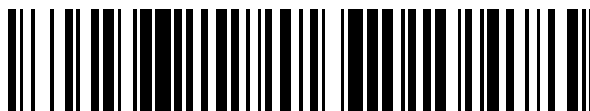


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 719**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2013** **PCT/US2013/024826**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014** **WO14123516**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2013** **E 13874359 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018** **EP 2953473**

54 Título: **Método de producción de una subpoblación heterogénea de células de médula ósea adecuada para el tratamiento de la neurodegeneración provocada por un accidente cerebrovascular isquémico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.05.2019

73 Titular/es:

NC MEDICAL RESEARCH INC. (100.0%)
17F, Shiroyama Trust Tower 4-3-1, Toranomon,
Minato-ku
Tokyo 105-6017, JP

72 Inventor/es:

CHASE, THOMAS N.;
SASAKI, KEISHIN y
KOGA, MINAKO

74 Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

ES 2 712 719 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

Método de producción de una subpoblación heterogénea de células de médula ósea adecuada para el tratamiento de la neurodegeneración provocada por un accidente cerebrovascular isquémico

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 **[0001]** La exposición describe composiciones celulares y métodos para su uso en el tratamiento de la neurodegeneración. La invención se da a conocer en las reivindicaciones 1-12.

ANTECEDENTES

- 10 **[0002]** La neurodegeneración es un estado patológico que tiene como resultado la muerte de células nerviosas. Aunque las causas de la neurodegeneración pueden ser diversas y no siempre determinables, un gran número de trastornos neurológicos comparten la neurodegeneración como un estado patológico común. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, y la esclerosis lateral
- 15 **[0002]** La neurodegeneración crónica, que se caracteriza por una muerte de células nerviosas lenta y progresiva durante varios años, mientras que la neurodegeneración aguda se caracteriza por un inicio repentino de la muerte de células nerviosas a consecuencia de una isquemia, como en un accidente cerebrovascular, o en un traumatismo, como un traumatismo craneoencefálico, o como resultado de una transección axonal por desmielinización o traumatismo causado, por ejemplo, por una lesión medular o por esclerosis múltiple.

- 20 **[0003]** La neurodegeneración también puede estar provocada por una amplia variedad de insultos de células nerviosas que son resultado de, por ejemplo, el alcoholismo, la drogadicción, la exposición a neurotoxinas y la radiación. Pueden encontrarse indicios de neurodegeneración incluso en la demencia, epilepsia, varios trastornos psiquiátricos, y como parte del proceso normal de envejecimiento.

- [0004]** Independientemente de la causa subyacente, cada vez más pruebas indican que, una vez que se desencadena la neurodegeneración, el resultado de todos estos trastornos es siempre el mismo: la muerte definitiva de células nerviosas.

- 25 **[0005]** Los accidentes cerebrovasculares conllevan una neurodegeneración aguda (la pérdida rápida de células nerviosas del sistema nervioso central con una pérdida de función concurrente) debido a la oclusión (accidente cerebrovascular isquémico) o ruptura (hemorragia) de un vaso sanguíneo que conduce a o que está dentro del cerebro. Normalmente constituye una emergencia médica, dado que puede provocar un daño neurológico
- 30 **[0005]** permanente, complicaciones sistémicas, e incluso la muerte. Los accidentes cerebrovasculares son la principal causa de discapacidad en adultos en Estados Unidos y Europa, y es la segunda causa de muerte en todo el mundo. Los accidentes cerebrovasculares provocan más de una de cada quince muertes en EE.UU. y es la tercera causa de muerte tras las cardiopatías y el cáncer (American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics - 2009 Update. Dallas, Texas: American Heart Association; 2009; Rosamond et al. Heart disease and stroke statistics - 2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke
- 35 **[0005]** Statistics Subcommittee. Circulation. 2007; 115: e69-e171). Uno de cada tres accidentes cerebrovasculares tiene un desenlace fatídico (Haheim et al. Risk factors of stroke incidence and mortality. A 12-year follow-up of the Oslo Study. Stroke. 1993; 24(10):1484-9). Aproximadamente el 6 % de todas las muertes anteriores a los 65 años y el 10 % de todas las muertes tras esa edad se deben a accidentes cerebrovasculares (Donnan et al. Stroke. Lancet. 2008; 371(9624):1612-23). Los datos estadísticos demuestran por tanto que la discapacidad severa es
- 40 **[0005]** una consecuencia desafortunada, pero demasiado frecuente, para muchas víctimas de accidentes cerebrovasculares. De hecho, los accidentes cerebrovasculares son la principal causa de reembolso de Medicare por atención hospitalaria para cuidado prolongado para adultos. Los costes totales asociados con el tratamiento y rehabilitación de accidentes cerebrovasculares actualmente superan los 45 mil millones de dólares al año e indudablemente seguirán contribuyendo al aumento general del coste de la sanidad en EE.UU. así como de otras
- 45 **[0005]** grandes naciones industrializadas.

- [0006]** Los accidentes cerebrovasculares isquémicos son los tipos más comunes de accidentes cerebrovasculares, representado más del 80 % de todos los accidentes cerebrovasculares. Son resultado de un bloqueo arterial, normalmente debido a la trombosis o menos comúnmente debido a una embolia. Suelen iniciarse de forma repentina y normalmente producen déficits neurológicos focales. Aproximadamente el 20 % de
- 50 **[0006]** los pacientes mueren al cabo de unos pocos días, en especial si el infarto es grande. Otro 10 % de los pacientes mueren al cabo de algunas semanas tras el infarto inicial. Desafortunadamente, los que sobreviven normalmente quedan gravemente discapacitados. Los síntomas, dependiendo del área del cerebro que se vea afectada, incluyen debilidad en las extremidades o en un lado de la cara, y alteraciones sensoriales así como dificultades cognitivas y en el habla. Cuanto más grande sea el área afectada del cerebro, más funciones podrán verse
- 55 **[0006]** afectadas. Algunas mejoras funcionales pueden empezar a ocurrir al cabo de algunos días y es normal una mayor recuperación tras varios meses. No obstante, el alcance de la recuperación es impredecible y, por lo general, incompleto. Según la American Stroke Association, del 15 al 30 % de los que sobreviven a un infarto quedan permanentemente discapacitados, y un 20 % necesita asistencia institucional tres meses después del

infarto (Harmsen et al. Long-term risk factors for stroke: twenty-eight years of follow-up of 7457 middle-aged men in Göteborg, Sweden. Stroke. 2006; 37(7):1663-7).

5 **[0007]** Los accidentes cerebrovasculares isquémicos provocan una lesión central, en los que las células neuronales mueren en cuestión de minutos por falta de oxígeno, y una penumbra circundante, una zona que recibe algo de flujo sanguíneo y por tanto algo de oxígeno, pero menos de lo normal. La muerte celular sucede más lentamente en la penumbra isquémica, normalmente al cabo de varias horas, y está causada por una anoxia variable y por sustancias tóxicas generadas por la cascada isquémica y la liberación de glutamato en la lesión central. Por tanto, las intervenciones terapéuticas actuales tienen como principal objetivo la mitigación de las condiciones perjudiciales en la penumbra del infarto.

10 **[0008]** No obstante, los tratamientos para los accidentes cerebrovasculares isquémicos agudos siguen siendo limitados.

15 **[0009]** Dado que el daño cerebral ocurre como resultado de una reducción del flujo sanguíneo al cerebro, las terapias actuales tienen como objetivo retirar el bloqueo arterial o bien disolviendo el coágulo (trombólisis) o retirando el coágulo mecánicamente (trombectomía). Cuanto más rápido se restaure el flujo sanguíneo, menos células cerebrales mueren y mayores son las posibilidades de que puedan evitarse secuelas permanentes.

[0010] En la actualidad, en EE.UU. solo dos tratamientos para los accidentes cerebrovasculares están aprobados por la FDA.

- Activador tisular del plasminógeno recombinante (rt-PA; Genetech), un fármaco que disuelve el coágulo arterial; y
- 20 • El Merci Retrieval System (Concentric Medical Inc.) y el Penumbra System® (Penumbra Inc.), un dispositivo que retira de manera mecánica los coágulos de sangre.

[0011] Todos los enfoques terapéuticos anteriores presentan limitaciones importantes.

25 **[0012]** Para que sea eficaz, la terapia con agentes trombolíticos debe llevarse a cabo dentro de las 3-4,5 horas siguientes al inicio de los síntomas, lo que significa que solo aproximadamente el 3 % de los pacientes con un accidente cerebrovascular isquémico agudo reciben un tratamiento rt-PA eficaz. Además, las terapias trombolíticas conllevan un aumento considerable del riesgo de hemorragia cerebral, que limita de manera adicional su uso en algunos individuos.

30 **[0013]** Por todas estas razones, existe una necesidad urgente insatisfecha en la técnica para terapias eficaces y seguras que mitiguen y/o eviten la neurodegeneración, y especialmente la neurodegeneración causada por isquemia.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0014] En el presente documento se describe una subpoblación heterogénea de células de médula ósea (BM, por sus siglas en inglés) preparadas mediante un proceso que comprende:

- a) obtener una población de células de médula ósea a partir de médula ósea sin procesar;
- 35 b) sembrar la población de células de médula ósea a una baja densidad en una superficie plástica;
- c) lavar la población celular sembrada para retirar células no adherentes;
- d) cultivar la población celular adherente prácticamente hasta la confluencia en medios que contienen suero;
- e) pasar en serie la población de células cultivadas por no más de aproximadamente 7 pases en serie, donde, en cada paso, las células sembradas se cultivan a baja densidad;
- 40 f) obtener la subpoblación heterogénea de células de médula ósea, donde una cantidad eficaz de la subpoblación heterogénea de células de médula ósea es eficaz en el tratamiento de la neurodegeneración.

[0015] Una cantidad eficaz de subpoblación heterogénea de células de médula ósea puede ser eficaz para tratar la neurodegeneración causada por isquemia.

45 **[0016]** La subpoblación heterogénea de células de médula ósea puede cultivarse en medio que contiene suero.

[0017] La población de células de médula ósea puede sembrarse en una densidad de aproximadamente 10^2 - 10^6 células/cm².

[0018] Las células cultivadas pueden sembrarse a una densidad de aproximadamente 750 células/cm² o menos en los pases.

50 **[0019]** La médula ósea sin procesar puede obtenerse de un sujeto que no está tratado previamente con ningún agente que module la división celular, por ejemplo, fármacos antineoplásicos utilizados en la quimioterapia incluyendo antimetabolitos, como 5-fluorouracilo.

[0020] La subpoblación heterogénea de células de médula ósea puede no ser aislable por fraccionamiento por densidad, por ejemplo, un gradiente de Ficoll™ o de Percoll™, o por lisis ACK (Amonio-Cloruro-Potasio)

[0021] La subpoblación heterogénea de células de médula ósea puede probarse de manera adicional en un modelo experimental de neurodegeneración causada por isquemia, donde solo se seleccionan aquellas poblaciones celulares que demuestran la habilidad para tratar la neurodegeneración causada por isquemia. El modelo experimental de la neurodegeneración causada por isquemia puede ser un modelo de cultivo celular de privación de oxígeno/glucosa (OGD, por sus siglas en inglés) o un modelo animal de accidente cerebrovascular. El modelo experimental puede ser un modelo de cultivo celular de privación de oxígeno/glucosa (OGD, por sus siglas en inglés) seguido de un modelo animal de accidente cerebrovascular.

[0022] Tras la inyección en el flujo sanguíneo, las células de la subpoblación heterogénea pueden migrar a un sitio de neurodegeneración.

[0023] La neurodegeneración causada por isquemia puede ser un accidente cerebrovascular isquémico.

[0024] En el presente documento también se describe un método para tratar la neurodegeneración causada por isquemia, comprendiendo inyectar la subpoblación heterogénea de células de médula ósea tal como se ha descrito anteriormente en el flujo sanguíneo de un mamífero con neurodegeneración, donde la inyección de la subpoblación heterogénea de células de médula ósea reduce un déficit neurológico causado por la neurodegeneración.

[0025] Cuando la neurodegeneración está causada por un accidente cerebrovascular isquémico, el método puede comprender además un tratamiento adicional para aumentar el flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo ocluido, donde la inyección de la subpoblación heterogénea de células de médula ósea en combinación con el tratamiento adicional tiene como resultado una mayor reducción del déficit neurológico que el tratamiento adicional por sí solo o la inyección de la subpoblación heterogénea de células de médula ósea sin el tratamiento adicional.

[0026] El tratamiento adicional para aumentar el flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo ocluido puede ocurrir al mismo tiempo que la inyección de la subpoblación heterogénea de células de médula ósea.

[0027] El tratamiento adicional para aumentar el flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo ocluido puede ocurrir antes de la inyección de subpoblación heterogénea de células de médula ósea.

[0028] Cuando la neurodegeneración está causada por un accidente cerebrovascular isquémico, el vaso sanguíneo puede bloquearse por un coágulo de sangre. El coágulo de sangre puede ser resultado de la ruptura de una placa aterosclerótica.

