ensayo de TUNEL (Apoptag Fluorescein Detection kit, Intergen, Purchase, NY). Además, se usó derivado de Fluro-Jade B (Chemicon), que se une específicamente a neuronas degenerantes.

(xlii) Microscopía. Se examinaron las secciones teñidas y se fotografiaron con un microscopio confocal (Axiovert 100M; Zeiss, Oberkochen, Alemania), o con un microscopio de fluorescencia (E600; Nikon, Tokio, Japón), dotado de objetivos Plan Fluor conectados a la cámara CCD (DMX1200F, Nikon). Se recogieron imágenes digitales y se analizaron con el programa informático Image Pro⁺. Las imágenes se montaron usando Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA).

(xliii) Cuantificación. Las células progenitoras neuronales se cuantificaron contando las células BrdU⁺ (aquellas con doble tinción de BrdU/DCX) y contando las células DCX⁺ (en la ZSG) o midiendo la superficie teñida con DCX (en la ZSV y CMR, donde la densidad no permitió el recuento de células individuales). La cuantificación se realizó en secciones coronales, en la ZSV a partir del nivel del septo medial y 640 µm hacia atrás, y en el GD del hipocampo (en ambas cuchillas para BrdU/DCX o en la cuchilla superior para DCX) a través de su eje septotemporal. La cuantificación en la CMR se realizó en secciones sagitales a partir de 1 mm de la línea media del cerebro y 640 µm lateralmente. Se promediaron los resultados de cada estructura cerebral de 8 niveles unilaterales por ratón (80 µm de distancia, 3-4 ratones en cada grupo de tratamiento) y se expresaron como las veces de cambio con respecto a los controles preinmunes. La cuantificación de células positivas dobles BrdU/NeuN en la corteza se realizó en superficies de 0,15 mm², seleccionadas aleatoriamente (10 secciones contadas/ratón, 3 ratones en cada grupo de tratamiento).

(xliv) Análisis estadístico. Para el análisis de BrdU y DCX, se sometió la media ± ETM (un promedio de 8 niveles unilaterales por ratón, 3-4 ratones en cada grupo de tratamiento) a análisis de la varianza de una vía (ANOVA), seguido de la mínima diferencia significativa de Fishers (LSD) en la tasa de error de comparación de 0,05, en su caso. Dado que los valores de control para la incorporación de BrdU se redujeron en función del tiempo, los resultados se expresaron como las veces de cambio con respecto a los controles preinmunes inyectados simultáneamente con BrdU. Se promedió el número de células doble positivas BrdU/NeuN en la corteza de 10 secciones por ratón (3 ratones en cada grupo de tratamiento) y se expresó como las células por mm³.

(xlv) Preparación de las células madre. Los ratones ROSA26 expresan lacZ en todos los tejidos del embrión y en la mayoría de tejidos del ratón adulto. Se aislaron células de médula ósea (BM) de ratones ROSA26 lavando el fémur y la tibia con sal equilibrada de Hanks que contenía suero bovino fetal al 10 %. Se preparó una sola suspensión de células para el trasplante.

Ejemplo 5(1). Descripción del modelo experimental

Para estudiar las manifestaciones de la EAE, así como el tratamiento con GA en el SNC, se usó el modelo de EAE inducida por el péptido MOG 35-55 en dos cepas de ratones: la cepa susceptible C57BL/6 y los ratones transgénicos 2.2YFP, que expresan selectivamente YFP (proteína fluorescente amarilla) en su población neuronal motora y sensorial, proporcionando, por lo tanto, una herramienta sencilla para seguir el daño axonal/neuronal (Feng *et al.*, 2000). Los ratones YFP 2.2 fueron susceptibles a la EAE inducida por MOG de manera similar a los ratones C57BL/6 (**Fig. 19A**). En ambas cepas, la inducción de EAE dio lugar a la enfermedad crónica (no recurrente), a partir del día 16 al 20 (aumento en gravedad, alcanzando una puntuación media de 3 hacia el día 20-24), y se mantuvo en la fase crónica, grado 2-2,5, hasta la perfusión. Se aplicó el tratamiento con GA mediante 5-8 inyecciones diarias en diferentes etapas: (1) comenzando inmediatamente después de la inducción de la enfermedad (tratamiento de prevención); (2) comenzando tras la aparición de las manifestaciones de la enfermedad el día 20 (tratamiento de supresión); o (3) comenzando durante la fase crónica, 45 días después de la inducción (supresión retardada). El GA mejoró las manifestaciones clínicas de la EAE independientemente de la etapa en la que se administró (**Fig. 19B**). El efecto beneficioso se mantuvo estable en el tiempo y se mantuvo hasta que los ratones murieron. Las manifestaciones *in situ* en los cerebros de ratones afectados de EAE (ratones con EAE) frente a ratones de EAE inducida tratados con GA (EAE + GA) se estudiaron en comparación con los cerebros de ratones preinmunes (control).

Ejemplo 5(2). Caracterización del daño neurológico

En ratones YFP2.2, YFP fue expresada principalmente por los axones y las dendritas. La población parcial de la corteza cerebral y del hipocampo también expresaron YFP en los cuerpos celulares. La expresión de YFP en secciones del cerebro de ratones que habían sufrido EAE de grado 2-4 reveló múltiples malformaciones neuronales que se manifiestan en la transección axonal, procesos dispersos y deterioro de las fibras (**Fig. 20A**). Con frecuencia, se observaron lesiones generalizadas múltiples en varias regiones del cerebro (**Fig. 20B**), indicativo de una considerable pérdida neuronal y axonal. Una deformación adicional en la morfología celular en ratones con EAE fue la ampliación y la inflamación del cuerpo celular neuronal acompañado de la marginación del núcleo como es evidente por los núcleos teñidos con Hoechst huecos distendidos (**Fig. 20C**). Estos defectos no se deben a la anomalía de la cepa transgénica, ya que se observaron fenómenos similares en ratones C57BL/6 de EAE inducida teñidos con el marcador neuronal NeuN (datos no mostrados). La tinción con fluoro-jade B, que se une a las neuronas degenerantes, reveló células teñidas positivamente en la corteza, 25 días después de la inducción de la enfermedad, que es el pico de las manifestaciones clínicas (**Fig. 20D**). Sin embargo, no se pudo observar una cantidad significativa de apoptosis en la corteza ni en el cuerpo estriado de ambas cepas usando bien anticuerpo caspasa 3 escindido o el ensayo de TUNEL, lo que indica que los mecanismos apoptóticos no pudieron explicar el grado de la lesión en este modelo. Hay infiltraciones perivasculares de células teñidas de CD3 adyacentes o dentro de regiones aberrantes, lo que indica el papel perjudicial de los linfocitos T infiltrantes (**Fig. 20A**). En los controles preinmunes, así como en los ratones inyectados con GA, pero en los que no se indujo la EAE, no se encontraron malformaciones neuronales ni infiltraciones perivasculares (no se muestra).

En los cerebros de los ratones EAE + GA (bien el tratamiento de prevención o de supresión), se detectó considerablemente menos daño que en los cerebros de ratones con EAE, lo que revela una menor cantidad de fibras en deterioro (**Fig. 20A**), la reducción del número y del tamaño de las lesiones (**Fig. 2B**) y núcleos de células menos inflamados (**Fig. 20C**). Una fina capa de fibras positivas en YFP se encontró con frecuencia en las lesiones de los animales tratados con GA (**Fig. B**), lo que sugiere filamentos supervivientes o brote axonal en las zonas dañadas. También se encontraron infiltraciones de linfocitos T en los cerebros de los ratones tratados con GA, sin embargo, en menor cantidad, y su posición no estaba asociada con el daño (**Fig. 20A**).

Ejemplo 5(3). Activación de las células microgliales

La inmunotinción con MAC-1 (CD11b, expresado en los macrófagos y en las células microgliales y regulado positivamente después de su activación), se correlacionó con el grado de la lesión neuronal en los ratones con EAE (mostrado en el cerebelo, **Fig. 21A**). Por lo tanto, en las zonas ocupadas con células microgliales activadas, en general, eran evidentes las fibras dispersas y la pérdida axonal (recuadro I), mientras que en las zonas adyacentes de células microgliales no activadas, la estructura neuronal parecía intacta (recuadro II). La infiltración perivascular de células MAC-1⁺ activadas se encontró en zonas lesionadas, lo que sugiere que macrófagos originados periféricamente también estaban implicados en el proceso patológico. Como se muestra en la **Fig. 21B**, el gran aumento en la intensidad de la tinción de MAC-1 encontrado en ratones con EAE se demostró en otras regiones cerebrales, por ejemplo, cuerpo estriado, tálamo e hipocampo. Las células MAC-1⁺ de cerebros de ratones de control tenían cuerpo celular relativamente pequeño y largos procesos ramificados indicativos de células microgliales en reposo. Por el contrario, los cerebros de los ratones con EAE, manifestaron cuerpo celular redondeado con un aumento del tamaño y numerosos procesos cortos retraídos, indicativo de células microgliales altamente activas (inserto). En los cerebros de los ratones EAE + GA, la expresión de MAC-1 se redujo significativamente, mostrando un grado moderado de activación. La morfología celular de las células MAC-1⁺ en los ratones tratados con GA fue similar a la de las células microgliales no activadas en ratones preinmunes (inserto). Dicha detención de la activación microglial en ratones EAE + GA se encontró en diversos puntos temporales hasta 30 días después de haberse

finalizado las inyecciones de GA.

Ejemplo 5(4). Proliferación de células progenitoras neuronales

Para evaluar la generación y la proliferación de células progenitoras neuronales tras el proceso patológico de la EAE, así como después del tratamiento con GA, se usaron dos marcadores: el marcador neuronal inmaduro DCX (asociado con la migración y diferenciación de las neuronas de cerebro fetal y adulto) y BrdU (análogo de la timidina que se incorpora al ADN de las células en división) que habían sido inyectados simultáneamente con el tratamiento de GA. Por lo tanto, la expresión de DCX indicó la cantidad de nuevas neuronas generadas 10-14 días antes del sacrificio de los animales, y el número de células con BrdU incorporado (aquellas con tinción doble de BrdU/DCX) indicó el número de neuroprogenitores emergentes durante el período de inyección de BrdU. La neuroproliferación se estudió en las zonas neuroproliferativas-la zona subventricular (ZSV), así como en la zona subgranular (ZSG) y la capa de células granulares (CCG) del hipocampo. BrdU y DCX manifestaron patrones superpuestos.

En la ZSV de los ratones con EAE, la proliferación de neuroprogenitoras se elevó tras la aparición de la enfermedad (25 días después de la inducción de la EAE, 1 día después de la última inyección de BrdU) en comparación con los controles (**Fig. 22A, 22BI**). Esto fue evidente por un aumento de 2,1 y de 1,4 veces en la expresión de BrdU y DCX, respectivamente (**Fig. 22D, ZSV, I, columnas rojas**). Aún así, 10 y 20 días más tarde, no hubo diferencia significativa en la expresión de BrdU y DCX entre los ratones con EAE y los controles preinmunes (**Fig. 22B, 22D, II, III**). Además, en los ratones que padecieron la enfermedad durante períodos prolongados (35 y 60 días), la proliferación manifestada por la incorporación de BrdU fue menor que la de los controles, bien cuando se inyectó BrdU simultáneamente con la inducción de EAE y se ensayó un mes más tarde (**Fig. 22D, primera columna roja**) o durante la etapa crónica antes de la perfusión (**Fig. 22D, última columna roja**). El tratamiento con GA en ratones con EAE (esquemas de administración ilustrados en la **Fig. 22E**) aumentó la proliferación neuronal en la ZSV en comparación con los ratones con EAE no tratados, así como los controles (**Fig. 22A, 22B**). Esta elevación alcanzó significación estadística frente al control y EAE tanto para BrdU como para DCX mediante el tratamiento de supresión, 1 y 10 días después de finalizarse la inyección de GA (**Fig. 22D**). El tratamiento de supresión retardada generó la elevación significativa frente a EAE, pero no el control. En el tratamiento de prevención, la elevación sustancial frente a EAE y el control solo se observó para DCX (4 veces), aunque incluso la incorporación de BrdU era indicativa de la elevación significativa en comparación con la EAE.

En la ZSG del hipocampo, la proliferación neuronal se elevó tras la aparición de la enfermedad, pero posteriormente se redujo por debajo de la del control preinmune (**Fig. 22C, 22D, hipocampo, columnas rojas**). El efecto del tratamiento con GA en el hipocampo fue similar a su efecto en la ZSV, en concreto, una mayor proliferación manifestada tanto por la incorporación de BrdU como por la expresión DCX que no se mantuvo una vez finalizados los tratamientos de supresión. Los tratamientos de prevención, así como los tratamientos de supresión retardada generaron una mayor neuroproliferación que en los ratones con EAE, un mes y un día después de finalizarse la inyección de GA/BrdU, respectivamente. En particular, en el hipocampo de ratones con EAE, y en mayor medida en los ratones EAE + GA (**Fig. 22C**), se encontraron células BrdU⁺/DCX⁺ en la ZSG y en la CCG adyacente. Las células que expresaban DCX manifestaron un árbol dendrítico denso y ramificado con dendritas apicales bien desarrolladas que atravesaban la capa molecular interna y se extendían en la capa molecular externa.

La inyección de GA a ratones preinmunes (sin EAE), bien justo antes de la perfusión o un mes antes, no se tradujo en una elevación significativa de la expresión de BrdU o DCX, tanto en la ZSV como en el GD (**Fig. 22D, columnas grises**).

Ejemplo 5(5). Migración de las células progenitoras neuronales

Para estudiar el destino de las células progenitoras inducidas, primero se siguió su movilización por la ruta en la que las células de la ZSV normalmente migran en los ratones adultos-la corriente migratoria rostral (CMR, ilustrada en la **Fig. 23A**). Como se representa en un segmento adyacente a la ZSV (**Fig. 23D**) y en una sección más medial (**Fig. 23E**), la cantidad de BrdU, así como las células marcadas con DCX que migran a lo largo de la CMR de ratones con EAE (25 días después de la inducción de la enfermedad, 1 día después de la última inyección de BrdU), se elevó en comparación con los controles. Esto se manifestó por un aumento de 3,1 y 1,6 veces en el número de células BrdU⁺/DCX⁺ y en la zona teñida con DCX, respectivamente (**Fig. 23F, 23G, columnas rojas**). Después del tratamiento con GA (en los días 20-25, supresión), la cantidad de progenitores neuronales en la CMR fue aún mayor, mostrando una extensa corriente de células que expresaban BrdU/DCX (**Fig. 23B, 23D, 23E**). Así pues, se obtuvo un aumento de 7,8 y 2,6 veces en la expresión de BrdU y DCX frente al control, y de 2,2 y 1,6 veces frente a los ratones con EAE tras el tratamiento con GA (**Fig. 23F, 23G, columnas azules**). En particular, la inyección de solo GA también mejoró la movilización de las células progenitoras en la CMR, pero en un grado inferior (**Fig. 23F, 23G, columnas grises**).

Se encontraron patrones de movilización de células progenitoras neuronales similares en un punto temporal posterior (35 días después de la inducción de EAE, cuando se administró el tratamiento de GA como tratamiento de prevención, es decir, expresión elevada de DCX en la CMR de ratones con EAE frente a ratones de control, y la migración aún más potente en ratones EAE + GA) (**Fig. 23H**). Curiosamente, en un ratón con EAE (de 13 ratones), se encontró una mayor migración neuronal similar a la de los ratones tratados con GA. Este ratón (denotado EAE-

rec) presentó solo una leve enfermedad a corto plazo (puntuación 2, en los días 24 a 26 después de la inducción), y se recuperó por completo el día de la perfusión.

El tratamiento de ratones con EAE con GA no solo condujo a una mayor movilización de las células progenitoras neuronales a través de la CMR, sino también su migración en una región correspondiente a la corriente cortical lateral (CCL) de la migración neuronal, que se encuentra de manera natural en el cerebro anterior en desarrollo (ilustrado en la **Fig. 23A**). Por lo tanto, las células DCX⁺ parecían viajar desde la ZSV caudalmente, en una cadena a lo largo del cuerpo calloso y la superficie de contacto entre el hipocampo y el cuerpo calloso, hacia diversas regiones corticales principalmente la corteza occipital (**Fig. 23C**). No se pudieron rastrear dichos patrones de movilización en las secciones de los ratones con EAE no tratados con GA correspondientes. Además, en los ratones EAE + GA, las células progenitoras neuronales divergieron desde las zonas neuroproliferativas clásicas, así como las corrientes migratorias y se extendieron a regiones atípicas tales como el cuerpo estriado, núcleo accumbens y la corteza (**Fig. 24**). Los células DCX⁺ parecieron alejarse de la CMR en estrecha proximidad a los filamentos que expresaban YFP, lo que sugiere su migración a lo largo de las fibras nerviosas (**Fig. 24A**). Como se ve por su dirección y orientación, emigraron lejos tanto de la CMR como de la ZSV. Sin embargo, en algunos ratones, la mayoría de las células se extendieron desde la ZSV (**Fig. 24B**), mientras que en otros la CMR parecía ser su principal origen (**Fig. 24C**). Las células DCX⁺ parecían llegar a la corteza frontal de la CMR (**Fig. 23B, 24D**) y a la corteza occipital de la CCL (**Fig. 23C**). Manifestaron rasgos morfológicos características de las neuronas en migración, tales como somata fusiforme con un proceso de inicio y final (O'Rourke *et al.*, 1995), y su orientación coincidía con la migración lejos de la corriente migratoria a la parte interna de la corteza, a lo largo de las fibras nerviosas (mostrado en las capas 5 y 6, **Fig. 24E, 24F**). No se detectaron células neuroprogenitoras en zonas alejadas de las zonas neuroproliferativas y las corrientes migratorias tales como el cerebelo y la protuberancia.

Pronto después del tratamiento con GA y la inyección de BrdU (1-10 días), los progenitores neuronales que migraron lejos de la CMR manifestaron la expresión conjunta de BrdU y DCX, como se muestra en el cuerpo estriado (**Fig. 25A**) y el núcleo accumbens

(**Fig. 25B**), lo que indica que se sometieron a la división simultáneamente con el tratamiento de GA. En algunos casos, estas células doble positivas aparecieron en pequeños grupos, lo que sugiere también divisiones locales. Además, la tinción con la histona fosforilada H³, un marcador endógeno de células en fase M, indicó que algunas células DCX⁺ habían proliferado justo antes de la perfusión, como se observa para las células neuroprogenitoras acumuladas en el núcleo accumbens en la **Fig. 25C**.

En puntos temporales posteriores (un mes después de la finalización del tratamiento de GA), células BMU⁺ que expresaban conjuntamente el antígeno nuclear neuronal (NeuN), se encontraron en el cuerpo estriado (**Fig. 25D, 25F**), el núcleo accumbens (**Fig. 25E**) y la corteza (**Fig. 25G**, capa 5 de la corteza cingulada), indicando que algunas células neuroprogenitoras se han diferenciado más hacia un fenotipo neuronal maduro. En la corteza (**Fig. 25H, 25I**, cingulada, **Fig. 25J**, occipital, **Fig. 25K**, motora) de los ratones YFP, se observaron células piramidales que expresaban conjuntamente BrdU e YFP con dendritas apicales y axones, indicativo de neuronas funcionales maduras. Se encontró un promedio de $128 \pm 46/\text{mm}^3$ de células marcadas doblemente BrdU⁺/NeuN⁺ en la corteza de ratones EAE + GA, que consistía en el 1,3 % de todas las células NeuN⁺. Cabe señalar que también se encontraron células BrdU⁺/NeuN⁺ en la corteza de ratones con EAE no tratados con GA, aunque menos ($48 \pm 0,25/\text{mm}^3$, 0,58 % de células NeuN⁺). En la corteza de los ratones preinmunes, no se encontraron células BrdU⁺/NeuN⁺.

Ejemplo 5(6). Migración a los sitios de lesión

Las neuronas recién generadas parecían ser atraídas a las regiones dañadas. Por lo tanto, las agrupaciones de DCX/BrdU, así como las células que expresaban conjuntamente NeuN/BrdU, estaban situadas en zonas con fibras que expresaban YFP en deterioro y lesiones (**Fig. 24B, 24C, 25A-25D**). Además, se encontraron células que expresaban DCX alrededor de los bordes y dentro de las lesiones del cuerpo estriado (**Fig. 26B, 26C**), la corteza (**Fig. 26D, 26E**) y el núcleo accumbens (**Fig. 26F**). En ratones con EAE (no tratados con GA), también se observaron unas cuantas células DCX⁺ rodeando las lesiones (**Fig. 26A**), pero en los ratones EAE + GA, la cantidad de células progenitoras que migraron a las lesiones fue mucho más elevada. Las células neuroprogenitoras DCX⁺ se situaron en zonas comúnmente ocupadas con astrocitos que expresaban GFAP (**Fig. 27A-27C**), lo que sugiere su migración a las zonas de la cicatriz gliótica.

En las lesiones ocupados por células DCX⁺ (**Fig. 26D-26F**), se observaron fibras que expresaban YFP extendidas dentro de las lesiones, lo que sugiere la inducción de la regeneración o del brote axonal por las células neuroprotectoras. Para averiguar si las neuronas recién generadas en realidad pueden inducir un ambiente que potencie el crecimiento, se ensayó su capacidad para expresar BDNF. Como se muestra en la **Fig. 27**, en los nucleolos accumbens (**Fig. 27D, 27E**) y en el hipocampo (**Fig. 27F**), una proporción sustancial de las células DCX⁺ que migran en ratones EAE + GA manifestó una amplia expresión de BDNF.

Ejemplo 5(7). Tratamiento de combinación de acetato de glatiramero y células madre progenitoras en un modelo de ratón de la EAE

El siguiente experimento se llevó a cabo para evaluar el efecto de la combinación del acetato de glatiramero (GA) y la administración células madre en un modelo de EAE. Se empleó el modelo de ratones de EAE inducida por la glucoproteína de mielina de los oligodendrocitos (MOG). La degeneración neuronal y axonal se manifiestan ampliamente en los ratones con EAE. Se aplicó el tratamiento con GA a ratones con EAE en combinación con células madre mediante un procedimiento, que resultó ser eficaz en la generación de autoneurogénesis, en concreto, mediante inyecciones subcutáneas diarias.

Se obtuvieron células madre multipotentes de la médula ósea de ratones transgénicos ROSA26, que expresan Lac-z en la mayoría de los tejidos del ratón adulto. La expresión del gen Lac-z se detectó por la actividad enzimática del producto génico beta-galactosidasa. Estas células madre fueron trasplantadas en ratones C57BL/6 con EAE por inclusión estereotáctica local en el ventrículo lateral del cerebro. Como alternativa, las células madre se pueden administrar sistémicamente por inyección intravenosa.

Se comparó el efecto de la administración combinada de GA y células madre con la administración de GA y células madre por separado. Los ratones con EAE no tratados y los ratones preinmunes sirvieron como controles. Tras el tratamiento, los ratones se examinaron diariamente en cuanto a los síntomas neuronales y se registraron la gravedad de la enfermedad y/o la mejoría clínica. El efecto *in situ* de los tratamientos se evaluó mediante la caracterización del daño neuronal como se describe en 5(2) anterior. Se monitorizó el destino de las células trasplantadas usando procedimientos inmunohistológicos como se describe en 5(4), 5(5) y 5(6) anteriores. Por ejemplo, la proliferación se evaluó usando marcadores tales como BrdU inyectados simultáneamente con el trasplante, y la diferenciación se monitorizó mediante la detección de marcadores DCX y NeuN. También se hizo un seguimiento de la migración de las células trasplantadas y de su capacidad para llegar al sitio de la lesión.

Los resultados preliminares obtenidos indican que el tratamiento combinado de GA + células madre aumenta el efecto beneficioso de cada tratamiento por separado, como se evidencia por los parámetros anteriores examinados. Se pueden obtener los mismos efectos beneficiosos mediante el tratamiento combinado de GA y células madre en otros modelos experimentales. Por lo tanto, el tratamiento combinado de GA y células madre se puede usar en la terapia de enfermedades neurológicas adicionales y otros trastornos.

Discusión

El principal hallazgo presentado en el presente documento es que el tratamiento inmunomodulador periférico de una enfermedad neurodegenerativa autoinmune inflamatoria induce la neuroprotección, así como el aumento de la autoneurogénesis provocada por el proceso patológico. Esto produce la migración masiva de las neuronas nuevas a los sitios de las lesiones, en regiones del cerebro que normalmente no sufren neurogénesis, lo que sugiere relevancia para el efecto beneficioso del GA en la EAE y la EM.

Las manifestaciones histopatológicas de la EAE inducida por MOG, tanto en la cepa C57BL/6 como en la cepa YFP 2.2, fueron fibras en deterioro, pérdida axonal, lesiones generalizadas y marginación del núcleo, indicativos de daño grave (**Fig. 20**). Se encontraron infiltraciones perivasculares de linfocitos T (**Fig. 20A**) y de macrófagos (**Fig. 21A**) en las proximidades de las regiones aberrantes, coincidiendo con su papel perjudicial en esta enfermedad (Behi *et al*, 2005; Stollg y Jander 1999). El efecto protector del GA se manifestó en la prevención del daño axonal y neuronal típicos como se evidencia en el menos fibras en deterioro, la reducción de la cantidad de las lesiones con menor magnitud y menos núcleos celulares marginados. Un efecto importante adicional del GA fue la reducción de la activación de la células microgliales (**Fig. 21B**), que se manifiesta en todos los puntos temporales (1-30 días después de la terminación del tratamiento), mediante los diferentes programas. Las células microgliales producen como células presentadoras de antígenos en el SNC y, con ello, activan los linfocitos T encefalitogénicos y producen mediadores inflamatorios tóxicos, aunque también se demostró una función doble, debido a su capacidad para expresar factores neurotróficos (Stollg y Jander 1999). En el modelo actual, la activación de las células microgliales se elevó notablemente en los ratones afectados de EAE en varias regiones del cerebro, y esta activación se correlacionó con la cantidad de lesión neuronal.

El tratamiento con GA no solo redujo el daño neuronal, sino que también aumentó la proliferación neuronal. La combinación de dos marcadores de detección permitió evaluar tanto la cantidad de las nuevas neuronas generadas 10-14 días antes de que el animal fuera sacrificado, por la expresión general del marcador neuronal inmaduro DCX (Bayer *et al.*, 1991), así como el número de células neuroprogenitoras que surgieron durante el período de inyección de BrdU/GA concurrente (las que se diferenciaron en el linaje neuronal y, por lo tanto, presentaron doble tinción con BrdU/DCX). Ambos sistemas dieron resultados comparables en cuanto al efecto del proceso patológico de la EAE y el del tratamiento de GA. Por lo tanto, la inducción de EAE provocó un aumento de la proliferación de células neuroprogenitoras en las zonas neuroproliferativas (ZSV y ZSG) tras la aparición de la enfermedad (**Fig. 22**), de acuerdo con estudios previos que demuestran el aumento de la proliferación celular en estas zonas tras la lesión (Jin *et al*, 2003; Magavi *et al.*, 2000; Picard-Riera *et al*, 2002). Aún así, esta neuroproliferación disminuyó gradualmente y posteriormente declinó por debajo de la de los ratones preinmunes, indicativo del deterioro causado por la enfermedad y la falta de autoneurogénesis para compensar el daño. El tratamiento con GA aplicado mediante

diversas pautas a los ratones con EAE aumentó la proliferación neuronal tanto en la ZSV como en la ZSG frente a la de los ratones con EAE, y prolongó su duración. Es de especial importancia la consecuencia neuroproliferativa del tratamiento con GA iniciada en la fase crónica de la enfermedad (supresión retardada), ya que esta fase de la EAE/EM se considera la fase en la que la neurogénesis autocompensadora agotada falla, y se produce una amplia neurodegeneración (Bjartmar *et al.*, 2003; Hobom *et al.*, 2004).

Las células neuroprogenitoras originadas en la ZSV se movilizaron en la ruta en la que normalmente migran en los adultos, el CMR. Esta movilización se aumentó en ratones con EAE, y el GA aumentó aún más (**Fig. 23**). La relevancia terapéutica de este efecto está implícita en el aumento de la migración neuronal encontrado en el ratón con EAE que presentó una enfermedad leve a corto plazo y la recuperación espontánea. Aun así, en los ratones tratados con GA, la migración de las células neuroprogenitoras no se limitó a la CMR. Se encontró la recurrencia de la CCL-ruta migratoria neuronal, que se encuentra de forma natural en el cerebro anterior embrionario (Francic *et al.*, 1999), pues las células que expresaban DCX migraron a lo largo del cuerpo caloso y la superficie de contacto entre el hipocampo y el cuerpo caloso, hacia diversas regiones corticales, principalmente a la corteza occipital (**Fig. 23C**). Además, las células progenitoras neuronales divergieron desde las zonas neuroproliferativas clásicas, así como las corrientes migratorias, y se extendieron a regiones cerebrales atípicas adyacentes que normalmente no sufren neurogénesis, tales como el cuerpo estriado, el núcleo accumbens y la corteza (**Fig. 24**). En el hipocampo de los ratones con EAE, tras la aparición de la enfermedad, y en mayor grado y mayor duración, en ratones EAE + GA, las células que expresaban BrdU y DCX migraron de la ZSG a la CCG adyacente, extendiendo dendritas ramificadas a través de la capa molecular interna y externa (**Fig. 22C**). Sin embargo, la movilización de las células procedentes de la SGL probablemente se restringía al hipocampo, pues no se encontraron pruebas de migración más allá de esta región, de acuerdo con estudios previos que identifican la ZSV en lugar de la ZSG como el origen de la migración de los neuroprecusores (Jin *et al.*, 2003).

