



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 180 433**

② Número de solicitud: 200101223

⑤ Int. Cl.7: **A61K 35/14**

A61K 35/28

C12N 5/06

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **28.05.2001**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2003**

Fecha de la concesión: **05.04.2004**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **16.05.2004**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.05.2004

⑰ Titular/es: **Universidad Miguel Hernández de Elche.
Edificio Helike. Avda. del Ferrocarril, s/n
03202 Elche, Alicante, ES**

⑱ Inventor/es: **Alarcón Martínez, Pedro;
Bonilla Jiménez, Sonia;
Silva González, Augusto Gerardo y
Martínez Pérez, Salvador**

⑲ Agente: **Carpintero López Francisco**

⑳ Título: **Empleo de células madre hematopoyéticas en la generación de células madre neurales.**

㉑ Resumen:

Empleo de células madre hematopoyéticas en la generación de células madre neurales.

La producción de células madre neurales comprende cultivar células madre hematopoyéticas bajo condiciones que promueven el crecimiento y la diferenciación de dichas células madre hematopoyéticas en células madre neurales, las cuales pueden utilizarse para regenerar poblaciones de células perdidas en el sistema nervioso. La invención también se refiere al empleo de células madre hematopoyéticas en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o de situaciones patológicas en las que existen células neuronales degeneradas, tanto en procesos localizados como multifocales.

ES 2 180 433 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Empleo de células madre hematopoyéticas en la generación de células madre neurales.

Campo de la invención

La invención se refiere a la generación de células madre neurales, tanto *in vitro* como *in vivo*, a partir de células madre hematopoyéticas. Las células madre neurales pueden usarse para regenerar poblaciones de células perdidas en el sistema nervioso.

Antecedentes de la invención

Las células madre son células pluripotentes que se autorenuevan y que proliferan en la vida adulta mediante divisiones asimétricas características en las que una célula hija se ve forzada a diferenciarse y el resto permanece como células madre. Existen diversos tipos de células madre dependiendo del órgano en el que estén localizadas y de su diferenciación potencial.

Las células madre de adulto pueden ser transformadas en tipos heterogénicos de células mediante influencias ectópicas, induciendo la generación de un destino diferente bajo nuevas señales ambientales. En este sentido, se ha descrito que células de médula ósea de ratón pueden ser incorporadas en el sistema nervioso central (SNC) y diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, y que células de médula ósea humana pueden desarrollar un fenotipo neuronal *in vitro*. También se conoce la generación de células madre hematopoyéticas y la restauración de progenitores sanguíneos, a partir de células madre neurales.

Las enfermedades neurodegenerativas afectan a poblaciones de células neurales y, en general, el daño principal ocurre en un fenotipo estructural o neuroquímico específico. En la enfermedad de Parkinson, por ejemplo, el tipo celular perdido mayoritariamente son neuronas dopaminérgicas del cerebro medio. La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune inflamatoria del SNC caracterizada por la existencia de placas desmielinizadas diseminadas que evolucionan progresivamente hacia lesiones crónicas. En el caso de la EM existen evidencias de que en los estadios iniciales de la enfermedad, los progenitores de oligodendrocitos se activan para reactivar el proceso de remielinización. Cuando este intento regenerativo no tiene éxito, la placa desmielinizada se convierte en una lesión crónica.

El reemplazamiento funcional de poblaciones neuronales específicas mediante trasplante de tejido neural representa una estrategia terapéutica atractiva, para tratar enfermedades neurodegenerativas.

Sin embargo, actualmente, las células madre neurales se obtienen a partir de tejido cerebral, mediante biopsia de tejido o necropsia, lo que plantea problemas éticos y de compatibilidad inmunológica. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de proporcionar una fuente de células madre neurales que supere los inconvenientes mencionados.

Compendio de la invención

La presente invención se enfrenta con el problema de proporcionar una fuente de células madre neurales.

La solución proporcionada por esta invención

se basa en que los inventores han observado que, a partir de células madre hematopoyéticas se pueden generar células madre neurales tanto *in vitro* como *in vivo* (Ejemplos 2 y 3). Las células madre hematopoyéticas, tras su administración a un animal mamífero postnatal, pueden producir células madre neurales que pueden diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Ejemplo 4). Por tanto, las células madre hematopoyéticas pueden ser utilizadas para producir células madre neurales que, a su vez, son útiles para tratar enfermedades neurodegenerativas.

