

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 815 537**

51 Int. Cl.:

A61K 35/30 (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2016** **PCT/KR2016/006848**
87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2016** **WO16209057**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2016** **E 16814770 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020** **EP 3315133**

54 Título: **Composición para el tratamiento de enfermedades isquémicas o trastornos inflamatorios neurogénicos, que contienen el secretoma de células progenitoras neurales como ingrediente activo**

30 Prioridad:

26.06.2015 KR 20150091378

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.03.2021

73 Titular/es:

S-BIOMEDICS (100.0%)
(Uil Venture Bldg., Seongsu-dong 2-ga)4, 28,
Seongsui-ro 26-gil, Seongdong-gu
Seoul 04797, KR

72 Inventor/es:

KIM, DONG WOOK y
KIM, HAN SOO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 815 537 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

Composición para el tratamiento de enfermedades isquémicas o trastornos inflamatorios neurogénicos, que contienen el secretoma de células progenitoras neurales como ingrediente activo

Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición que comprende el secretoma de células precursoras neurales (NPC) como ingrediente activo para su uso en el tratamiento de una enfermedad cerebrovascular isquémica, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de cuerpos de Lewy, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica o lesión de la médula espinal.

Antecedentes en el estado de la técnica

Las células madre se consideran un material candidato terapéutico prometedor para diversas enfermedades debido a su multipotencia. Por ejemplo, las células madre mesenquimales (MSC) liberan muchos factores nutricionales que pueden obtenerse y aislarse fácilmente y lograr la promoción de la angiogénesis y la inhibición de la inflamación (bibliografía 1 que no es de patente). Estas características de las MSC se han considerado en estudios para su aplicación al tratamiento de una serie de enfermedades humanas. Estudios recientes han encontrado que las MSC contribuyen a la reparación de tejidos en una gran cantidad de modelos animales y tratamientos clínicos con humanos (bibliografías 2, 3 que no son de patente). Varios informes indicaron la capacidad de diferenciación *in vitro* de las MSC en el linaje neural (bibliografía 4 que no es de patente) y astrocitos (bibliografía 3 que no es de patente), pero no hay evidencia definitiva sobre qué funciones realizan las células diferenciadas *in vivo*. Parece que el efecto favorable de las MSC es inducido por mecanismos paracrinós más que por el reemplazo celular y, por lo tanto, el trasplante de MSC tendría efectos temporales y limitados, pero no el alivio mantenido durante un largo período de tiempo (bibliografía 5 que no es de patente).

Por el contrario, las células madre embrionarias (ESC) pueden diferenciarse en tipos de células derivadas de las tres capas germinales embrionarias y tienen una fuerte capacidad de autorrenovación. Notablemente, las células precursoras neurales (NPC) derivadas de las ESC, en primer lugar, se diferencian en un tipo de célula particular de células de linaje neural, incluidas células neurales, astrocitos y oligodendrocitos, y por lo tanto se consideran una fuente celular ideal para la reparación o regeneración de tejidos del cerebro dañado. Estas células secretan ciertos factores para promover la supervivencia y la proliferación de células precursoras neurales endógenas (bibliografía 6 que no es de patente). Sin embargo, todavía no se sabe cómo las NPC diferenciadas de las ESC o el medio condicionado de las NPC contribuyen a la mejora de las funciones después de la administración en modelos de enfermedad.

Las células madre reprogramadas se refieren a células reprogramadas para adquirir pluripotencia sometiendo células somáticas a un procedimiento de reprogramación artificial a través de diversos medios, tales como transducción génica/inducción del factor transcripcional, tratamiento químico y tratamiento con factor de crecimiento. Las células madre reprogramadas se denominan células madre pluripotentes inducidas (iPSC) (documento 7 que no es de patente). En comparación con las células madre embrionarias, estas células muestran una similitud muy alta en vista de la morfología celular, el estado del cultivo, la tasa de proliferación, el perfil de expresión génica, los patrones de alteración cromosómica, la pluripotencia y la capacidad de formación de teratomas en ratones inmunodeficientes. La potencia de diferenciación de las células madre pluripotentes inducidas es similar a la de las células madre embrionarias, pero no se sabe bien cómo las NPC se diferenciaron de las mismas o un medio acondicionado de NPC contribuye a la mejora de las funciones después de la administración en modelos de enfermedad.