Poco después de la inyección de GA y BrdU (1-10 días después de su última inyección), las células neuroprogenitoras BrdU⁺ expresaron el marcador neuronal inmaduro DCX característico de la migración y la diferenciación de las neuronas (Bernier *et al.*, 2002), y mostraron morfología migratoria, somata fusiforme con un proceso de inicio y final (O'Rourke *et al.*, 1995) (**Fig. 24**). Se ha puesto en duda si las células progenitoras conservan su capacidad de proliferar después de salir de las zonas neuroproliferativas (Gould y Gross, 2002; Iwai *et al.*, 2002). En los ratones EAE + GA, se encontraron pequeños grupos de células que expresaban conjuntamente BrdU/DCX en el cuerpo estriado y el núcleo accumbens, lo que sugiere divisiones locales. Además, la tinción con histona fosforilada, un marcador endógeno de células en fase M, indicó que algunas células DCX⁺ de estas regiones se habían dividido justo antes de la perfusión (**Fig. 25**), lo que sugiere la proliferación *in situ* fuera de las zonas neuroproliferativas clásicas. En un punto temporal posterior (un mes después de la finalización del tratamiento con GA), se observaron células DCX⁺ con procesos de ramificación (**Fig. 26**), así como células BrdU⁺ que expresaban el marcador neuronal maduro NeuN y presentaban la morfología madura (**Fig. 25**). La cantidad de nuevas neuronas en la corteza de ratones con EAE fue comparable a la encontrada en otros casos de neurogénesis inducida por daño (Magavi *et al.*, 2000; Picard-Riera *et al.*, 2002; Arlotta *et al.*, 2003). El tratamiento con GA aumentó este número en 2,6 veces, lo que indica la elevación sustancial de las neuronas recién generadas. No se encontraron células BrdU/NeuN⁺ en la corteza de ratones preinmunes, lo que confirma que la neurogénesis normalmente no se produce en la corteza del roedor adulto (Iwai *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2003; Arlotta *et al.*, 2003). Por lo tanto, tres procesos que comprenden la neurogénesis: la proliferación, la migración y la diferenciación celulares (Jin *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004) se elevaron tras el tratamiento con GA.

Estos hallazgos establecen una correlación entre el tratamiento con GA y la generación de neuroprotección y neurogénesis. Es posible que estos efectos sean el resultado de la supresión de la inflamación- la lesión que inicia el proceso patológico, y por lo tanto, el daño posterior, como se ha demostrado para el tratamiento antiinflamatorio tras la administración de endotoxina (Monje *et al.*, 2003). La capacidad de GA para cambiar la secreción de citocinas de la ruta inflamatoria Th1 a la ruta antiinflamatoria Th2/3 se demostró en la periferia de ratones y de seres humanos (Aharoni *et al.*, 1998; Duda *et al.*, 2000). Por otra parte, el GA induce linfocitos Th2/3 específicos que atraviesan la barrera hematoencefálica, se acumulan en el SNC (Aharoni *et al.*, 2000, 2002) y expresan *in situ* las citocinas antiinflamatorias IL-10 y TGF- β (Aharoni *et al.*, 2003). En el presente estudio, también se encontraron linfocitos T infiltrantes en los cerebros de ratones con EAE + GA, y en contraste con los ratones con EAE, su ubicación no se asoció con el daño (**Fig. 19C**). Sin embargo, el efecto de las células inducidas por el GA en el SNC va más allá del bloqueo de la inflamación. Por lo tanto, IL-10 mostró modular la activación glial (Ledeboer *et al.*, 2000), por lo tanto su expresión *in situ* puede explicar el bloqueo de la activación de las células microgliales en ratones tratados con GA (**Fig. 21**). En cuanto a TGF- β , se ha demostrado su actividad neuroprotectora en varias especies (Dhandapani y Brann, 2003), así como su capacidad para inducir la neuroproliferación y la diferenciación (Newmann *et al.*, 2000; Kawachi *et al.*, 2003). Además, las células específicas del GA en el cerebro, mostraron expresar el factor neurotrófico potente BDNF (Aharoni *et al.*, 2003), un regulador clave de la supervivencia y la neurogénesis neuronal en el cerebro adulto (Lassmann *et al.*, 2003). El BDNF mostró estimular el reclutamiento de células de la ZSV, su migración a través de la CMR a estructuras que no presentan neurogénesis en la edad adulta, y su diferenciación en neuronas (Pencea *et al.*, 2001), de manera similar al hallazgo encontrado en el presente estudio. Por lo tanto, son de especial relevancia los hallazgos anteriores de los presente inventores sobre que la transferencia adoptiva de los linfocitos T específicos de GA, o la inyección de GA como tal, indujo un efecto de espectador en las células residentes del SNC, por ejemplo, los astrocitos y las neuronas, para expresar ampliamente IL-10, TGF- β y BDNF, lo

que resulta en su elevación significativa en varias regiones del cerebro (Aharoni *et al.*, 2003, 2004).

Es de especial importancia que las neuronas recién generadas fueron atraídas a o reclutadas en las regiones dañadas, como lo demuestra su migración hacia las zonas de cicatriz gliótica (**Fig. 27**) y las regiones que presentan deterioro de las fibras, la pérdida neuronal y lesiones (**Fig. 24B, 24C, 25A-25D, 26**). Se ha demostrado la migración dirigida de nuevas neuronas hacia los sitios de lesión tras la isquemia cerebral (Jin *et al.*, 2003), así como, en el presente estudio, en ratones con EAE (**Fig 26A**). Sin embargo, aunque las lesiones en ratones con EAE tratados con GA fueron menos amplias, la cantidad de células progenitoras que migraron a las mismas fue espectacularmente superior. Estas nuevas neuronas pudieron constituir una combinación para la sustitución de las células muertas o disfuncionales y/o inducir un entorno potenciador del crecimiento que apoye la neuroprotección y el crecimiento axonal. Esta última actividad se evidenció por la expresión de BDNF de las nuevas neuronas (**Fig. 27D-27F**). Por otra parte, en las lesiones ocupadas por células neuroprogenitoras, se observaron fibras que expresaban YFP que se extendían en las lesiones (**Fig. 20B, 26D-26F**), lo que sugiere la inducción de la regeneración o del brote axonal. Los resultados acumulativos presentados en el presente documento apoyan la noción de que un fármaco inmunomodulador puede inducir neuroprotección y neurogénesis que contrarreste el curso de la enfermedad neurodegenerativa.

Referencias

- Aberg, M. A., Aberg, N. D., Hedbacker, H., Oscarsson, J. y Eriksson, P. S. "Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus". *J Neurosci* 20, 2896-903 (2000).
- Aharoni R., Schlegel P. G., Teitelbaum D., Roikhel-Karpov O., Chen Y., Arnon R., Sela M., Chao N. J. (1997) "Studies on the mechanism and specificity of the effect of synthetic random copolymer GLAT on graft-versus-host disease". *Immunol. Lett.* 58 (2):79-87.
- Aharoni R., Teitelbaum D., Sela M., Arnon R. (1998) "Bystander suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cell lines and clones of the Th2 type induced by copolymer 1". *J. Neuroimmunol.* 2:135-146.
- Aharoni R., Teitelbaum D., Leitner O., Meshorer A., Sela M., Arnon R. (2000) "Specific Th2 cells accumulate in the central nervous system of mice protected against experimental autoimmune encephalomyelitis by copolymer 1". *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 97:11472-11477.
- Aharoni R., Teitelbaum D., Arnon R., Sela M. (2001). "Copolymer 1 inhibits manifestations of graft rejection. Transplantation" 27: 598-605.
- Aharoni R., Meshorer A., Sela M., Arnon R. (2002) "Oral treatment of mice with copolymer 1 (glatiramer acetate) results in the accumulation of specific Th2 cells in the central nervous system". *J. Neuroimmunol.* 126:58-68.
- Aharoni R., Kayhan B., Eilam R., Sela M., Arnon R. (2003) "Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ". *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 100:14157-14162.
- Aharoni R., Eilam R., Labunskay G., Sela M., Arnon R. (2004) "Copaxone (glatiramer acetate) injection augment brain derived neurotrophic factor expression in the brain". *Multiple Sclerosis* 10:S256
- Aharoni R., Yussim A., Sela M., Arnon R. (2005). "Combined treatment of glatiramer acetate and low doses of immunosuppressive drugs is effective in the prevention of graft rejection". *Int Immunopharmacol.* 5(1):23-32.
- Aharoni R., Kayhan B., Arnon R. (2005) "Therapeutic effect of the immunomodulator glatiramer acetate on trinitrobenzene sulfonic acid-induced experimental colitis". *Inflamm Bowel Dis.* 11(2): 106-115.
- Angelov D. N., Waibel S., Guntinas-Lichius O., Lenzen M., Neiss W. F., Tomov T. L., Yoles E., Kipnis J., Schori H., Reuter A., Ludolph A., Schwartz M. (2003). "Therapeutic vaccine for acute and chronic motor neuron diseases: implications for amyotrophic lateral sclerosis". *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 100(8):4790-4795.
- Arnon, R., Sela M. (2003) "Immunomodulation by the copolymer glatiramer acetate". *J. Mol. Recognit.* 16:412-421.
- Bakalash S., Kessler A., Mizrahi T., Nussenblatt R., Schwartz, M. (2003) "Antigenic specificity of immunoprotective therapeutic vaccination for glaucoma". *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 3374-3381.
- Bayer S. A., Altman J., Russo R. J., Dai X. F., Simmons J. A. (1991) "Cell migration in the embryonic neocortex". *I. Comp. Neurol.* 307:499-516.
- Behi M. E., Dubucquoi S., Lefranc D., Zephir H., De Seze J., Vermersch P., Prin L. (2005) "New insights into cell responses involved in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis". *Immunology Letters* 96:11-26.
- Benner E. J., Mosley R. L., Destache C. J., Lewis T. B., Jackson-Lewis V., Gorantla S., Nemachek C., Green S. R., Przedborski S., Gendelman H. E. (2004) "Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease". *Proc Natl Acad Sci, EE.UU.* 101:9435-40.
- Bernier P. J., Bedard A., Vinet J., Levesque M., Parent A. (2002) "Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates". *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 99:11464-11469.
- Bjartmar C., Wujek J. R., Trapp B. D. (2003) "Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease". *J. Neurol. Sci.* 15:165-171.
- Bliss, T. V. y Collingridge, G. L. "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus". *Nature* 361, 31-9 (1993).
- Boje, K. M. y Arora, P. K. "Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death". *Brain Res.* 587, 250-6 (1992).

- Borchelt, D. R. et al., "Neuron" 19, 939 (1997).
- Brown, J. et al. "Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis". *Eur J Neurosci* 17, 2042-6 (2003).
- 5 Brown J. P., Couillard-Despres S., Cooper-Kuhn C. M., Winkler J., Aigner L., Kuhn H. G. (2003) "Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis". *J. Comp Neurol.* 467: 1-10.
- Butovsky O., Talpalar A. E., Ben-Yaakov K., Schwartz M. "Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective". *Mol Cell Neurosci* 29:381-393 (2005).
- 10 Butovsky, O., Hauben, E. y Schwartz, M. "Morphological aspects of spinal cord autoimmune neuroprotection: colocalization of T cells with B7--2 (CD86) and prevention of cyst formation". *Faseb J.* 15, 1065-7 (2001).
- Cameron, H. A. y McKay, R. D. "Restoring production of hippocampal neurons in old age". *Nat Neurosci* 2, 894-7 (1999).
- Cameron, H. A. y McKay, R. D. "Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus". *J Comp Neurol* 435, 406-17 (2001).
- 15 Cammer, W. y Zhang, H. "Maturation of oligodendrocytes is more sensitive to TNF alpha than is survival of precursors and immature oligodendrocytes". *J Neuroimmunol* 97, 37-42 (1999).
- Chen J., Magavi S. S., Macklis J. D. (2004) "Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice". *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 101:16357-16362.
- 20 Cummings, B. J., Uchida, N., Tamaki, S. J., Salazar, D. L., Hooshmand, M., Summers, R., Gage, F. H. y Anderson, A. J. *Proc Natl Acad Sci, EE.UU.*, 102, 14069-74 (2005).
- Dawson, M. R., Polito, A., Levine, J. M. y Reynolds, R. "NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS". *Mol Cell Neurosci* 24, 476-88 (2003).
- Dhandapani K. M., Brann D. W. (2003) "Transforming growth factor-beta: a neuroprotective factor in cerebral ischemia". *Cell Biochem Biophys.* 39:13-22.
- 25 Dijkstra, C. D., De Groot, C. J. y Huitinga, I. "The role of macrophages in demyelination". *J Neuroimmunol* 40, 183-8 (1992).
- Duda, P. W., Schmied, M. C., Cook, S. L., Krieger, J. I. y Hafler, D. A. "Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis". *J Clin Invest* 105:967-976 (2000).
- 30 Ekdahl, C. T., Claassen, J. H., Bonde, S., Kokaia, Z. y Lindvall, O. "Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain". *Proc Natl Acad Sci, EE.UU.*, 100, 13632-7 (2003).
- Engesser-Cesar, C., Anderson, A. J., Basso, D. M., Edgerton, V. R. y Cotman, C. W. "Voluntary wheel running improves recovery from a moderate spinal cord injury". *J Neurotrauma* 22, 157-71 (2005).
- Enzmann, G. U., Benton, R. L., Woock, J. P., Howard, R. M., Tsoulfas, P. y Whittemore, S. R. *Exp Neurol* 195, 293-304 (2005).
- 35 Feng G., Mellor R. H., Bernstein M., Keller-Peak Cynthia, Nguyen Q. T., Wallace M., Nerbonne J. M., Lichtman J. W., Samce J. R. (2000) "Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP". *Neuron* 28:41-51.
- Francis F., Koulakoff A., Boucher D., Chafey P., Schaar B., Vinet M. C., Friocourt G., McDonnell N., Reiner O., Kahn A., McConnell S. K., Berwald-Netter Y., Denoulet P., Chelly J. (1999) "Doublecortin is a developmentally regulated microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons". *Neuron* 23:247-256.
- 40 Fridkis-Hareli M., Aharoni R., Teitelbaum D., Arnon R., Sela M., Strominger J. L. (1999) "Binding motifs of copolymer 1 to multiple sclerosis- and rheumatoid arthritis-associated HLA-DR molecules". *J Immunol.* 162(8):4697-4704.
- 45 Gould E., Gross C. G. (2002) "Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems". *J. Neuroscience.* 22:619-623.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A. y Shors, T. J. "Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation". *Nat Neurosci* 2, 260-5 (1999).
- 50 Hauben E., Schwartz M. "Therapeutic vaccination for spinal cord injury: helping the body to cure itself". *Trends Pharmacol Sci* 24:7-12 (2003).
- Hauben, E., Gothilf, A., Cohen, A., Butovsky, O., Nevo, U., Smirnov, I., Yoles, E., Akselrod, S. y Schwartz, M. (2003), *J Neurosci* 23, 8808-19.
- Hauben, E., Agranov, E., Gothilf, A., Nevo, U., Cohen, A., Smirnov, I., Steinman, L. y Schwartz, M. "Posttraumatic therapeutic vaccination with modified myelin self-antigen prevents complete paralysis while avoiding autoimmune disease". *J. Clin. Invest.* 108, 591-9 (2001).
- 55 Hauben, E., Butovsky, O., Nevo, U., Yoles, E., Moalem, G., Agranov, G., Mor, F., Leibowitz-Amit, R., Pevsner, E., Akselrod, S., Neeman, M., Cohen, I. R. y Schwartz, M. "Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion". *J. Neurosci.* 20, 6421-6430 (2000).
- Hellings N., Raus, J. Stinissen P. (2002), "Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis". *Immunol Res.* 25:27-51.
- 60 Hobom M., Storch M. K., Weissert R., Maier K., Radhakrishnan A., Kramer B., Bahr M., Diem R. (2004) "Mechanisms and time course of neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis". *Brain Pathol.* 14:148-157.
- Hsieh, J., Aimone, J. B., Kaspar, B. K., Kuwabara, T., Nakashima, K., y Gage, F.H. 2004. "IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes". *J Cell Biol* 164, 111-22 (2004).
- 65 Imitola, J., Raddassi, K., Park, K. I., Mueller, F. J., Nieto, M., Teng, Y. D., Frenkel, D., Li, J., Sidman, R. L., Walsh,

- C. A., Snyder, E. Y. y Khoury, S. J. *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU., 101, 18117-22 (2004a).
- Imitola, J., Comabella, M., Chandraker, A. K., Dangond, F., Sayegh, M. H., Snyder, E. Y. y Khoury, S. J. "Neural stem/progenitor cells express costimulatory molecules that are differentially regulated by inflammatory and apoptotic stimuli". *Am J Pathol* 164, 1615-25 (2004b).
- 5 Ishii, K. *et al.*, *Faseb J* 14, 1485 (2000).
- Iwai M., Sato K., Omori N., Nagano I., Manabe Y., Shoji M., Abe K. (2002) "Three steps of neural stem cells development in gerbil dentate gurus after transient ischemia", *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22:411-419.
- Jankowsky, J. L. *et al.*, *Hum Mol Genet* 13, 159 (2004).
- 10 Jin K., Sun Y., Xie L., Peel A., Mau X. O., Batteur S., Greenberg D. A. (2003) "Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. Molecular and Cellular Neuroscience", 24:171-189.
- Jones, L. L., Yamaguchi, Y., Stallcup, W. B. y Tuszynski, M. H. "NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors". *J Neurosci* 22, 2792-803 (2002).
- 15 Kawauchi S., Beites C. L., Crocker C. E., Wu H. H., Bonnin A., Murray R., Calof A. L. (2004) "Molecular signals regulating proliferation of stem and progenitor cells in mouse olfactory epithelium". *Dev. Neurosci.* 26:166-180.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B. y Kronenberg, G. "Milestones of neuronal development in the adult hippocampus". *Trends Neurosci* 27, 447-52 (2004).
- Kempermann, G., Kuhn, H.G. y Gage, F.H. "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment". *Nature* 386, 493-5 (1997).
- 20 Kipnis, J., Cohen, H., Cardon, M., Ziv, Y. y Schwartz, M. "T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: Implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions". *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU., 101, 4 8180-8185 (2004).
- Kipnis J., Nevo U., Panikashvili D., Alexandrovich A., Yoles E., Akselrod S., Shohami E., Schwartz M. (2003) "Therapeutic vaccination for closed head injury". *J. Neurotrauma* 20(6):559-569.
- 25 Kipnis, J. y Schwartz, M. (2002) "Dual Action of Glatiramer Acetate (Cop-1) as a Treatment for Autoimmune Diseases and a Vaccine for Protective Autoimmunity after CNS Injury". *Trends Mol. Med.* 8: 319-323.
- Kipnis, J., Mizrahi, T., Yoles, E., Ben-Nun, A., Schwartz, M. y Ben-Nur, A. *J Neuroimmunol* 130, 78-85 (2002a).
- Kipnis, J., Mizrahi, T., Hauben, E., Shaked, I., Shevach, E. y Schwartz, M. "Neuroprotective autoimmunity: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU., 99, 15620-5 (2002b).
- 30 Kipnis J., Yoles E., Porat Z., Cohen A., Mor F., Sela M., Cohen I. R., Schwartz M. (2000), "T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies", *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU. 97:7446-7451.
- Lafaille, J. J., Nagashima, K., Katsuki, M. y Tonegawa, S. "High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice". *Cell* 78, 399-408 (1994).
- 35 Ledeboer A., Breve J. P., Poole S., Tilders F. J., Van Dam A. M. (2000) "Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells". *Glia* 30:134-141.
- 40 Lepore, A. C. y Fischer, I. *Exp Neurol* 194, 230-42 (2005).
- Lessmann V., Gottmann K., MacLacangio M., (2003) "Neurotrophin secretion: current facts and future prospect. Progress in Neurobiology" 69:341-374.
- Li, W. W., Setzu, A., Zhao, C. y Franklin, R. J. "Minocycline-mediated inhibition of microglia activation impairs oligodendrocyte progenitor cell responses and remyelination in a non-immune model of demyelination". *J Neuroimmunol* 158:58-66 (2005).
- 45 Lu, P., Jones, L. L. y Tuszynski, M. H. *Exp Neurol* 191, 344-60 (2005).
- Magavi S. S., Leavitt B. R., Mackliss J. (2000) "Induction of Neurogenesis in the neocortex of adult mice". *Nature*, 405:951-955.
- Magavi S. S., Leavitt B. R., Mackliss J. (2000) "Induction of Neurogenesis in the neocortex of adult mice". *Nature*, 405:951-955.
- 50 Mason, J. L., Ye, P., Suzuki, K., D'Ercole, A. J. y Matsushima, G. K. "Insulin-like growth factor-1 inhibits mature oligodendrocyte apoptosis during primary demyelination". *J Neurosci* 20, 5703-8 (2000).
- McDonald, J. W., Becker, D., Holekamp, T. F., Howard, M., Liu, S., Lu, A., Lu, J., Platik, M. M., Qu, Y., Stewart, T. y Vadivelu, S. *J Neurotrauma* 21, 383-93 (2004).
- 55 Merrill, J. E., Ignarro, L. J., Sherman, M. P., Melinek, J. y Lane, T. E. "Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide". *J Immunol* 151, 2132-41 (1993).
- Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Yoles, E., Mor, F., Cohen, I.R. y Schwartz M., "Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy". *Nat. Med.* 5, 49-55 (1999).
- Moalem, G., Gdalyahu, A., Shani, Y., Otten, U., Lazarovici, P., Cohen, I.R. y Schwartz, M., "Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity". *J Autoimmun* 15, 331-45 (2000).
- 60 Monje, M. L., Mizumatsu, S., Fike, J. R. y Palmer, T. D. "Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction". *Nat Med* 8, 955-62 (2002).
- Monje, M. L., Toda, H. y Palmer, T. D. "Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis". *Science* 302, 1760-5 (2003).
- 65 Morris, R. *J Neurosci Methods* 11, 47 (1984).

- Morshead, C. M. *et al.* "Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells". *Neuron* 13, 1071-82 (1994).
- Nakatomi, H., Kuriu, T., Okabe, S., Yamamoto, S., Hatano, O., Kawahara, N., Tamura, A., Kirino, T. y Nakafuku, M. *Cell* 110, 429-41 (2002).
- 5 Ness, J. K. & Wood, T. L. "Insulin-like growth factor I, but not neurotrophin-3, sustains Akt activation and provides long-term protection of immature oligodendrocytes from glutamate-mediated apoptosis". *Mol Cell Neurosci* 20, 476-88 (2002).
- Neumann, H., Misgeld, T., Matsumuro, K. y Wekerle, H. "Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor". *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95:5779-5784 (1998).
- 10 Newman M. P., Feron F., Mackay-Sim A. (2000), "Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium". *Neuroscience* 99:343-350.
- O'Kusky, J. R., Ye, P. y D'Ercole, A. J. "Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development". *J Neurosci* 20, 8435-42 (2000).
- 15 O'Rourke N. A., Sullivan D. P., Kaznowsky C. E., Jacobs A. A., McConnell S. K. (1995) "Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex". *Development* 121:2165-2176.
- Packer, M. A. *et al.* "Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 100, 9566-71 (2003).
- 20 Pencea V, Bingaman K. D., Wiegand S. J., Luskin M. B. (2001), "Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus". *J Neurosci.* 1:6706-6717.
- Picard-Riera N., Decker L., Delarasse C., Goude K., Nait-Oumesmar B., Liblau R., Pham-Dinh D., Evercooren (2002) "Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilized neuronal progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice". *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 99:13211-13216.
- 25 Picard-Riera N., Nait-Oumesmar B., Baron-Van Evercooren A. (2004) "Endogenous adult neural stem cells: limits and potential to repair the injured central nervous system". *J Neurosci. Res.* 76:223-231.
- Pluchino, S., Quattrini, A., Brambilla, E., Gritti, A., Salani, G., Dina, G., Galli, R., Del Carro, U., Amadio, S., Bergami, A., Furlan, R., Comi, G., Vescovi, A. L. y Martino, G. "Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis". *Nature* 422, 688-94 (2003).
- 30 Popovich, P. G., Wei, P. y Stokes, B. T. "Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats". *J Comp Neurol* 377, 443-64 (1997).
- Popovich, P. G. *et al.* "The neuropathological and behavioral consequences of intraspinal microglial/macrophage activation". *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 623-33 (2002).
- 35 Rapalino, O., Lazarov-Spiegler, O., Agranov, E., Velan, G. J., Yoles, E., Fraidakis, M., Solomon, A., Gepstein, R., Katz, A., Belkin, M., Hadani, M. y Schwartz, M. *Nat Med* 4, 814-21 (1998).
- Schori, H., Yoles, E. y Schwartz, M. "T-cell-based immunity counteracts the potential toxicity of glutamate in the central nervous system". *J. Neuroimmunol.* 119, 199-204 (2001).
- Schori H., Kipnis J., Yoles E., WoldeMussie E., Ruiz G., Wheeler L. A., Schwartz M. (2001b) "Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma". *Proc Natl Acad Sci, EE.UU.*, 98:3398-3403.
- 40 Schlegel P. G., Aharoni R., Chen Y., Chen J., Teitelbaum D., Arnon R., Sela M., Chao N. J. (1996) "A synthetic random copolymer with promiscuous binding to class II MHC molecules inhibits T-cell proliferative response to major and minor histocompatibility antigens in vitro and confers the capacity to prevent murine graft-versus-host disease in vivo". *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 93: 5061-6.
- 45 Schwartz, M. y Hauben, E. "T cell-based therapeutic vaccination for spinal cord injury". *Prog Brain Res* 137, 401-6 (2002).
- Schwartz, M. y Kipnis, "J. Harm or heal-divergent effects of autoimmune neuroinflammation?. Response from Schwartz and Kipnis". *Trends Immunol* 24, 7-8 (2003).
- 50 Schwartz, M. y Kipnis, J. "Autoimmunity on alert: naturally occurring regulatory CD4(+)CD25(+) T cells as part of the evolutionary compromise between a 'need' and a 'risk'". *Trends Immunol.* 23, 530-4 (2002).
- Schwartz M., Kipnis J. (2002) "Multiple sclerosis as a by-product of the failure to sustain protective autoimmunity: a paradigm shift". *Neuroscientist* 8: 405-413.
- Schwartz, M., Shaked, I., Fisher, J., Mizrahi, T. y Schori, H. "Protective autoimmunity against the enemy within: fighting glutamate toxicity". *Trends Neurosci.* 26, 297-302 (2003).
- 55 Setoguchi, T., Nakashima, K., Takizawa, T., Yanagisawa, M., Ochiai, W., Okabe, M., Yone, K., Komiya, S. y Taga, T., "Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor". *Exp Neurol* 189, 33-44 (2004).
- Shaked, I., Porat, Z., Gersner, R., Kipnis, J. y Schwartz, M. "Early activation of microglia as antigen-presenting cells correlates with T cell-mediated protection and repair of the injured central nervous system". *J Neuroimmunol* 146, 84-93 (2004).
- 60 Shaked, I., Tchoresh, D., Gersner, R., Meiri, G., Mordechai, S., Xiao, X., Hart, R. P. & Schwartz, M. *J Neurochem* 92, 997-1009 (2005).
- Shors, T. J. *et al.* "Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories". *Nature* 410, 372-6 (2001).
- 65 Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y. y Gould, E. "Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning". *Hippocampus* 12, 578-84 (2002).

Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J. y Wojtowicz, J. M. "A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory". *Neuroscience* 130, 843-52 (2005).
 Stollg G., Jander S. (1999) "The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS". *Progress in Neurology* 58:233-247
 5 van Praag, H., G. Kempermann, F. H. Gage, *Nat Rev Neurosci* 1, 191 (2000).
 van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J. & Gage, F.H. "Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 96, 13427-31 (1999).
 Yoles, E., Hauben, E., Palgi, O., Agranov, E., Gothilf, A., Cohen, A., Kuchroo, V., Cohen, I. R., Weiner, H. y Schwartz, M. "Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma". *J Neurosci* 21, 3740-8
 10 (2001a).
 Yoles, E., Friedmann, I., Barouch, R., Shani, Y. y Schwartz, M. *J Neurotrauma* 18, 339-49 (2001b).
 Zhao, X., Ueba, T., Christie, B. R., Barkho, B., McConnell, M. J., Nakashima, K., Lein, E. S., Eadie, B. D., Willhoite, A. R., Muotri, A. R., Summers, R. G., Chun, J., Lee, K. F. y Gage, F. H. "Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function". *Proc Natl Acad Sci, EE.UU.*, 100, 6777-82 (2003).
 15 Zielasek J, Tausch M, Toyka K. V., Hartung H. P., "Production of nitrite by neonatal rat microglial cells/brain macrophages". *Cell Immunol* 141:111-120 (1992).