Por tanto, un objeto de esta invención lo constituye el empleo de células madre hematopoyéticas para generar células madre neurales.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye un procedimiento para la producción de células madre neurales a partir de células madre hematopoyéticas.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye una composición farmacéutica que comprende células madre hematopoyéticas.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de células madre hematopoyéticas en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere, en general, al empleo de células hematopoyéticas para generar *in vitro* o *in vivo* células madre neurales.

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la producción de células madre neurales que comprende cultivar células madre hematopoyéticas bajo condiciones que promueven el crecimiento y la diferenciación de dichas células madre hematopoyéticas en células madre neurales.

Las células madre hematopoyéticas pueden obtenerse fácilmente a partir de médula ósea o sangre periférica de un mamífero adulto (animal o humano que ha realizado todos los procesos normales de desarrollo) o a partir del cordón umbilical (de mamíferos incluido el hombre), mediante métodos convencionales. La selección de las células madre hematopoyéticas a partir de las extracciones sanguíneas o aspirado medular se realiza por métodos convencionales, por ejemplo, por citometría de flujo utilizando los marcadores apropiados para cada tipo celular. En el Ejemplo 1 se describe la obtención, separación y selección de células madre hematopoyéticas a partir de médula ósea y sangre periférica de un mamífero adulto y a partir de cordón umbilical humano.

Las células madre hematopoyéticas pueden ser cultivadas tanto *in vitro* como *in vivo* para obtener células madre neurales.

Para el cultivo *in vitro* de células madre hematopoyéticas se siembran dichas células en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, DMEM (Sigma) o RPMI 1640 (Gibco), y se incuban bajo condiciones que permiten el crecimiento celular. Al cabo de unos pocos días, normalmente a los 5-6 días, se observan células que manifiestan marcadores específicos de células madre neurales (nestina, marcadores de glía radial y proteína fibrilar ácida de la glía [GFAP]). Estos resultados ponen

de manifiesto la transdiferenciación *in vitro* de células madre hematopoyéticas a células madre neurales. En el Ejemplo 2 se describe una realización particular del cultivo *in vitro* de células madre hematopoyéticas para obtener células madre neurales.

Para el cultivo *in vivo* de células madre hematopoyéticas se administra a un animal mamífero postnatal una composición fisiológicamente aceptable que comprende células madre hematopoyéticas. La administración de dichas células madre hematopoyéticas se puede realizar por cualquier método adecuado. En una realización particular la administración de dichas células al animal se realiza bien mediante inyección intracerebral o bien mediante inyección intraperitoneal (intravenosa o intraperitoneal). Al cabo de 4-6 días post-inyección se observa en el mamífero receptor la presencia de células que manifiestan marcadores específicos de células madre neurales (nestina, marcadores de glía radial y GFAP), lo que pone de manifiesto la transdiferenciación *in vivo* desde células madre hematopoyéticas a células madre neurales. En el Ejemplo 3 se describe una forma particular de cultivar *in vitro* células madre hematopoyéticas para obtener células madre neurales.

Como es conocido, las células madre neurales pueden ser aisladas, expandidas y utilizadas como fuente para trasplantes cerebrales y, por tanto, pueden ser utilizadas para tratar enfermedades neurodegenerativas. A la vista de los resultados obtenidos, en particular, de la generación *in vivo* de células madre neurales a partir de células madre hematopoyéticas, se ensayó la posibilidad de utilizar células madre hematopoyéticas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, obteniéndose unos resultados satisfactorios y esperanzadores.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre hematopoyéticas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica puede prepararse en cualquier forma farmacéutica de administración apropiada. En una realización particular, dicha composición farmacéutica se presenta en forma de un inyectable destinado a su administración por vía intracerebral, por ejemplo, intraparenquimatosa o intraventricular, o intraperitoneal, por ejemplo, intravenosa o intraperitoneal. Una revisión general de las distintas formas farmacéuticas de administración de productos con actividad terapéutica puede encontrarse, por ejemplo, en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, (1993).

La presente invención también se refiere al empleo de células madre hematopoyéticas en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o de situaciones patológicas en las que existen células neuronales degeneradas, tras pérdidas quirúrgicas o traumáticas, tanto en procesos localizados como multifocales.

La expresión "enfermedades neurodegenerativas", tal como se utiliza en esta descripción, incluye todo tipo de patologías, alteraciones o si-

tuaciones en donde se produce la pérdida degenerativa de células neurales.