[0029] Cuando la neurodegeneración está causada por un accidente cerebrovascular isquémico, el tratamiento adicional para aumentar el flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo ocluido puede incluir la administración de un agente trombolítico. El agente trombolítico puede ser al menos uno de entre estreptoquinasa, uroquinasa y un activador tisular del plasminógeno recombinante. Además, el activador tisular del plasminógeno recombinante puede ser alteplasa, reteplasa, desmoteplasa o tenecteplasa.

[0030] Cuando la neurodegeneración está causada por un accidente cerebrovascular isquémico, el tratamiento adicional para aumentar el flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo ocluido podría incluir la retirada mecánica de un coágulo de sangre del vaso sanguíneo ocluido.

[0031] El coágulo de sangre puede atraparse con un filtro.

[0032] Cuando la neurodegeneración está causada por un accidente cerebrovascular isquémico, el tratamiento adicional para aumentar el flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo ocluido podría incluir la realización de una angioplastia y/o la implantación de un estent vascular.

[0033] La subpoblación heterogénea de células de médula ósea puede inyectarse por vía intravenosa, por vía intraarterial, por ejemplo, en la arteria carótida, o por vía intracerebral.

[0034] En el presente documento también se describe el tratamiento para la neurodegeneración causada por isquemia, comprendiendo inyectar la subpoblación heterogénea de células de médula ósea en el flujo sanguíneo de un mamífero con neurodegeneración causada por isquemia, en el que la inyección de la subpoblación heterogénea de células de médula ósea reduce el volumen de un infarto causado por isquemia.

[0035] Cuando la neurodegeneración está causada por un accidente cerebrovascular isquémico, el método puede comprender además un tratamiento adicional para aumentar el flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo ocluido, donde la inyección de la subpoblación heterogénea de células de médula ósea en combinación con el tratamiento adicional tiene como resultado una reducción del volumen del infarto mayor que tras el tratamiento adicional por sí solo o la inyección de subpoblación heterogénea de células de médula ósea sin el tratamiento adicional.

[0036] Cuando la neurodegeneración está causada por un accidente cerebrovascular isquémico, el tratamiento adicional para aumentar el flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo ocluido comprende la administración de un agente trombolítico. El agente trombolítico puede ser al menos uno de entre estreptoquinasa, uroquinasa y

un activador tisular del plasminógeno recombinante. Además, el activador tisular del plasminógeno recombinante puede ser alteplasa, reteplasa, desmoteplasa o tenecteplasa.

5 **[0037]** Cuando la neurodegeneración está causada por un accidente cerebrovascular isquémico, el tratamiento adicional para aumentar el flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo ocluido puede incluir la realización de una angioplastia y/o la implantación de un estent.

[0038] Cuando la neurodegeneración está causada por un accidente cerebrovascular isquémico, el tratamiento adicional para aumentar el flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo ocluido puede incluir la retirada mecánica de un coágulo de sangre cercano al área del infarto.

10 **[0039]** Según un segundo método, la subpoblación heterogénea de células de médula ósea puede inyectarse por vía intravenosa, por vía intraarterial, por ejemplo, en una arteria carótida, o por vía intracerebral.

[0040] Cuando la neurodegeneración esté causada por un accidente cerebrovascular isquémico, puede proporcionarse un kit que comprende un agente trombolítico y la subpoblación heterogénea de células de médula ósea tal como se ha descrito anteriormente. El agente trombolítico puede ser al menos uno de entre estreptoquinasa, uroquinasa y un activador tisular del plasminógeno recombinante. Además, el activador tisular del plasminógeno recombinante puede ser alteplasa, reteplasa o tenecteplasa.

[0041] Cuando la neurodegeneración está causada por un accidente cerebrovascular isquémico, puede proporcionarse un kit que comprende la subpoblación heterogénea de células de médula ósea descrita anteriormente y un medio para retirar mecánicamente un coágulo de sangre.

20 **[0042]** De manera adicional, cuando la neurodegeneración está causada por un accidente cerebrovascular isquémico, puede proporcionarse una composición para el tratamiento de la neurodegeneración causada por isquemia comprendiendo un agente trombolítico, la subpoblación heterogénea de células de médula ósea descrita anteriormente, y un portador para la inyección de la composición. El agente trombolítico puede ser al menos uno de entre estreptoquinasa, uroquinasa y un activador tisular del plasminógeno recombinante. Además, el activador tisular del plasminógeno recombinante puede ser alteplasa, reteplasa o tenecteplasa.

25 **[0043]** Vista desde un primer aspecto, la invención proporciona un método para producir una subpoblación heterogénea de células de médula ósea para el tratamiento de la neurodegeneración causada por un accidente cerebrovascular isquémico, comprendiendo:

- a) sembrar una población de células de médula ósea obtenidas a partir de médula ósea humana sin procesar a una baja densidad de 10^5 - 10^6 células/cm² sobre una superficie plástica.
- 30 b) lavar la población celular sembrada para retirar células no adherentes;
- c) cultivar las células adherentes de la población lavada de células en un medio que contiene suero;
- d) pasar en serie las células cultivadas por no más de siete pases en serie, donde, en cada pase, las células cultivadas se siembran a baja densidad de aproximadamente 750 células/cm²;
- 35 e) obtener la subpoblación heterogénea de células de médula ósea, donde dicha subpoblación heterogénea de células de médula ósea trata la neurodegeneración causada por accidente cerebrovascular isquémico,

donde dicha médula ósea sin procesar se obtiene de un sujeto que no se ha tratado previamente con un agente quimioterápico.

40 **[0044]** La médula ósea sin procesar descrita anteriormente se obtiene de un sujeto que no está tratado previamente con ningún agente que module la división celular, por ejemplo, fármacos antineoplásicos utilizados en la quimioterapia incluyendo antimetabolitos, como 5-fluorouracilo.

[0045] En un aspecto, la subpoblación heterogénea de células de médula ósea no puede aislarse por fraccionamiento por densidad, por ejemplo, un gradiente de FicollTM o de PercollTM, o por lisis ACK (Amonio-Cloruro-Potasio)

50 **[0046]** En un aspecto adicional de la invención, la subpoblación heterogénea de células de médula ósea puede probarse además en un modelo experimental de neurodegeneración causada por isquemia, en el que solo se seleccionan aquellas poblaciones celulares que demuestren la habilidad de tratar la neurodegeneración causada por un accidente cerebrovascular isquémico y en el que las pruebas no son en un ser humano. Los modelos experimentales de la neurodegeneración causada por isquemia pueden ser un modelo de cultivo celular de privación de oxígeno/glucosa (OGD, por sus siglas en inglés) y un modelo animal de accidente cerebrovascular. En un aspecto, el modelo experimental puede ser un modelo de cultivo celular de privación de oxígeno/glucosa (OGD, por sus siglas en inglés) seguido de un modelo animal de accidente cerebrovascular. En un aspecto, ambos modelos pueden utilizarse para analizar la subpoblación heterogénea de células de médula ósea.

55 **[0047]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para optimizar un protocolo experimental para el aislamiento de una población celular heterogénea que trate la neurodegeneración causada por un accidente cerebrovascular isquémico, comprendiendo los pasos de:

aislar una población celular según un protocolo experimental, que es un método del primer aspecto de la invención

donde la población celular trata la neurodegeneración causada por un accidente cerebrovascular isquémico, y

- 5 donde los parámetros óptimos de cada paso del protocolo se determinan al analizar el efecto que cada parámetro tiene en la eficacia de la población celular aislada para tratar la neurodegeneración causada por un accidente cerebrovascular isquémico en un modelo experimental de isquemia, con la condición de que los experimentos no se lleven a cabo en un ser humano.

- 10 **[0048]** En un aspecto, los parámetros pueden incluir la densidad celular en la siembra, el número de pase celular, la composición del medio de cultivo o el fraccionamiento celular.

- [0049]** En otro aspecto, el modelo experimental de la isquemia puede ser un modelo de cultivo celular de privación de oxígeno/glucosa (OGD, por sus siglas en inglés) o un modelo animal de accidente cerebrovascular, como un modelo animal con oclusión de la arteria cerebral media (MCAO, por sus siglas en inglés). También pueden utilizarse ambos modelos. En un aspecto, el modelo experimental puede ser un modelo de cultivo celular de privación de oxígeno/glucosa (OGD, por sus siglas en inglés) seguido de un modelo animal de accidente cerebrovascular.

- 20 **[0050]** Los aspectos descritos anteriormente pueden tener muchas ventajas, incluyendo la habilidad de la subpoblación heterogénea de células de médula ósea para tratar la neurodegeneración causada por un accidente cerebrovascular isquémico. La población celular disminuye en gran medida el área del infarto y mejora la función neurológica.

[0051] En combinación con agentes trombolíticos y métodos mecánicos de retirada de coágulos, la terapia celular promete ejercer una influencia clínica significativa en la supervivencia del paciente, su funcionamiento y su calidad de vida tras el accidente cerebrovascular.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 25 **[0052]** El experto en la materia entenderá que los dibujos, descritos a continuación, son solo para fines ilustrativos. Las figuras no pretenden limitar el alcance de lo descrito de ningún modo.

La FIG. 1 representa los resultados de la investigación de subpoblaciones celulares derivadas de la médula ósea candidata utilizando el modelo de OGD in vitro (FIG. 1A, 1B y 1E) y el modelo de MCAO en ratas in vivo (FIG. 1C, 1D y 1F).

- 30 Las FIGS. 1A y 1B representan la supervivencia de células huésped y la liberación de citoquina (bFGF e IL-6) respectivamente en el modelo de OGD in vitro en respuesta a la presencia o ausencia de 7 subpoblaciones celulares diferentes derivadas de la médula ósea candidata.

- 35 Las FIGS. 1C y 1D comparan la supervivencia de células huésped, el volumen del infarto y la función neurológica en el modelo de MCAO en ratas in vivo en respuesta a la subpoblación de células de médula ósea NCS-01 o a la solución salina inyectada o bien por vía intravenosa (IV) o por vía intraarterial (ICA).

La FIG. 1E representa la supervivencia de células huésped y la liberación de citoquina (bFGF e IL-6) en el modelo OGD in vitro en respuesta a la presencia o ausencia de la subpoblación de células de médula ósea NCS-01.

- 40 La FIG. 1F muestra cambios en el volumen del infarto y la función neurológica en el modelo de MCAO en ratas in vivo en respuesta a la inyección de 3×10^5 , 10^6 y 10^7 células de médula ósea NCS-01.

La FIG. 2 muestra cambios en el volumen del infarto (Panel A) y la función neurológica (Panel B; medida mediante la escala de Bederson modificada (0 = normal a 3 = más grave)) en un modelo de MCAO en ratas permanente o transitorio (60 minutos) en respuesta a la inyección por vía intraarterial de 1 ml de $7,5 \times 10^6$ células NCS-01 o de solución salina.

- 45 La FIG. 3 muestra un diagrama esquemático que describe el protocolo utilizado en el ensayo de privación de oxígeno/glucosa (OGD, por sus siglas en inglés) in vitro.

La FIG. 4 muestra los niveles relativos de bFGF y de citoquinas IL-6 secretadas en el medio de cultivo celular de un ensayo de OGD tras la adición de solución salina, células de Li o células NCS-01.

- 50 Las FIG. 5A y 5B muestran la supervivencia de células huésped, el volumen del infarto y la función neurológica en el modelo de MCAO en ratas in vivo en respuesta a una inyección de solución salina, células de Li o células NCS-01.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- [0053]** La práctica de la invención emplea, a menos que se indique de otro modo, técnicas de biología molecular convencionales dentro del ámbito de especialización. Los trabajadores especializados conocen bien dichas técnicas, y estas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2008), incluidos todos los suplementos; Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

[0054] A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia. La memoria también proporciona definiciones de los términos para ayudar a interpretar la exposición y las reivindicaciones de esta solicitud. En caso de que una definición no sea coherente con las definiciones de otro sitio, controlará la

5

[0055] Las células derivadas de la médula ósea (BM) incluyen una mezcla heterogénea de muchos tipos diferentes de células. La médula ósea está compuesta de dos sistemas celulares principales que pertenecen a dos linajes distintos: los tejidos hematopoyéticos y el estroma de soporte asociado. Por tanto, se sabe que al menos dos células madre distintas, a saber células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) y células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) coexisten en la médula ósea (Bianco, M. Riminucci, S. Gronthos, & P. G. Robey, "Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications", Stem Cells, vol. 19, n.º 3, pp. 180-192, 2001).

10

[0056] Las MSC pueden definirse en general por los marcadores de superficie celular y por su habilidad para adherirse al plástico del cultivo celular/tisular. Por consiguiente, las poblaciones de MSC son necesariamente heterogéneas, es decir, no son poblaciones celulares clónicas. Incluso si las subpoblaciones de MSC comparten uno o más marcadores de superficies celulares comunes, pueden diferenciarse de forma significativa en su actividad biológica dependiendo del método de fabricación utilizado para aislarlas. Esta exposición describe un protocolo de análisis en dos pasos para la identificación de una población celular de médula ósea heterogénea que sea eficaz para tratar la neurodegeneración que incluye la neurodegeneración inicial aguda causada por isquemia.

15

20

[0057] En un primer paso, las subpoblaciones de médula ósea se analizan por su habilidad para atenuar el efecto de la privación de oxígeno/glucosa (OGD) en cocultivos comprendiendo subpoblaciones de médula ósea candidata y células nerviosas. La actividad de las subpoblaciones de médula ósea candidata para atenuar la neurodegeneración se evalúa midiendo la secreción de factores tróficos (bFGF e IL6) en el medio de cultivo así como determinando la supervivencia de células huésped en el ensayo de OGD.