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD. Eisenbach-schwartz, Michal Ruth, Arnon Butovsky, oleg Ziv, Yaniv Kipnis, Jonathan Ron, Noga Eilam, Raya Aharoni, Rina

<120> INDUCCIÓN DE LA NEUROGÉNESIS Y TERAPIA CON CÉLULAS MADRE EN COMBINACIÓN CON EL COPOLÍMERO 1

25 <130> TEVA-008 PCT

<150> US 60/631.163

<151> 29-11-2004

30 <150> US 60/690.498

<151> 15-06-2005

<160> 44

35 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 15

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

45 <400> 1

Ala Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15

50 <210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Sintética

<400> 2

Ala Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15

5	<210> 3 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Sintética <400> 3 Ala Lys Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala 1 5 10 15
15	<210> 4 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
20	<220> <223> Sintética <400> 4 Ala Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala 1 5 10 15
25	<210> 5 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
30	<220> <223> Sintética <400> 5 Ala Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala 1 5 10 15
35	<210> 6 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
40	<220> <223> Sintética <400> 6 Lys Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala 1 5 10 15
45	<210> 7 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
50	<220> <223> Sintética
55	<210> 7 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
55	<220> <223> Sintética

<400> 7

Ala Glu Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

5 <210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 8

Ala Ala Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

15 <210> 9
<211> 15
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

25 <400> 9

Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

30 <210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sintética

<400> 10

Ala Ala Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

40 <210> 11
<211> 15
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 11

50 Ala Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

55 <210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

	<220> <223> Sintética	
5	<400> 12	
		Glu Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala 1 5 10 15
10	<210> 13 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Sintética	
	<400> 13	
		Glu Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala 1 5 10 15
20	<210> 14 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Sintética	
	<400> 14	
30		Glu Ala Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala 1 5 10 15
35	<210> 15 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sintética	
	<400> 15	
		Ala Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala 1 5 10 15
45	<210> 16 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sintética	
	<400> 16	
55		Ala Lys Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala 1 5 10 15

5	<210> 17 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Sintética
	<400> 17
	Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala 1 5 10 15
15	<210> 18 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
20	<220> <223> Sintética
	<400> 18
	Ala Lys Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala 1 5 10 15
25	<210> 19 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
30	<220> <223> Sintética
35	<400> 19
	Ala Glu Ala Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala 1 5 10 15
40	<210> 20 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
45	<220> <223> Sintética
	<400> 20
	Lys Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala 1 5 10 15
50	<210> 21 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
55	<220>

<223> Sintética

<400> 21

Ala Glu Glu Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Sintética

<400> 22

Ala Ala Glu Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 23

Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 24

Ala Ala Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 25

Ala Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
5	<220>
	<223> Sintética
	<400> 26
	Glu Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
	1 5 10 15
10	<210> 27
	<211> 15
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
15	<220>
	<223> Sintética
	<400> 27
20	Glu Ala Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
	1 5 10 15
25	<210> 28
	<211> 15
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Sintética
30	<400> 28
	Ala Glu Tyr Ala Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
	1 5 10 15
35	<210> 29
	<211> 15
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
40	<220>
	<223> Sintética
	<400> 29
45	Ala Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
	1 5 10 15
50	<210> 30
	<211> 15
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Sintética
55	<400> 30

Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

5 <210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética
 <400> 31

Ala Tyr Lys Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

15 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética
 <400> 32

Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

25 <210> 33
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética
 35 <400> 33
 aggaggcgct ccccaaaaag atggg 25

40 <210> 34
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintética
 <400> 34
 gtacatgggc tcataccagg gcttg 25

50 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Sintética
 <400> 35
 caggctccta gcatacctgc 20

60 <210> 36

	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 36		
10	gctggtaaag gtgagcaagc	20	
	<210> 37		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 37		
20	ttgtaaccaa ctgggacgat atgg	24	
	<210> 38		
	<211> 24		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
30	<400> 38		
	gatcttgatc ttcattgtgc tagg	24	
	<210> 39		
	<211> 21		
35	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
40	<400> 39		
	Met Glu val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg val val His Leu		
	1 5 10 15		
	Tyr Arg Asn Gly Lys		
	20		
45	<210> 40		
	<211> 21		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 40		
	Met Glu val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Asp Arg val val His Leu		
	1 5 10 15		
	Tyr Arg Asn Gly Lys		
	20		
55			

5	<210> 41 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintética	
10	<400> 41 gtggataccc cctccccag cctagacc	28
15	<210> 42 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintética	
20	<400> 42 cctctttgtg actatgtgga ctgatgtcgg	30
25	<210> 43 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintética	
30	<400> 43 aatagagaac ggcaggagca	20
35	<210> 44 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintética	
40	<400> 44 gccatgaggg cactaatcat	20
45		

REIVINDICACIONES

1. Un agente neuroprotector seleccionado entre Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el Copolímero 1, un péptido relacionado con el Copolímero 1 y linfocitos T activados que han sido activados por el Copolímero 1, un polipéptido relacionado con el Copolímero 1 o un péptido relacionado con el Copolímero 1, en combinación con
5 terapia de células madre con la condición de que dichas células madre no sean células madre embrionarias humanas, para su uso en el tratamiento de una lesión del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP), un trastorno de Parkinson tal como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple o esclerosis lateral amiotrófica (ELA), en donde dicho polipéptido
10 relacionado con el Copolímero 1/péptido relacionado con el Copolímero 1 reacciona funcionalmente de forma cruzada con la proteína básica de la mielina (MPB) y es capaz de competir con la MBP en el MHC de clase II en la presentación de antígenos.
2. El agente neuroprotector de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho agente neuroprotector es para la administración a un paciente antes, simultáneamente o después del trasplante de las células madre a dicho paciente.
- 15 3. El agente neuroprotector de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho agente neuroprotector es Copolímero 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
4. El agente neuroprotector de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células madre son células madre adultas, células madre embrionarias con la
20 condición de que dichas células madre embrionarias no sean células madre embrionarias humanas, células madre de sangre del cordón umbilical, células madre hematopoyéticas, células madre de sangre periférica, células madre mesenquimales, células madre multipotentes, células madre neuronales, células progenitoras neuronales, células madre estromales, células progenitoras o precursores de las mismas, o células madre diseñadas por ingeniería genética.
- 25 5. El agente neuroprotector de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha lesión del SNC se selecciona entre lesión de la médula espinal, traumatismo craneal cerrado, traumatismo contuso, traumatismo penetrante, apoplejía hemorrágica, apoplejía isquémica, isquemia cerebral, lesión del nervio óptico, infarto de miocardio y lesión causada por escisión tumoral.