La actividad terapéutica de las células madre hematopoyéticas en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas deriva de su capacidad de diferenciarse *in vivo* en células madre neurales, las cuales, a su vez, pueden migrar hacia la región que padece la lesión neurodegenerativa, invadir la región lesionada y generar la población específica de células neuronales apropiadas.

Para alcanzar los resultados proporcionados por esta invención, los inventores han realizado numerosos estudios sobre el efecto de la administración de composiciones fisiológicamente aceptables que contenían células madre hematopoyéticas en cerebros de animales normales y lesionados. En una realización particular, la administración de dichas composiciones se realiza mediante inyección intracerebral, por ejemplo, intraparenquimatosa o intraventricular, o bien mediante inyección intraperitoneal, por ejemplo, intravenosa o intraperitoneal. En el Ejemplo 4 se describen unos experimentos *in vivo* que ponen de manifiesto la eficacia de la administración de células madre hematopoyéticas tanto por vía intracerebral como por vía intraperitoneal, en la regeneración de poblaciones neuronales perdidas, y, consecuentemente, su potencial utilidad en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas que cursen con la pérdida de poblaciones neuronales.

Por tanto, se pueden emplear células madre hematopoyéticas para generar células madre neurales, que a su vez pueden ser utilizadas para regenerar células neurales degeneradas o pérdidas neuronales, tras intervenciones quirúrgicas o traumáticas, tanto en procesos localizados como multifocales. A modo ilustrativo, no limitativo, dichas células madre hematopoyéticas se pueden utilizar tanto en terapia celular de enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, esclerosis múltiple (regeneración de oligodendrocitos), esclerosis lateral amiotrófica (regeneración de neuronas motoras de la médula), enfermedad de Parkinson regeneración de neuronas dopaminérgicas), enfermedad de Alzheimer (regeneración de neuronas colinérgicas y neuronas del hipocampo), ataxias olivocerebelosas degenerativas (regeneración de neuronas olivares y células de Purkinje), encefalitis espongiforme humana o Enfermedad de Creutzfeld-Jacob, etc., como en terapia sustitutiva y/o regenerativa en procesos postquirúrgicos y post-traumáticos. Por otra parte, dado que actualmente se está cada vez más cerca de determinar la base biológica de las psicosis funcionales (esquizofrenia, enfermedad bipolar y síndromes obsesivos), la terapia celular podría servir para restablecer circuitos no establecidos o restaurar conexiones aberrantes.

Las células madre hematopoyéticas pueden administrarse en cualquier forma de administración farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, dichas células madre hematopoyéticas se formulan en forma de inyectables destinados a su administración por vía intracerebral, por ejemplo, intraparenquimatosa o intraventricular, o intraperitoneal, por ejemplo, intravenosa o intraperitoneal.

La cantidad y forma de administrar las células madre hematopoyéticas a un paciente que padece una enfermedad neurodegenerativa en necesidad de tratamiento deberá ser fijada por el facultativo quien fijará la pauta y forma de proceder a la vista de, entre otros factores, la gravedad de la enfermedad y el estado general del paciente. Del mismo modo se procederá para procesos de regeneración postraumática, postquirúrgica o psicosis funcional.

El empleo de células madre hematopoyéticas como fuente celular para generar tanto *in vitro* como *in vivo* células madre neurales presenta numerosas ventajas ya que, por una parte, son las células progenitoras que se pueden obtener más fácilmente, por ejemplo, a partir de sangre periférica de animales adultos o de cordón umbilical, sin tener que recurrir a la realización de biopsias ni necropsias para, obtener células madre neurales, lo que permite superar, además de molestias para el paciente, evidentes problemas éticos; y, por otra parte, la posibilidad de transformar células madre hematopoyéticas en células madre neurales permite tener una fuente permanente de células madre neurales del propio individuo o de donantes compatibles evitándose problemas de compatibilidad inmunogenica.

La posibilidad de obtener células madre neurales a partir de células madre hematopoyéticas permitirá disponer de una fuente de células madre neurales que podrán ser utilizadas para restaurar células neuronales en procesos neurodegenerativos. Adicionalmente, las enseñanzas proporcionadas por esta invención llevan consigo diversos efectos, por ejemplo, al poder obtenerse fácilmente células madre neurales en cantidades elevadas se podrán avanzar de forma significativa los estudios sobre la biología del proceso de transdiferenciación entre células madre de hematopoyéticas a neurales; y, además, se amplían las posibilidades reales de uso terapéutico de las células madre (hematopoyéticas o neurales) gracias a la posibilidad de obtener células del propio paciente (homotransplante) o de un donante de médula ósea compatible (alotransplante).