25

[0058] En un segundo paso, las poblaciones celulares derivadas de la médula ósea que presentan la actividad más fuerte en el ensayo de OGD se investigan después adicionalmente analizándolas en un modelo de MCAO en ratas in vivo de la neurodegeneración causada por isquemia. Este procedimiento de análisis facilita la identificación de una subpoblación heterogénea de médula ósea, llamada NCS-01, que atenúa en gran medida la neurodegeneración causada por isquemia, tal como se define en el presente documento.

30

[0059] Las células de médula ósea sin procesar están fácilmente disponibles para un experto en la materia.

[0060] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "médula ósea sin procesar" hace referencia a un aspirado de médula ósea humana sin ningún procesamiento adicional, como el fraccionamiento por densidad o la clasificación de células.

[0061] En otros modos de realización, se obtiene "médula ósea sin procesar" de sujetos que no se tratan previamente con ningún agente que interfiera con el crecimiento y división celular normal, incluyendo, por ejemplo, agentes quimioterápicos como agentes antimitóticos o agentes antimetabolitos.

35

[0062] Pueden encontrarse ejemplos de dichos agentes en Cancer Principles and Practice of Oncology de V.T. Devita & S. Hellman (eds.), 6ª ed. (15 de febrero de 2001), Lippincott Williams & Wilkins Publishers.

[0063] Un agente "antimetabolito", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto que inhibe o altera la síntesis de ADN que provoca muerte celular. Ejemplos de antimetabolitos incluyen, pero sin carácter limitativo, 6-mercaptopurina; citarabina; fludarabina; flexuridina; 5-fluorouracilo; capecitabina; Raltitrexed; metotrexato; cladribina; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; tioguanina; hidroxurea; agentes desmetilantes de ADN, como 5-azacitidina y decitabina; edatrexato; y antagonistas del ácido fólico como, pero sin carácter

40

45

[0064] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fraccionamiento por densidad" se refiere a procedimientos de laboratorio conocidos para el fraccionamiento de células de médula ósea con base en la densidad celular utilizando gradientes de Ficoll-PaqueTM o de PercollTM. Por ejemplo, se pone Ficoll-PaqueTM en el fondo de un tubo cónico, y después se pone lentamente la médula ósea sin procesar en capas sobre el Ficoll-PaqueTM. Tras la centrifugación de las células mediante el gradiente de Ficoll, las células se separan en capas según su densidad, de arriba a abajo: plasma y otros constituyentes, una capa de células mononucleares, llamada capa leucocítica, comprendiendo células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y células mononucleares (MNC, por sus siglas en inglés) y eritrocitos y granulocitos en el pellet. Este procedimiento de fraccionamiento separa los eritrocitos de las PBMC. Se suelen utilizar etilendiamino tetraacetato (EDTA) y heparina en conjunto con el Ficoll-PaqueTM para evitar los coágulos.

50

55

[0065] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "lisis ACK" se refiere a un tampón de lisis con amonio, cloruro y potasio (tampón de lisis ACK) para la lisis de glóbulos rojos en sangre total anticoagulada con EDTA.

5 **[0066]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sembrar la población de células de médula ósea a una baja densidad" se refiere a la concentración de células de médula ósea añadida al principio del cultivo celular. En un aspecto, las células de médula ósea se siembran a una densidad de aproximadamente 10^2 o aproximadamente 10^3 o aproximadamente 10^4 o aproximadamente 10^5 o aproximadamente 10^6 células/cm². En un aspecto preferido, las células de médula ósea se siembran a una densidad de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^6 células/cm².

10 **[0067]** Tal como se utiliza en el presente documento, la "neurodegeneración" hace referencia a cualquier estado patológico que da como resultado la pérdida progresiva de estructura o función de células nerviosas, incluyendo la muerte de células nerviosas. Por consiguiente, la neurodegeneración es un estado patológico causado por trastornos neurológicos.

15 **[0068]** La expresión "célula nerviosa" incluye células neuronales (es decir, neuronas, por ejemplo, neuronas unipolares, bipolares y multipolares) y sus precursoras, y células gliales (por ejemplo, macroglías como oligodendrocitos, células de Schwann, y astrocitos, o microglías) y sus precursoras.

20 **[0069]** Una "cantidad eficaz" hace referencia al número óptimo de células que se necesitan para provocar una mejora clínicamente significativa en los síntomas y/o estado patológico asociado con la neurodegeneración, incluyendo ralentizar, parar o revertir la neurodegeneración, reducir un déficit neurológico o mejorar una respuesta neurológica. En algunos modos de realización, una cantidad eficaz de población celular NCS-01 se refiere al número óptimo de células que se necesita para reducir el volumen del infarto causado por el inicio repentino de una neurodegeneración aguda tras un accidente cerebrovascular. Una cantidad eficaz apropiada de la población celular NCS-01 para un organismo en particular puede determinarla un experto en la materia utilizando experimentación rutinaria.

25 **[0070]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratar la neurodegeneración" hace referencia al tratamiento de la neurodegeneración con una población celular NCS-01 que da como resultado una mejora clínicamente significativa en los síntomas y/o estado patológico asociado con la neurodegeneración, incluyendo ralentizar, parar o revertir la neurodegeneración, reducir un déficit neurológico o mejorar una respuesta neurológica.

30 **[0071]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "agentes trombolíticos" hace referencia a fármacos que se utilizan en la medicina para disolver coágulos de sangre en un procedimiento llamado trombólisis. Ejemplos no limitativos de fármacos trombolíticos incluyen activador del plasminógeno tisular tPA, alteplasa (Activase), reteplasa (Retavase), tenecteplasa (TNKase), anistreplasa (Eminase), estreptoquinasa (Kabikinase, Streptase) y uroquinasa (Abbokinasa).

35 **[0072]** Lo que sigue describe los procedimientos para aislar y caracterizar una subpoblación de células de médula ósea heterogéneas de médula ósea entera sin procesar que sea óptima para el tratamiento de la neurodegeneración incluyendo el tratamiento de la neurodegeneración causada por isquemia.

Aislamiento de poblaciones de células de médula ósea candidatas eficaces para tratar la neurodegeneración causada por isquemia

40 **[0073]** Se extrae médula ósea sin procesar y entera de un mamífero que no se haya tratado previamente con un antimitótico o un antimetabolito, como 5-fluorouracilo (5-FU).

45 **[0074]** Después, la médula ósea sin procesar se coloca directamente en el plástico del cultivo celular/tisular y se expandió mediante pases en serie en un medio que contiene suero. En cada pase, las células se siembran a una densidad celular muy baja, es decir, aproximadamente 750 células/cm² o menos, y se cultivan para acercar la confluencia antes de cualquier pase adicional. Las células no adherentes se retiran al lavarlas. Como la médula ósea no se procesa mediante fraccionamiento por densidad, la población inicial de células de médula ósea entera incluye células hematopoyéticas y no hematopoyéticas así como células de médula ósea nucleadas y no nucleadas.

50 **[0075]** Después, se establecen bancos de células maestras (MCB, por sus siglas en inglés) y bancos de células de trabajo (WCB, por sus siglas en inglés) en los pases 3 y 5, respectivamente, y se criopreservan.

[0076] Cuando sea necesario, se siembran células de WCB a una densidad muy baja, por ejemplo, aproximadamente 750 células/cm² o menos, y se expanden en medio que contiene suero antes de recogerse y criopreservarse utilizando procedimientos estándar.

55 *Protocolo de selección en dos pasos para evaluar la habilidad de una población de células de médula ósea para atenuar la neurodegeneración*

[0077] Las poblaciones de células de médula ósea "candidatas" pueden analizarse después utilizando un procedimiento en dos pasos que selecciona la población de células de médula ósea óptima para el tratamiento de la neurodegeneración.

5 **[0078]** En el primer paso, las poblaciones de células de médula ósea candidatas se analizan en un ensayo de privación de oxígeno/glucosa in vitro en el que las poblaciones de células de médula ósea candidatas se cocultivan con células nerviosas en condiciones experimentales que simulan la neurodegeneración. Después, se analiza la habilidad para tratar la neurodegeneración in vivo de las poblaciones celulares que hayan mostrado que atenúan la neurodegeneración in vitro.

10 **[0079]** En el segundo paso, las poblaciones de células de médula ósea candidatas seleccionadas se evalúan en un modelo de MCAO en ratas de la neurodegeneración causada por isquemia. Luego, se selecciona la población de células de médula ósea heterogénea candidata que demuestre la mayor actividad para atenuar la neurodegeneración in vivo.

[0080] La población de células de médula ósea heterogénea seleccionada por este procedimiento de análisis en dos pasos se llama la población celular NCS-01 o NCS-01.

15 *Identificación de las condiciones de cultivo celular óptimas para el aislamiento de una población de células de médula ósea con actividad de atenuación de la neurodegeneración*

20 **[0081]** El protocolo de análisis en dos pasos también es útil para identificar las condiciones experimentales óptimas, como la densidad celular en la siembra, el número de pase celular, la composición del medio de cultivo o el fraccionamiento celular para el cultivo de poblaciones de células de médula ósea que sean capaces de tratar la neurodegeneración.

25 **[0082]** Por consiguiente, al utilizar los dos procedimientos de análisis, la concentración celular óptima en la resiembra es de aproximadamente 750 células/cm² o menos en cada pase. El medio de cultivo óptimo es un medio que contiene suero. Las poblaciones celulares NCS-01 puede pasarse no más de aproximadamente 7, aproximadamente 6, aproximadamente 5, o aproximadamente 4, o aproximadamente 3, o aproximadamente 2 veces desde la colocación inicial de la médula ósea sin procesar entera. Un pase extendido, es decir, más de 7 pases desde la colocación inicial en la placa de la médula ósea entera sin procesar, disminuye o abole la habilidad del NCS-01 de tratar la neurodegeneración en el ensayo de OGD in vitro y en el modelo de MCAO en ratas.

30 **[0083]** El ensayo de OGD y el modelo de MCAO en ratas de neurodegeneración se describen a continuación con más detalle.

Análisis in vitro de las poblaciones de células de médula ósea capaces de tratar la neurodegeneración

[0084] Se analiza primero la habilidad de evitar la neurodegeneración de las poblaciones de células de médula ósea candidatas en un cocultivo de neuronas-astrocitos según las condiciones de cultivo de la privación de oxígeno/glucosa (OGD) que simulan la neurodegeneración causada por isquemia.

35 **[0085]** Los cultivos mixtos primarios de astrocitos y neuronas humanas o de rata se exponen primero a las condiciones de cultivo de privación de oxígeno/glucosa (OGD) (por ejemplo, un medio libre de glucosa con un 8 % de oxígeno) durante aproximadamente de 0,5 a 3 horas para inducir la neurodegeneración. Después, la privación de oxígeno/glucosa del cultivo celular se interrumpe y las células nerviosas a las que se le induce la OCD se cultivan en condiciones fisiológicas durante 2 horas y luego se cocultivan en presencia de una población de células de médula ósea candidatas durante 3 horas más. Luego, se evalúa la neurodegeneración midiendo la viabilidad de la célula huésped en presencia o en ausencia de la población de células de médula ósea candidatas después de 0 y a partir de 5 horas tras la OGD. La viabilidad de las células huésped (neuronas y astrocitos) puede evaluarse utilizando, por ejemplo, tinción azul tripán y/o el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio).

45 **[0086]** Un aumento en la viabilidad celular en presencia de una población de células de médula ósea candidatas en comparación con la viabilidad celular de un control (sin la adición de la población de médula ósea candidata) de aproximadamente un 5 % o aproximadamente un 10 % o aproximadamente un 15 % o aproximadamente un 20 % o aproximadamente un 25 % o más indica que la población de células de médula ósea puede proteger y rescatar cocultivos de neurona/astrocito de la neurodegeneración causada por la privación de oxígeno y glucosa.

50 **[0087]** Además, el medio de cultivo de los cultivos celulares de neuronas/astrocitos sometidos a las condiciones de OGD en presencia o ausencia de poblaciones de células de médula ósea candidatas también puede evaluarse para la secreción inducida de factores tróficos, por ejemplo, bFGF y/o IL-6 utilizando kits de ELISA disponibles en el mercado.

55 **[0088]** En determinados modos de realización, las poblaciones de células de médula ósea candidatas se seleccionan según su habilidad para inducir un aumento de la cantidad de IL-6 y/o bFGF secretados en el medio

de los cocultivos de neuronas/astrocitos en respuesta a la privación de oxígeno/glucosa, pero no en ausencia de la privación de oxígeno/glucosa.

- 5 **[0089]** En otros modos de realización, las poblaciones de células de médula ósea candidatas se seleccionan según su habilidad para inducir un aumento de la cantidad de IL-6 y/o bFGF secretados de al menos el doble o más en el medio de los cocultivos de neuronas/astrocitos en respuesta a la privación de oxígeno/glucosa, pero no en ausencia de la privación de oxígeno/glucosa.