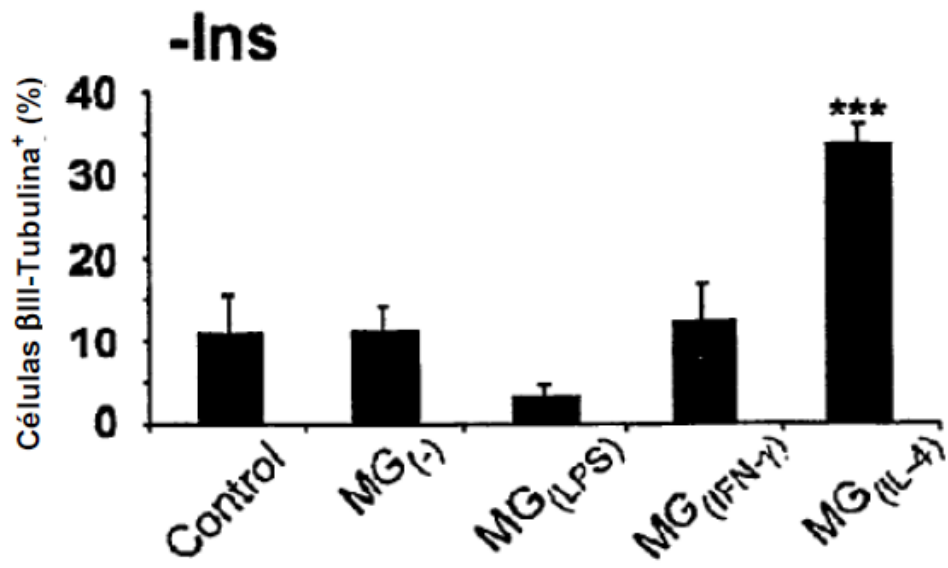


Fig. 1A

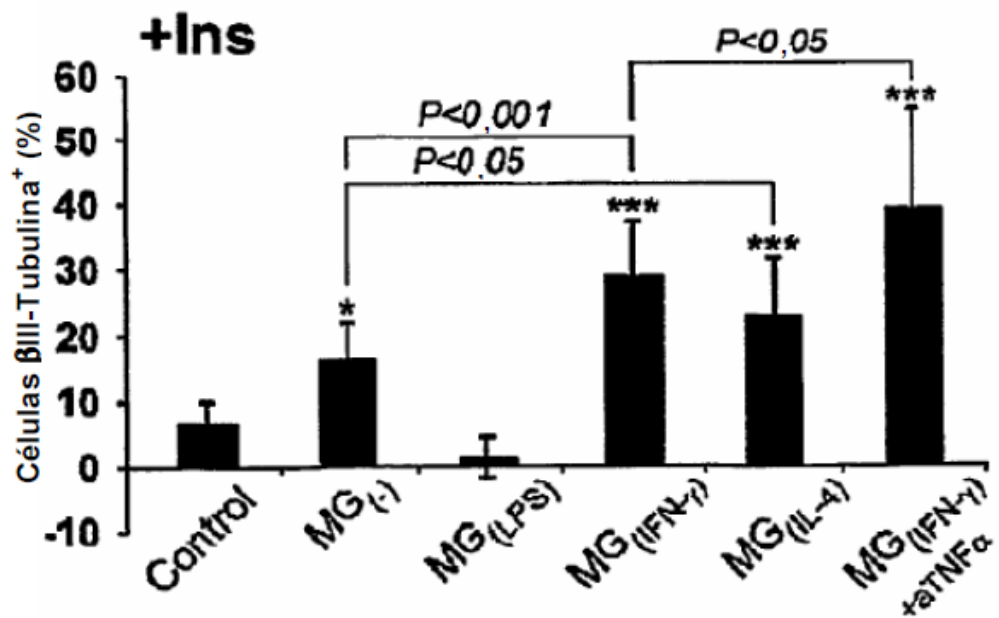


Fig. 1B

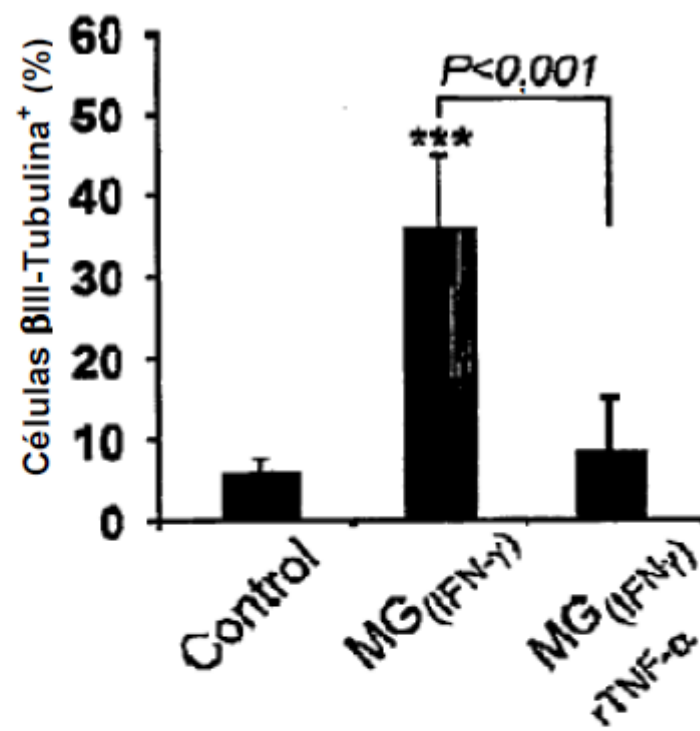


Fig. 1C

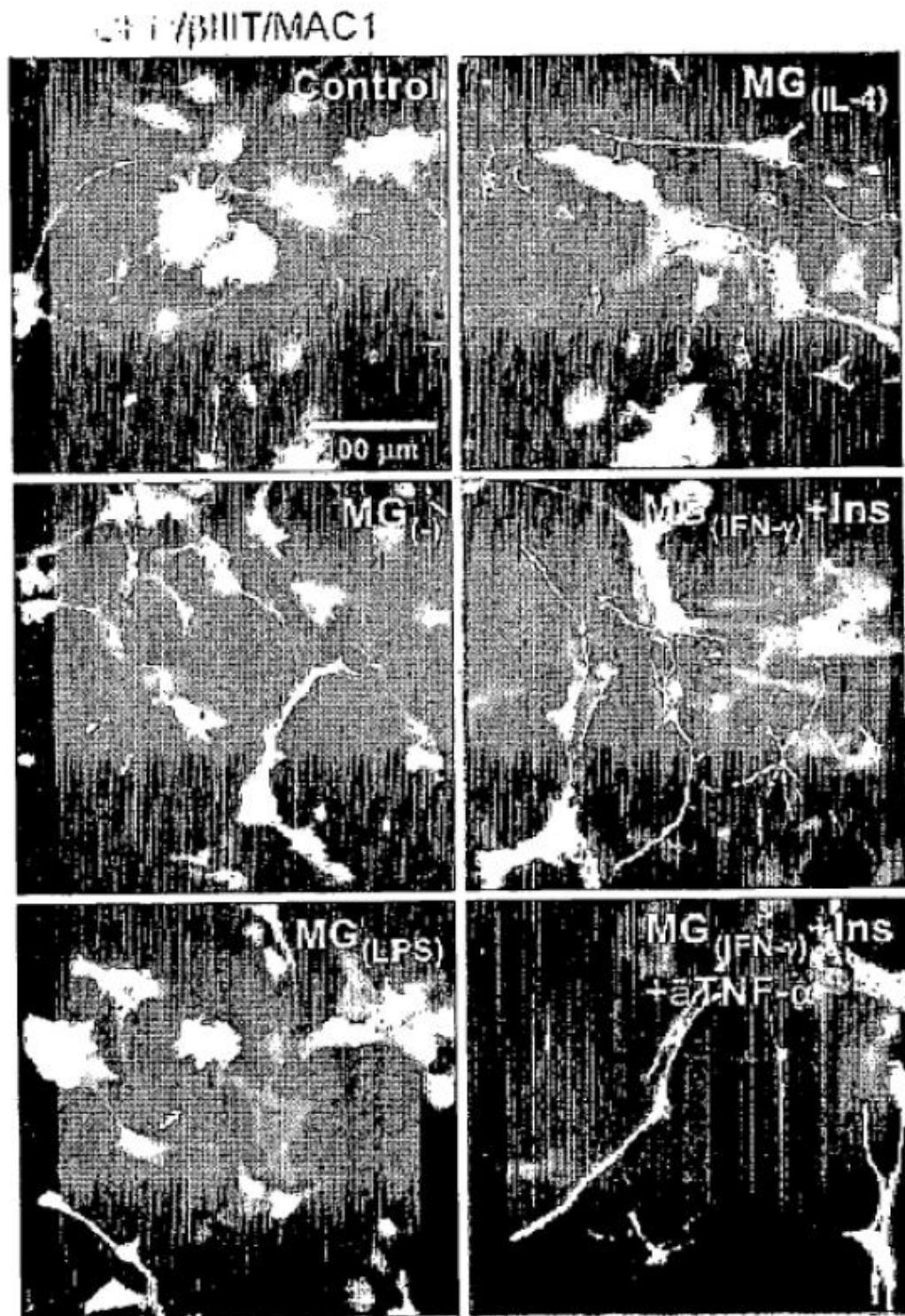


Fig. 1D

GFP/ β IIIIT/Nestina

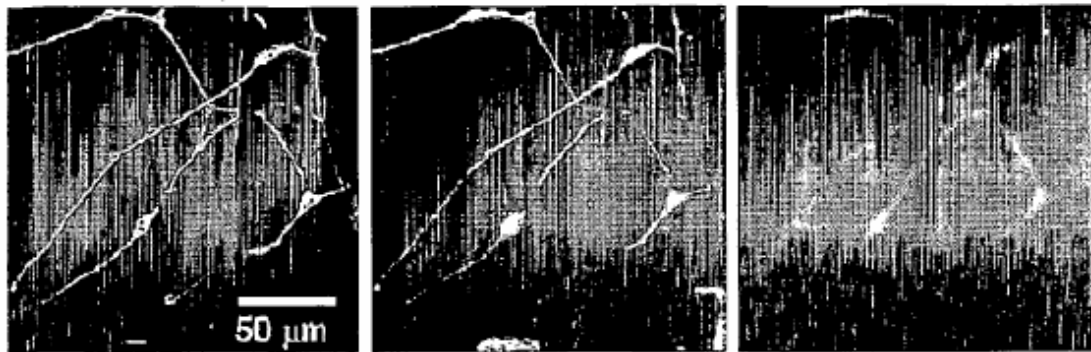


Fig. 1E

GFP/ β IIIIT/GAD

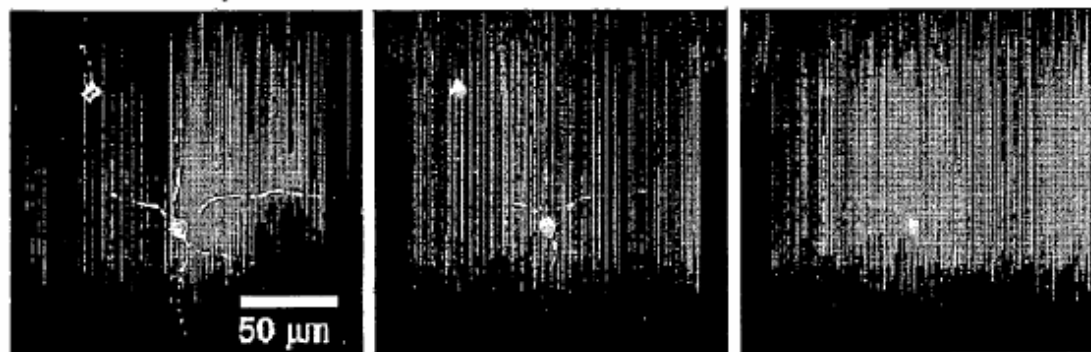


Fig. 1F

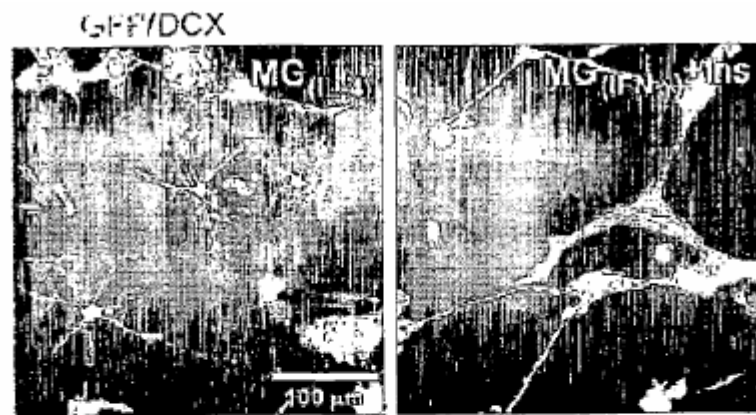


Fig. 2A

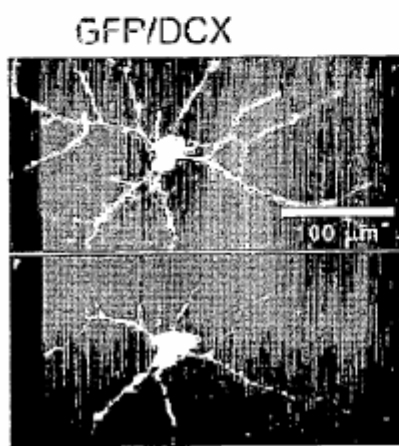


Fig. 2B

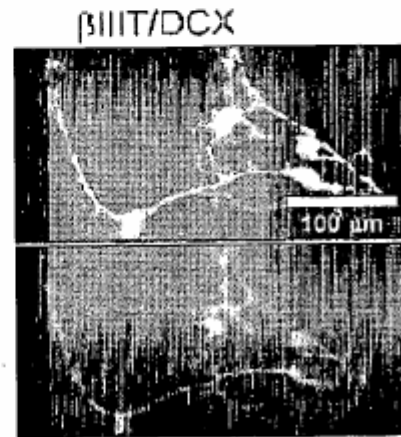


Fig. 2C

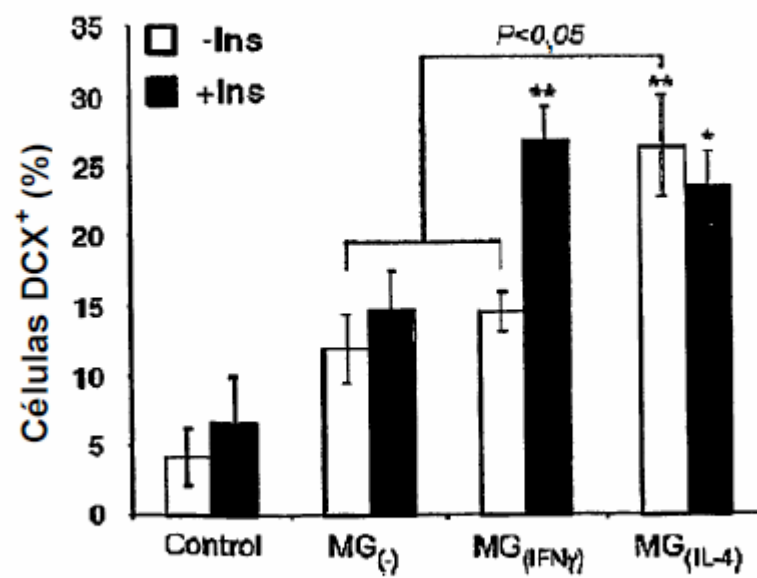


Fig. 2D

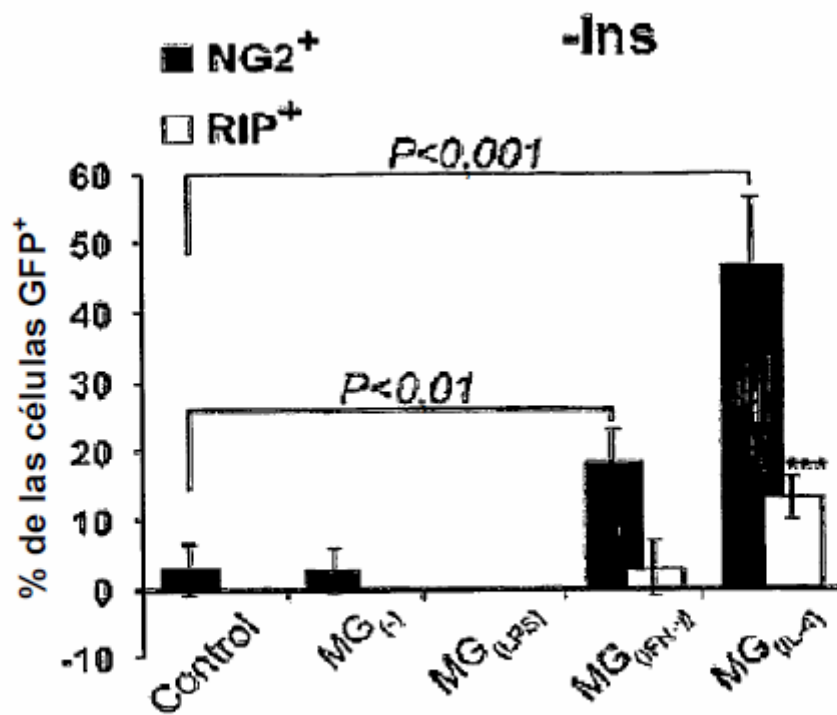


Fig. 3A

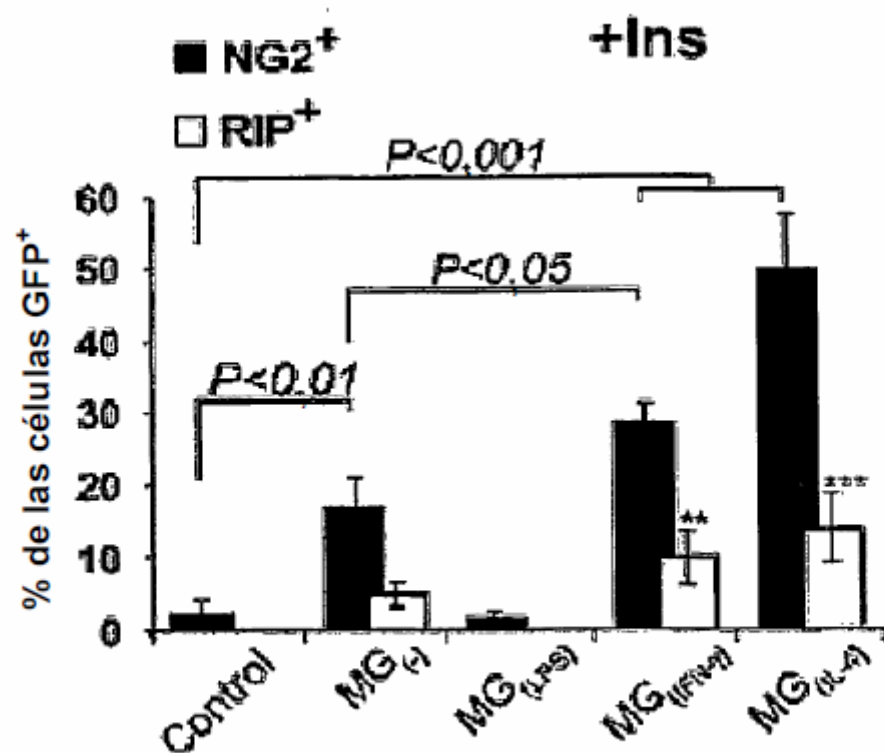


Fig. 3B

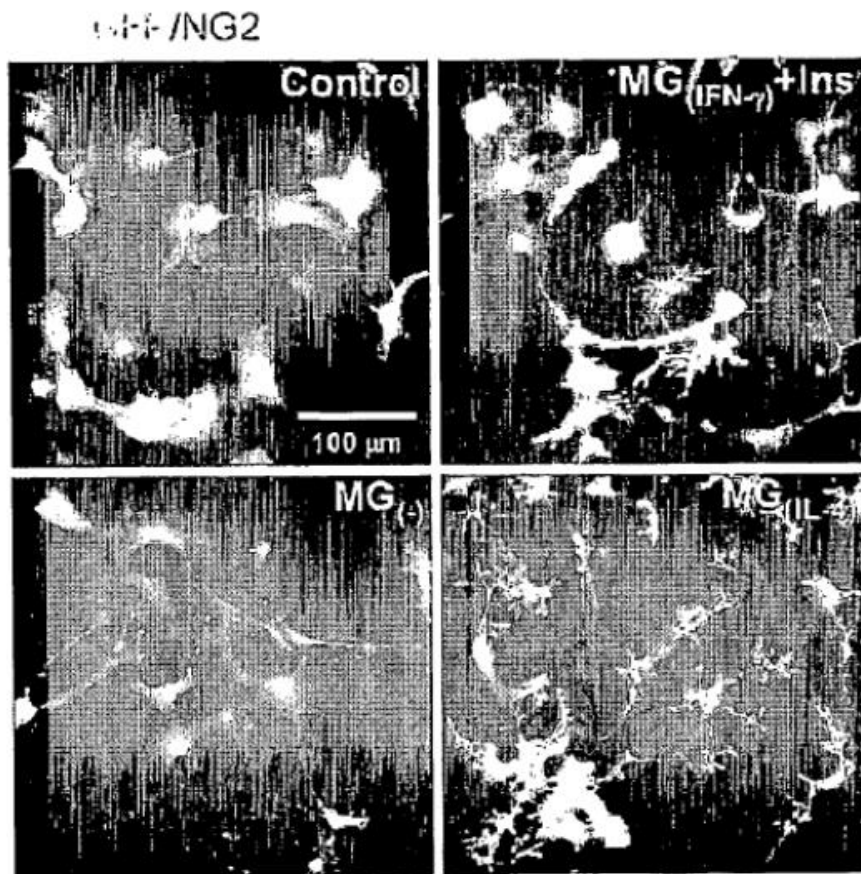


Fig. 3C

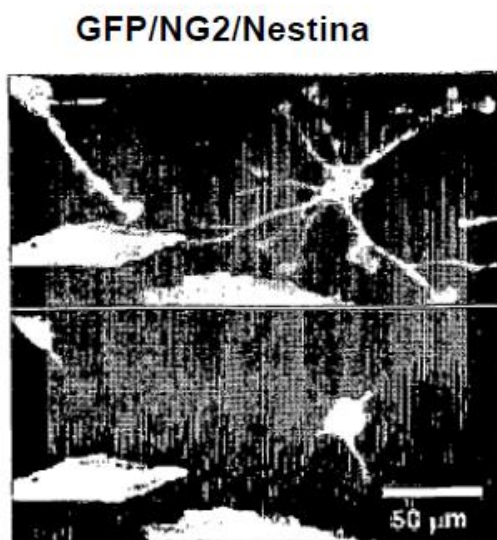


Fig. 3D

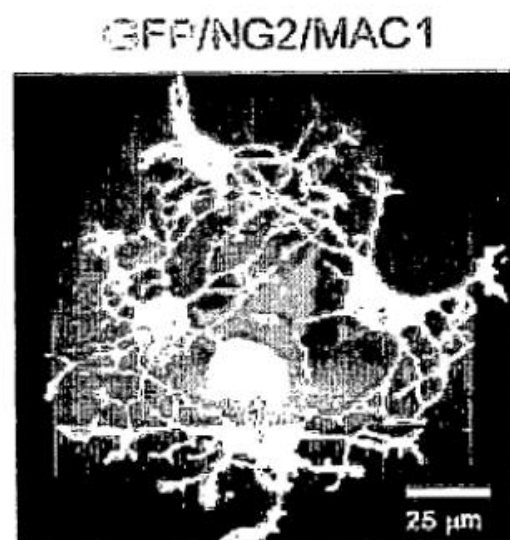


Fig. 3E

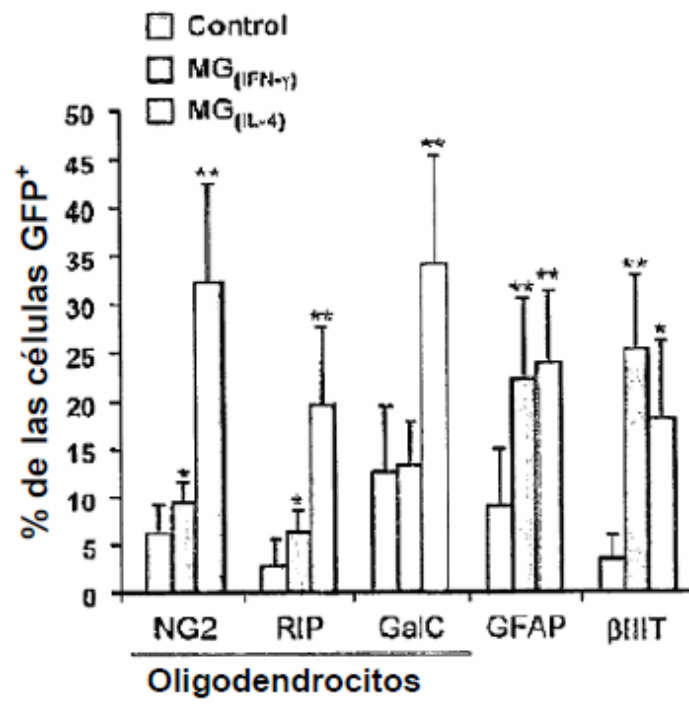


Fig. 4A

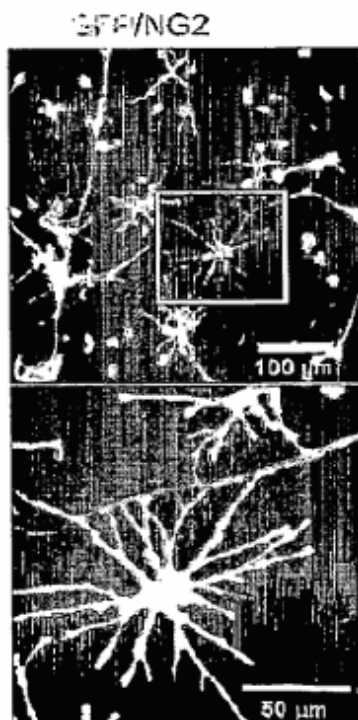


Fig. 4B

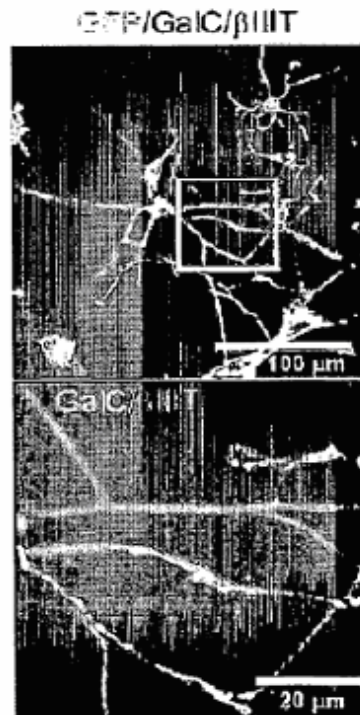


Fig. 4C

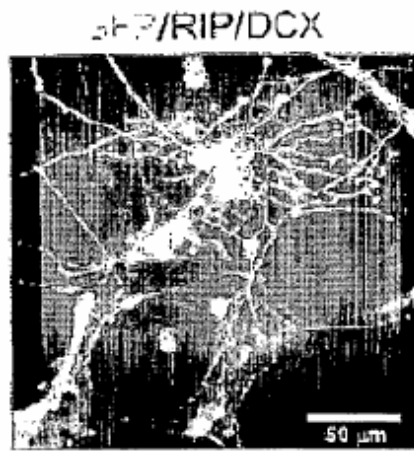


Fig. 4D

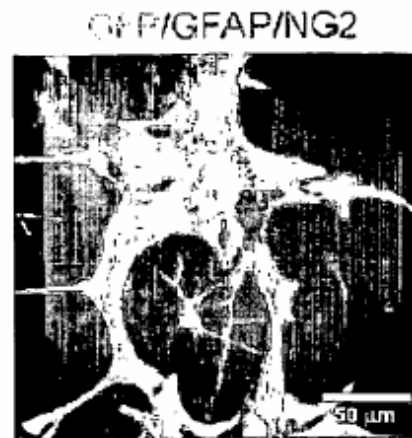


Fig. 4E

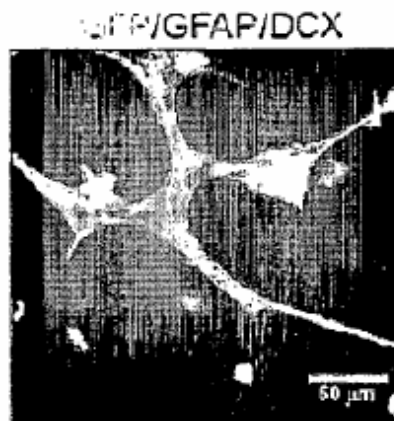


Fig. 4F

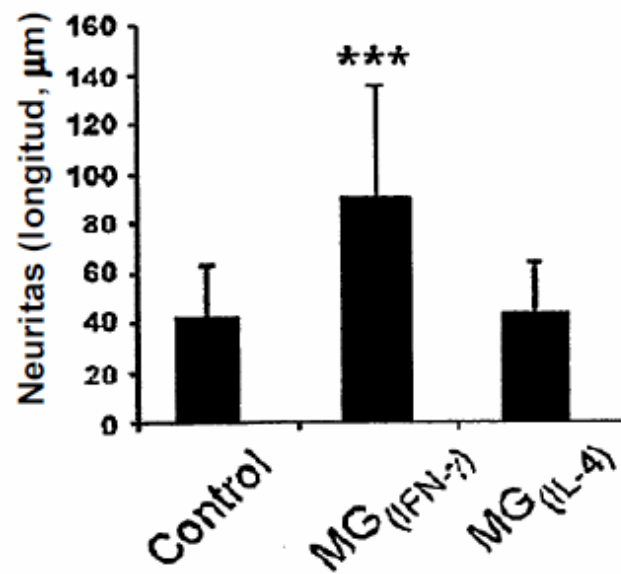


Fig. 4G