Por otra parte, puesto que muchas formas de procesos neurodegenerativos presentan multifocalidad, la única forma de actuar con terapia celular de forma global sobre todas las lesiones es la administración, por ejemplo, sistémica de los elementos terapéuticos. La administración sistémica (intravenosa o intraperitoneal) permite el acceso de las células madre neurales a todos los lugares donde se localiza la lesión. Esto es de fundamental interés en procesos multifocales tales como la EM, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), etc.

La posibilidad de manipular las células madre antes de ser utilizadas en terapia celular, permitirá inducir, generar y/o modificar los parámetros biológicos que pudieran influir en su capacidad terapéutica, tales como mayor resistencia al proceso lesivo (inmunológico, genético o metabólico), mayor capacidad proliferativa, toxicidad dirigida, etc.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Obtención y selección de células madre hematopoyéticas

1.1 *A partir de médula ósea de un mamífero adulto* (cualquier especie de mamífero que ha superado el periodo neonatal de desarrollo postnatal, incluido el hombre).

El tejido medular se aspira y recoge en DMEM (Dubelcco's modified Eagle medium, Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), a 41C. Se disocia mecánicamente pipeteando repetidamente en condiciones de esterilidad, con cuidado, se centrifuga a 1.200 rpm durante 6 minutos y resuspende en cloruro amónico 0,144 M disuelto en tampón Tris 17 mM, pH 7,2, durante 5 minutos. A continuación, se lava con DMEM-SFB y se resuspende en el mismo medio en volumen definido para contaje y selección por citometría.

A partir de la suspensión celular obtenida que contiene las células madre hematopoyéticas se procede a la separación y selección de dichas células madre hematopoyéticas mediante citometría de flujo utilizando los marcadores apropiados dependiendo del origen de las células madre hematopoyéticas a separar, por ejemplo, mediante el empleo de los siguientes marcadores:

a) para células de ratón: marcadores CD117 (BD Pharmingen) y Sca-1 (BD Pharmingen) para citometría o, alternativamente, selección por tamaño una vez calibrado el citómetro para la población CD117 y Sca-1 positiva; y

b) para células humanas: marcadores CD34 (BD Pharmingen).

1.2 *A partir de sangre periférico de un mamífero adulto* (cualquier especie de mamífero que ha superado el periodo neonatal de desarrollo postnatal, incluido el hombre).

Células madre hematopoyéticas de mamífero adulto pueden obtenerse a partir de sangre periférica tras movilización de los precursores medulares con factor estimulador de los granulocitos (G-CSF). La sangre periférica se extrae y las células madre hematopoyéticas se seleccionan directamente, por ejemplo, mediante el empleo de marcadores fluorescentes específicos. Los medios celulares y el protocolo a seguir para la obtención, separación y selección de células madre hematopoyéticas son los mismos que los descritos en el Ejemplo 1.1.

1.3 *A partir de cordón umbilical humano*

Células madre hematopoyéticas pueden obtenerse a partir de cordón umbilical. Para ello, se realiza un sangrado del cordón umbilical y se seleccionan los progenitores, por ejemplo, mediante citometría utilizando marcadores apropiados. Los medios celulares y el protocolo a seguir para la obtención, separación y selección de células madre hematopoyéticas son los mismos que los descritos en el Ejemplo 1.1.

Ejemplo 2

Cultivo in vitro de células madre hematopoyéticas

Se siembran en placas de 96 pocillos unas 200.000 células por pocillo de células madre hematopoyéticas de mamífero procedentes de una suspensión celular en DMEM-SFB enriquecida en dichas células, obtenida mediante el procedi-

miento descrito en el Ejemplo 1 (en cualquiera de sus alternativas). Al cabo de 5 ó 6 días en cultivo (a 37°C, con un 10% de CO₂) en condiciones que permiten el crecimiento celular se observan células con características, determinadas por la manifestación de marcadores específicos, de células madre neurales, tales como:

nestina: determinado por reacción con un anticuerpo monoclonal anti-nestina (Chemicon);

marcadores de glía radial: determinados con el anticuerpo 40E-C (Hybromada Banck), y

GFAP: determinado con anticuerpos policlonales (Chemicon).

Estos resultados ponen de manifiesto la transdiferenciación *in vitro* de células madre hematopoyéticas a células madre neurales.