[0090] Las poblaciones de células de médula ósea candidatas que disminuyan la incidencia de la muerte celular inducida por OGD e inducen un incremento de la cantidad de factores tróficos secretados (como bFGF y/o IL-6) se seleccionan para analizar in vivo el modelo de MCAO en ratas (véase a continuación).

- 10 **[0091]** Por ejemplo, las poblaciones de células de médula ósea candidatas pueden seleccionarse para un análisis adicional si disminuyen la incidencia de la muerte celular inducida por OGD más de aproximadamente un 25 % y disminuyen la cantidad de factores tróficos secretados en al menos un 10 % o más.

Análisis in vivo de las poblaciones de células de médula ósea candidatas capaces de tratar la neurodegeneración

- 15 **[0092]** Se estudia la habilidad de tratar la neurodegeneración in vivo de las poblaciones de células de médula ósea candidatas, seleccionadas en el paso de análisis del ensayo de OGD descrito anteriormente. Por ejemplo, puede analizarse la habilidad para tratar la neurodegeneración de las poblaciones de células de médula ósea candidatas en un modelo de neurodegeneración en un animal de experimentación que incluya modelos transgénicos de enfermedades neurodegenerativas (véase, por ejemplo, Harvey et al., Transgenic animal models of neurodegeneration based on human genetic studies J Neural Transm. (2011) 118(1): 27-45; Trancikova et al. Genetic mouse models of neurodegenerative diseases. Prog Mol Biol Transl Sci. (2011); 100:419-82; Chan et al. Generation of transgenic monkeys with human inherited genetic disease Methods (2009) 49(1):78-84; Rockenstein et al. Transgenic animal models of neurodegenerative diseases and their application to treatment development. Adv Drug Deliv Rev. (2007) 59(11):1093-102).

- 25 **[0093]** En un modo de realización, el modelo de neurodegeneración en un animal de experimentación puede ser un modelo animal de isquemia cerebral/accidente cerebrovascular (artículo de revisión de Graham et al. Comp Med. 2004 54(5):486-96), como el modelo de MCAO en ratas, donde la restricción de una ligadura implantada quirúrgicamente alrededor de una arteria cerebral simula el efecto de un accidente cerebrovascular isquémico al limitar el flujo sanguíneo al cerebro y causa isquemia y posterior neurodegeneración.

- 30 **[0094]** En el modelo de MCAO temporal, una población de células de médula ósea candidatas, seleccionada en el ensayo de OGD, se administra mediante perfusión continua en el flujo sanguíneo de una rata con MCAO temporal. Un experto en la materia puede determinar las dosis adecuadas, que pueden oscilar, por ejemplo, entre $7,5 \times 10^4$ y $3,75 \times 10^7$ células. Las células pueden inyectarse, por ejemplo, en la vena yugular (IV) o en la arteria carótida (ICA). Los controles consisten en la administración de un volumen equivalente de medios de crioconservación o de solución salina. Las células de la población de médula ósea candidata después se desplazan al sitio del infarto causado por la MCAO temporal.

- 35 **[0095]** La función neurológica en presencia o ausencia de las poblaciones de células de médula ósea seleccionadas para la OGD se evalúa posteriormente utilizando un Test Neurológico de Bederson varias veces tras el infarto. Después se sacrifican las ratas y se mide el volumen del infarto y la supervivencia de células huésped mediante tinciones con hematoxilina y eosina (H&E) o de Nissl de secciones de tejido cerebral de ratas con MCAO tratadas y sin tratar. Luego se seleccionan las poblaciones de células de médula ósea según su habilidad de mejorar la función neurológica, aumentar la supervivencia de las células huésped y disminuir el volumen del infarto en comparación con los animales de control hasta 28 días tras la MCAO.

Terapias combinadas para el tratamiento de la neurodegeneración causada por un accidente cerebrovascular isquémico

- 45 **[0096]** Detener el flujo sanguíneo a través de la arteria cerebral media durante un periodo prolongado simula una oclusión arterial permanente con un coágulo de sangre. La oclusión temporal, donde el flujo sanguíneo a través de la arteria cerebral se detiene durante un periodo limitado antes de restaurarse para permitir la reperfusión tiene como objetivo simular terapias como la trombólisis o la retirada mecánica de coágulos que restauran el flujo sanguíneo a la penumbra del accidente cerebrovascular inmediatamente tras el bloqueo arterial causado por un accidente cerebrovascular isquémico.

[0097] En muchos aspectos, la administración de la población celular NCS-01 a ratas con MCAO simula la reperfusión de arterias ocluidas como resultado de una trombólisis o de una retirada mecánica de los coágulos de sangre incluyendo angioplastia o implantación quirúrgica de estents.

- 55 **[0098]** Cuando la neurodegeneración está causada por un accidente cerebrovascular isquémico, la población celular NCS-01 puede combinarse con terapias trombolíticas para el tratamiento de la neurodegeneración causada por isquemia. Puede encontrarse una descripción de los agentes trombolíticos y su administración, por ejemplo, en los documentos de patente U.S. 5,945,432 y 6,821,985.

[0099] Los agentes trombolíticos inyectados tras el evento isquémico pueden administrarse antes, junto con, o después de la inyección de la población celular NCS-01.

[0100] Entre los ejemplos no limitativos de procedimientos mecánicos para mejorar el flujo sanguíneo de la penumbra de un infarto que pueden utilizarse en conjunto con la inyección de la composición celular NCS-01 dada a conocer se incluye la angioplastia o la implantación de estents conforme a los procedimientos que se conocen bien en la técnica.

[0101] Se describirá la presente invención con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

[0102] Los ejemplos exponen métodos para aislar, seleccionar y utilizar subpoblaciones de células de médula ósea para tratar la neurodegeneración causada por un accidente cerebrovascular isquémico de acuerdo con la presente invención. Se entiende que los pasos de los métodos descritos en estos ejemplos no pretenden ser limitativos. Objetivos y ventajas adicionales de la presente invención aparte de los expuestos anteriormente se pondrán de manifiesto a partir de los ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

EJEMPLO 1: Aislamiento de la población celular NCS-01

1) Aislamiento de las poblaciones de células de médula ósea candidatas

[0103] Se aisló una población de células de médula ósea heterogénea mediante el siguiente proceso de fabricación:

- Se recogió médula ósea sin procesar humana de donantes sanos previamente analizados de 50 años o menos por un proveedor comercial cualificado. La médula ósea se recogió de un donante que no se había tratado previamente con ningún agente antimitótico como 5-fluorouracilo.
- La médula ósea, ya sea procesada o sin procesar, se sembró posteriormente a baja densidad (10^2 - 10^6 células/cm²) sobre una superficie de plástico del cultivo celular/tisular y se cultivó en presencia de medio que contiene suero;
- tras varios días para permitir que las células se adhirieran al plástico, se retiraron las células no adherentes al lavarla; y
- cultivar la población celular adherente prácticamente hasta la confluencia en un medio que contiene suero; pasando en serie la población de células cultivadas durante no más de aproximadamente 7 pases en serie, en los que, en cada pase, las células cultivadas se siembran a baja densidad.

[0104] Para seleccionar las condiciones de cultivo óptimas para el aislamiento de una población de células de médula ósea que pueda tratar la neurodegeneración, se cultivaron inicialmente poblaciones celulares en distintas condiciones de cultivo como la densidad celular al sembrarlas, el número de pase celular, la composición del medio de cultivo o el fraccionamiento celular (véase la Tabla I).

[0105] Las células de médula ósea de médula ósea sin procesar o tras el fraccionamiento por densidad o la lisis ACK se sembraron en un plástico de cultivo celular/tisular en presencia de α -MEM complementado con 2 mM de GlutaMax (Invitrogen) y suero bovino fetal (FBS, HyClone o GIBCO) al 10 % o α -MEM (Mediatech) con 2 mM de GlutaMax (Invitrogen) y suero bovino fetal (FBS, HyClone o GIBCO) al 10 % o medio libre de suero (StemPro). Tras lavarlo para retirar las células no adherentes, se dejó que las células adherentes proliferasen prácticamente hasta la confluencia. Luego, las células se pasaron en serie por un total de 3, 4, 5 o 6 pases.

[0106] Después, se analizó la habilidad para tratar la neurodegeneración de las poblaciones de células de médula ósea candidatas en el ensayo de OGD in vitro y el estudio de MCAO in vivo.

TABLA I

CÉLULAS	FRACCIÓN CELULAR	MEDIO DE CULTIVO	PASES
Célula 1	BM sin procesar*	α MEM + FBS al 10 %	3
Célula 2	Utilizando Ficoll	α MEM + FBS al 10 %	3
Célula 3	Utilizando lisis ACK	α MEM + FBS al 10 %	3
Célula 4	Utilizando Ficoll	Medio libre de suero (StemPro)	6
Célula 5	Utilizando lisis ACK	Medio libre de suero (StemPro)	5
Célula 6	Utilizando Ficoll	Medio libre de suero (StemPro)	4
Célula 7	Utilizando lisis ACK	Medio libre de suero (StemPro)	4
Médula ósea			

2) Análisis primario utilizando el protocolo de privación de oxígeno/glucosa (OGD) in vitro

[0107] Se evaluaron diferentes parámetros en el proceso de fabricación señalado anteriormente, como la preparación de la médula ósea en presencia o ausencia del fraccionamiento por densidad, la densidad al sembrarla, el número de pases, el medio de cultivo y/o su combinación mediante la utilización del protocolo experimental de privación de oxígeno/glucosa (OGD) in vitro para determinar el procedimiento óptimo para el aislamiento de una poblaciones de células de médula ósea candidata que pueda tratar la neurodegeneración.

[0108] El modelo de OGD in vitro se eligió como análisis inicial porque simula la neurodegeneración causada por accidente cerebrovascular isquémico. En concreto, la OGD estudiaba si una subpoblación de células de médula ósea candidatas específica puede evitar la muerte de células nerviosas en el cultivo o no, y si puede inducir la secreción de factores tróficos neuroprotectores, como bFGF y IL-6.

[0109] En el modelo in vitro de privación de oxígeno/glucosa (OGD), los cultivos primarios mixtos de neuronas y astrocitos de rata (en una proporción de 1:1) se expusieron a una lesión por OGD (8 % de oxígeno; solución salina equilibrada de Earle sin glucosa) durante 90 minutos y se devolvieron a las condiciones fisiológicas durante 2 horas, tras las que se añadieron poblaciones de células de médula ósea candidatas al cocultivo de neuronas/astrocitos tratado por OGD durante 3 horas más. La viabilidad de las células nerviosas se evaluó inmediatamente después de la OGD y 5 horas tras la OGD utilizando metodologías estándar de tinción azul tripán y MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol- 2-il)-2,5-difenil-tetrazolio).

Cultivo celular

[0110] Los cultivos primarios mixtos de neuronas y astrocitos de rata se mantuvieron en el cultivo siguiendo el protocolo del proveedor (CAMBREX, MD). Inmediatamente después de descongelarlas, las células (4×10^4 células/pocillo) se sembraron y se cultivaron en placas de 96 pocillos recubiertos de poli-lisina en medios Neurobasal (GIBCO, CA) que contienen 2 mM de L-glutamina, B27 al 2 % (GIBCO, CA), y 50 U/ml de penicilinas y estreptomycin durante 7-10 días a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene un 5 % de CO₂. La pureza de las poblaciones celulares de neuronas y astrocitos se evaluó después utilizando inmunotinciones MAP2 y GFAP, respectivamente, y se descubrió que eran de más del 99 %.

Privación de oxígeno/glucosa (OGD) y cocultivos con poblaciones de células de médula ósea candidatas

[0111] Las células cultivadas se expusieron al modelo de lesión por OGD tal como se ha descrito anteriormente (Malagelada et al., Stroke (2004) 35(10):2396-2401) con pocas modificaciones. En resumen, el medio de cultivo se sustituyó por una solución salina equilibrada (BSS) de Earle sin glucosa que presenta la siguiente composición: 116 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl, 0,8 mM de MgSO₄, 1 mM de NaH₂PO₄, 26,2 mM de NaHCO₃, 0,01 mM de glicina, 1,8 mM de CaCl₂, y el pH se ajustó a 7,4. Las células cultivadas se situaron en una cámara humidificada para equilibrarla con un flujo continuo de 92 % de N₂ y 8 % de O₂ durante 15 minutos. Después de que se alcanzase el equilibrio, la cámara se selló y se situó en una incubadora a 37 °C durante 90 minutos. Después de este periodo, la OGD se terminó al añadir glucosa al medio de cultivo y devolver los cultivos a la incubadora estándar con un 95 % de O₂ y un 5 % de CO₂. Luego se permitió un periodo de reperusión de dos horas en un medio estándar y en condiciones normóxicas, tras el cual una población celular de médula ósea (BM) candidata se añadió al cultivo glial-neuronal mixto tratado con OGD durante aproximadamente 3 horas. El sobrenadante y la población de células de médula ósea se separaron después del cultivo mixto lavándolo. Posteriormente, se llevó a cabo la viabilidad celular y la inmunocitoquímica en las células y se midieron las cantidades de factores tróficos secretados utilizando ensayos de ELISA disponibles en el mercado tal como se describe a continuación.