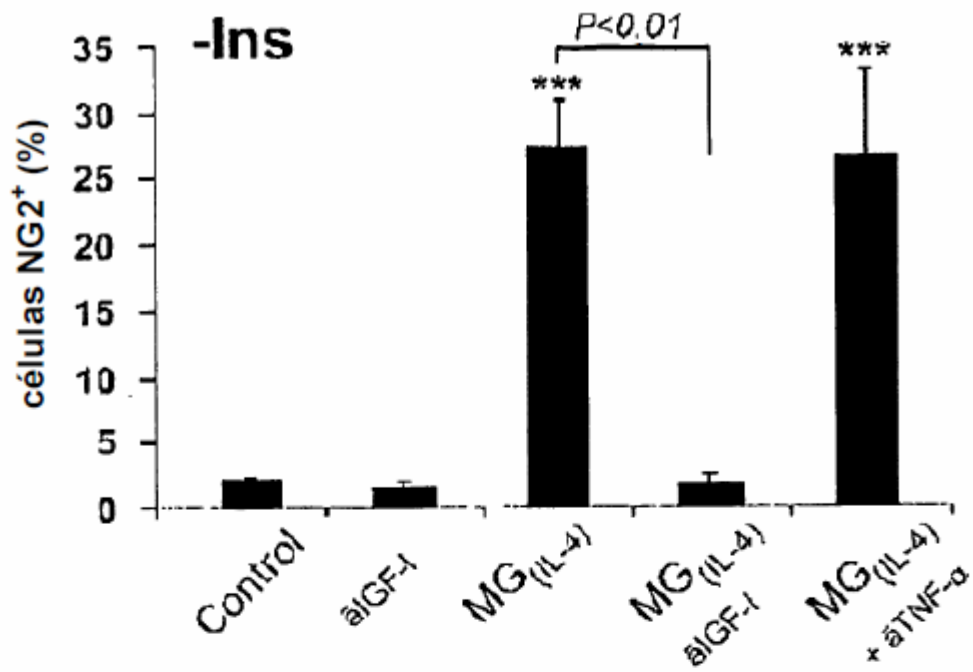


Fig. 5A

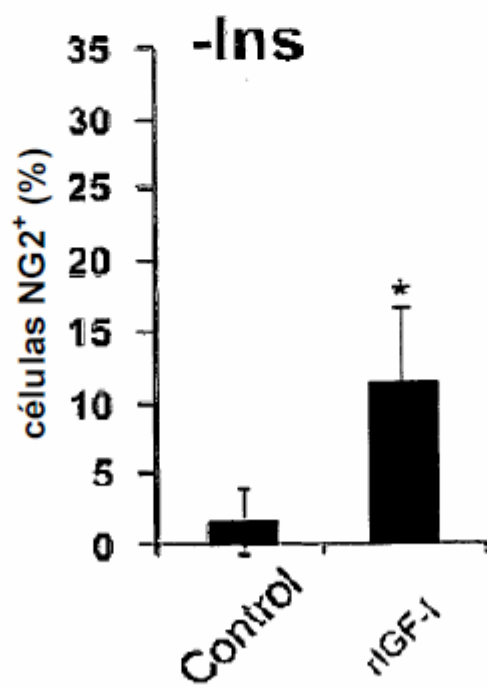


Fig. 5B

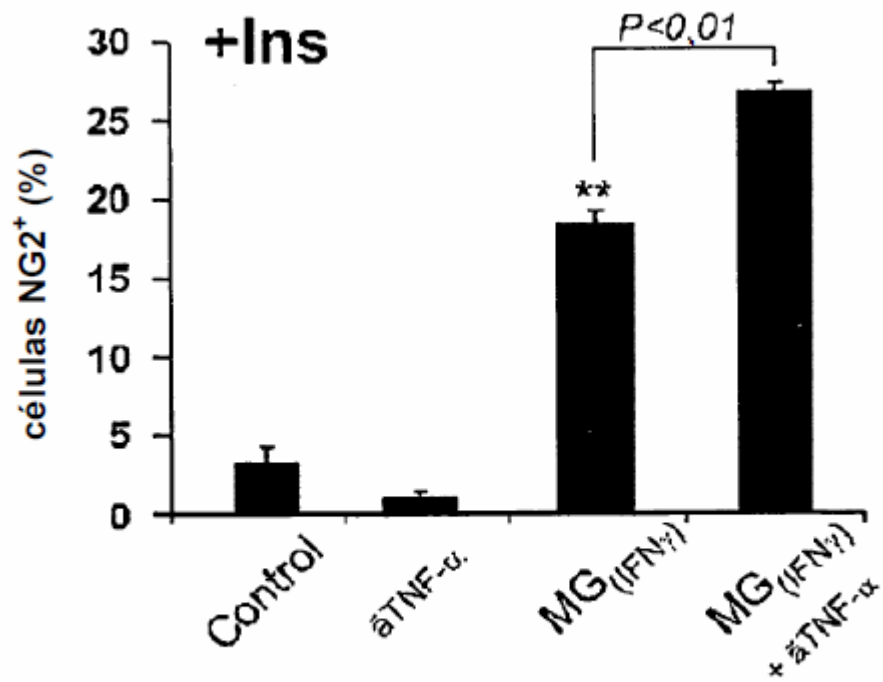


Fig. 5C

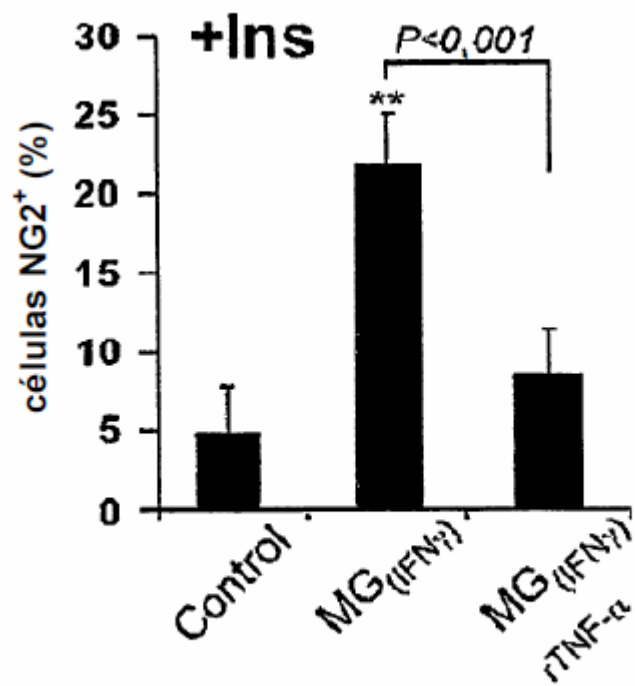


Fig. 5D

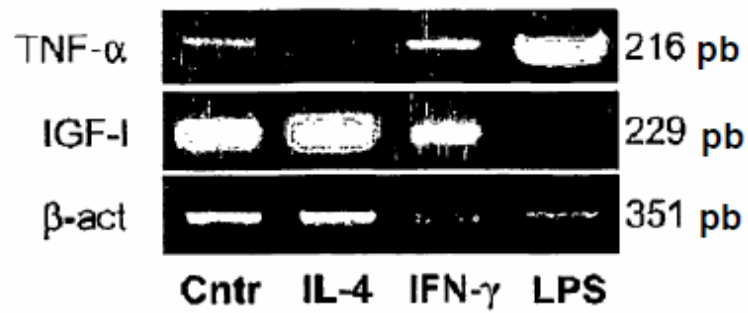


Fig. 6A

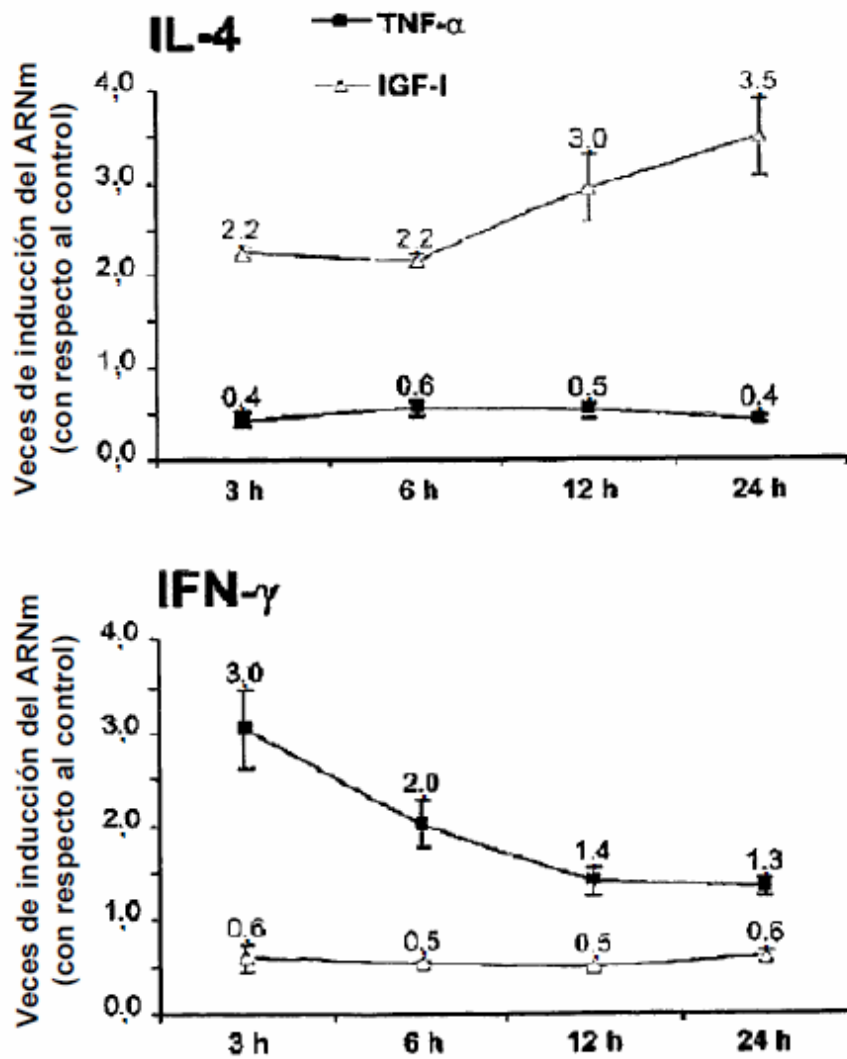


Fig. 6B

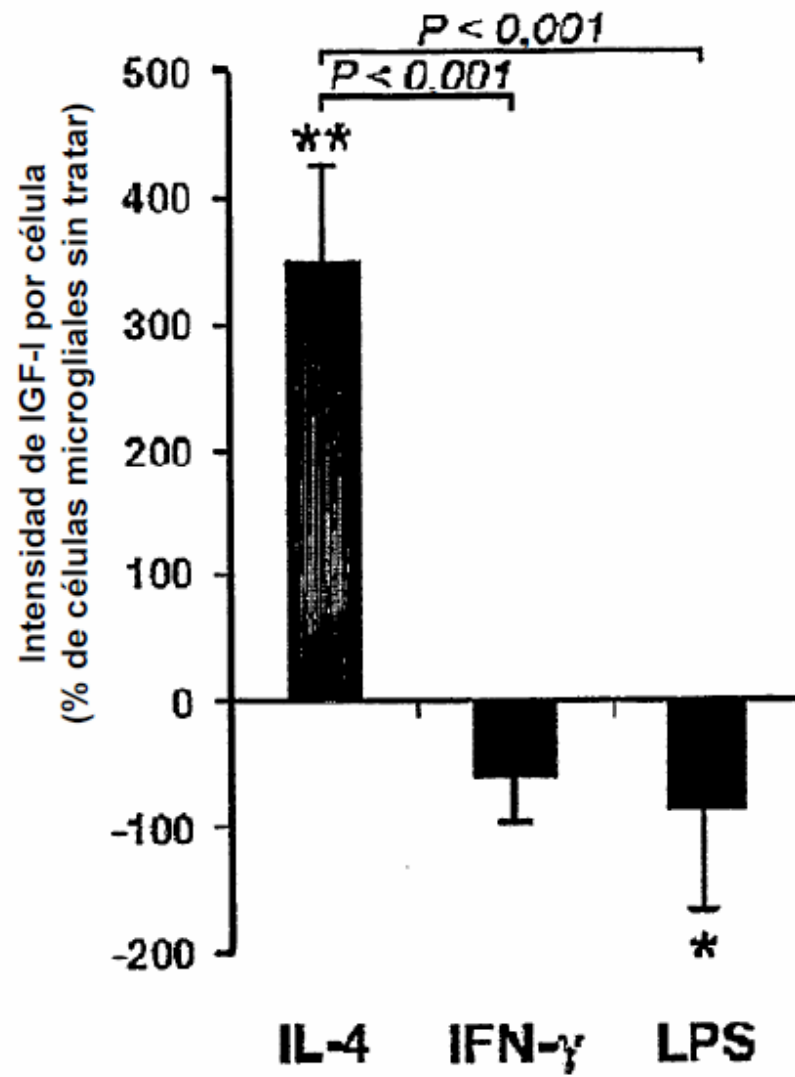


Fig. 6C

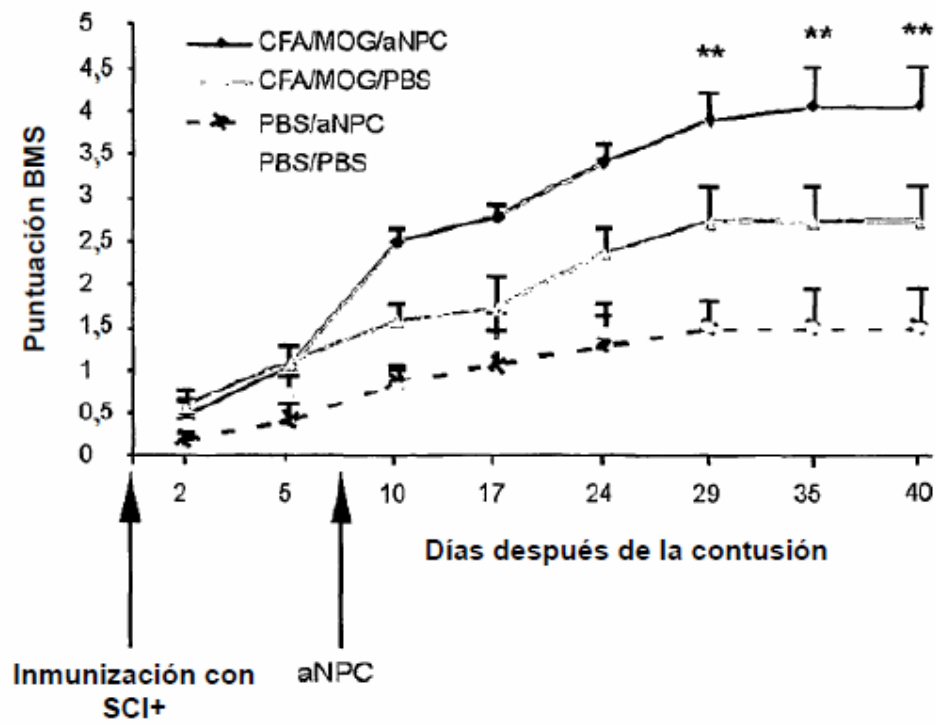


Fig. 7A

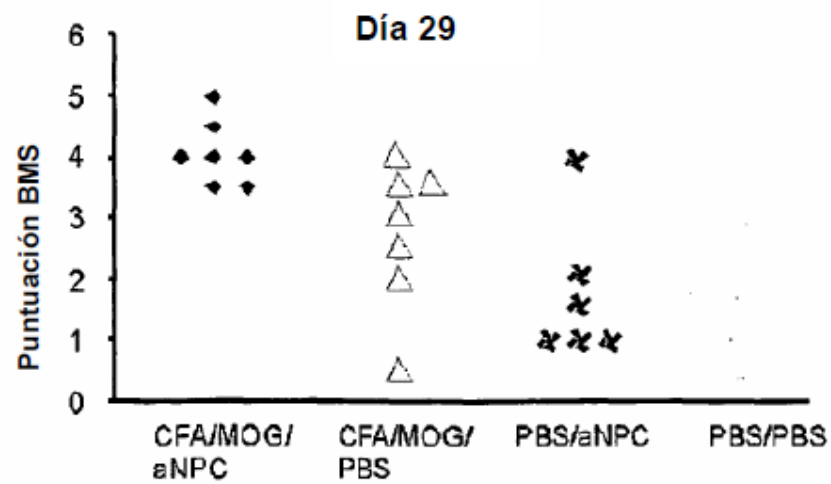


Fig. 7B

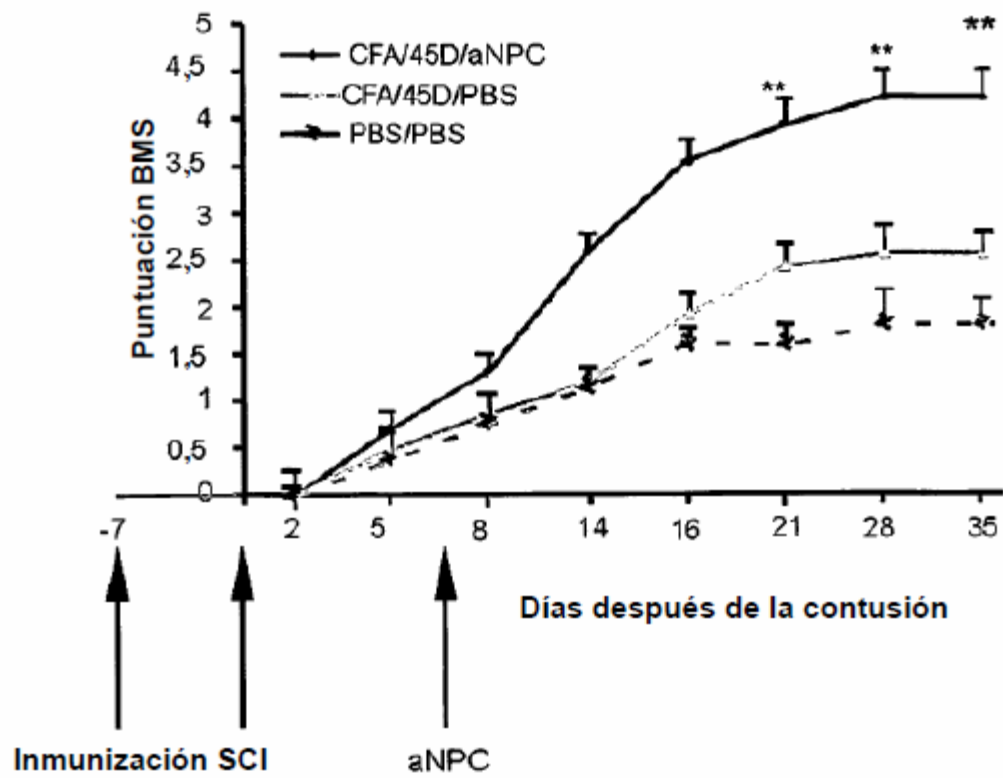


Fig. 7C

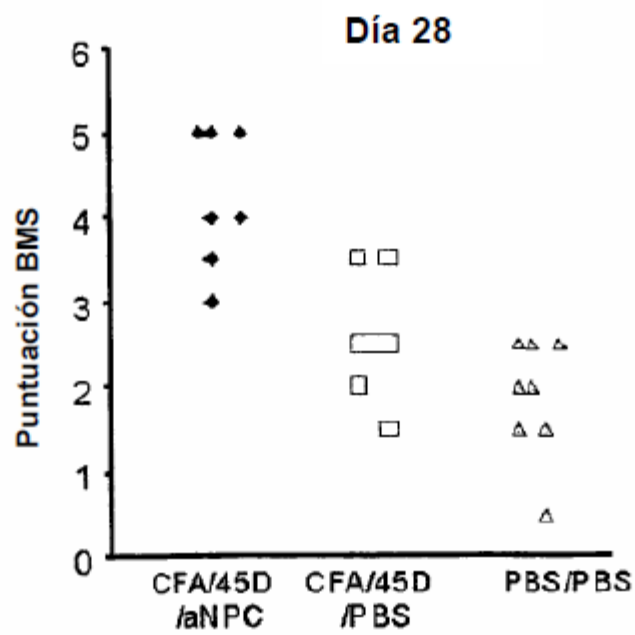


Fig. 7D

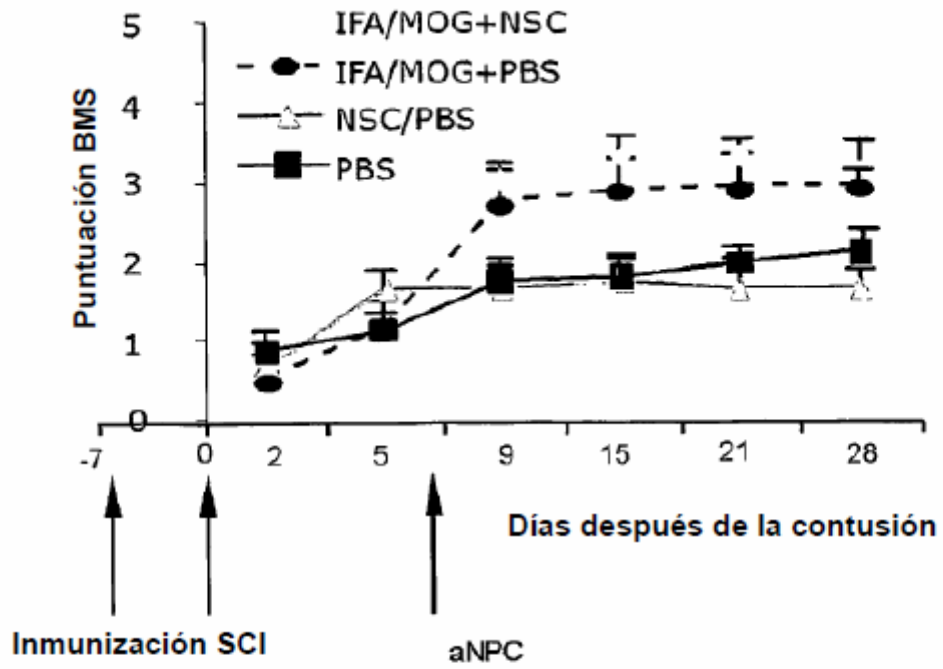


Fig. 7E

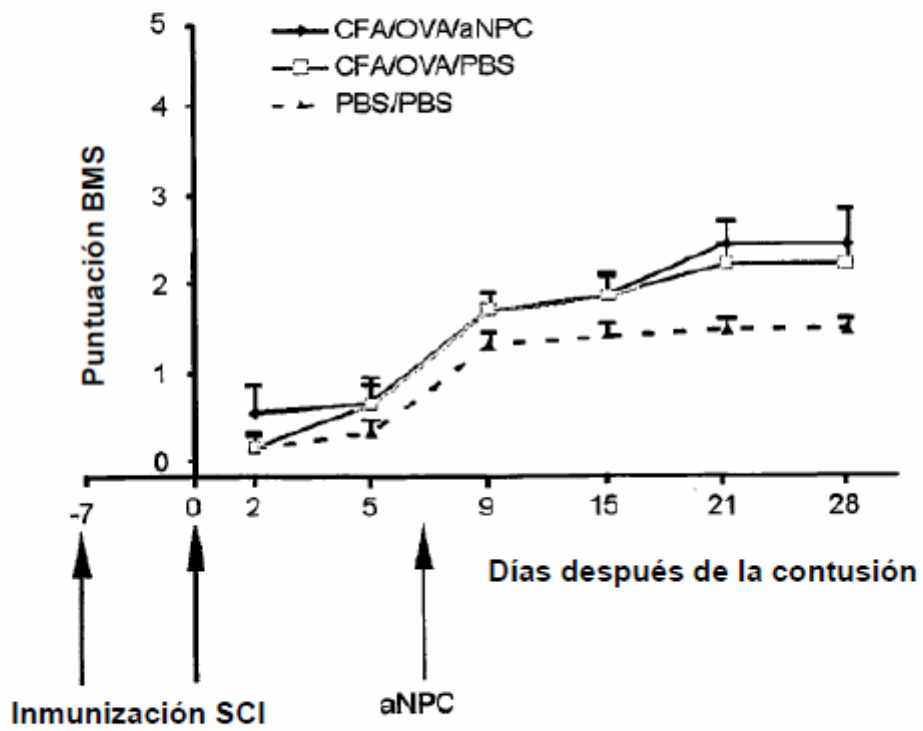


Fig. 7F

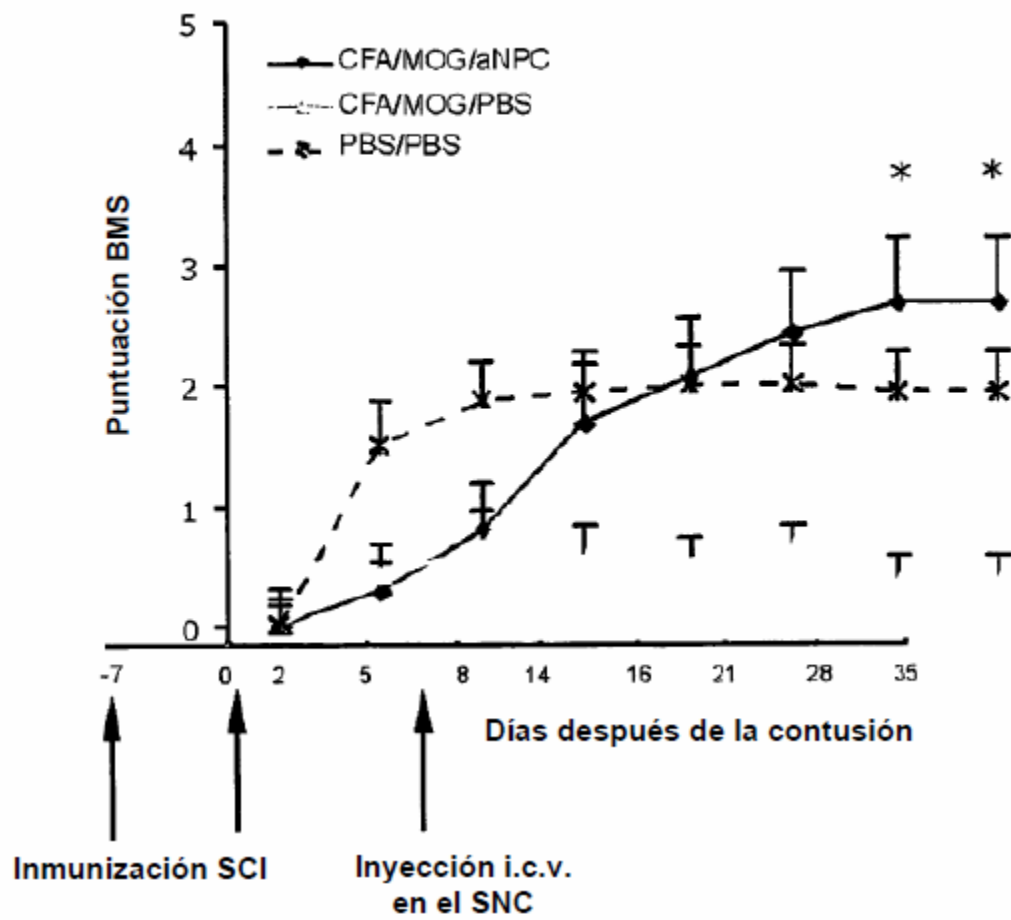


Fig. 7G

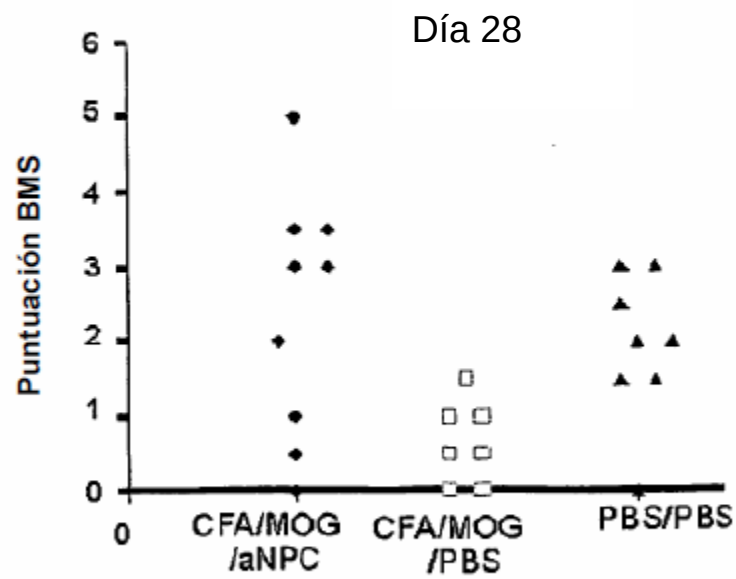


Fig. 7H

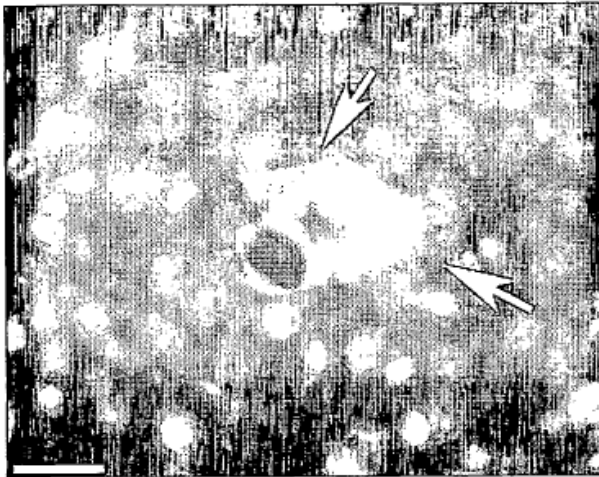


Fig. 8A



Fig. 8B

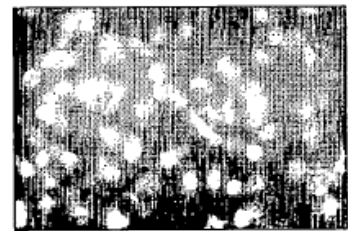


Fig. 8C

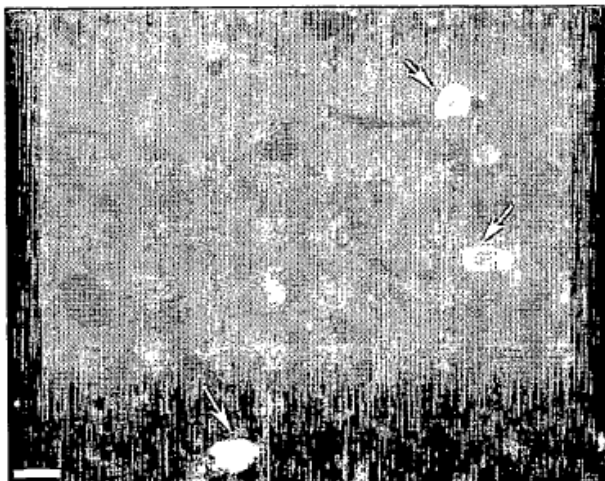


Fig. 8D

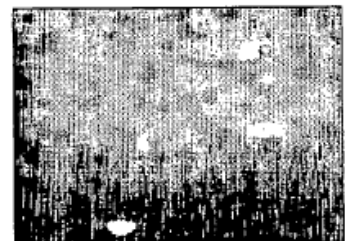


Fig. 8E

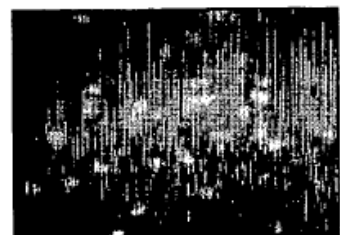


Fig. 8F

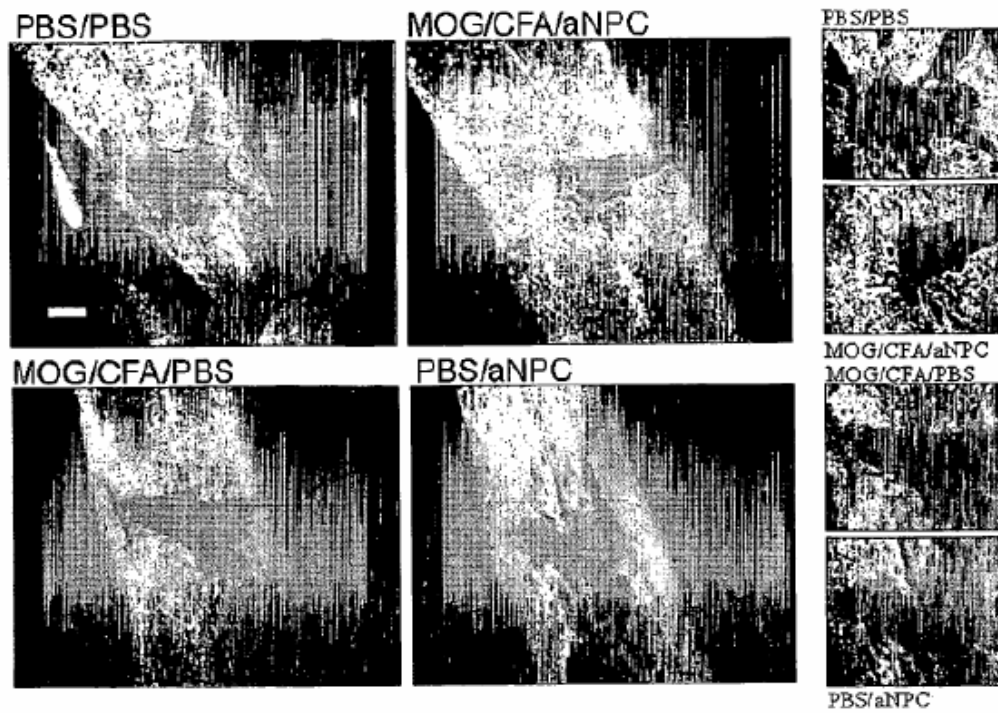


Fig. 9A

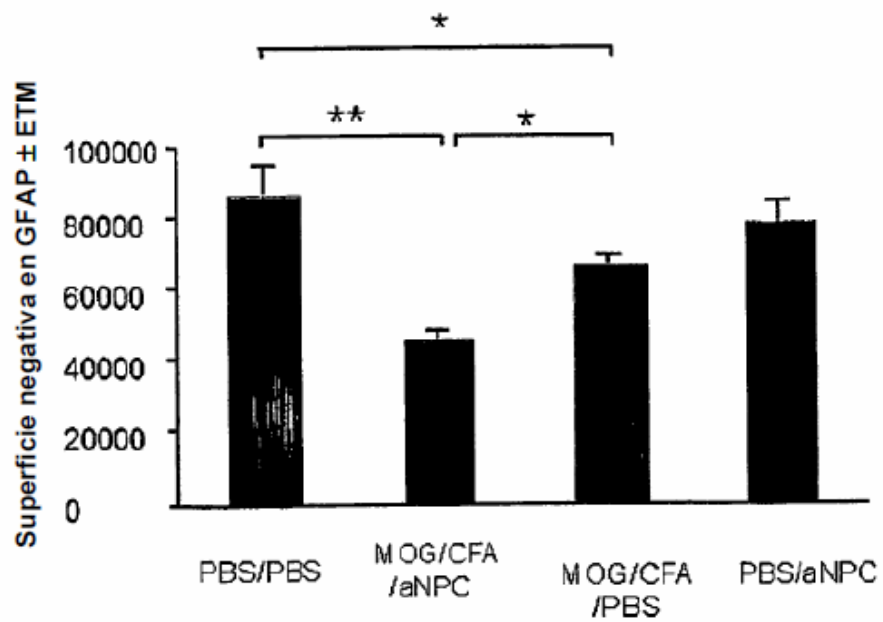


Fig. 9B

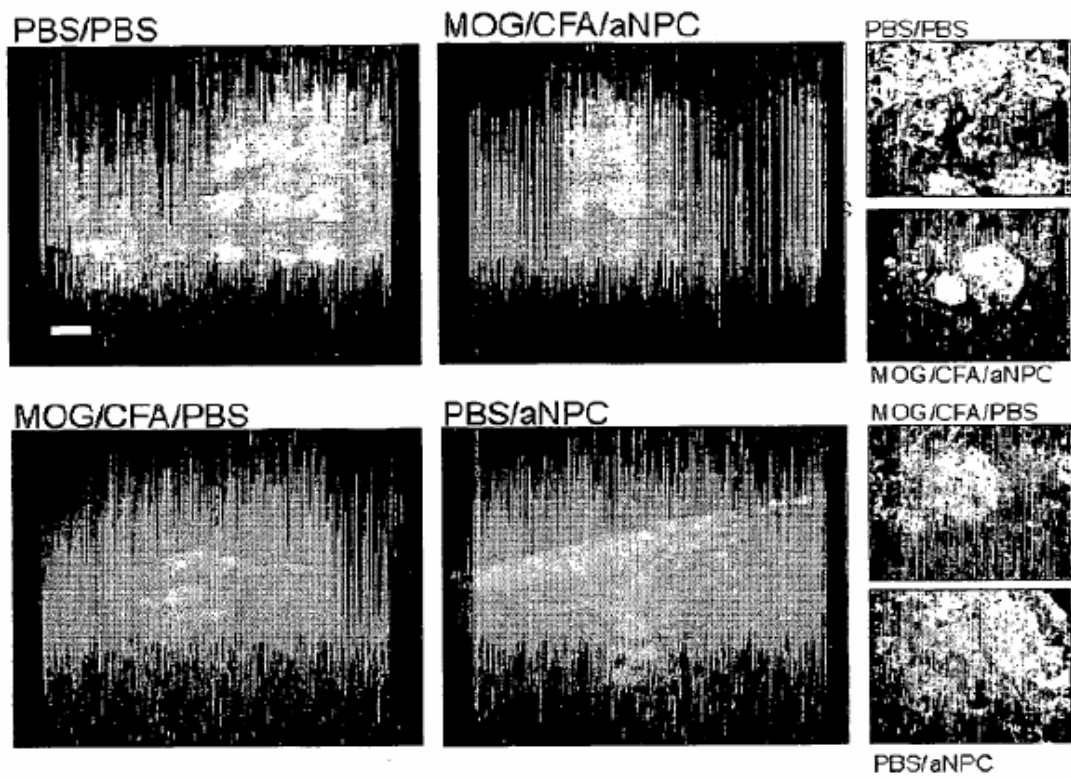


Fig. 9C