La bibliografía 8 que no es de patente describe secretomas de progenitores mesenquimales del cordón umbilical (de HUCPVC), que muestran que el trasplante de sus secretomas es capaz de potenciar la supervivencia y diferenciación neuronal *in vitro* e *in vivo*.

La bibliografía 9 que no es de patente describe el potencial terapéutico de la célula precursora neural positiva para la molécula de adhesión celular neural-ácido polisialico (PSA-NCAM) derivada de células madre embrionarias humanas en un modelo de accidente cerebrovascular de rata como una fuente prometedora para una futura terapia basada en células para enfermedades neurológicas, incluido el accidente cerebrovascular isquémico.

La bibliografía 10 que no es de patente describe precursores neurales positivos para PSA-NCAM como una estrategia prometedora en el desarrollo de fármacos para terapia celular en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

La bibliografía 1 de patente se refiere a una composición de células madre útil para prevenir y tratar lesiones neurales, enfermedades neurodegenerativas, accidente cerebrovascular isquémico que incluye isquemia y reperfusión, teniendo dicha composición también moléculas de adhesión celular que incluyen fibronectina, euzrina, integrina y galectina. La bibliografía 2 de patente describe la generación de células neuroprogenitoras a partir de células madre embrionarias pluripotentes de mamífero que se trasplantan en un modelo de rata de la enfermedad de Parkinson para aliviar enfermedades neurodegenerativas.

[Estado de la Técnica]

[Bibliografía que no es de patente]

1. Caplan, A. I., & Dennis, J. E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98, 1076-1084.
2. Chen, J., Li, Y., Katakowski, M., et al., (2003). Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *Journal of Neuroscience Research*, 73, 778-786.
3. Kopen, G. C., Prockop, D. J., & Phinney, D. G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 10711-10716.
4. Bae, K. S., Park, J. B., Kim, H. S., Kim, D. S., Park, D. J., & Kang, S. J. (2011). Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Yonsei Medical Journal*, 52, 401-412.
5. Cho, S. R., Kim, Y. R., Kang, H. S., et al., (2009). Functional recovery after the transplantation of neurally differentiated mesenchymal stem cells derived from bone marrow in a rat model Functional recovery after the transplantation of spinal cord injury. *Cell Transplantation*, 18, 1359-1368.
6. Capone, C., Frigerio, S., Fumagalli, S., et al., (2007). Neurosphere- derived cells exert a neuroprotective action by changing the ischemic microenvironment. *PLoSOne*, 7, e373.
7. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., y Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872.
8. Teixeira Fábio G. et al., (2014), "Secretome of Mesenchymal Progenitors from the Umbilical Cord Acts as Modulator of Neural/Glial Proliferation and Differentiation", *STEM CELL REVIEWS, HUMANA PRESS INC, US*, 11(2), 288-297.
9. Kim, H. S. et al. (2014), "PSA-NCAM+ Neural Precursor Cells from Human Embryonic Stem Cells Promote Neural Tissue Integrity and Behavioral Performance in a Rat Stroke Model", *STEM CELL REVIEWS AND REPORTS*, 10(6), 761-771.
10. Kim, D. S. et al. (2012), "Highly Pure and Expandable PSA-NCAM-positive Neural Precursors from Human ESC and iOSC-derived Neural Rosettes", *PLOS ONE*, 7(7), 1-12.

[Bibliografía de patente]

1. KR20130116552
2. US2007/020247

Descripción detallada de la invención

Problema técnico

Los presentes inventores han investigado y se han esforzado por desarrollar un método de tratamiento fundamental para enfermedades isquémicas y enfermedades neuroinflamatorias. Como resultado, los presentes inventores han confirmado que como un enfoque diferente del trasplante de células madre, la administración del secretoma de células precursoras neurales (NPC) (es decir, medio acondicionado de NPC) en un sitio de lesión reduce la extensión del infarto isquémico cerebral y restaura las funciones neurales, tratando así eficazmente enfermedades isquémicas, enfermedades de daño neurológico y enfermedades degenerativas del sistema nervioso y, por tanto, los presentes inventores han completado la presente invención.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención es proporcionar una composición para su uso en el tratamiento de enfermedad cerebrovascular isquémica, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de cuerpos de Lewy, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica o lesión de la médula espinal, comprendiendo la composición el secretoma de células precursoras neurales (NPC) positivas para la molécula de adhesión celular neural polisialiladas (PSA-NCAM) como ingrediente activo, en la que las células precursoras neurales positivas para PSA-NCAM se separan de las rosetas neurales diferenciadas de células madre pluripotentes, y las células madre pluripotentes son células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas (iPSC), en la que el secretoma está contenido en un líquido de cultivo celular obtenido mediante el cultivo de células precursoras neurales positivas para PSA-NCAM en medio de cultivo celular, en la que el secretoma se obtiene eliminando las células del medio de cultivo celular.

Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición para su uso en el tratamiento de enfermedad cerebrovascular isquémica, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de cuerpos de Lewy, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, o lesión de la médula espinal, la composición que comprende el secretoma de las células precursoras neurales (NPC) positivas para la molécula de adhesión celular neural polisialilada (PSA-NCAM) como ingrediente activo,

en el que las células precursoras neurales positivas para PSA-NCAM se separan de rosetas neurales diferenciadas de células madre pluripotentes, y las células madre pluripotentes son células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas (iPSC),

en el que el secretoma está contenido en un líquido de cultivo celular obtenido mediante el cultivo de células precursoras neurales positivas para PSA-NCAM en medio de cultivo celular, en el que el secretoma se obtiene eliminando las células del medio de cultivo celular.

Los presentes inventores han estudiado y se han esforzado por desarrollar un método de tratamiento fundamental para enfermedades isquémicas cerebrales y enfermedades neuroinflamatorias. Como resultado, los presentes inventores han confirmado que, como un enfoque diferente del trasplante de células madre, la administración del secretoma de células precursoras neurales (NPC) en un sitio de lesión reduce un área de lesión isquémica y restaura las funciones neurales, tratando efectivamente por lo tanto enfermedades de isquemia cerebral, enfermedades de daño neurológico y enfermedades degenerativas del sistema nervioso.

Como se usa en el presente documento, el término "secretoma de células precursoras neurales" se refiere a la totalidad (o colección) de proteínas secretadas de células precursoras neurales al entorno de las células (en medio de cultivo) cuando se cultivan las células precursoras neurales.

De acuerdo con una realización de la presente invención, las células precursoras neurales utilizadas en la preparación del secretoma de la presente invención son las células precursoras neurales diferenciadas de las células madre pluripotentes.

Como se usa en este documento, el término "células madre" es un término genérico para células indiferenciadas antes de la diferenciación en células respectivas que constituyen tejidos, y las células madre tienen la capacidad de diferenciarse en células particulares mediante estímulos de diferenciación particulares (entorno). A diferencia de las células diferenciadas terminalmente, que no proliferan, las células madre son capaces de producir células idénticas a las células madre originales a través de la división celular (autorrenovación), y tienen plasticidad en la diferenciación, en la que las células madre pueden diferenciarse en células particular. mediante la aplicación de la estimulación de diferenciación y pueden diferenciarse en varias células en diferentes entornos o mediante estímulos de diferenciación.

Las células madre utilizadas en la presente invención son células madre pluripotentes que proliferan indefinidamente *in vitro* y pueden diferenciarse en diversas células derivadas de todas las capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo). Más específicamente, las células madre pluripotentes son células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células germinales embrionarias o células de carcinoma embrionario.

Las células madre embrionarias se derivan de la masa celular interna (ICM) del blastocisto, y las células germinales embrionarias se derivan de las células germinales primordiales presentes en las crestas gonadales de 5-10 semanas de edad. Los métodos que implicarían la destrucción de un embrión humano no están dentro del alcance de la presente invención.

Las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) son un tipo de células madre pluripotentes derivadas artificialmente de células no pluripotentes (por ejemplo, células somáticas) mediante la transducción de genes particulares que les confieren pluripotencia. Las células madre pluripotentes inducidas se consideran iguales a las células madre pluripotentes (por ejemplo, células madre embrionarias) ya que las células madre pluripotentes inducidas tienen genes de células madre y expresión de proteínas muy similares, patrón de metilación cromosómica, tiempo de duplicación, capacidad de formación de cuerpos embrioides, capacidad de formación del teratoma, capacidad de formación de quimeras viables, formación de híbridos y capacidad de diferenciación como células madre embrionarias.

De acuerdo con una realización de la presente invención, las células precursoras neurales (NPC) son células precursoras neurales antes o después de una etapa de rosetas neurales formadas al inducir la diferenciación de células madre pluripotentes (por ejemplo, células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas) en células de linaje neural.

De acuerdo con una realización de la presente invención, las células precursoras neurales son células precursoras neurales (NPC) positivas para la molécula de adhesión celular neural polisialilada (PSA-NCAM).