Ejemplo 3

Cultivo in vivo de células madre hematopoyéticas

Para el cultivo *in vivo* de células madre hematopoyéticas se administra a un ratón neonatal una composición fisiológicamente aceptable que contiene células madre hematopoyéticas de mamífero, tal como una suspensión celular en DMEM-SFB enriquecida en células madre hematopoyéticas obtenida mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 (en cualquiera de sus alternativas). La administración de dichas células madre hematopoyéticas en el animal se realiza bien mediante inyección intracerebral (inyección estereotáxica de 200.000-300.000 células disueltas en 1 microlitro de medio RPMI 1640 (Gibco) o DMEM (Sigma) enriquecidos con 10% de SFB, en parénquima cerebral o ventrículo lateral) o bien 2.000.000 -3.000.000 células en 100 microlitros de medio (RPMI 1640) mediante inyección intraparenteral (intravenosa o intraperitoneal). A los 4-6 días de la inyección de células madre hematopoyéticas se observa en el animal receptor la presencia de células que manifiestan marcadores específicos de células madre neurales: nestina, marcadores de glía radial y GFAP (determinados como se indica en el Ejemplo 2), lo que pone de manifiesto la transdiferenciación *in vivo* desde células madre hematopoyéticas a células madre neurales.

Ejemplo 4

Experimentos in vivo

4.1 Inyecciones en cerebros de animales normales neonatales

Una suspensión celular de 300.000 células en 1 µl de células madre hematopoyéticas obtenidas según el Ejemplo 1 [1.1] a partir de médula ósea, en un vehículo fisiológicamente aceptable, se inyecta en el cerebro de ratones neonatales (P0) mediante inyección intraparenquimatosa o intraventricular. Al cabo de 4-6 días post-inyección, se observan células del donante en la región ventricular y subventricular del cerebro del huésped. Estas células presentan características moleculares de células madre neurales: nestina, vimentina y GFAP positivas.

A partir del cerebro del animal inyectado (cerebro transplantado), a los 6 días post-inyección, se puede obtener una suspensión celular de dicho cerebro transplantado y cultivar dichas células en condiciones apropiadas para seleccionar células

madre neurales [DMEM, 10% de SFB, 20 ng/ml de Bfgf (Fibroblast growth factor básico), 20 ng/ml de EGF (Epidermal growth factor) y 1.000 U/ml de LIF (factor inhibidor de leucemia)]. Al cabo de 5-6 días se observa la formación de neuroesferas y se puede constatar la existencia de abundantes células procedentes del donante. Además, si se inyectan estas células en las mismas condiciones, en cerebro de mamíferos neonatos (ratones P0) o en cerebro lesionado de ratones adultos (véase el Ejemplo 4.2), se consigue activar su proliferación y la producción de células madre neurales con tipologías y características similares a las obtenidas tras la inyección de células madre hematopoyéticas. Estos resultados ponen de manifiesto que las células madre hematopoyéticas de mamífero adulto pueden convertirse en células madre neurales, que, además de presentar características moleculares específicas de este tipo celular, se comportan biológicamente como tales, generando células neurales *in vivo*.

Experimentos control, con concentrado celular pero sin células madre hematopoyéticas, es decir, CD117 y Sca-1 negativas, no han mostrado ningún tipo de células neurales procedentes del donante.

4.2 Inyecciones en cerebros lesionados de animales adultos

Para realizar este ensayo se provocan lesiones desmielinizantes en ratones localizadas en el hemisferio cerebral mediante la inyección estereotáxica de lisolecitina. Para ello, mediante un trépano estereotáxico se inocula, lentamente y con una jeringuilla Hamilton, 1 µl de lisolecitina (Sigma) en el parénquima cerebral del telencéfalo. Se intenta localizar la región lateral de la sustancia blanca hemisférica de un lado del cerebro. El estudio anatomo-patológico muestra que en una semana se ha producido una importante desmielinización con abundante proliferación astrogliar en la región de la inoculación.

Tras localizar la lesión se inyecta una composición que comprende una suspensión de células madre hematopoyéticas en un vehículo fisiológicamente aceptable, en el hemisferio cerebral contralateral, obtenidas de médula ósea siguiendo el protocolo del Ejemplo 1 [1.1].

En animales control (animales que tenían la lesión pero que no recibieron tratamiento con células madre hematopoyéticas) se observa en la región lesionada, una semana después de localizar la lesión, una reacción astrogliar acompañada de pérdida de marcadores de oligodendroglia (PLP), así como la presencia en su periferia de células con marcadores de progenitores de oligodendrocitos (O4).