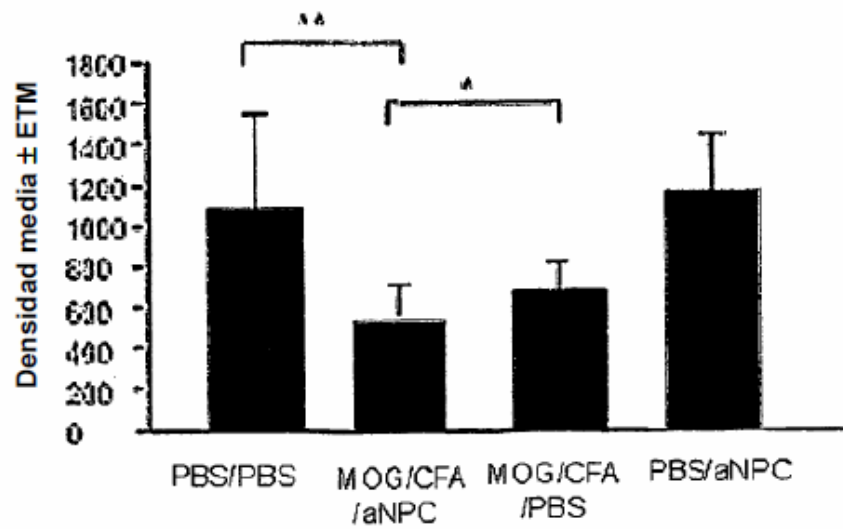


Fig. 9D

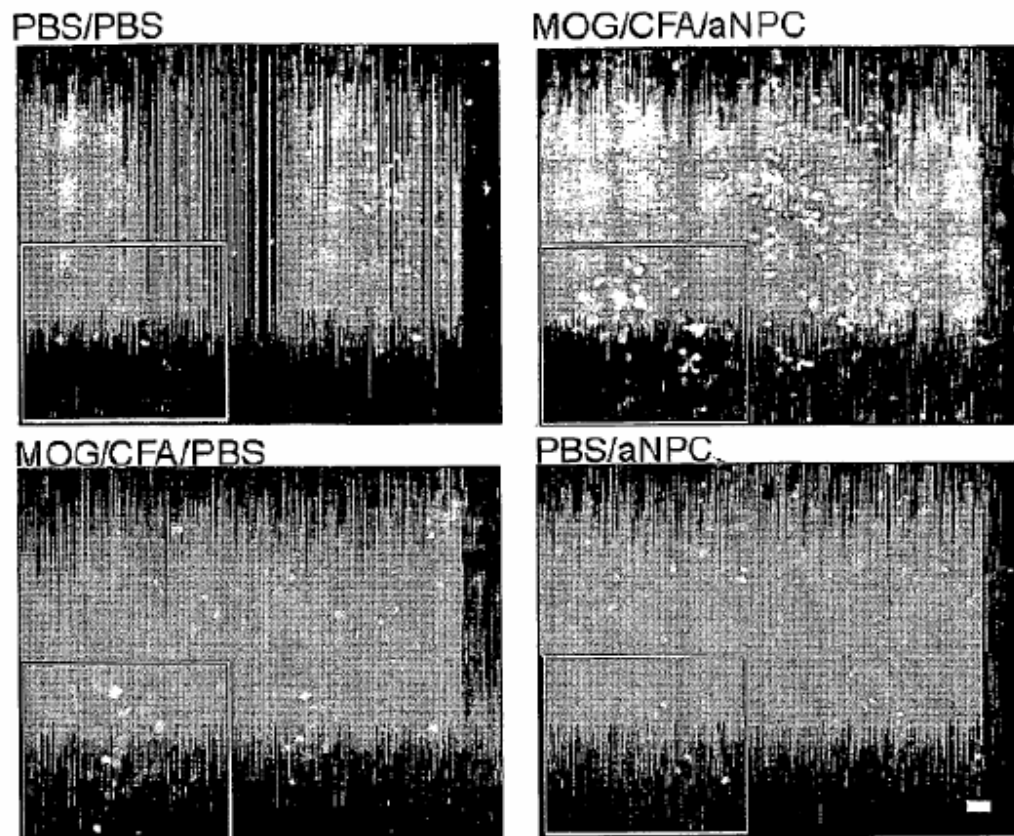


Fig. 9E

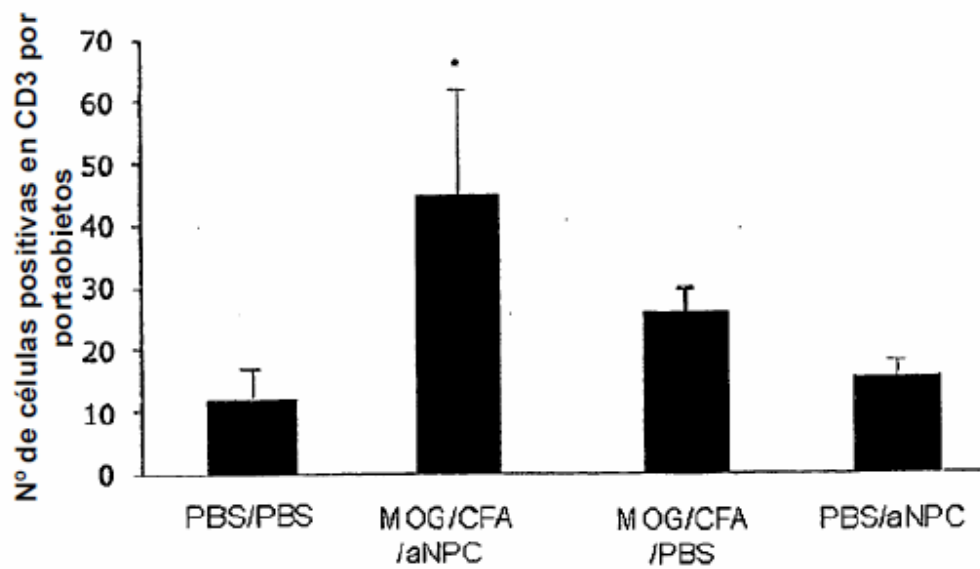


Fig. 9F

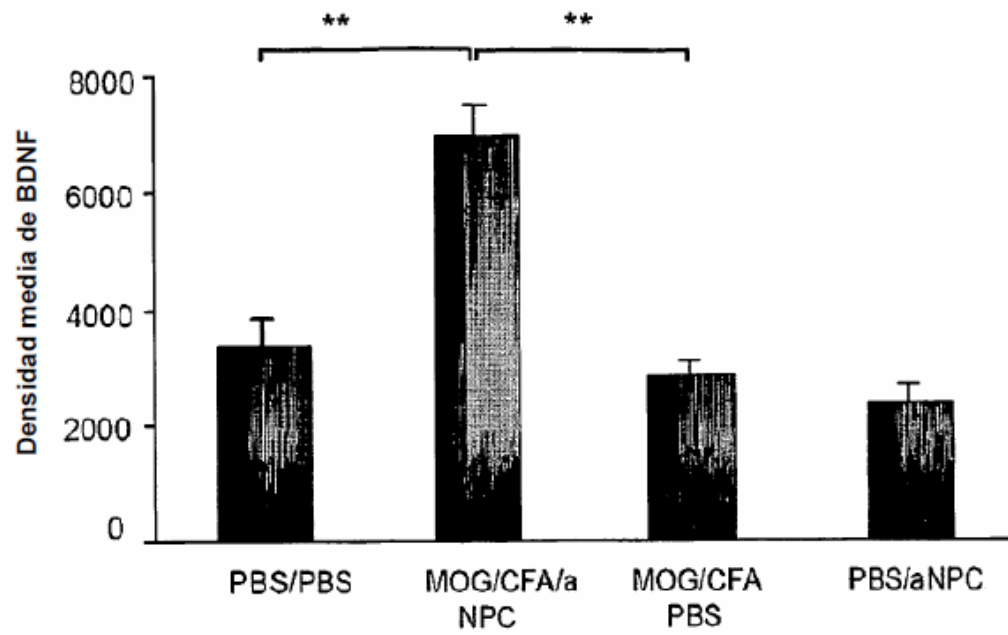


Fig. 10A

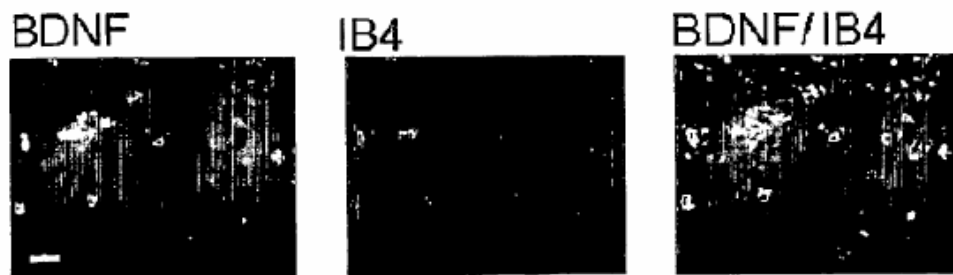


Fig. 10B

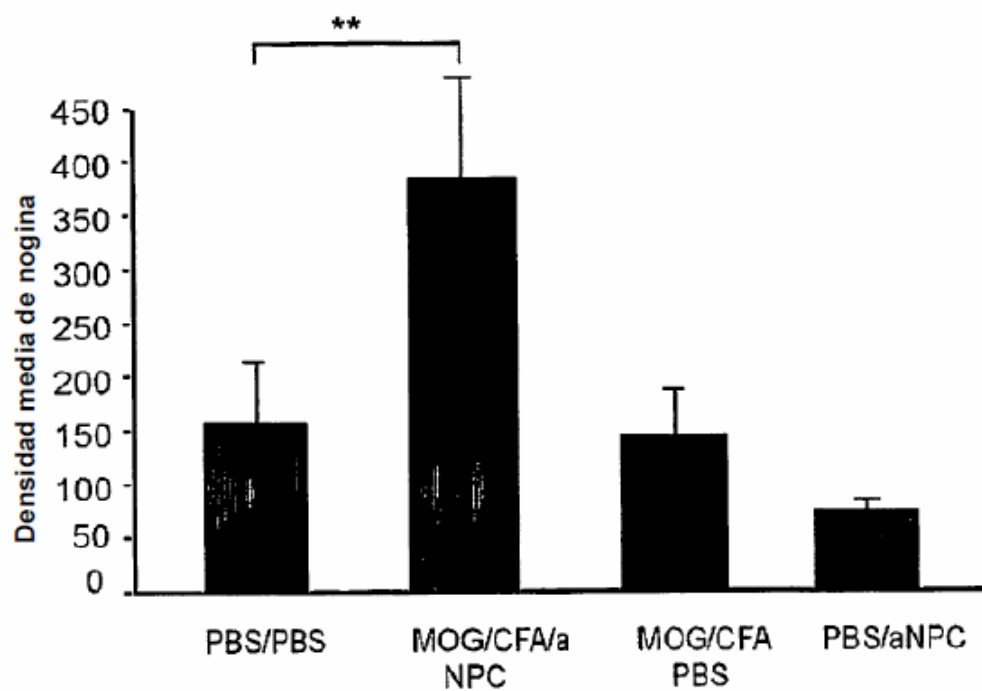


Fig. 10C



Fig. 10D

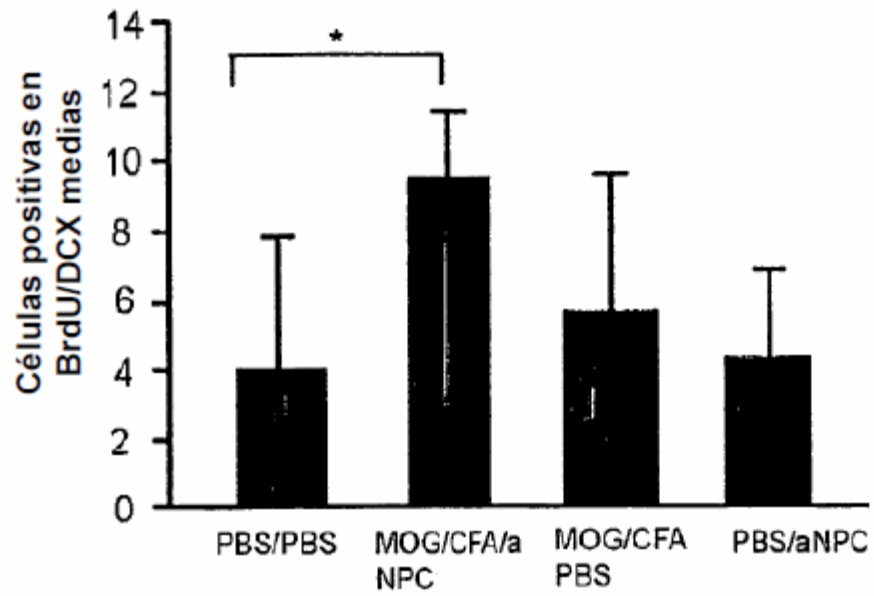


Fig. 11A

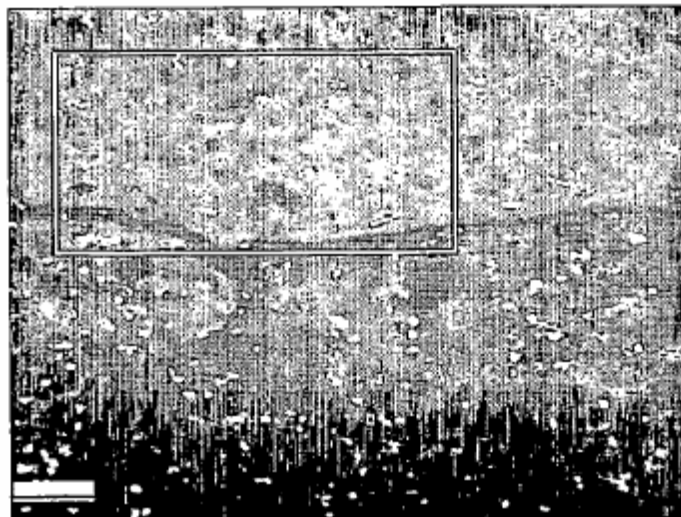


Fig. 11B

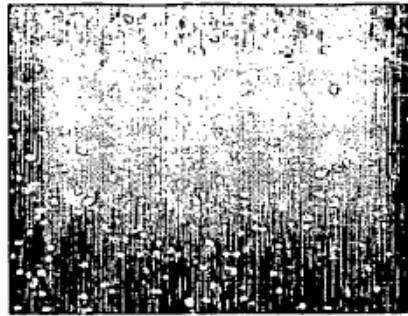


Fig. 11C

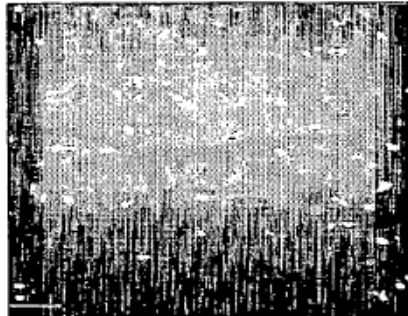


Fig. 11D

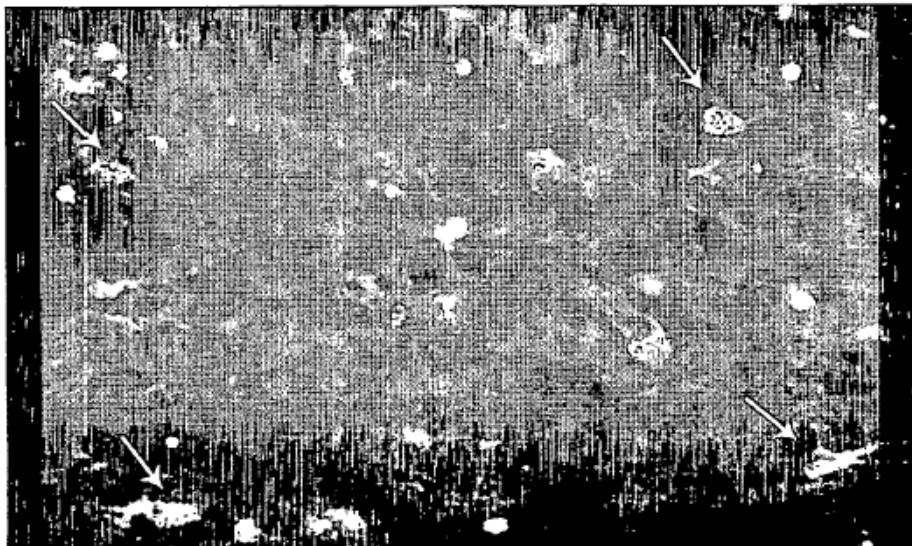


Fig. 11E

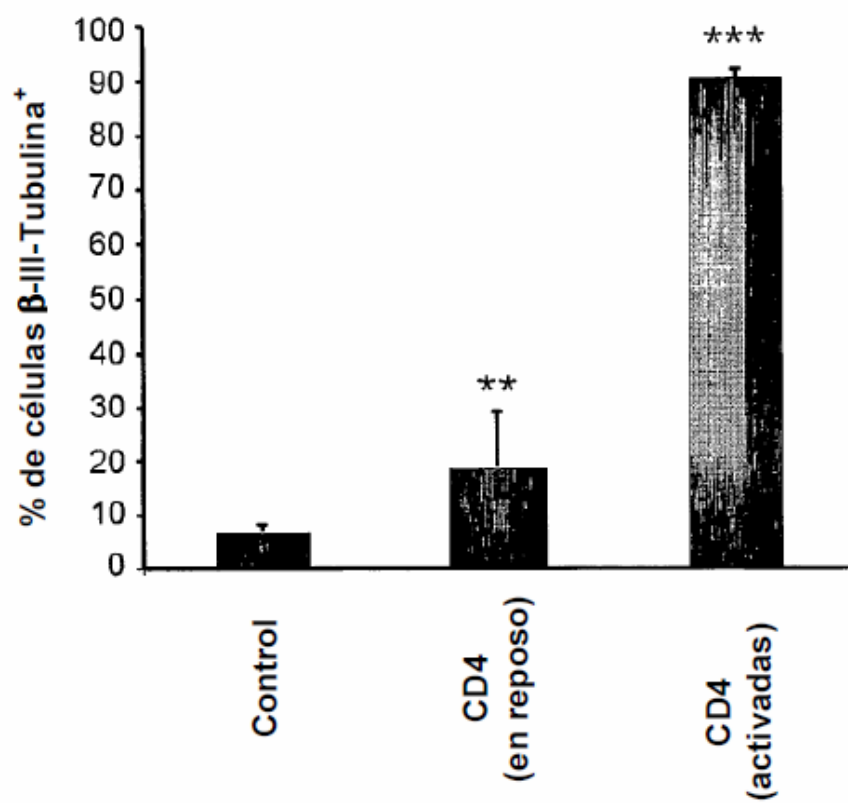


Fig. 12A

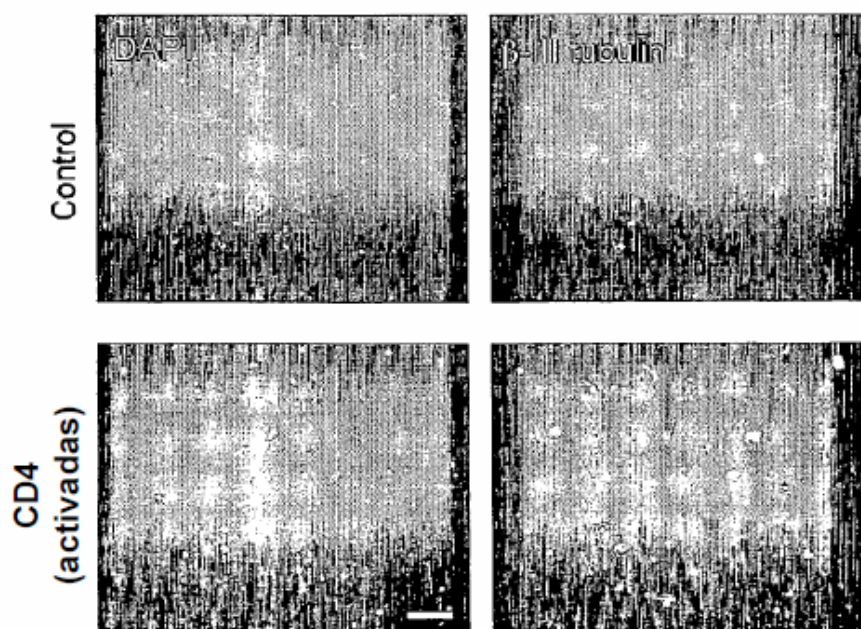


Fig. 12B

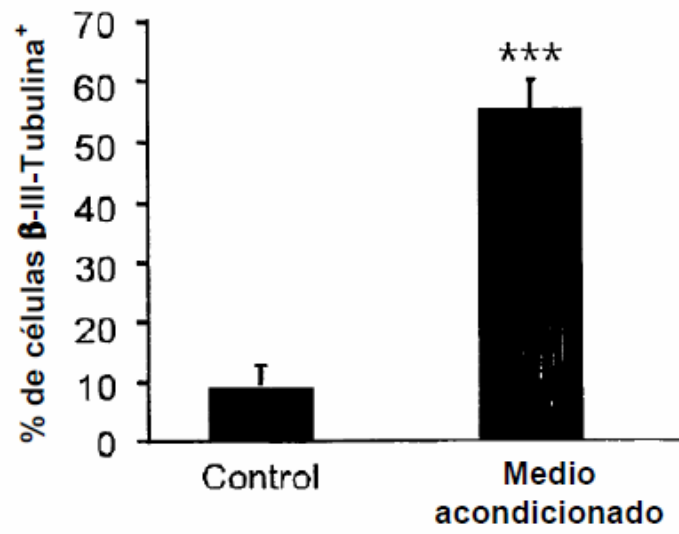


Fig. 12C

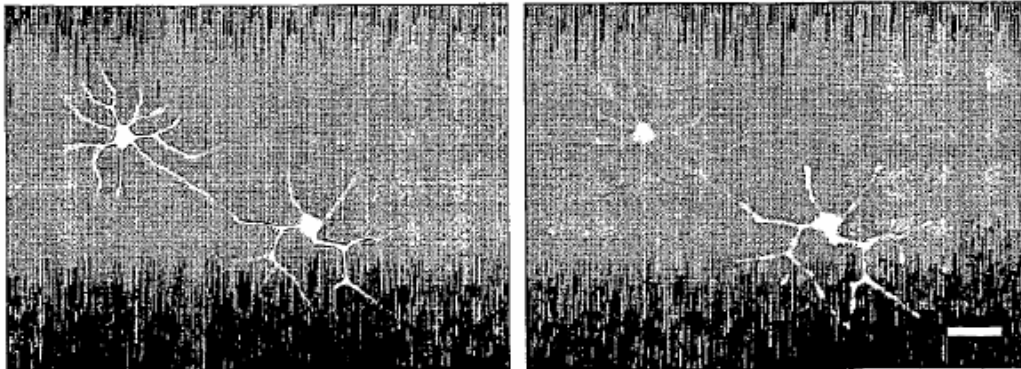


Fig. 12D

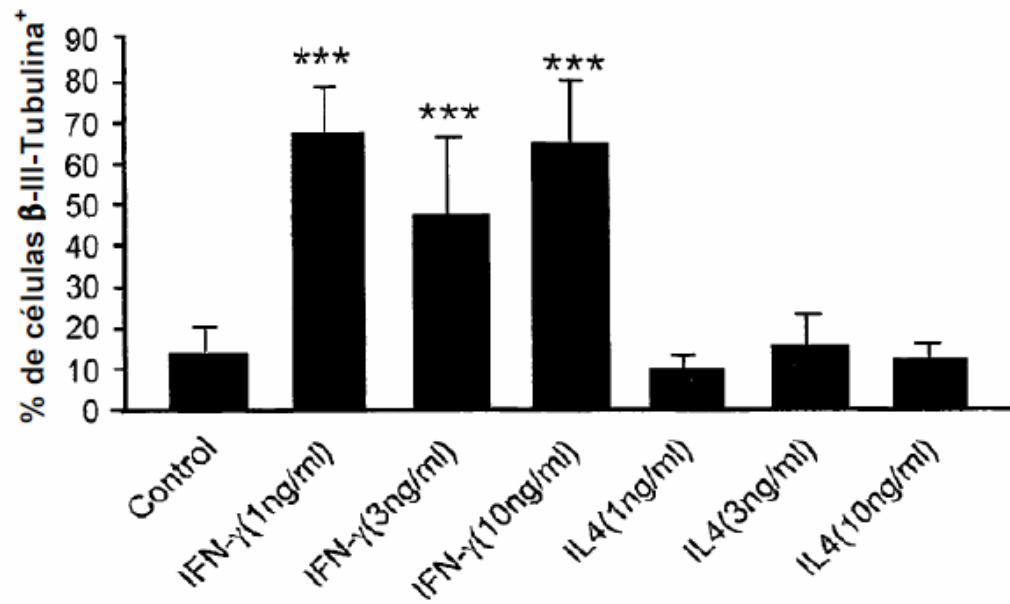


Fig. 12E

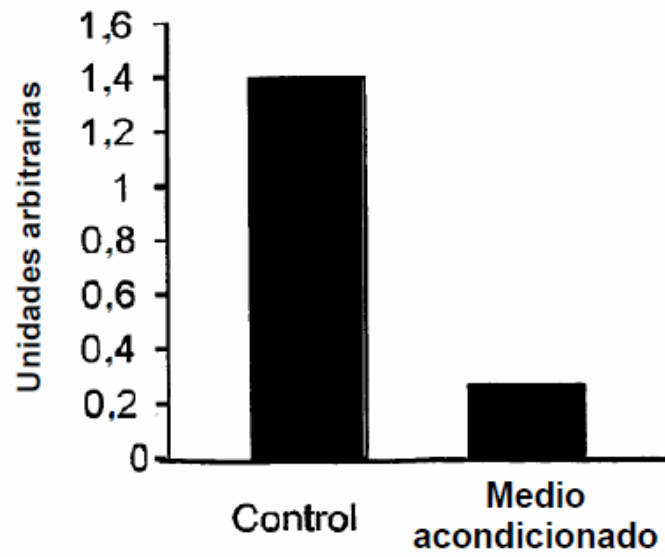


Fig. 12F

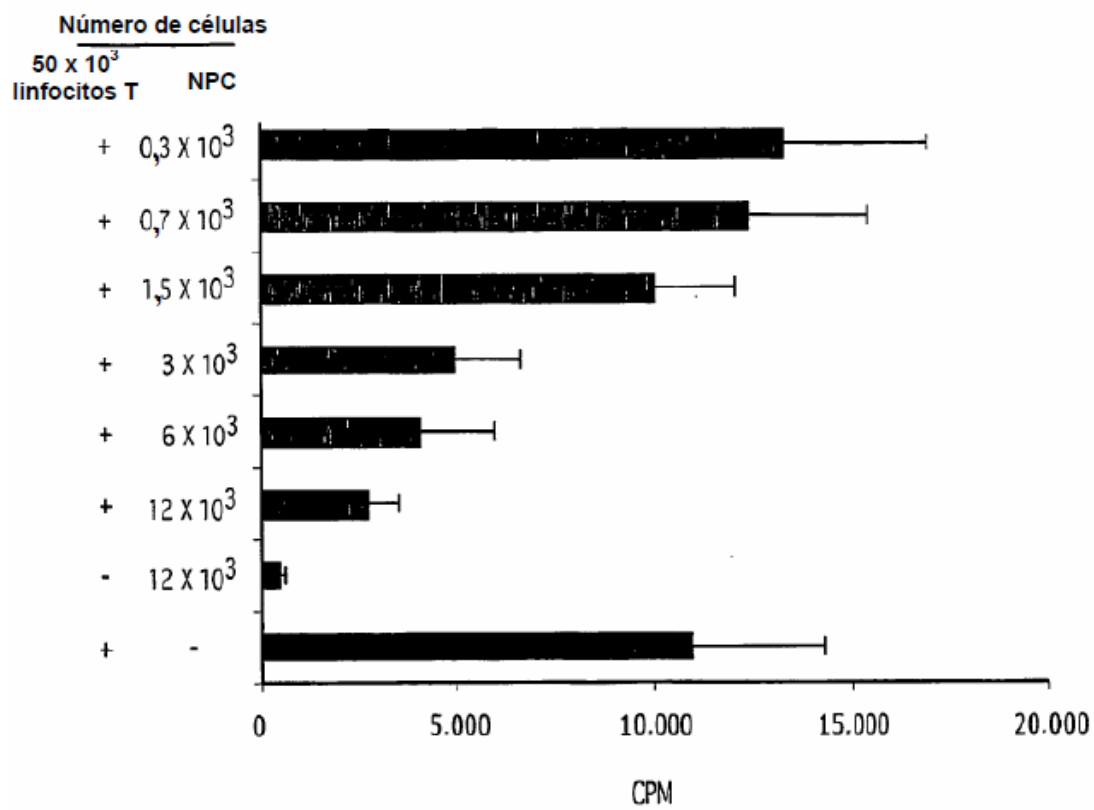


Fig. 13A

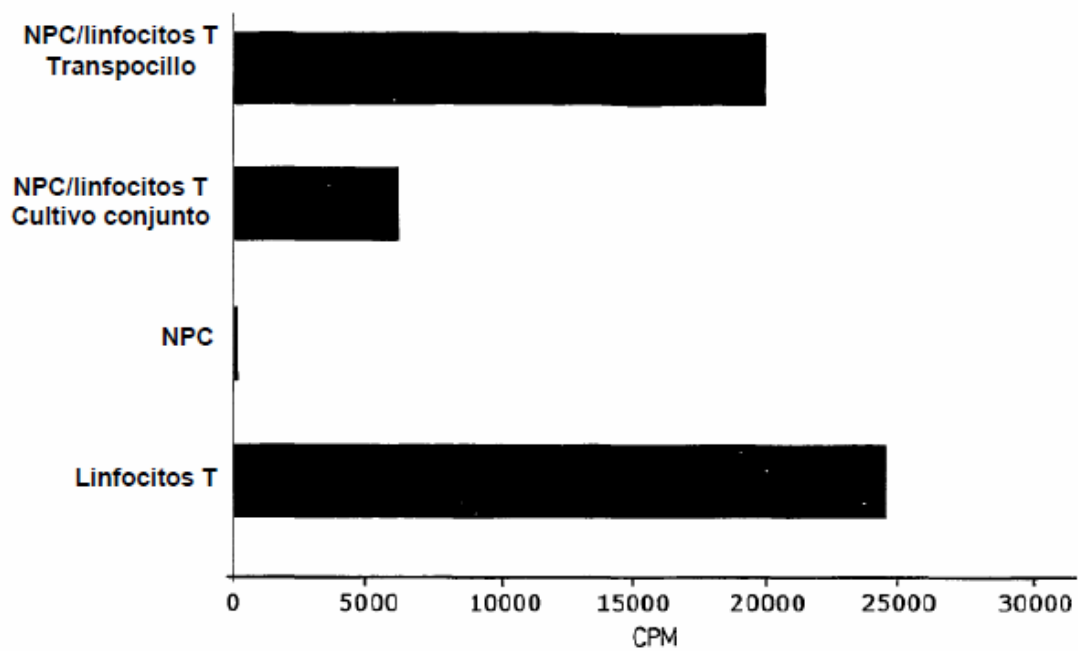
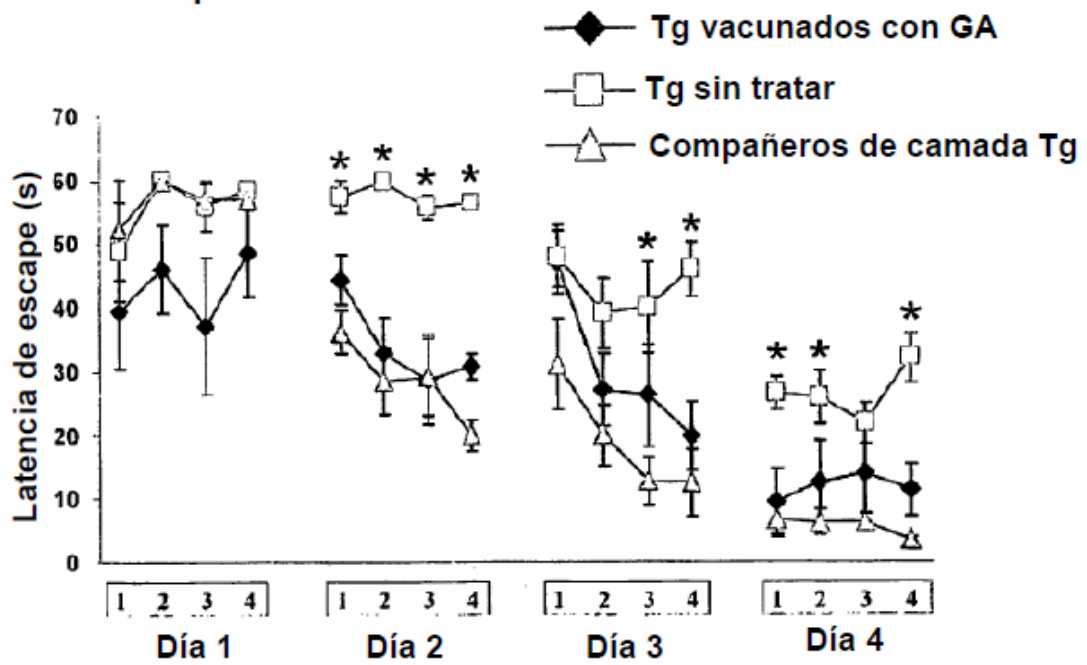


Fig. 13B

	Concentración de citosina pg/ml					
	IL-12	TNF- α	IFN- γ	MCP-1	IL-10	IL-6
Linfocitos T	5	293	3055	12	87	48
Linfocitos T/NCP	5	265	2877	4968	125	96