Ensayo de viabilidad celular

[0112] La viabilidad celular se evaluó en dos puntos de tiempo: inmediatamente después de la OGD y 5 horas tras la OGD (es decir, 2 horas de reperusión más 3 horas de tratamiento con la población de células de médula ósea seleccionada). Para el ensayo de viabilidad tras la OGD, el sobrenadante que contiene las células derivadas de la médula ósea se separó del cultivo de células nerviosas mixtas adherente. Se llevó a cabo un método de tinción azul tripán y se contaron las células viables medios en tres áreas seleccionadas al azar (0,2 mm²) en cada pocillo (n = 5 por condición de tratamiento) para revelar la viabilidad celular para cada condición de tratamiento). Además, la tinción azul tripán se llevó a cabo en subconjuntos de células derivadas de médula ósea recogidas como pellets del sobrenadante.

Ensayo ELISA

[0113] Los factores tróficos como el bFGF e IL-6 así como los posibles factores neurotróficos secretados por las células derivadas de la médula ósea participan presumiblemente en el tratamiento de la neurodegeneración simulada por las condiciones de cultivo en OGD. Por lo tanto, medir la cantidad de estas moléculas secretadas en el medio de cultivo proporciona criterios por los cuales se evalúan las poblaciones de células de médula ósea que pueden tratar la neurodegeneración in vivo. Los sobrenadantes de los cocultivos de células nerviosas y

poblaciones de células de médula ósea candidatas en condiciones de cultivo estándar o expuestas a OGD se recogieron, y se analizó la presencia de una secreción de factor trófico utilizando kits de ELISA disponibles en el mercado conforme a las instrucciones del fabricante.

5 **[0114]** Los resultados de un análisis de OGD de las poblaciones de células derivadas de médula ósea procesadas conforme a los parámetros expuestos en la Tabla 1 anterior se muestran en la FIG. 1A y 1B.

10 **[0115]** Con base en los resultados de las FIGS. 1A y 1B, se eligió α MEM + FBS al 10 % como el medio de cultivo celular óptimo y se descubrió que la médula ósea sin procesar era superior a la médula ósea procesada por fraccionamiento por densidad (como Ficoll-Paque o Percoll) o por lisis ACK. Se descubrió que el número de pases óptimo para células de médula ósea sin procesar en un medio de α MEM + FBS al 10 % era de no más de 7 pases.

3) Análisis secundario y selección de poblaciones de células de médula ósea candidatas utilizando el modelo de ratas con oclusión de la arteria cerebral media in vivo

15 **[0116]** Con base en los resultados obtenidos con el análisis inicial del modelo de OGD in vitro, la actividad biológica de cada población de células de médula ósea candidata para tratar la neurodegeneración se evaluó al comparar el déficit neurológico y el volumen del infarto de ratas con MCAO tratadas con la población de células de médula ósea con el de ratas con MCAO tratadas solo con solución salina.

Cirugía de oclusión de arteria cerebral media (MCAO)

20 **[0117]** Los animales se anestesiaron utilizando isoflurano (al 1,5 % - 2,5 % con oxígeno). Se rasuró la piel de la cabeza y se limpió con un detergente quirúrgico de alcohol y clorhexidina. Después se colocó al animal en un aparato estereotáctico. Se le practicó una incisión sagital de línea media de aproximadamente 2,5 cm de largo empezando algo detrás de los ojos, y se expuso el área del cráneo utilizando el extremo redondeado de una espátula. Con el bregma como punto de referencia, se obtuvo un registro por láser Doppler del punto de partida (esto es, antes de la cirugía del accidente cerebrovascular) a partir de las siguientes coordenadas (AP: +2,0, ML: 2,0). La piel de la región ventral del cuello se rasuró desde la mandíbula hasta el mango del esternón y se limpió con un detergente quirúrgico de alcohol y clorhexidina. Después se colocó al animal bajo el microscopio quirúrgico. Se practicó una incisión cutánea sobre la arteria carótida derecha. La carótida externa se aisló y se ligó lo más lejos distalmente posible. La arteria occipital se cauterizó. En ocasiones había otra rama o dos que se extendían de la arteria carótida que también se necesitarían cauterizar. Una segunda ligadura se situó de forma proximal en la arteria carótida exterior, que después se cortó entre las ligaduras. Se ligó la arteria pterigopalatina. 25 Posteriormente, se colocó una sutura temporal alrededor de la carótida común para proporcionar tensión y restringir el flujo sanguíneo. El muñón proximal de la carótida externa se retiró utilizando la ligadura, enderezando de manera eficaz la bifurcación carotídea. Se realizó una incisión utilizando un par de microtijeras en el muñón de la carótida externa y se insertó un filamento de nailon 4-0 con un extremo prefabricado, y se pasó hacia el interior de la carótida interna hasta que se sintió resistencia (aproximadamente 15-17 mm). Esto bloquea de manera eficaz la arteria cerebral media (MCA, por sus siglas en inglés). El filamento se aseguró en su lugar con una ligadura alrededor del muñón proximal de la carótida externa. La carótida común contralateral se aisló y se sujetó con una ligadura temporal. La incisión cutánea se cerró con grapas. El animal se fijó después al aparato estereotáctico para un registro por láser Doppler a fin de revelar una oclusión satisfactoria de la MCA. Después de 5 minutos, se retiró la ligadura a la arteria carótida común contralateral. El isoflurano se interrumpió y el animal se situó en una jaula de recuperación sobre una manta caliente. Después de 60 minutos, el animal se volvió a anestesiarse con isoflurano y se abrió la incisión para analizar el modelo temporal. Se retiró el filamento que causaba la oclusión y el muñón de la carótida externa se ligó cerca de la bifurcación carotídea. La incisión cutánea se cerró con grapas. El animal se volvió a fijar al aparato estereotáctico para un registro por láser Doppler a fin de revelar una perfusión satisfactoria. Finalmente, el animal se situó en una jaula de recuperación sobre una manta caliente. 45

Análisis de la función neurológica

[0118] Se llevó a cabo el reconocido Test Neurológico de Bederson modificado en cada rata, e implica obtener una puntuación para cada uno de los siguientes:

- 50 • retracción de las extremidades inferiores contralaterales, que mide la habilidad del animal para volver a colocar la extremidad inferior después de que se haya desplazado lateralmente unos 2-3 cm, clasificada desde 0 (colocación inmediata) a 3 (no colocación).
- habilidad para caminar sobre una barra, clasificada desde 0 para una rata que atravesase rápidamente una barra de 2,4 cm de ancho por 80 cm de largo, hasta 3 para una rata incapaz de mantenerse en la barra durante 10 segundos, y
- 55 • agarre bilateral de las patas delanteras, que mide la habilidad de agarrarse a una varilla de acero de 2 mm de diámetro, clasificada desde 0 para una rata con un agarre de las patas delanteras normal, a 3 para una rata incapaz de agarrarse con las patas delanteras.

[0119] Las puntuaciones de las 3 pruebas se evaluaron en un periodo de aproximadamente 15 minutos en cada día de evaluación. Se calculó una puntuación media de las 3 pruebas para proporcionar una puntuación del déficit neurológico conjunta que oscila entre 0 (función neurológica normal) a 3 (déficit neurológico grave). Por tanto, cuanto más alta sea la puntuación, mayor es el déficit neurológico.

- 5 **[0120]** Con base en estudios experimentales, una puntuación de más de aproximadamente 2,5 indica un animal que tiene déficits neurológicos característicos de un accidente cerebrovascular.

Histología.

Preparación de la sección cerebral

- 10 **[0121]** La preparación de las secciones cerebrales se diseñó para identificar zonas de daño cerebral. Después de 7 días o 28 días tras la oclusión de la MCA, las ratas se sacrificaron, se perfundieron mediante perfusión transcardiaca con solución salina, seguida de paraformaldehído al 4 %. Los cerebros se fijaron luego en paraformaldehído al 4 %, y posteriormente se sumergieron en sacarosa al 25 %. Cada cerebro anterior se cortó en secciones de tejido coronario de 30 µm de grosor con las coordenadas anteriores-posteriores correspondientes de bregma 5,2 mm a bregma -8,8 mm por animal.

Medición del volumen del infarto

[0122] Se procesaron al menos 4 secciones de tejido coronario por cerebro para la tinción con hematoxilina-eosina (H&E) o de Nissl. El área de la lesión indirecta, en la que el área intacta del hemisferio ipsilateral se sustrajo del área del hemisferio contralateral, se utilizó para revelar el infarto cerebral.

- 20 **[0123]** El volumen de la lesión se presentó como un porcentaje en volumen de la lesión en comparación con el hemisferio contralateral. La determinación histológica del volumen de la lesión se llevó a cabo utilizando tinción con hematoxilina-eosina (H&E) o de Nissl, con imágenes representativas capturadas de manera digital y procesadas mediante el software ImageJ del NIH, y un análisis cuantitativo de imágenes. El volumen de la lesión se determinó según la siguiente fórmula:

Espesor de la sección $\times$ suma del área del infarto en todas las secciones cerebrales.

- 25 **[0124]** Para minimizar los artefactos producidos por un edema postisquémico en el área del infarto, se midió indirectamente el área del infarto del hemisferio ipsilateral sustrayendo el área sin infarto en el hemisferio ipsilateral del área total intacta del hemisferio contralateral.

Mediciones de la supervivencia celular en un área isquémica alrededor del infarto

- 30 **[0125]** Un campo de gran tamaño seleccionado al azar que se corresponde con el área cortical alrededor del infarto se utilizó para contar las células que sobrevivieron en esta zona isquémica (Yasuhara et al., Stem Cells and Dev, 2009). Para una estimación de la viabilidad celular de las células huésped neuronales dentro de la región cortical isquémica, se llevó a cabo una tinción de Nissl utilizando solución de violeta cristal (Sigma, St. Louis, MO), y se seleccionaron al azar campos visuales de la zona cortical y se capturó fotográficamente (Carl Zeiss, Axiophot2) el córtex contralateral intacto correspondiente en 3 secciones, y los números celulares se
- 35 determinaron al contar células en vistas de campos de gran tamaño seleccionados al azar (28 800 µm²). Los porcentajes de neuronas preservadas en el córtex dañado en relación al lado intacto se calcularon y se utilizaron para análisis estadísticos. Se asignó un código oculto a las secciones cerebrales y se corrigió el número total de células tintadas contadas utilizando la fórmula de Abercrombie.

Examen de poblaciones de células de médula ósea candidatas utilizando el modelo de accidente cerebrovascular por MCAO en animales

- 40 **[0126]** Grupos de 3 (para administración intravenosa) o de 6 (para administración por vía intraarterial) ratas macho/grupo se sometieron a una MCAO temporal de 1 hora y luego se les inyectó 1 ml de medio de inyección que contiene o bien solución salina o bien $7,5 \times 10^6$ de células derivadas de la médula ósea (llamadas población celular NCS-01) aisladas conforme al protocolo descrito anteriormente. Se les hizo un seguimiento a los animales
- 45 hasta 7 días tras la administración de células.

- [0127]** Las FIG. 1C y 1D muestran que las poblaciones de células de médula ósea NCS-01 administradas por vía intraarterial o intravenosa proporcionaron considerables beneficios patológicos y neurológicos, cuando se administran en ratas con MCAO temporal. Además, la NCS-01 evitó la muerte de las células huésped al tratar la neurodegeneración inducida por isquemia con una reducción consiguiente del volumen del infarto y una mejora
- 50 del déficit neurológico.

[0128] Los procedimientos de análisis primarios in vitro y secundarios in vivo se repitieron hasta que el proceso produjo de manera fiable y reproducible una subpoblación óptima de células derivadas de médula ósea (llamadas población NCS-01) que podían tratar la neurodegeneración.

[0129] La población celular NCS-01 optimizada se volvió a analizar en el modelo de OGD in vitro para confirmar la actividad antineurodegenerativa en un cocultivo de neuronas y astrocitos humanos (véase la FIG. 1E) y en el modelo de MCAO en ratas in vivo (FIG. 1F). El experimento representado en la FIG. 1F también muestra la habilidad de la población celular NCS-01 de tratar la neurodegeneración es dependiente de la dosis.

5 *Ejemplo 2: Proceso de fabricación estandarizada para el producto de la población celular NCS-01 que puede tratar la neurodegeneración*

[0130] Se extrae médula ósea sin procesar y entera de un mamífero que no se haya tratado previamente con ningún agente antimetabólico o antimetabolito, como 5-fluorouracilo (5-FU). Como la médula ósea no se procesa mediante fraccionamiento por densidad o por lisis ACK, la población inicial de células de médula ósea entera puede incluir células hematopoyéticas y no hematopoyéticas así como células de médula ósea nucleadas y no nucleadas.

[0131] La médula ósea sin procesar anterior se diluye y se siembra a baja densidad (105-106 células/cm²) en una superficie de plástico para cultivo celular/tisular y se cultivó en presencia de medio que contiene suero (α-MEM (sin rojo de fenol) complementado con 2mM Glutamax (Invitrogen) y suero bovino fetal al 10 % (FBS, HyClone o GIBCO) o α-MEM (Mediatech) con 2mM Glutamax (Invitrogen) y suero bovino fetal al 10 % (FBS, HyClone o GIBCO)). Los cultivos celulares se incuban después a 37 °C, 5 % de CO₂, 80 % de HR (humedad relativa) durante 72 horas.