Por el contrario, en los animales lesionados y transplantados (tratados con células madre hematopoyéticas) se observan abundantes progenitores de oligodendrocitos (O4+) procedentes del donante que se acumulan periféricamente e invaden la región desmielinizada.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las células madre hematopoyéticas inyectadas en cerebros de mamíferos adultos con lesiones desmielinizantes pueden migrar atraídos por

la región lesionada, invadir la lesión y generar células de la línea oligodendroglial.

4.3 *Inyección intraparenteral de células madre hematopoyéticas*

En animales neonatales (ratones P0) y adultos lesionados (ratones adultos con lesiones desmielinizantes con lisolecitina) se inyecta una composición que comprende una suspensión de células madre hematopoyéticas en un vehículo fisiológicamente aceptable (2.000.000 de células en 100 microlitos de solución RPMI 1640) por vía intravenosa o intraperitoneal (células de médula ósea según el Ejemplo 1 [1.1]). Al cabo de una o dos semanas tras detectar la lesión y de haber inyectado las células madre hematopoyéticas, se observa, en la región lesionada, la presencia de

células del donante que muestran características neurales (astrocitos, oligodendrocitos y neuronas). Estos resultados ponen de manifiesto, que células madre hematopoyéticas inyectadas intraparenteralmente (por vía intravenosa o intraperitoneal) pueden llegar a las lesiones cerebrales, invadir el área lesionada y generar células neurales, restaurando las células perdidas.

En el caso de lesiones desmielinizantes, se generan progenitores de oligodendrocitos. Según resultados previos de los propios inventores, cabe pensar, aunque no se desea estar vinculado por ninguna teoría, que esta regeneración de poblaciones perdidas se realiza mediante una transdiferenciación previa a células madre neurales.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de células madre neurales que comprende cultivar células madre hematopoyéticas bajo condiciones que promueven el crecimiento y la diferenciación de dichas células madre hematopoyéticas en células madre neurales.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células madre hematopoyéticas se obtienen a partir de médula ósea o sangre periférica de un mamífero adulto o a partir del cordón umbilical humano.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células madre hematopoyéticas se cultivan *in vitro* para obtener células madre neurales.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, que comprende sembrar dichas células madre hematopoyéticas en un medio de cultivo, incubarlas bajo condiciones que permiten el crecimiento celular y ensayar los cultivos para detectar la presencia de células que manifiestan marcadores específicos de células madre neurales.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células madre hematopoyéticas se cultivan *in vivo* para obtener células madre neurales.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, que comprende administrar a un animal una composición fisiológicamente aceptable que comprende células madre hematopoyéticas y ensayar

la presencia de células que manifiestan marcadores específicos de células madre neurales en el animal receptor.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la administración al animal de dichas células madre hematopoyéticas se realiza mediante inyección intracerebral o intraparenteral.

8. Una composición farmacéutica que comprende células madre hematopoyéticas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

9. Empleo de células madre hematopoyéticas en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o de situaciones patológicas en las que existen células neuronales degeneradas, tanto en procesos localizados como multifocales.

10. Empleo según la reivindicación 9, en el que dicha composición fisiológicamente aceptable se administra mediante inyección intracerebral o intraparenteral.

11. Empleo según la reivindicación 9, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ataxias olivo-cerebelosas degenerativas y encefalitis espongiiforme humana o Enfermedad de Creutzfeld-Jacob.

12. Empleo de células madre hematopoyéticas en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de regeneración neural tras traumatismo craneoencefálico o regeneración neural postquirúrgica.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 180 433

② Nº de solicitud: 200101223

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.05.2001

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: A61K 35/14, 35/28, C12N 5/06

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9956759 A1 (UNIVERSITY OF SOUTH FLORIDA) 11.11.1999	1-12
X	WO 0069448 A1 (HENRY FORD HEALTH SYSTEM) 23.11.2000	1-12
X	WO 0121766 A3 (CELL SCIENCE THERAPEUTICS) 29.03.2001	1-12
X	REYES MORAYMA et al. Turning marrow into brain: Generation of glial and neuronal cells from adult bone marrow. (1999) Blood, Vol. 94, 10, Suppl. 1 Part 1, página 377a.	1-12
X	WOODBURY, DALE et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. (2000) Journal of Neuroscience Research, 61 (4), páginas 364-370.	1-12
A	MEZEY EVA et al. Bone marrow: A possible alternative source of cells in the adult nervous system. (2000) European Journal of Pharmacology, Vol. 405, páginas 297-302.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

10.11.2002

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/1