Fig. 13C

Fase de adquisición**Fig. 14A**

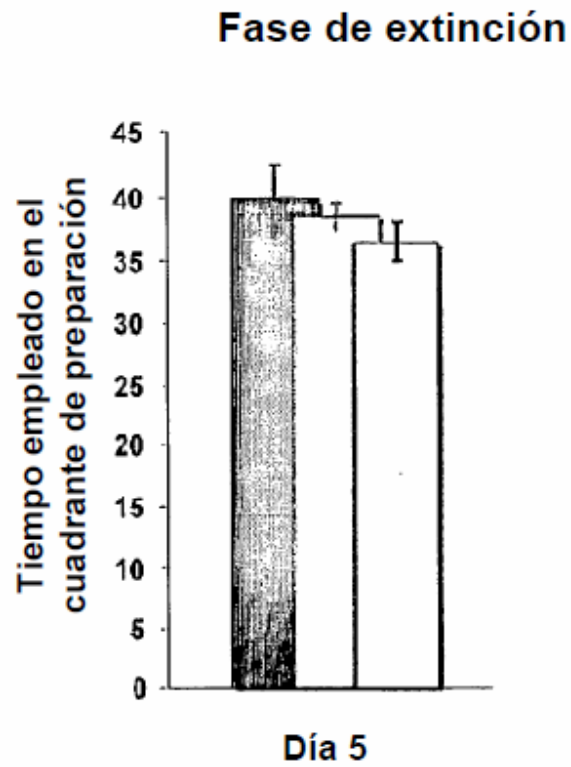


Fig. 14B

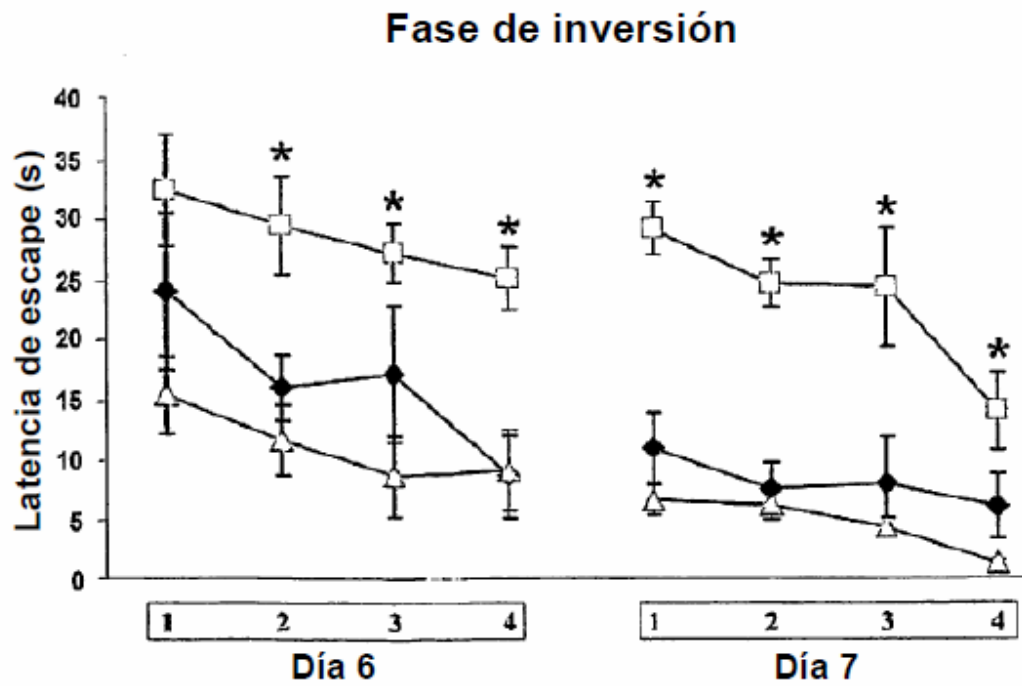


Fig. 14C

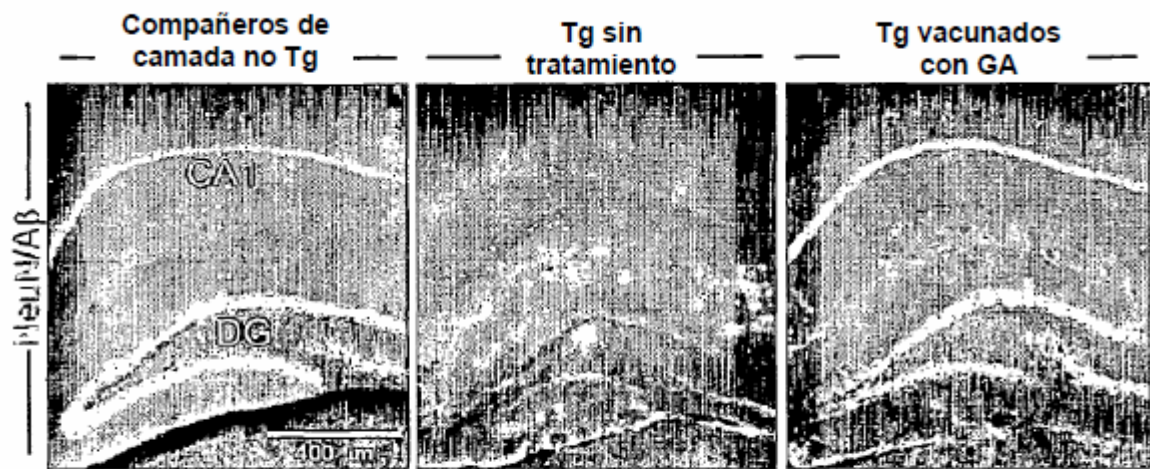


Fig. 15A

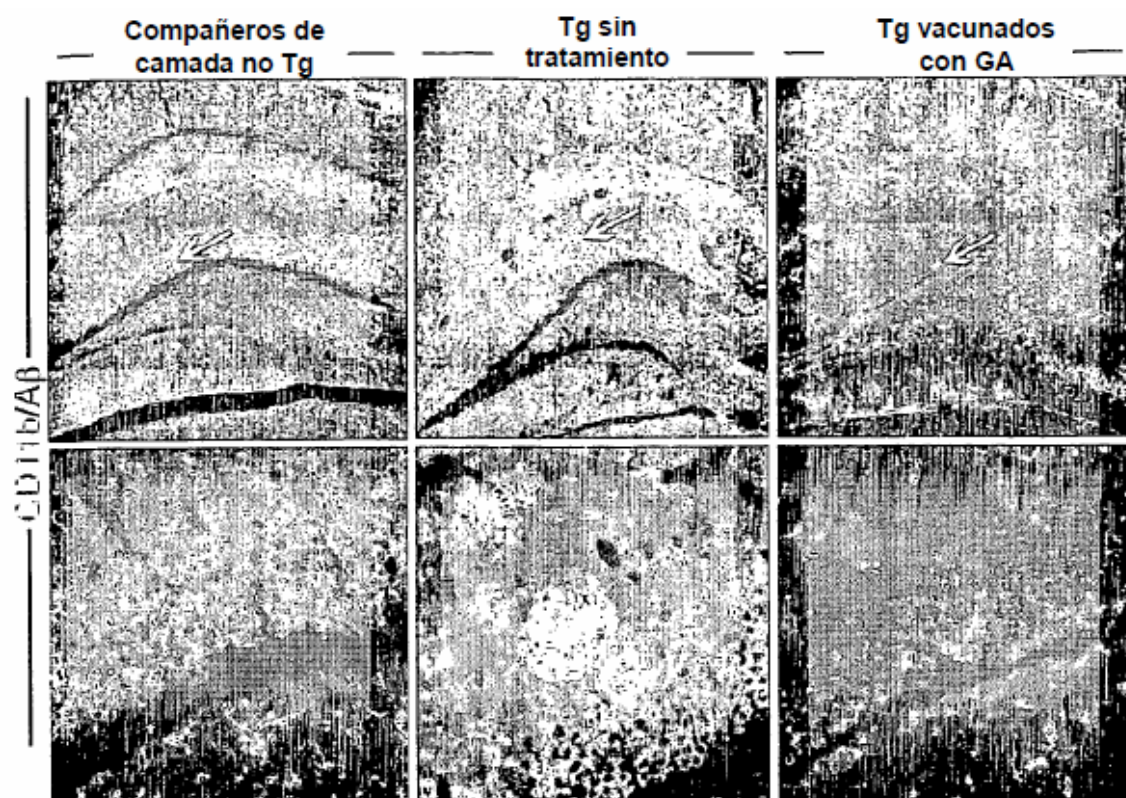


Fig. 15B

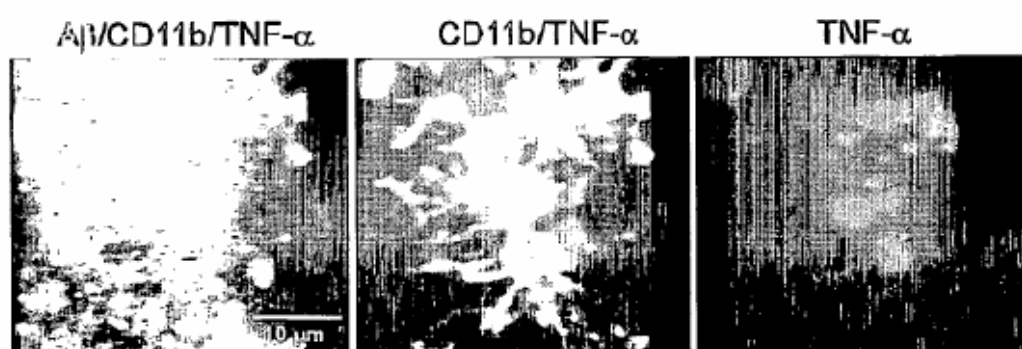


Fig. 15C



Fig. 15D

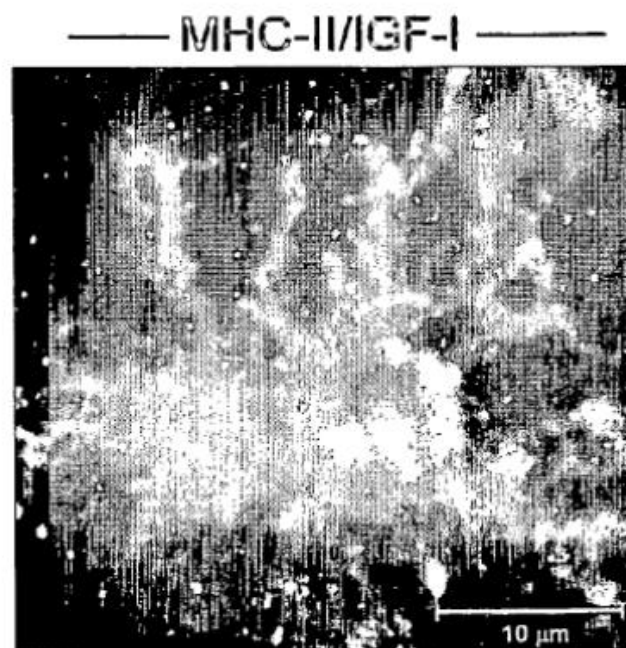


Fig. 15E

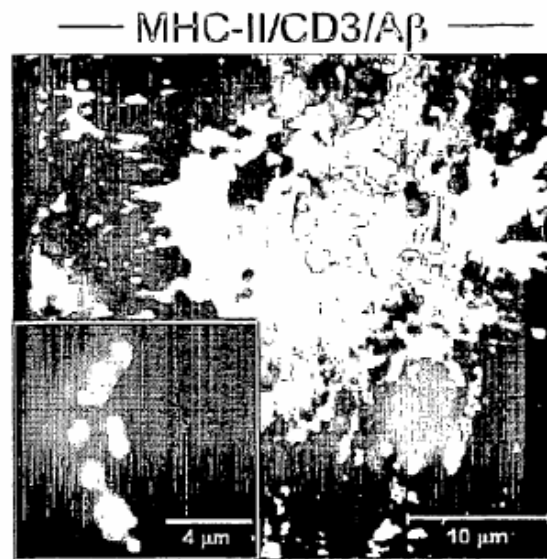


Fig. 15F

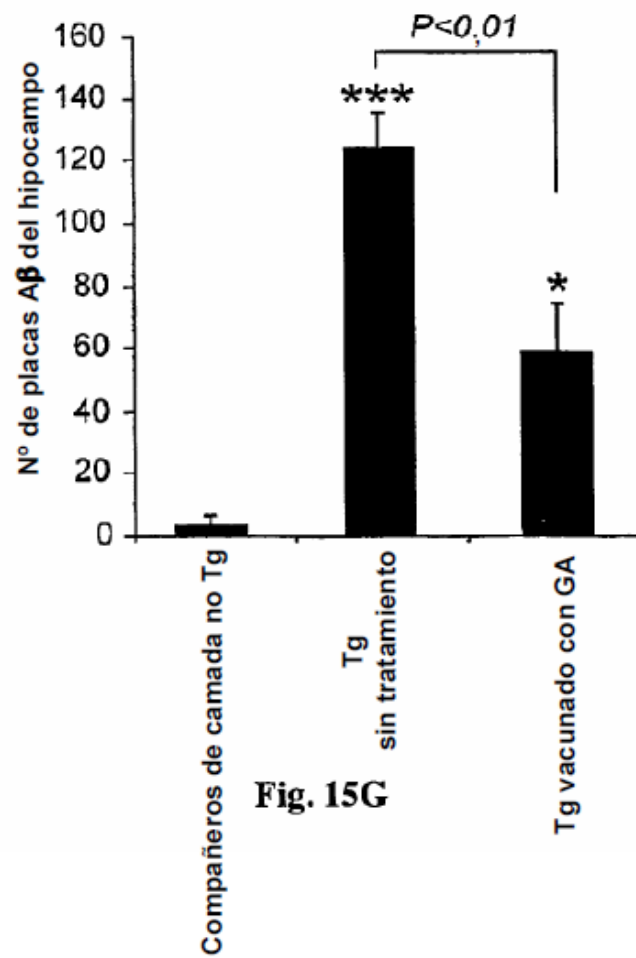


Fig. 15G

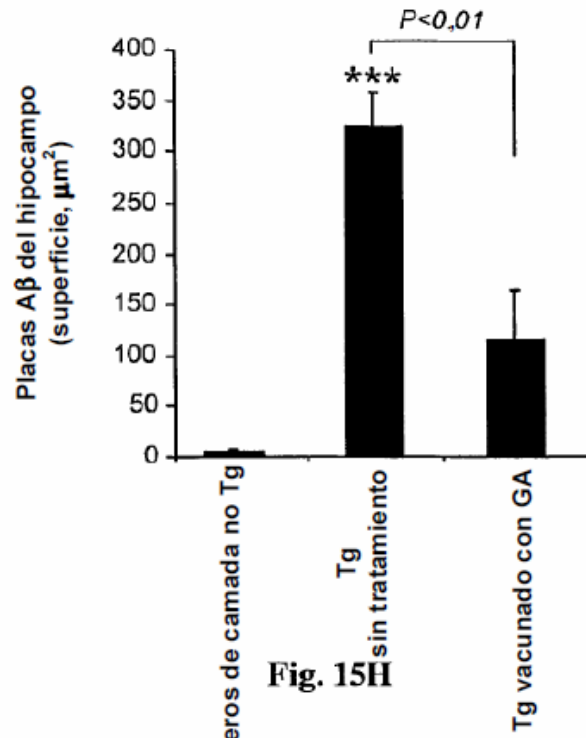


Fig. 15H

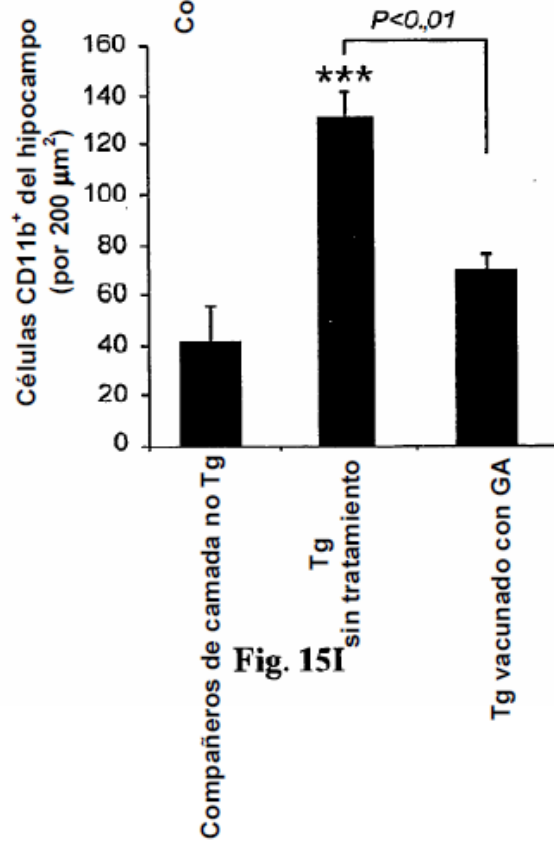
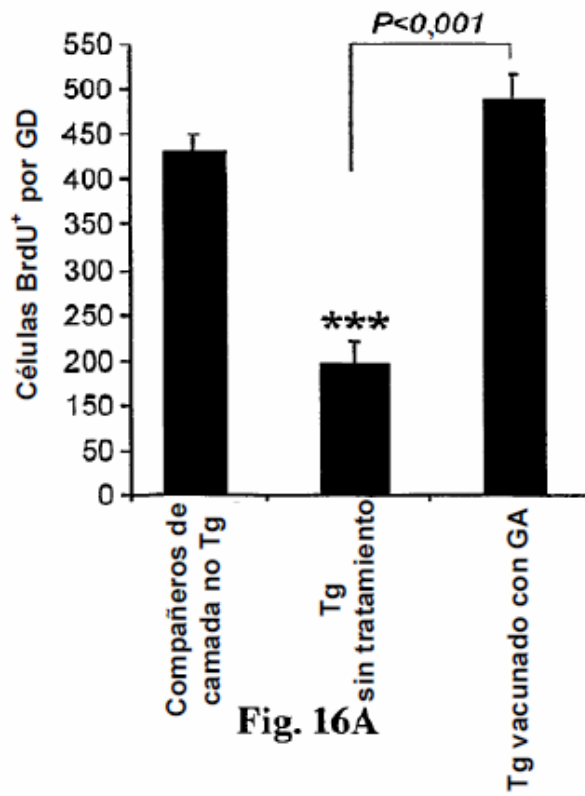
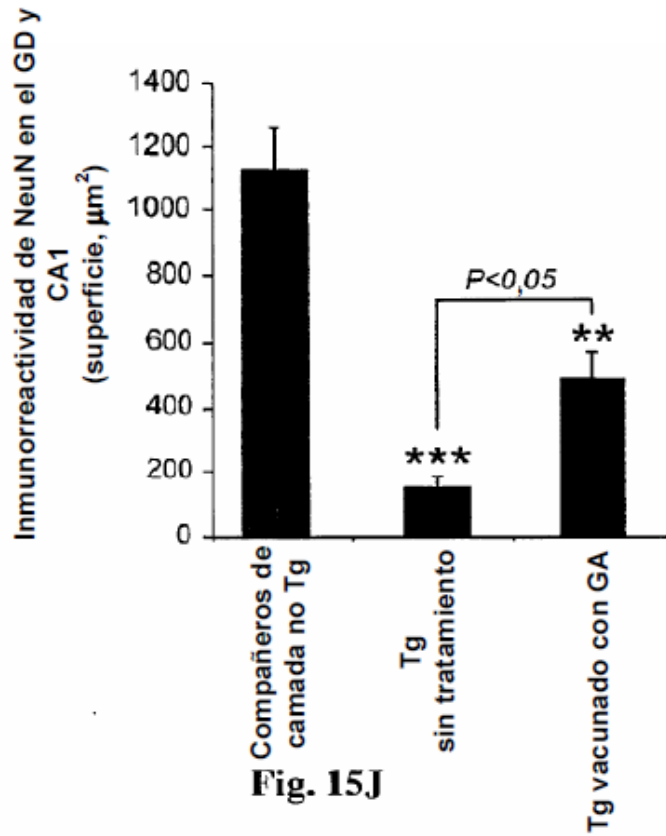
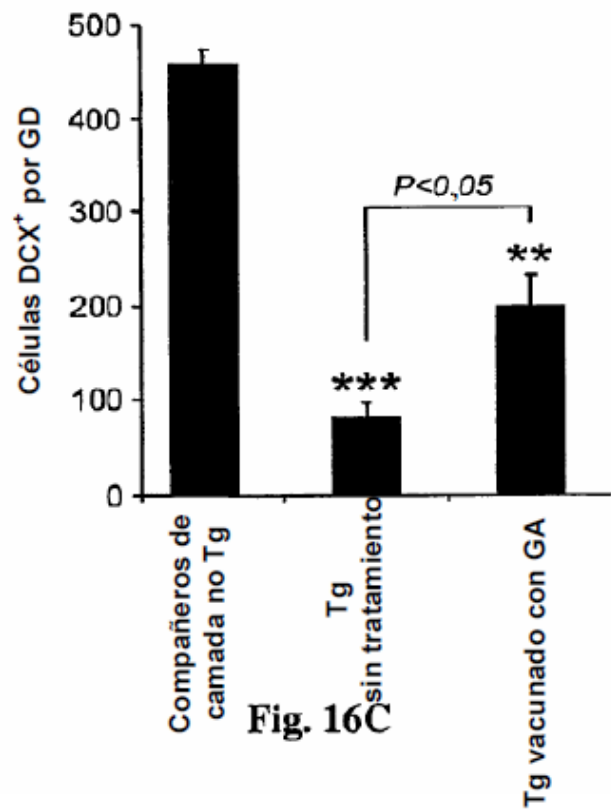
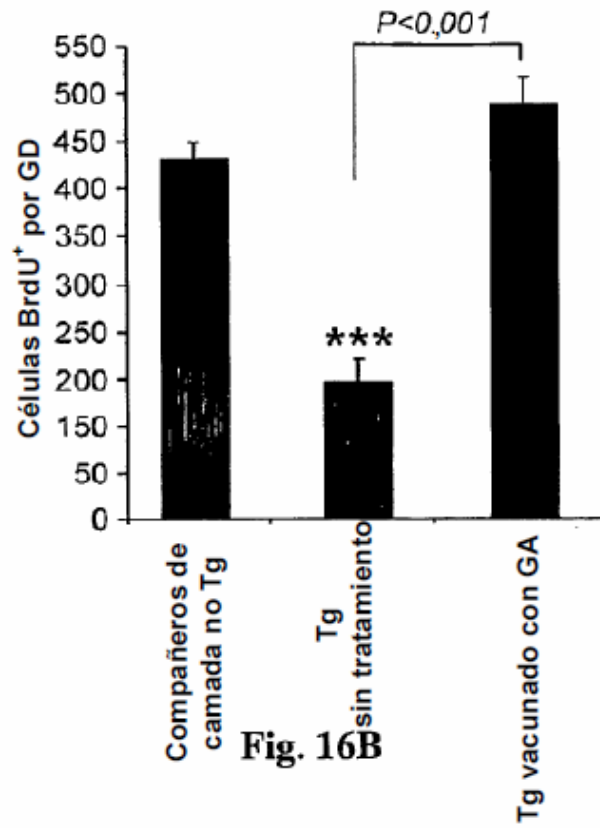


Fig. 15I





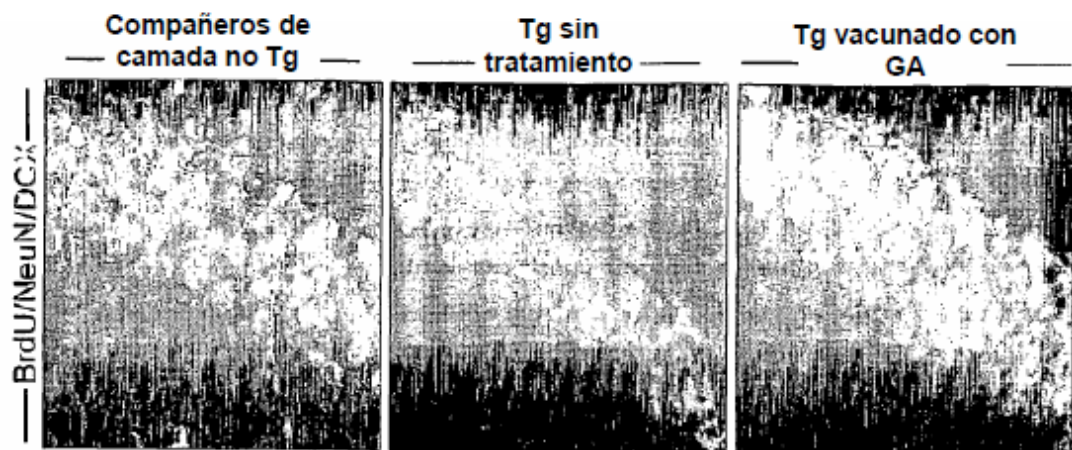


Fig. 16D

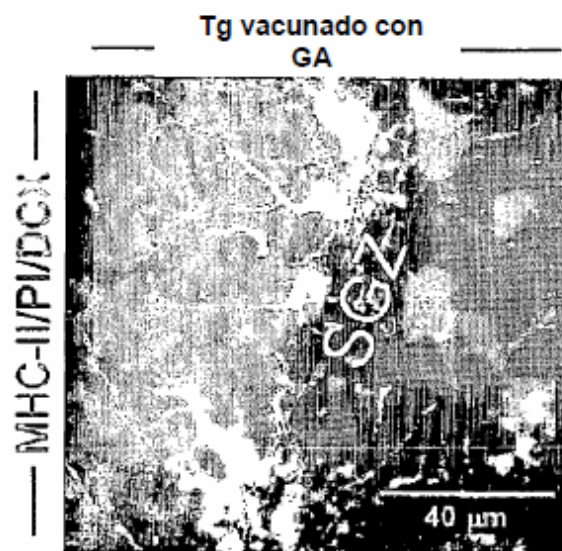


Fig. 16E

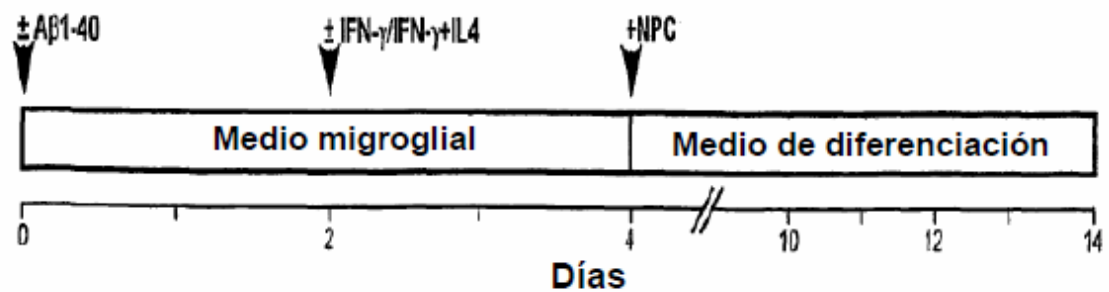


Fig. 17A

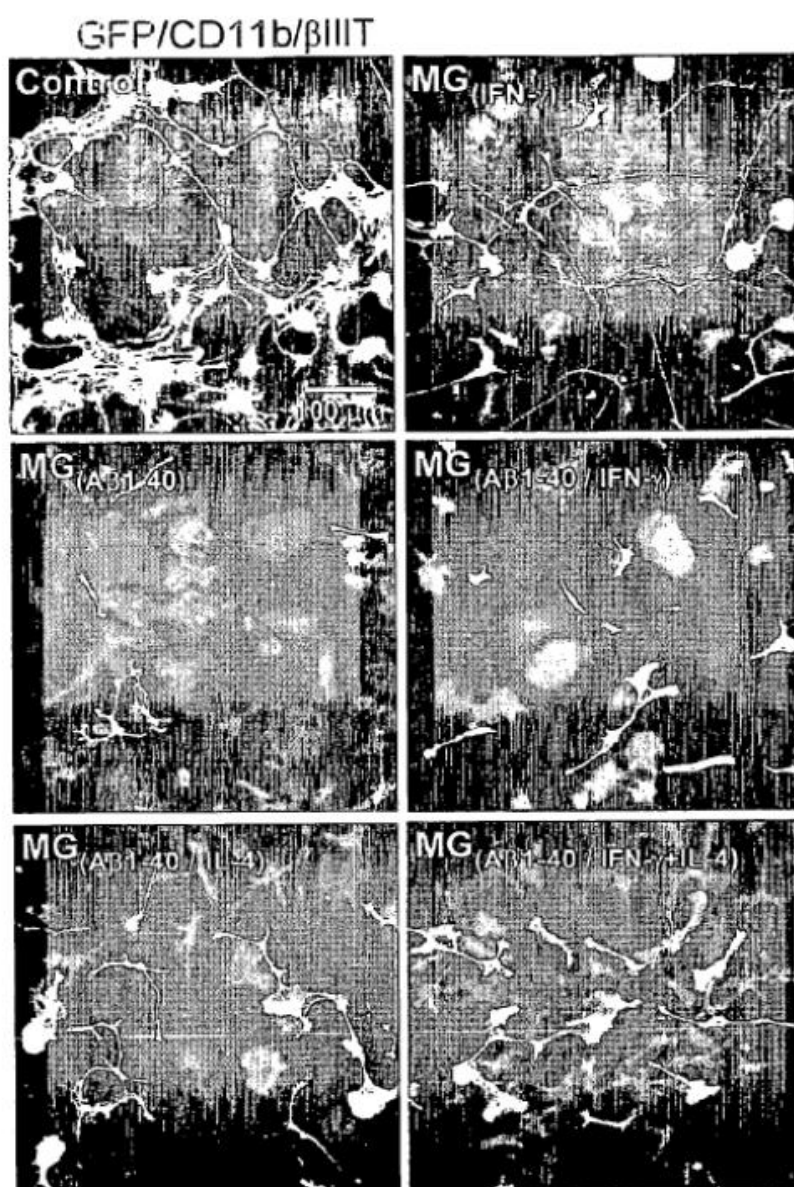


Fig. 17B

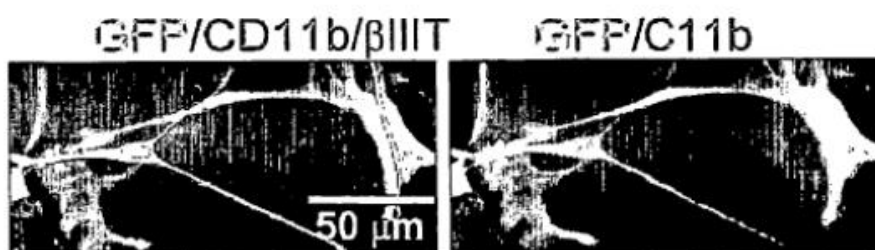


Fig. 17C

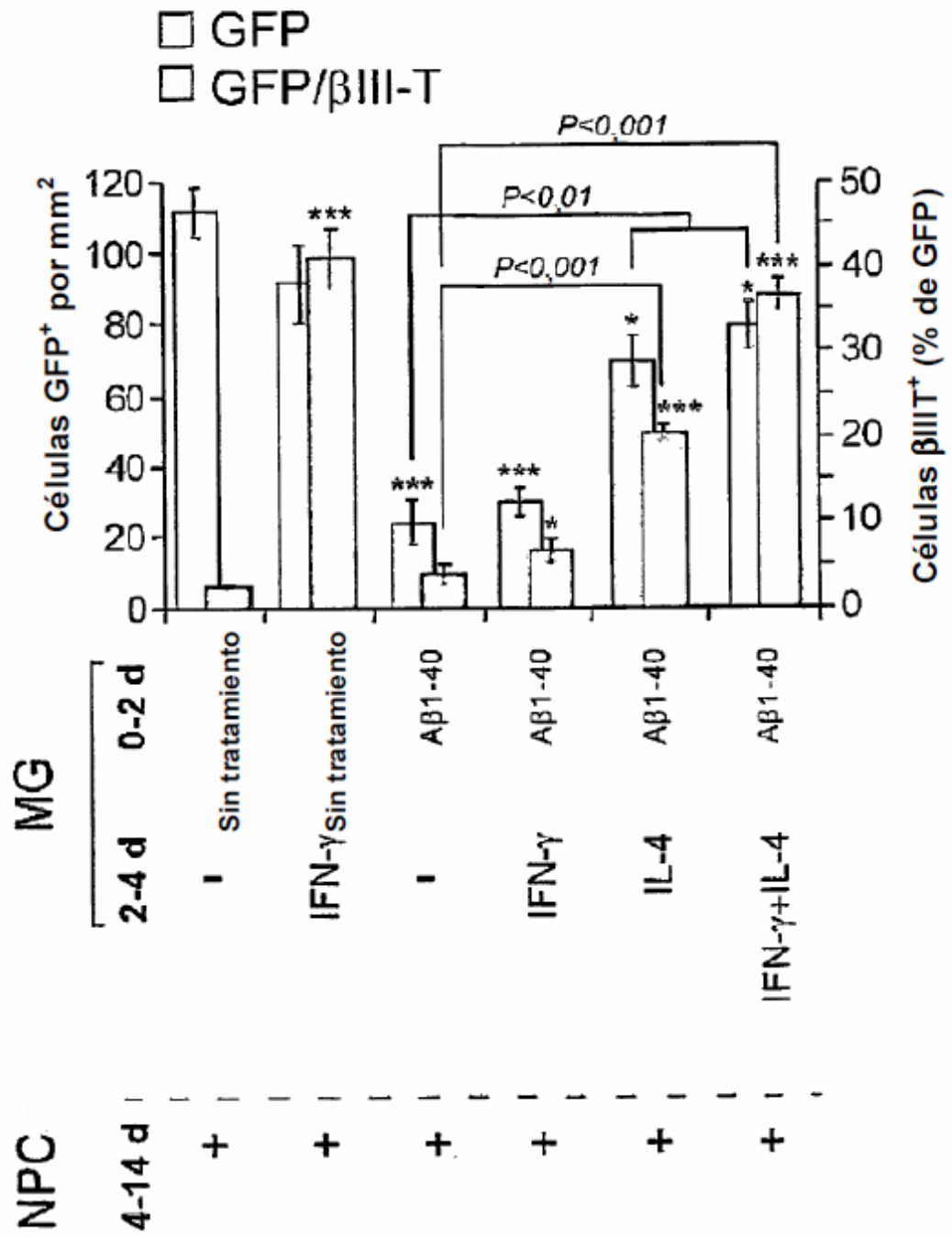
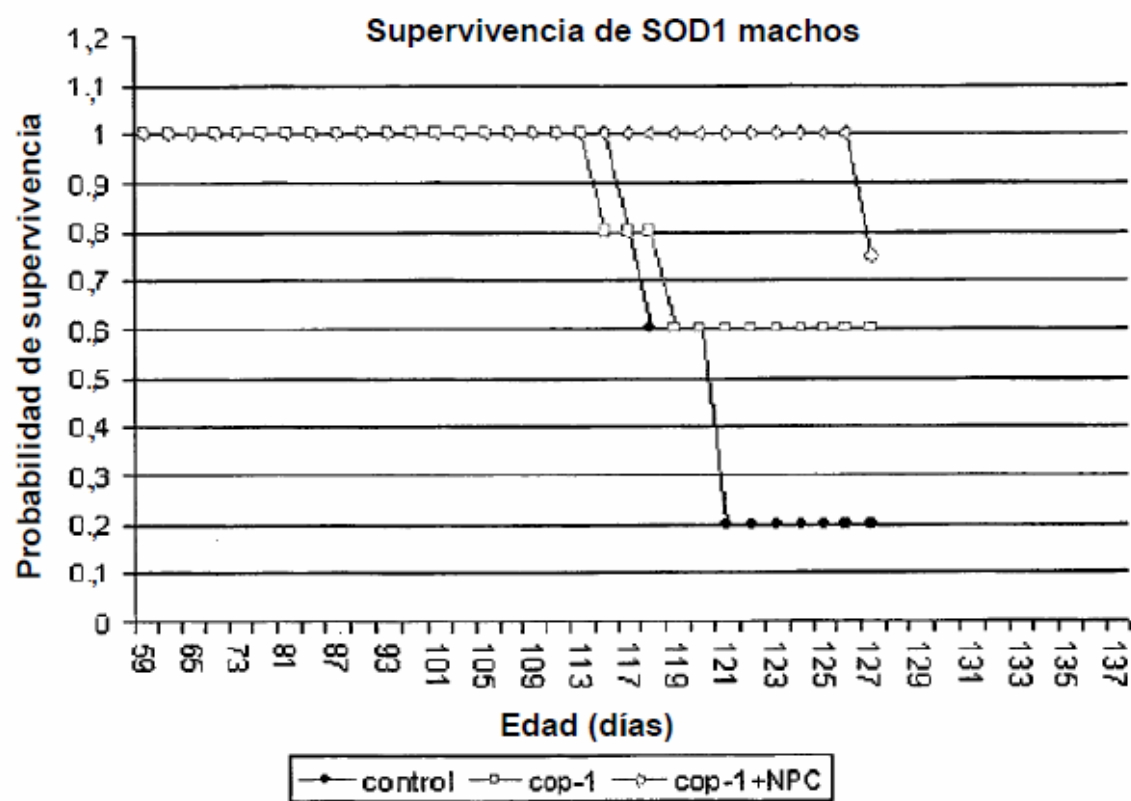