[0132] Las células se enjuagaron con D-PBS para retirar las células no adherentes y RBC del plástico del cultivo celular seguido de un intercambio de medio completo con α-MEM complementado, que se utiliza para todas las alimentaciones posteriores. Los cultivos celulares (en el pase 0 o p0) se incubaron después a 37 °C, 5 % de CO₂, 80 % de HR.

[0133] Para el pase 1, las células se enjuagan con D-PBS y las células adherentes del plástico se despegan utilizando un reagente de disociación celular. Las células disociadas se recogen mediante centrifugación a 300 g (~1000 rpm) durante 8-10 min. Las células sedimentadas se vuelven a suspender con α-MEM complementado y se sembraron a una densidad de aproximadamente 750 células/cm² sobre una superficie de plástico para cultivo celular/tisular.

[0134] Las células se cultivan prácticamente hasta la confluencia antes de un pase adicional.

[0135] Las células se recogen y se vuelven a sembrar a una densidad de aproximadamente 750 células/cm² sobre una superficie de plástico para cultivo celular/tisular tal como se ha descrito anteriormente para el pase 2.

[0136] Para el pase 3, las células se recogen utilizando un reagente de disociación celular y se centrifugan tal como se ha descrito anteriormente. Las células sedimentadas se vuelven a suspender y se acumulan. Las células se vuelven a suspender en un medio de criopreservación y 1 mL de suspensión celular se alicuota en Cryovials (Nunc). Los viales se congelan utilizando un congelador de velocidad controlada y una vez que el programa de congelación se ha completado, se trasladan en hielo seco para almacenarlas permanentemente en un congelador de nitrógeno líquido en fase de vapor.

[0137] Los viales que contienen células en el pase 3 (p3) constituyen el MCB.

[0138] Se descongela un vial de MCB y las células recuperadas (pase 4 o p4) se siembran en un plástico para cultivo celular/tisular a una densidad de aproximadamente 750 células/cm² en un α-MEM complementado con FBS al 10 % y GlutaMAXTM. Las células se incuban después a 37 °C, 5 % de CO₂, 80 % de HR.

[0139] Para el pase 4, las células se cultivan prácticamente hasta la confluencia antes de hacer pases adicionales. Las células se recogen y se plantan en una nueva superficie de plástico para cultivo celular/tisular tal como se ha descrito anteriormente.

[0140] Para el pase 5, las células se recogen y se congelan, siguiendo los métodos descritos anteriormente para el MCB. Las células que se alicuotan en viales y se criopreservan en el pase 5 (P5) constituyen el WCB.

[0141] Cuando sea necesario, se descongela un vial de WCB y las células recuperadas se siembran en un plástico para cultivo celular/tisular a una densidad de aproximadamente 750 células/cm² en un α-MEM complementado con FBS al 10 % y GlutaMAXTM. Las células se incuban después a 37 °C, 5 % de CO₂, 80 % de HR.

[0142] Para el pase 6, las células se cultivan prácticamente hasta la confluencia antes de hacer pases adicionales. Las células se recogen y se plantan en una nueva superficie de plástico para cultivo celular/tisular tal como se ha descrito anteriormente.

[0143] El medio de cultivo se cambia en medio del pase (del WCB al pase 6 y en el pase 6 y el pase 7).

[0144] Para el pase 7, las células se recogen y se congelan, siguiendo los métodos descritos anteriormente para el MCB.

Ejemplo 3: Tratamiento con células NCS-01 de la neurodegeneración causada por oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) temporal frente a permanente

[0145] El volumen del infarto y la función neurológica de las ratas tratadas con NCS-01 con MCAO permanente se compararon con los de ratas tratadas con NCS-01 con MCAO temporal (60 minutos).

- 5 **[0146]** La MCAO temporal simula el tratamiento de oclusión arterial causada por un accidente cerebrovascular con procedimientos clínicos estándar actuales que restauran el flujo sanguíneo a la penumbra del accidente cerebrovascular. Estos procedimientos incluyen la administración de fármacos trombolíticos, así como procedimientos como angioplastia y/o estent vascular que implican la retirada mecánica de coágulos sanguíneos.

- 10 **[0147]** Los grupos de 3 o 6 ratas se sometieron a una MCAO permanente o temporal (con reperfusión). Luego, se administró solución salina o $7,5 \times 10^6$ células NCS-01 en 1 ml por vía intraarterial 24 horas después de la isquemia y las ratas se monitorizaron durante hasta 28 días. Posteriormente se evaluó la función neurológica utilizando el Test Neurológico de Bederson modificado. El modelo de oclusión temporal simula la situación en que un paciente de accidente cerebrovascular se trató con tPA, o se sometió a una retirada del coágulo.

- 15 **[0148]** Los resultados de la FIG. 2 muestran un considerable beneficio histológico (volumen del infarto; Panel A) y clínico (escala de Bederson modificada; Panel B) con el tratamiento con la población celular NCS-01 en ambos paradigmas de MCAO. El beneficio era de 2 a 3 veces mayor en el modelo de oclusión temporal que en el modelo de oclusión permanente. La evolución temporal de la respuesta neurológica (Panel B) mostró una mejora constante hasta 28 días tras el infarto, promediando el 11 % durante este intervalo para controles sin reperfusión (oclusión permanente) y sin tratar, hasta el 67 % para animales tratados con NCS-01 y con reperfusión (oclusión temporal).

[0149] Inesperadamente, el NCS-01 fue más eficaz al tratar síntomas en el modelo de oclusión temporal, lo que indica que la eficacia máxima puede obtenerse cuando se añade NCS-01 en conjunto con la retirada del coágulo, ya sea tras la administración de un fármaco trombolítico o la retirada del coágulo utilizando un dispositivo mecánico.

25 *EJEMPLO 4: Comparación entre células NCS-01 y otras células derivadas de médula ósea*

1) Aislamiento de una población de células de médula ósea según Li et al.

[0150] Se preparó una población de células de médula ósea tal como se describe en la publicación de Li et al. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism (2000) 20: 131 1-1319 (en adelante llamada la población de médula ósea de Li).

- 30 **[0151]** Se obtuvieron células de médula ósea cultivadas primarias de ratones adultos que habían recibido el fármaco antimetabolito, 5-fluorouracilo (5-FU, 150 mg/kg) por vía intraperitoneal 2 días antes de recogerlas (Randall and Weissman, 1997). Utilizando una aguja de calibre 21 conectada a una jeringa de 1 mL con solución salina fosfatada (PBS, 0,5 mL), se recogió médula ósea completa fresca de manera aséptica de las tibias y los fémures. La médula ósea se disoció de forma mecánica hasta una suspensión homogénea monocelular lechosa.
- 35 Los glóbulos rojos se retiraron de la médula ósea utilizando NH_4Cl al 0,84 % y el número de células nucleadas de la médula se determinó utilizando un citómetro. Se sembraron 2×10^6 células nucleadas en un matraz de cultivo de tejidos en medio de Dulbecco modificado de Iscove complementado con suero bovino fetal (10 %). Tras 3 días de incubación, las células se adhirieron fuertemente al plástico y se volvieron a suspender en medio de Dulbecco modificado de Iscove fresco en nuevos matraces y se cultivaron durante 3 pases más.

40 *Comparación de la población celular de Li con la población celular NCS-01 en el ensayo de OGD in vitro*

[0152] Dos lotes de NCS-01 fabricados a partir de distintos WCB de un mismo MCB y médula ósea se analizaron junto con la población celular de Li en el modelo OGD in vitro tal como se señala en la FIG. 3.

- 45 **[0153]** Tal como se muestra en la FIG. 4, ambos lotes de células NCS-01 generaron el mismo aumento en la secreción de IL-6 y bFGF. Por tanto, las poblaciones celulares NCS-01 producidas por el proceso de fabricación optimizado descrito anteriormente trataron de forma constante la neurodegeneración en el ensayo de OGD in vitro.

[0154] En cambio, la población celular de Li, que se aisló tal como se describió en la publicación de Li (2000), produjo 4-5 veces menos bFGF e IL-6 que la población celular NCS-01 en el ensayo OGD.

2) Comparación de la población celular de Li con la población celular NCS-01 en el ensayo de MCAO in vivo

- 50 **[0155]** La habilidad de las poblaciones celulares de Li y NCS-01 para tratar la neurodegeneración in vivo se analizó in vivo utilizando el modelo de ratas con MCAO. El efecto de las células en la viabilidad de las células huésped, el volumen del infarto y el déficit neurológico se muestran en las FIGS. 5A y 5B. De acuerdo con los estudios descritos anteriormente, la población celular NCS-01 evitó la muerte de las células huésped (véase la

FIG. 5A) al tratar la neurodegeneración provocada por isquemia con una reducción consiguiente en el volumen del infarto y una mejora del déficit neurológico (véase la FIG. 5B).

- 5 **[0156]** Por el contrario, la población celular de Li no mostró ninguna actividad estadísticamente significativa en el volumen del infarto o en la función neurológica. Por consiguiente, estos datos demuestran que la habilidad de la población celular NCS-01 para tratar la neurodegeneración está definida por el proceso de fabricación, y que la población celular NCS-01 es distinta de la población celular descrita en la publicación de Li 2000.

REIVINDICACIONES

1. Método de producción de una subpoblación heterogénea de células de médula ósea para el tratamiento de la neurodegeneración causada por un accidente cerebrovascular isquémico, comprendiendo:
 - a) sembrar una población de células de médula ósea obtenidas a partir de médula ósea humana sin procesar a una baja densidad de 10^5 - 10^6 células/cm² sobre una superficie plástica.
 - b) lavar la población celular sembrada para retirar células no adherentes;
 - c) cultivar las células adherentes de la población lavada de células en un medio que contiene suero;
 - d) pasar en serie las células cultivadas por no más de siete pases en serie en los que, en cada pase, las células cultivadas se siembran a baja densidad de aproximadamente 750 células/cm².
 - e) obtener dicha subpoblación heterogénea de células de médula ósea, donde dicha subpoblación heterogénea de células de médula ósea trata la neurodegeneración causada por un accidente cerebrovascular isquémico.

donde dicha médula ósea sin procesar se obtiene de un sujeto que no se ha tratado previamente con un agente quimioterápico.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho agente quimioterápico es 5-fluorouracilo.
3. Método según la reivindicación 1, en el que dicha población de células de médula ósea no puede aislarse mediante fraccionamiento por densidad o lisis ACK.
4. Método según la reivindicación 3, en el que dicho fraccionamiento por densidad requiere un gradiente de FicollTM o de PercollTM.
5. Método según la reivindicación 1, comprendiendo además analizar dicha subpoblación heterogénea de células de médula ósea en un modelo experimental de neurodegeneración causada por isquemia, donde solo se seleccionan aquellas poblaciones que demuestran la habilidad para tratar la neurodegeneración causada por un accidente cerebrovascular isquémico y en el que los análisis no son en un ser humano.
6. Método según la reivindicación 5, en el que dicho modelo experimental de neurodegeneración causada por isquemia es un modelo de cultivo celular de privación de oxígeno/glucosa (OGD).
7. Método según la reivindicación 5, en el que el modelo experimental de neurodegeneración causado por isquemia es un modelo animal de accidente cerebrovascular.
8. Método de optimización de un protocolo experimental para el aislamiento de una subpoblación celular heterogénea que trata la neurodegeneración causada por un accidente cerebrovascular isquémico, comprendiendo los pasos de:
 - aislar la subpoblación celular conforme a un protocolo experimental, que es un método tal como se define en la reivindicación 1,
 - donde la subpoblación celular trata la neurodegeneración causada por un accidente cerebrovascular isquémico, y
 - donde los parámetros óptimos de cada paso del protocolo se determinan al analizar el efecto que cada parámetro tiene en la eficacia de la subpoblación celular aislada para tratar la neurodegeneración causada por un accidente cerebrovascular isquémico en un modelo experimental animal de la neurodegeneración causada por isquemia,
 - con la condición de que los análisis no sean en un ser humano.
9. Método según la reivindicación 8, en el que dichos parámetros incluyen la densidad celular en la siembra, el número de pase celular, la composición del medio de cultivo o el fraccionamiento celular.
10. Método según la reivindicación 8, en el que el modelo experimental de neurodegeneración causada por isquemia es un modelo de cultivo celular de privación de oxígeno/glucosa (OGD).
11. Método según la reivindicación 8, en el que el modelo experimental de neurodegeneración causado por isquemia es un modelo animal de accidente cerebrovascular.
12. Método según la reivindicación 11, en el que el modelo animal de accidente cerebrovascular de la neurodegeneración causada por isquemia es un modelo animal con oclusión de la arteria cerebral media (MCAO).