De acuerdo con otra realización de la presente invención, las células precursoras neurales son células precursoras neurales (NPC) negativas para la molécula de adhesión celular neural polisialilada (PSA-NCAM).

Las células precursoras neurales positivas o negativas para PSA-NCAM pueden purificarse a partir de rosetas neurales, que se diferencian de las células madre pluripotentes mediante la estimulación de la diferenciación neural, usando un anticuerpo anti-PSA-NCAM. El término "rosetas neurales" se refiere a células madre neurales en la etapa inicial del procedimiento de diferenciación neural de células madre embrionarias humanas, y la roseta neural tiene una forma radial cilíndrica. Las rosetas neurales están compuestas por células que expresan marcadores neuroectodérmicos iniciales, tal como Pax6 y Sox1, y pueden diferenciarse en varias células neurales y células neurogliales.

La estimulación de la diferenciación neural puede inducirse mediante un método que se realiza habitualmente en la técnica, por ejemplo, medios sin suero (Tropepe V et al., *Neuron*. 30: 6578 (2001)), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y tratamiento con morfógenos, tales como Wnt y ácido retinoico (RA) (Ying QL et al., *Nat Biotechnol*. 21: 183186 (2003)), pero no se limita a los mismos.

Se pueden usar anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales como purificación celular mediada por anticuerpos. Los anticuerpos contra PSA-NCAM pueden producirse mediante los métodos que se llevan a cabo convencionalmente en la técnica, por ejemplo, un método de fusión (Kohler y Milstein, *European Journal of Immunology*, 6: 511-519 (1976)), un método de ADN recombinante (patente de los Estados Unidos No. 4.816.56), o un método de biblioteca de anticuerpos de fagos (Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 58, 1-597 (1991)). Un procedimiento general para la producción de anticuerpos se describe en detalle en Harlow, E. y Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Nueva York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; y Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991. Por ejemplo, las células de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales pueden obtenerse fusionando líneas celulares inmortales con linfocitos productores de anticuerpos, cuya tecnología ha sido bien conocida por los expertos en la técnica y se puede realizar fácilmente. Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse inyectando antígenos de PSA-NCAM en un animal apropiado, recolectando antiseros del animal y luego aislando los anticuerpos de los antiseros usando la técnica de afinidad conocida.

Como se usa en este documento para citar la PSA-NCAM, el término "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo específico para PSA-NCAM, y el anticuerpo se une específicamente a la proteína de PSA-NCAM, e incluye una forma completa de un anticuerpo y un fragmento de unión antígeno de la molécula de anticuerpo. El anticuerpo completo tiene una estructura que tiene dos cadenas ligeras de longitud completa y dos cadenas pesadas de longitud completa, y las cadenas ligeras están unidas a las cadenas pesadas mediante un enlace disulfuro, respectivamente. El fragmento de unión al antígeno de la molécula de anticuerpo es un fragmento que tiene una función de unión al antígeno e incluye Fab, F(ab')₂ y Fv.

Para la separación de células precursoras neurales positivas para PSA-NCAM usando un anticuerpo, se pueden usar clasificadores de células activadoras de fluorescencia (FACS), clasificadores de células activadas magnéticamente (MACS), adherencia plástica recubierta de anticuerpos y lisis mediada por complemento.

De acuerdo con una realización, el secretoma esta contenido en un medio acondicionado obtenido mediante cultivo de células precursoras neurales en un medio de cultivo de células animales. Es decir, la composición de la presente invención puede estar contenida en un medio celular acondicionado de células precursoras neurales, que contiene un secretoma de células precursoras neurales.

De acuerdo con una realización de la presente invención, el medio acondicionado celular de las células precursoras neurales puede obtenerse cultivando las células precursoras neurales en un medio de cultivo celular libre de suero que contiene insulina/transferrina/selenio (ITS) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGT) y luego se eliminan las células. Para el cultivo, las células precursoras neurales que se obtienen subcultivando (por ejemplo, al menos cuatro pases) las células precursoras neurales en un medio de cultivo de células animales que contiene bFGF suplementado con, por ejemplo, N2, B-27 y/o Gem21.

La eliminación de las células del medio acondicionado se puede llevar a cabo utilizando un método de separación de células ordinario, tal como centrifugación o filtración.

Para el medio de cultivo de células animales, se puede usar sin limitación un medio ordinario que se usa para cultivar células precursoras neurales. Por ejemplo, puede usarse DMEM/F12.