Fig. 17D

**Fig. 18**

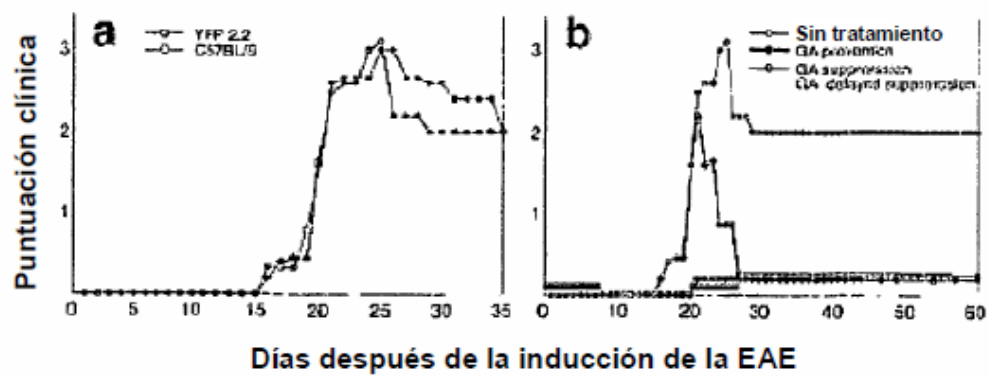


Fig. 19

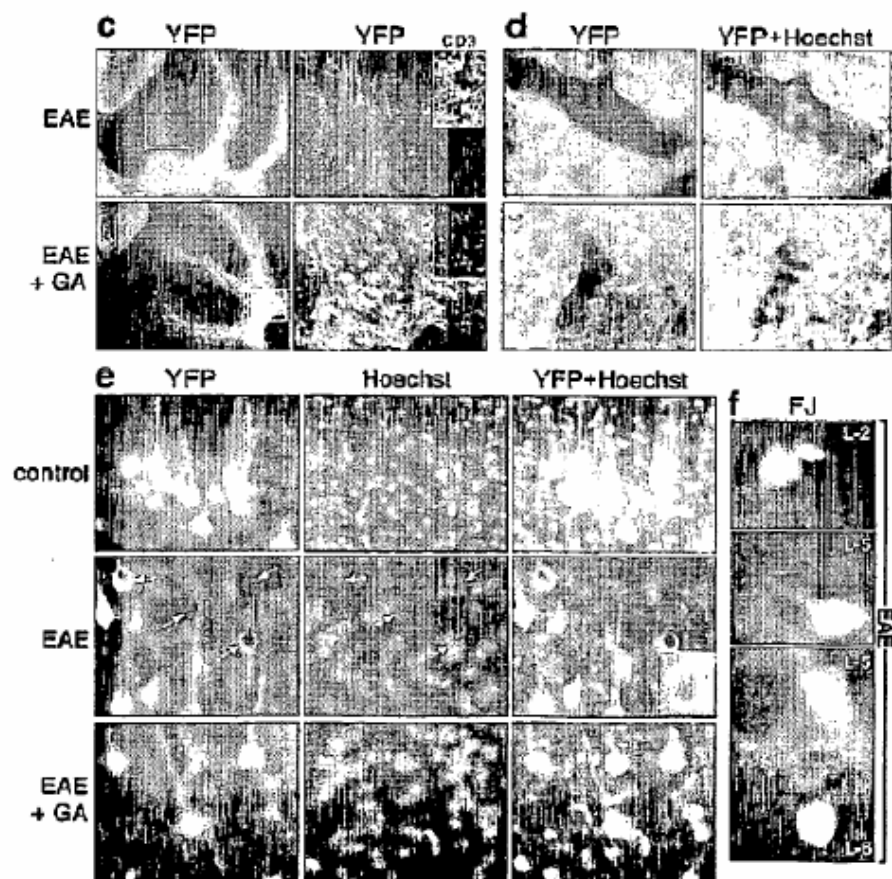


Fig. 20

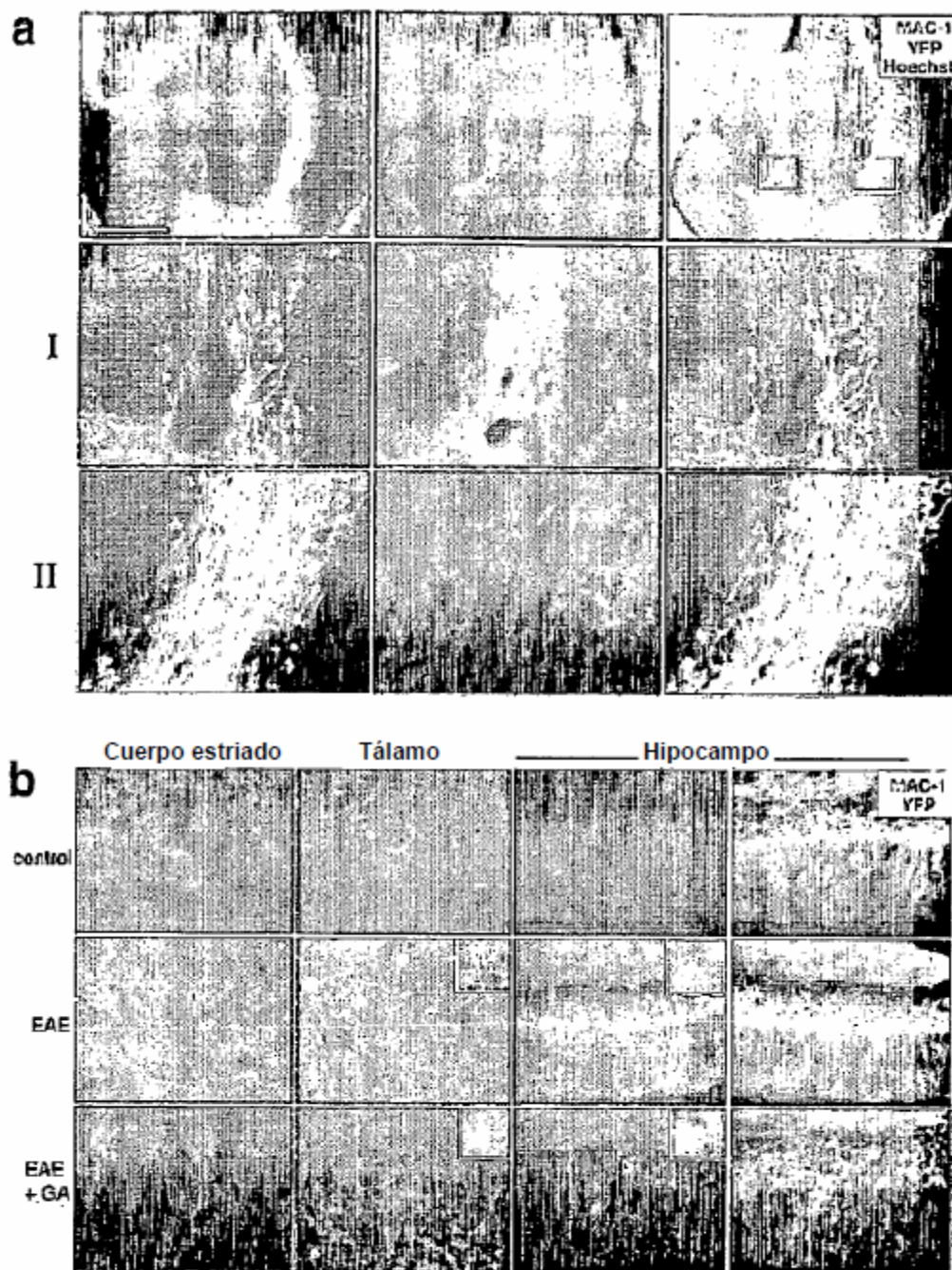


Fig. 21

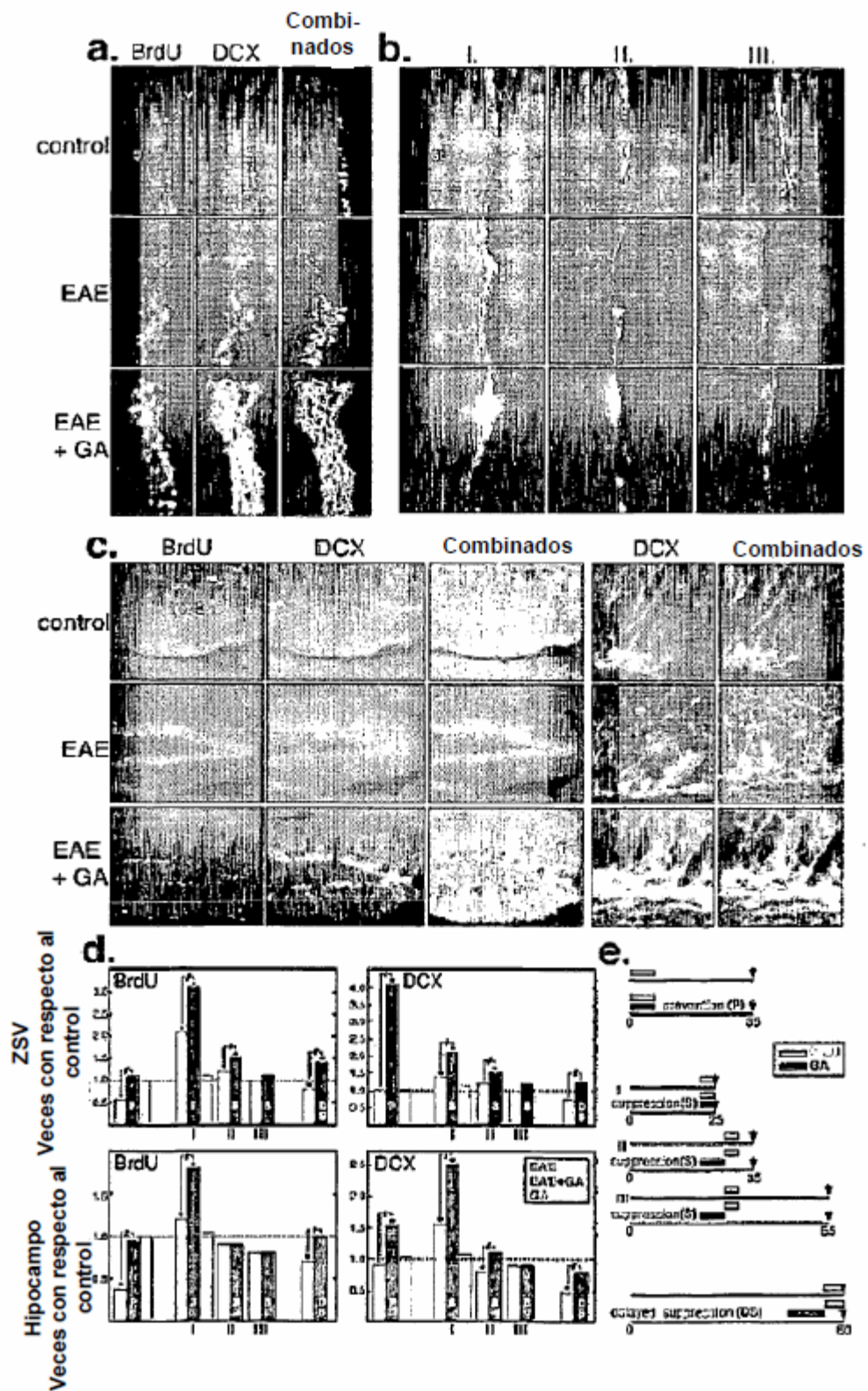


Fig. 22

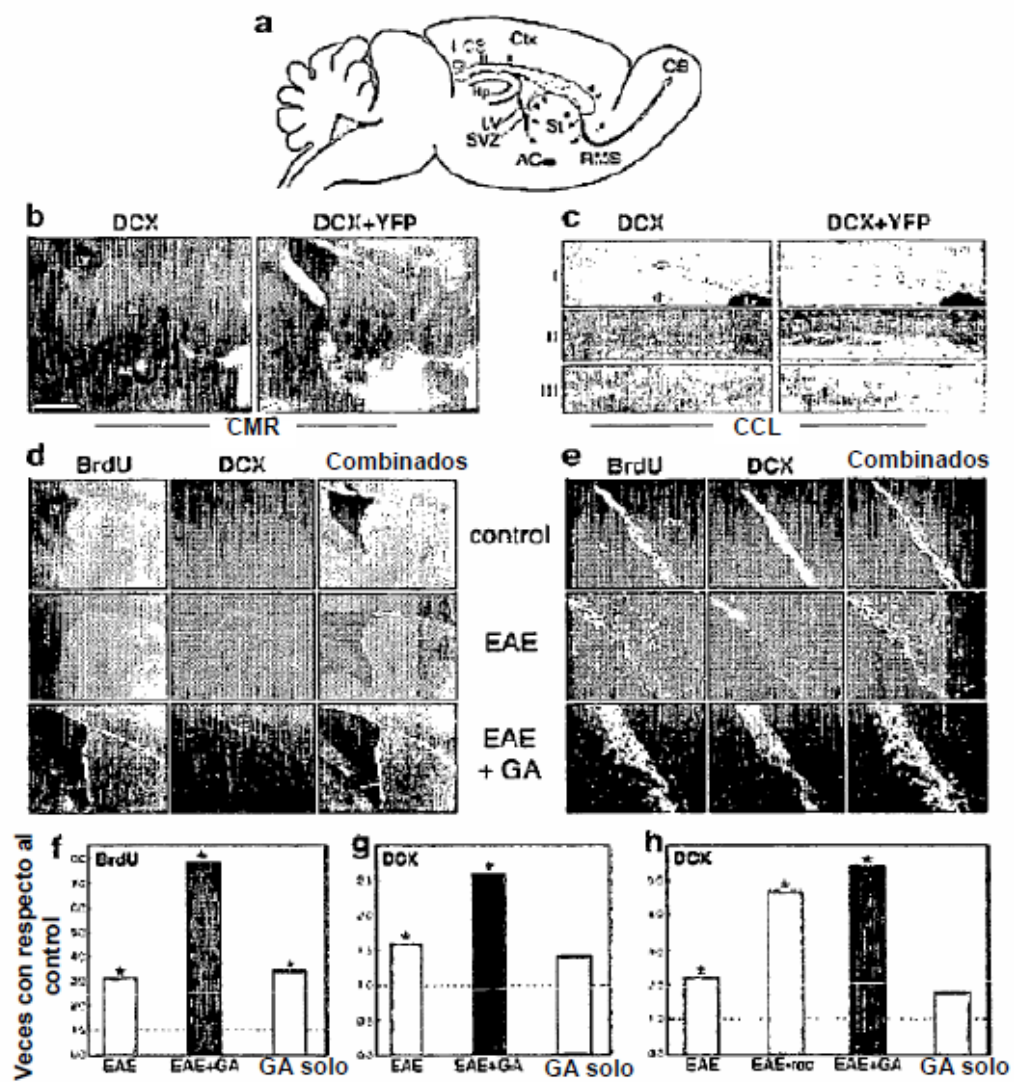


Fig. 23

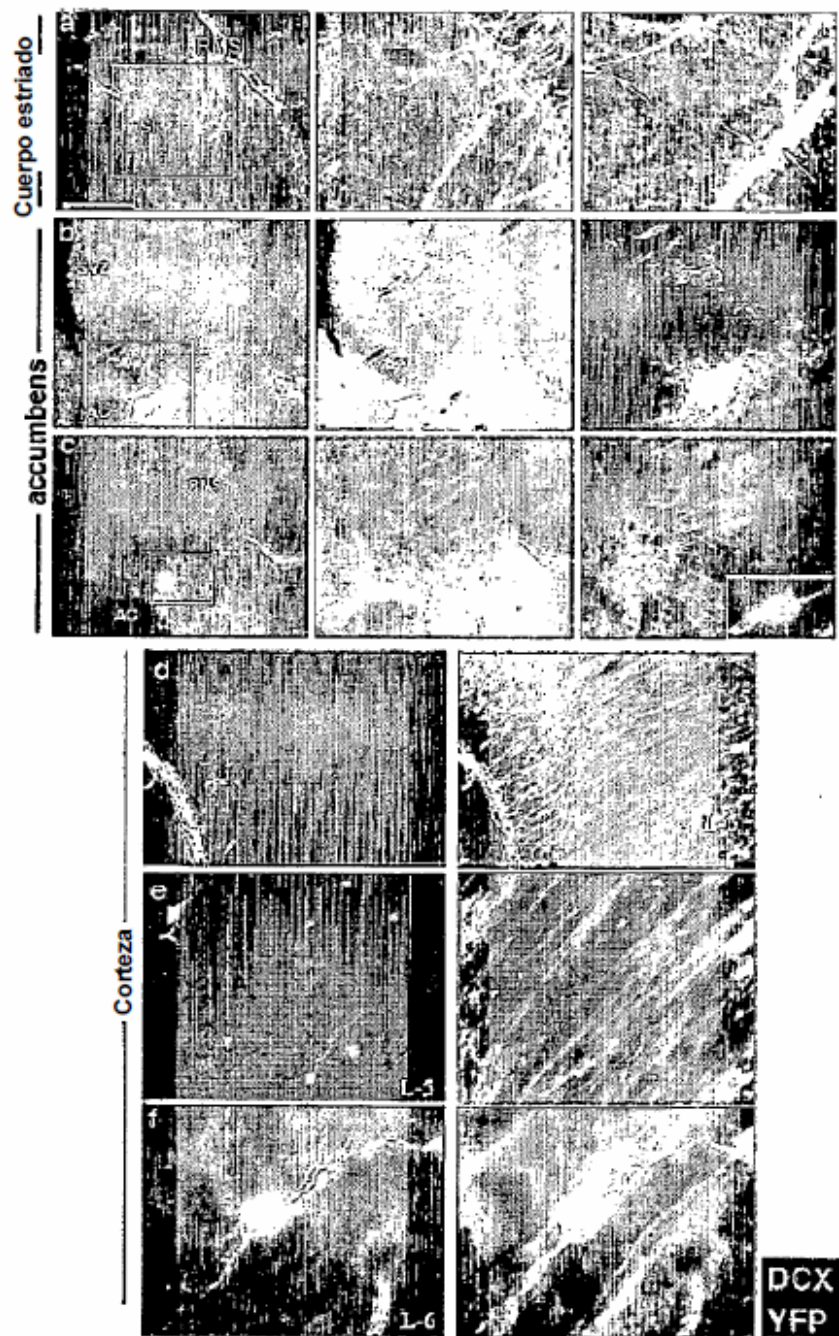


Fig. 24

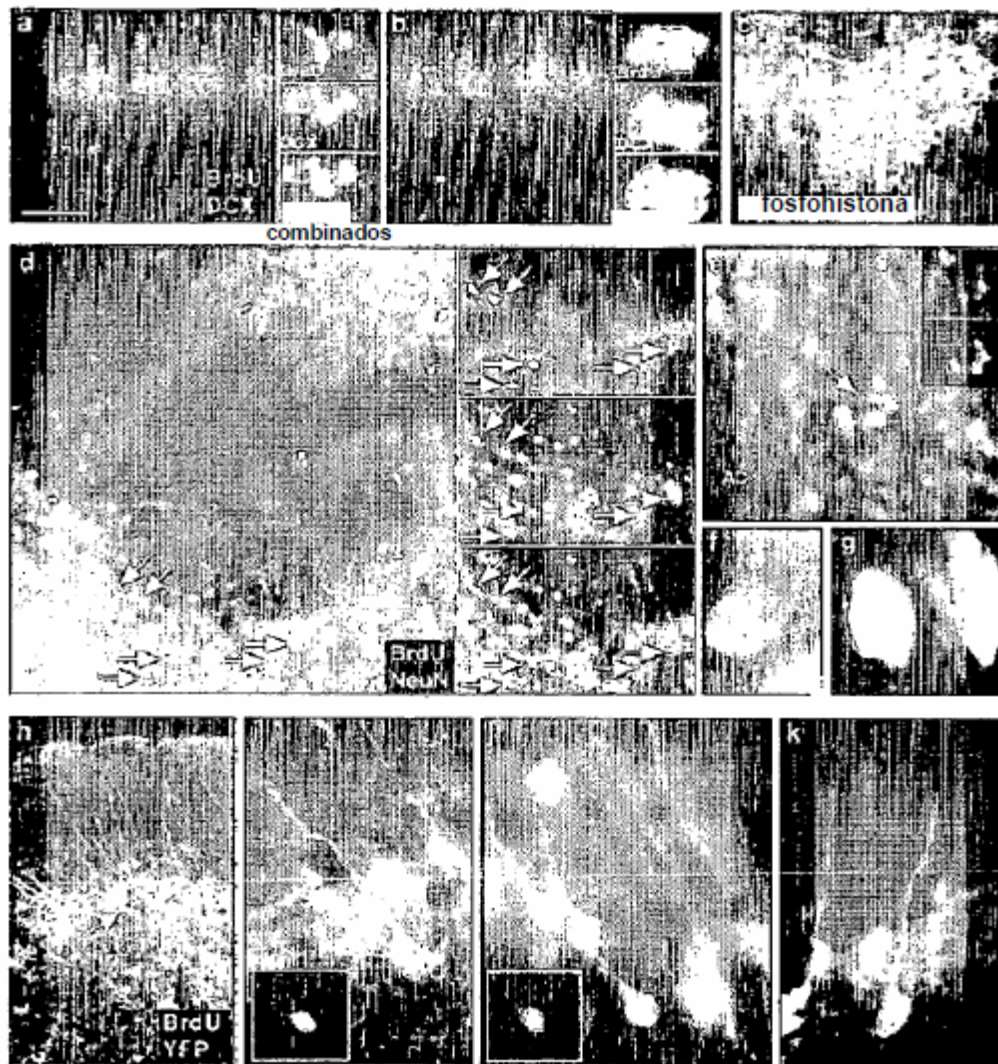


Fig. 25

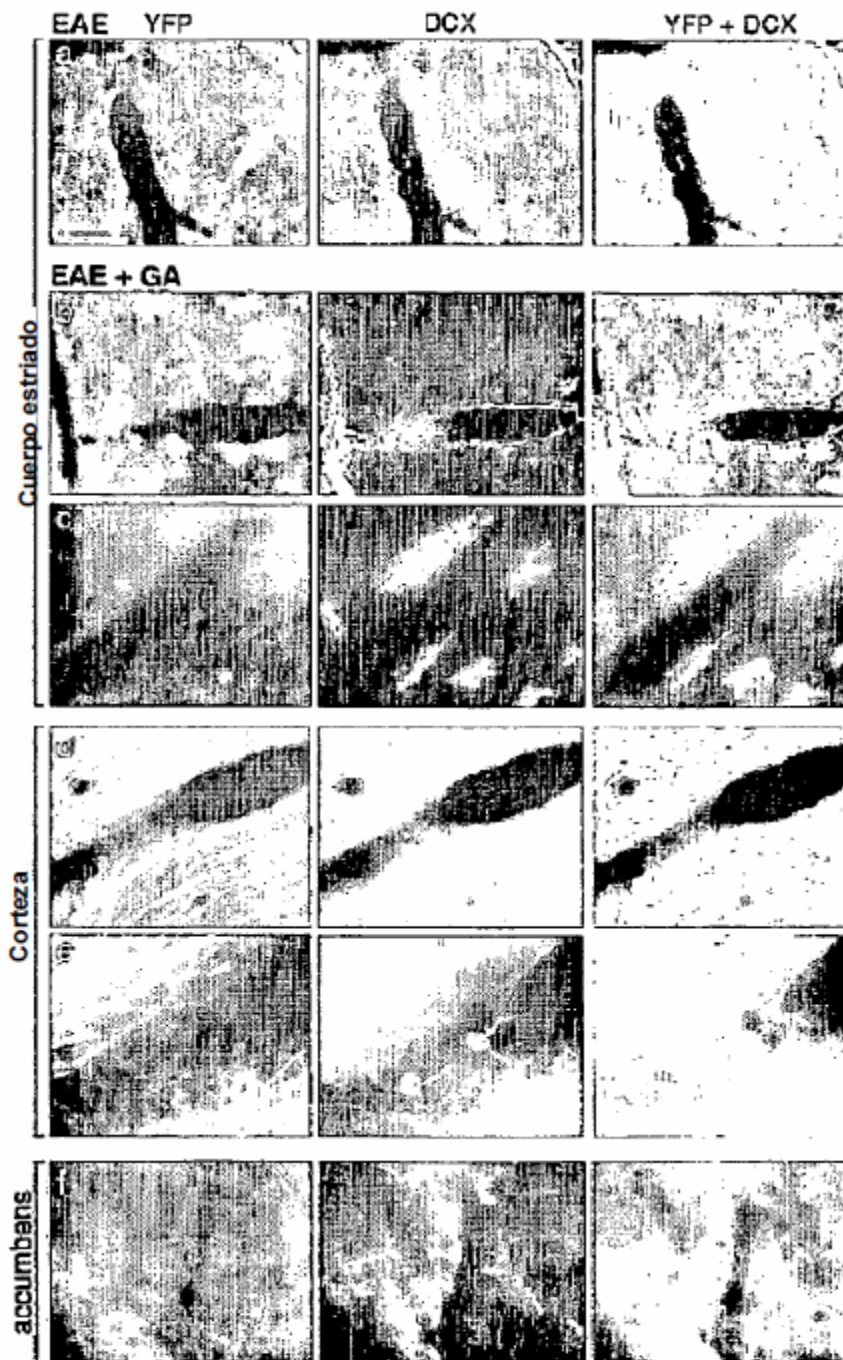


Fig. 26

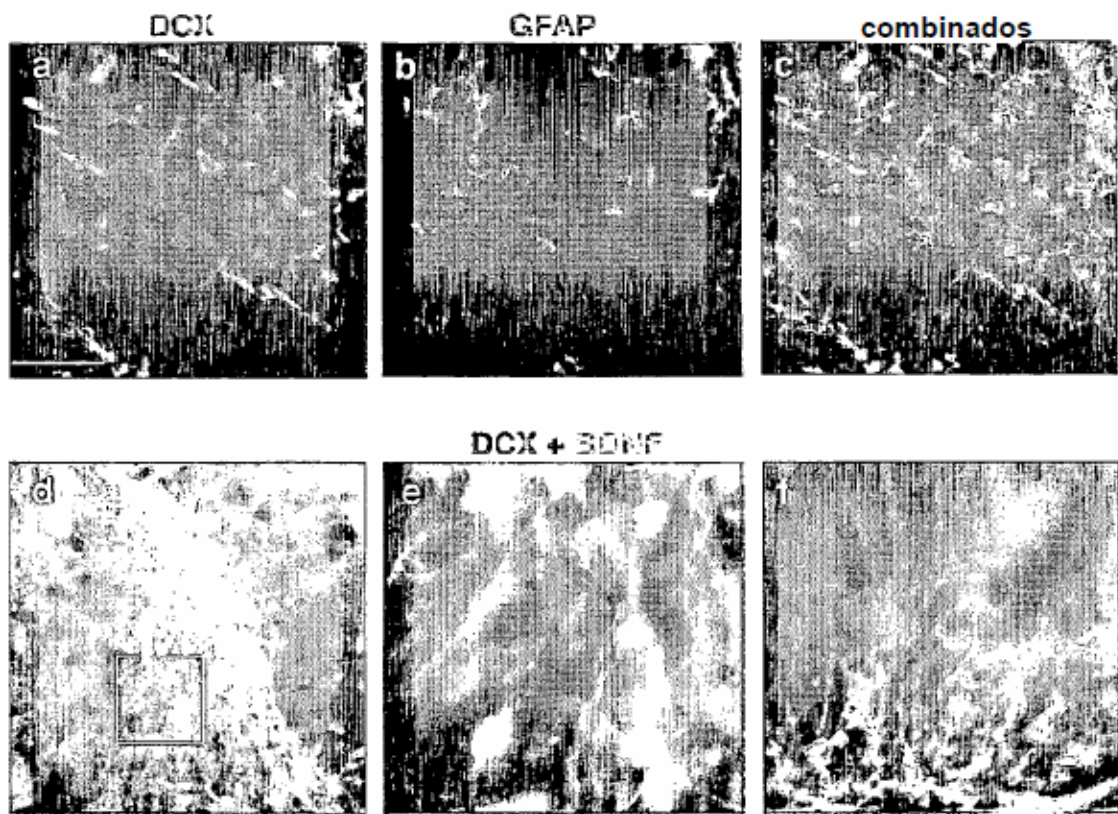


Fig. 27