FIG. 1A

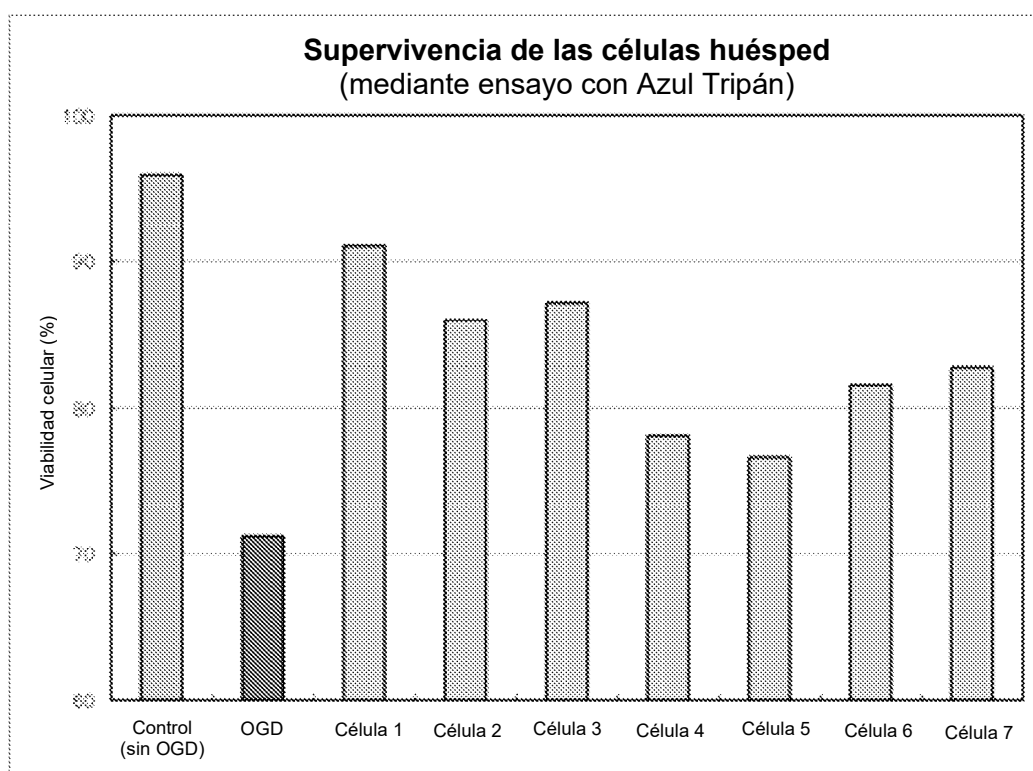


FIG 1B

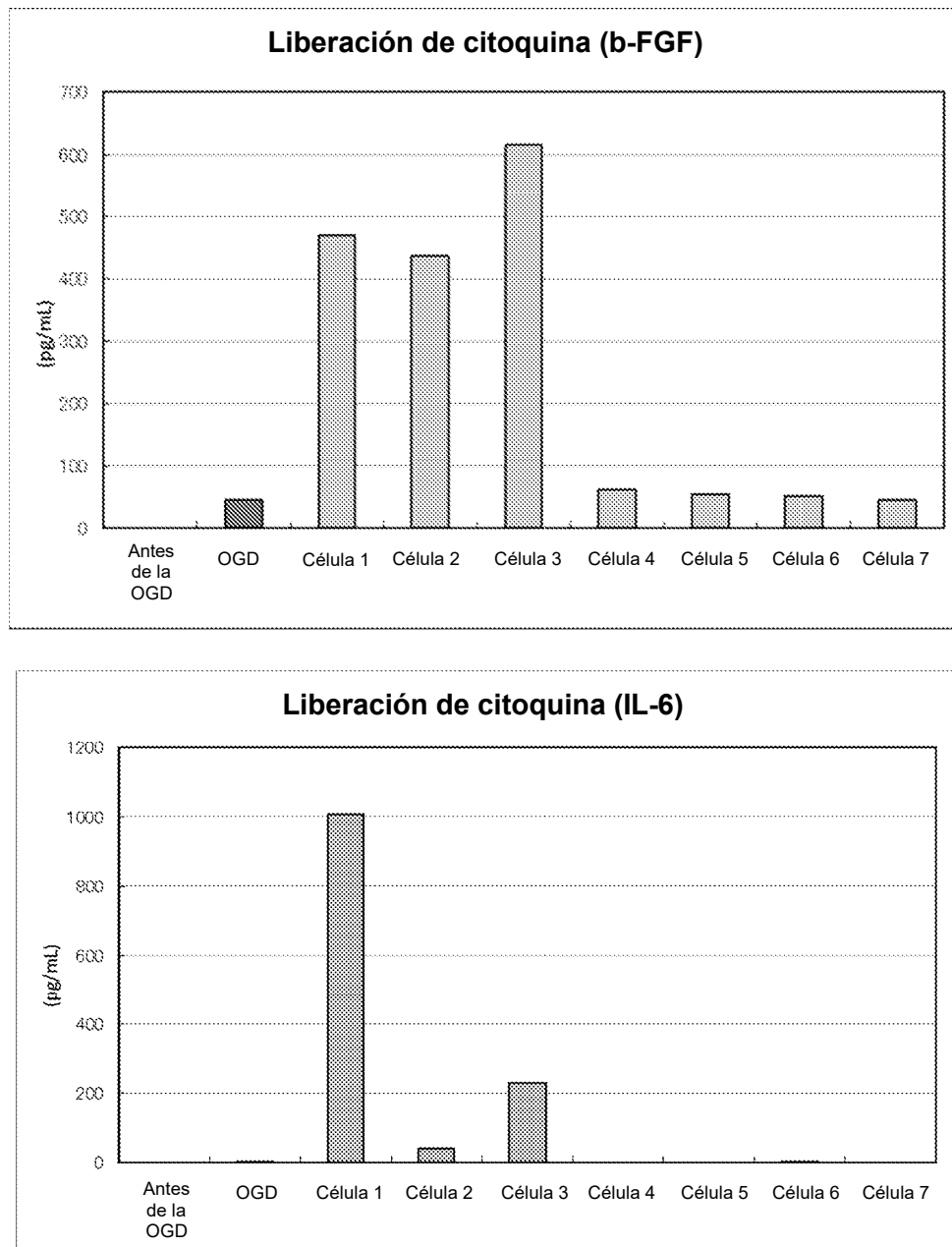


FIG. 1C

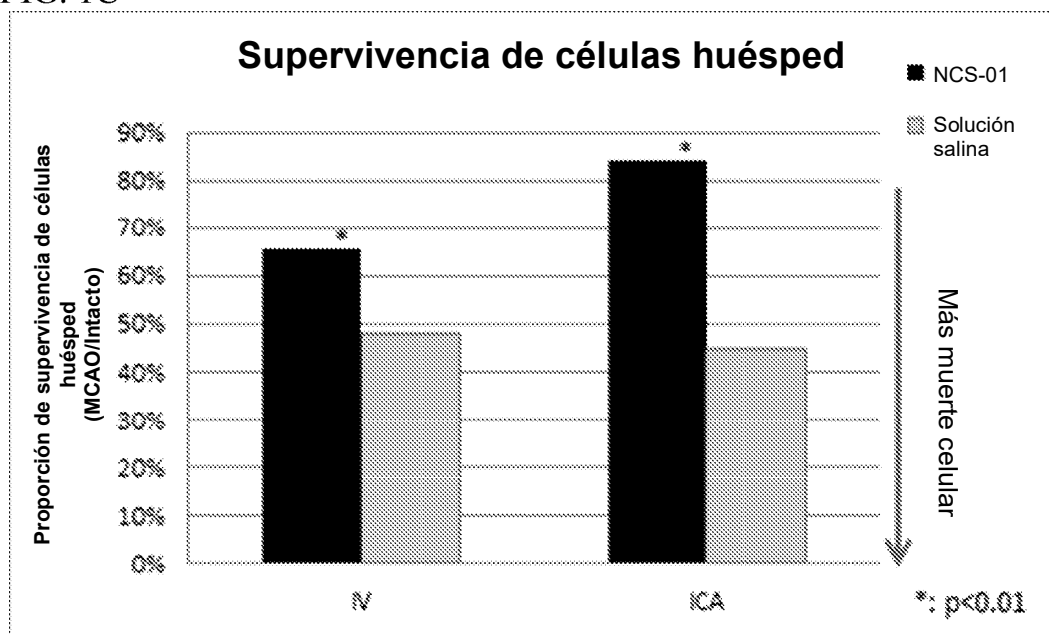


FIG. 1D

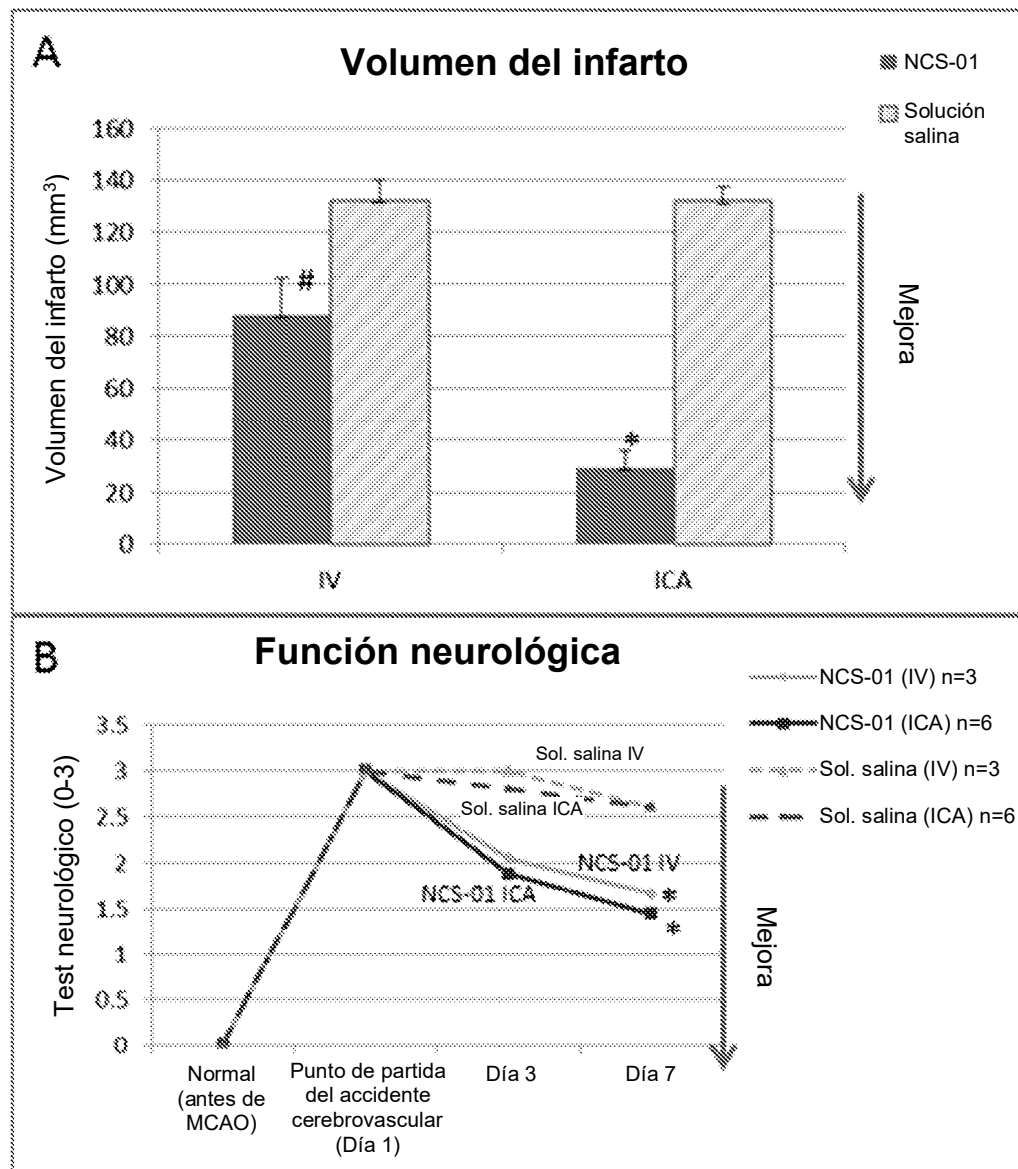


FIG. 1E