De acuerdo con una realización de la presente invención, las células precursoras neurales se diferencian de las células madre pluripotentes inducidas por humanos (iPSC), y el secretoma de las células precursoras neurales incluye las siguientes proteínas:

Agrina, anexina A5, BSG (Basigina), biglicano, calponina 3, proteína similar a la coactosina, cofilina 1, colágeno alfa-2, cullina 3, destrina, distroglicano, efrina B2, exportina 2, ezrina, fibronectina, fibulina 1, proteína relacionada con el encrespado, proteína de unión a galectina 3, granulinas, factor 11 de crecimiento/diferenciación, haptoglobina, hemopexina, proteína B2 del grupo de alta movilidad, hornerina, importina 9, proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, proteína La de lupus, factor inhibidor de la migración de macrófagos, midquina, moesina, neuropilina 2, pleiotrofina, profilina 1, proteína DJ-1, radixina, proteína 2 secretada relacionada con el encrespamiento, septina 11, talina 1, testicano, timopoyetina, transgelina 3 y vimentina.

De acuerdo con una realización de la presente invención, las células precursoras neurales se diferencian de las células madre embrionarias humanas (ESC), y el secretoma de las células precursoras neurales incluye las siguientes proteínas:

Agrina, anexina A2, atractina, biglicano, ceruloplasmina, cofilina 1, colágeno alfa-1, coronina 1X, dermicidina, DERP12, efrina B3, exostosina 2, ezrina, proteína de unión a galectina 3, granulinas, factor 11 de crecimiento/diferenciación,

haptoglobina, hemopexina, proteína B2 del grupo de alta movilidad, hornerina, proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a insulina, proteína La de lupus, midquina, moesina, proteína 8 de dominios múltiples similares al factor de crecimiento epidérmico, nidógeno 1, paratimosina, profilina 2, proteína DJ-1, proteína 2 secretada relacionada con el encrespamiento, secretogranina, talina 1, timosina beta-4, TGFBI (proteína ig-h3 inducida por el factor beta de crecimiento transformante), transgelina y vimentina.

Como se usa en este documento, el término "tratamiento" se refiere a: (a) suprimir la progresión de una enfermedad, trastorno o síntoma; (b) reducir una enfermedad, trastorno o síntoma; o (c) curar la enfermedad, trastorno o síntoma. La composición de la presente invención suprime el desarrollo de síntomas de enfermedad isquémica cerebral o enfermedad neuroinflamatoria, o elimina o reduce los síntomas de enfermedad isquémica cerebral o enfermedad neuroinflamatoria. Por lo tanto, la composición de la presente invención por sí misma puede ser una composición para su uso en el tratamiento de la enfermedad isquémica cerebral o la enfermedad neuroinflamatoria. Como se usa en este documento, el término "tratamiento" o "agente de tratamiento" incluye un significado de "auxiliar de tratamiento" o "adyuvante terapéutico".

Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad isquémica" se refiere a una enfermedad de necrosis tisular a través de una reducción en la velocidad del flujo sanguíneo y un bloqueo del suministro de sangre, causado por pérdida de sangre, embolia o infarto debido a lesiones de los vasos sanguíneos.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la enfermedad isquémica que puede tratarse mediante la composición de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en cardiopatía isquémica, infarto de miocardio y enfermedad cerebrovascular isquémica.

Como se usa en el presente documento, el término "cardiopatía isquémica" se refiere a una enfermedad causada por la reducción del flujo sanguíneo al músculo cardíaco debido al daño, estrechez y oclusión de las arterias coronarias para suministrar sangre al corazón. Más específicamente, la cardiopatía isquémica que puede tratarse con la composición de la presente invención es el infarto de miocardio.

Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad cerebrovascular isquémica" se refiere a una enfermedad del daño de los tejidos cerebrales causada por la falta de suministro de flujo sanguíneo debido al daño, estrechez u oclusión de los vasos sanguíneos del cerebro. Más específicamente, la enfermedad cerebrovascular isquémica es un accidente cerebrovascular isquémico y el accidente cerebrovascular isquémico incluye hemorragia cerebral e infarto cerebral.

Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad neuroinflamatoria" se refiere a una enfermedad causada por el daño de los tejidos neurales debido a respuestas inflamatorias, y más específicamente, se refiere a una enfermedad por daño neurológico y una enfermedad del sistema nervioso degenerativo, causada por respuestas inflamatorias.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la enfermedad neuroinflamatoria que puede tratarse mediante la composición de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica y lesión de la médula espinal. En este documento, la lesión de la médula espinal puede incluir tanto una lesión inflamatoria de la médula espinal como una lesión traumática de la médula espinal.