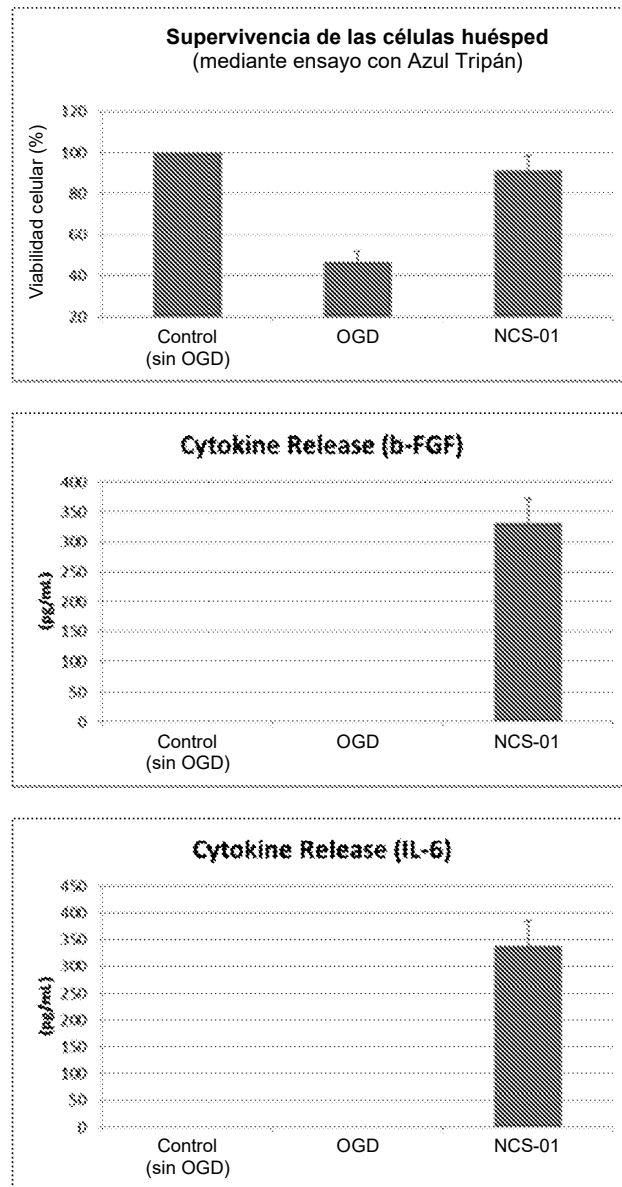


FIG. 1F

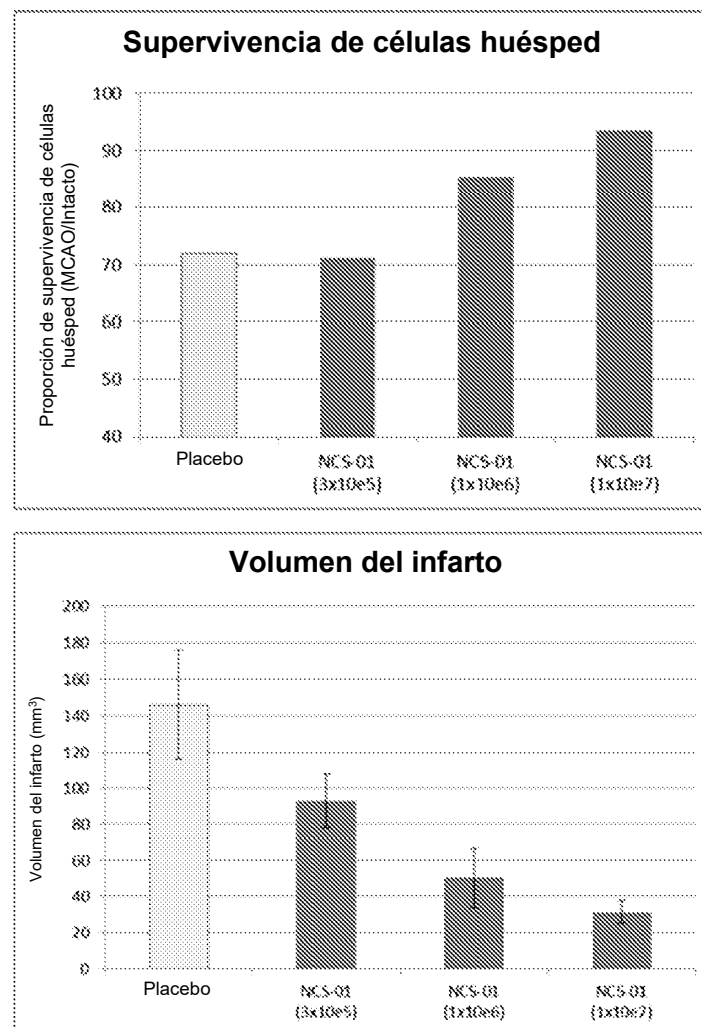


FIG. 2

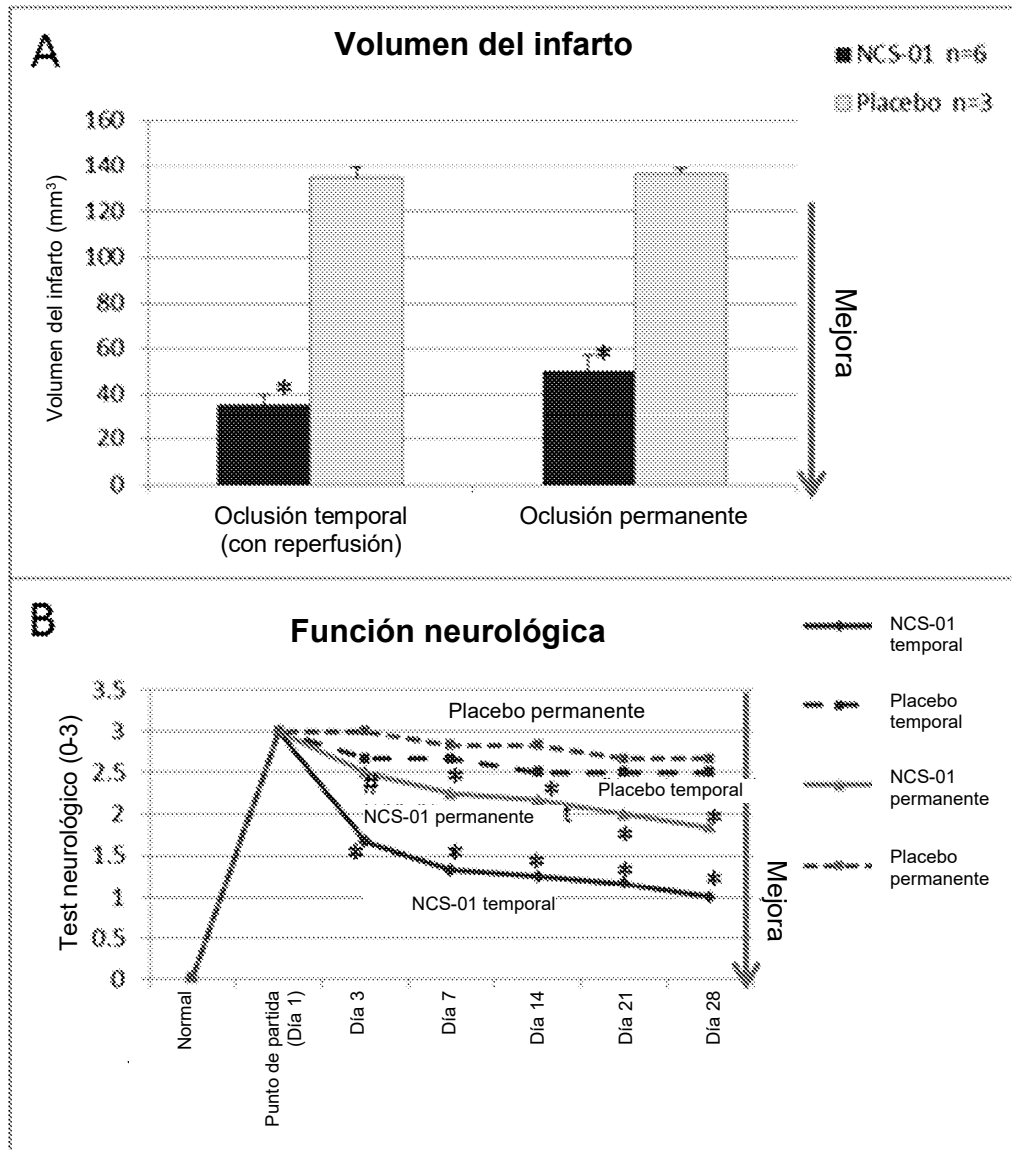


FIG. 4

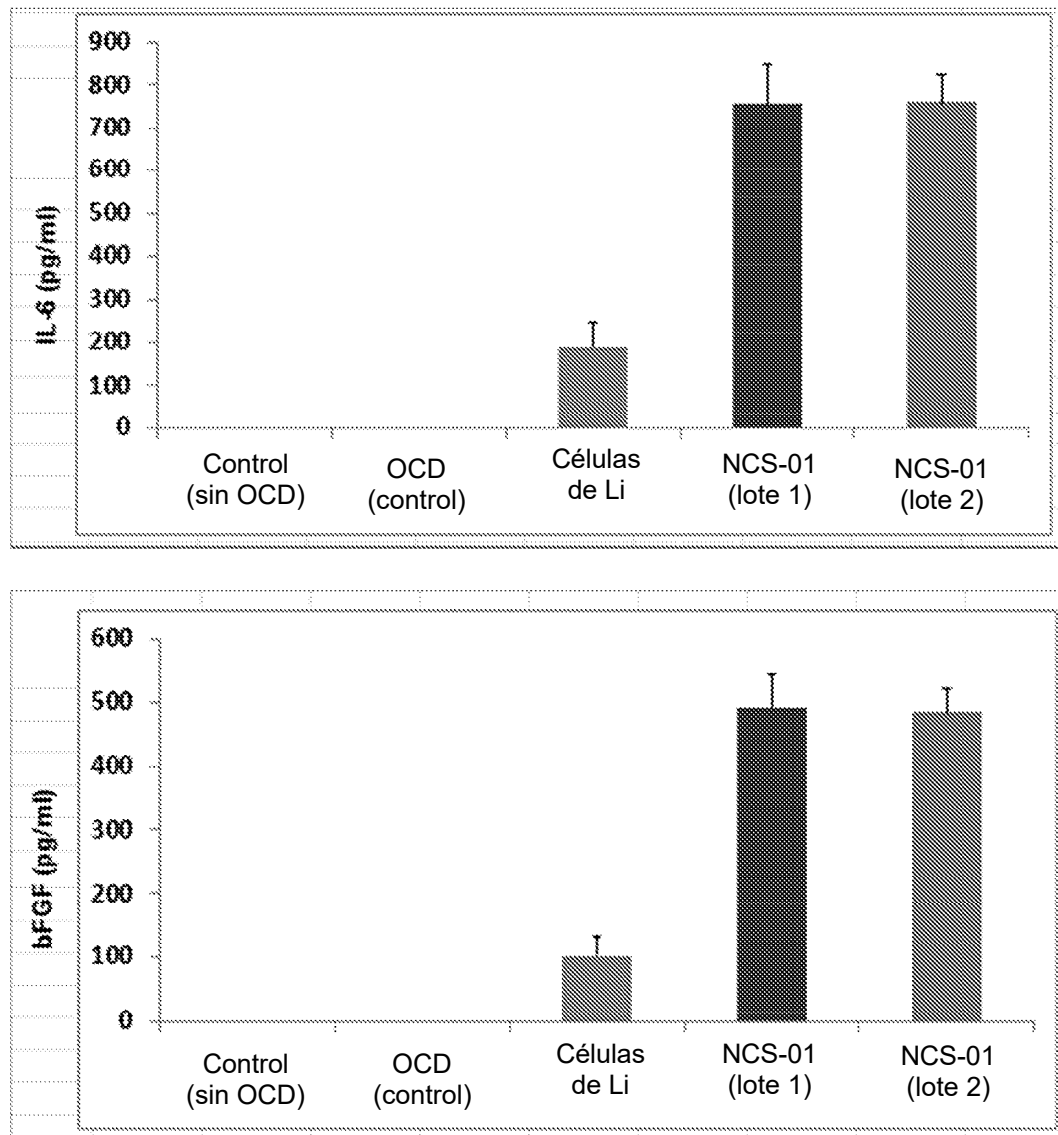


FIG. 5A

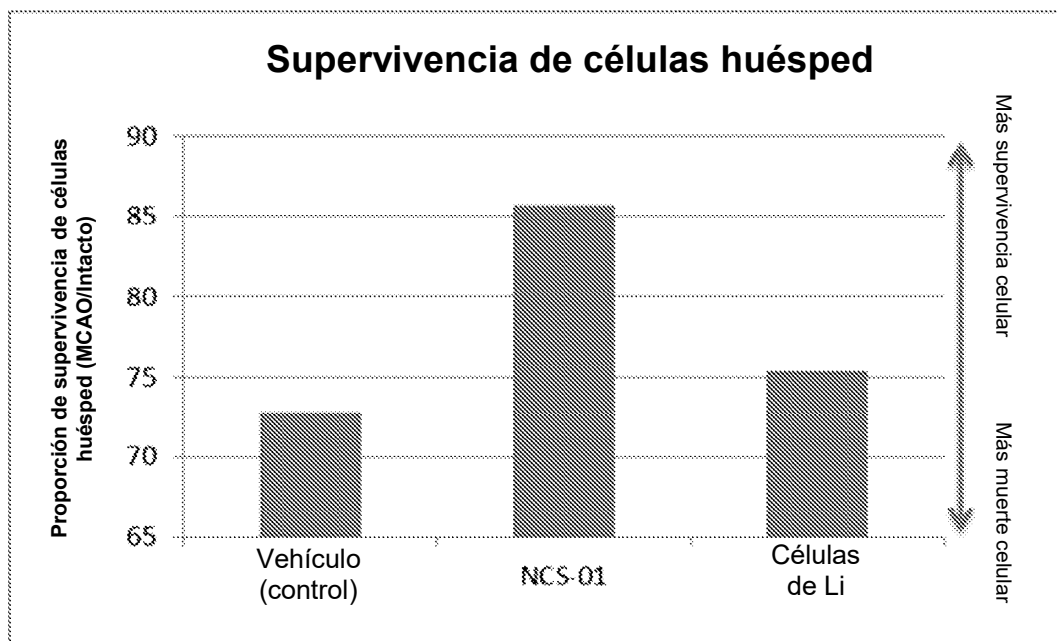


FIG. 5B