De acuerdo con una realización de la presente invención, en los casos en los que el secretoma de células precursoras neurales (NPC) derivadas de ESC y de iPSC humanas se administró a un modelo de accidente cerebrovascular isquémico experimental (modelo de oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO)), tanto la administración única como la administración múltiple indujeron significativamente la reducción de células positivas para ED-1 y células positivas para GFAP en comparación con el grupo de PBS (Figuras 8a-8b y 9a-9b). En otras palabras, el secretoma redujo la respuesta inflamatoria, redujo el número de células microgliales activadas (Figuras 8a-8b) y redujo el número de astrocitos activados (Figuras 9a-9b).

Además, el secretoma de la presente invención aumenta el número de células precursoras neurales que expresan doblecortina (DCX) (véase la Figura 10). La doblecortina es un marcador de la migración de células precursoras neurales. Estos resultados muestran que las células madre neurales endógenas se movilizan en los tejidos cerebrales debido a la administración del secretoma.

El secretoma de la presente invención aumentó el número de vasos positivos para α -SMA, lo que significa un aumento de la angiogénesis (véase la Figura 11).

Estos efectos antiinflamatorios, que movilizan las células madre endógenas y angiogénicos sugieren que el secretoma derivado de células precursoras neurales (NPC) tiene un efecto neuroprotector. Es decir, el secretoma derivado de células precursoras neurales exhibe los efectos anteriores, lo que permite el tratamiento de enfermedades neuroinflamatorias.

Mientras tanto, el secretoma de las células precursoras neurales derivadas de células madre pluripotentes de la presente invención tiene un efecto de tratamiento sobre la lesión de la médula espinal. De acuerdo con una realización de la presente invención, la prueba de BBB que usa un modelo de lesión de la médula espinal mostró una excelente recuperación del comportamiento en el grupo inyectado con células precursoras neurales derivadas de células madre pluripotentes (por ejemplo, ESC) (véase la Figura 12). Las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) se consideran que son las mismas células madre pluripotentes (por ejemplo, células madre embrionarias) ya que las iPSC tienen expresión de genes y proteínas de células madre, metilación cromosómica, tiempo de duplicación, formación de cuerpos embrioides, formación de teratomas, viables la formación de quimeras, la formación de híbridos y la diferenciación y, por lo tanto, las células madre pluripotentes inducidas también tienen un efecto de tratamiento sobre dicha lesión de la médula espinal.

Como se usa en el presente documento, el término "administración" o "administrar" se refiere a un método en el que una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición para su uso de acuerdo con la presente invención se administra directamente a un sujeto para formar la misma cantidad de la misma en el cuerpo del sujeto. Por lo tanto, el término "administrar" incluye la inyección de un ingrediente activo (un secretoma de células precursoras neurales positivas para PSA-NCAM, NPC) alrededor de un sitio de lesión y, por lo tanto, el término "administrar" se usa en el mismo significado que el término "inyectar".

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" de la composición se refiere al contenido, que es suficiente para proporcionar un efecto terapéutico o profiláctico a un sujeto al que se le administra, y por tanto el término tiene un significado que incluye "cantidad profilácticamente eficaz". Como se usa en este documento, el término "sujeto" incluye, pero no se limita a, humano, ratón, rata, conejillo de indias, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, mono, chimpancé, castor o mono rhesus. Específicamente, el sujeto de la presente invención es el ser humano.

En los casos en que la composición para su uso de acuerdo con la presente invención se prepara como una composición farmacéutica, la composición farmacéutica comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable contenido en la composición farmacéutica es uno que se usa convencionalmente en la formulación, y los ejemplos del mismo pueden incluir, pero no se limitan a, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma de acacia, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, aceite mineral, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS) y medios.

La composición farmacéutica puede comprender además, adicionalmente a los ingredientes anteriores, un lubricante, un agente humectante, un agente edulcorante, un agente saborizante, un emulsionante, un agente de suspensión, un conservante y similares. Los vehículos y preparaciones farmacéuticamente aceptables adecuados se describen en detalle en Remington's Pharmaceutical Sciences (19ª ed., 1995).

La composición farmacéutica se puede administrar por vía oral o parenteral. Específicamente, la composición farmacéutica se puede inyectar mediante administración parenteral y, más específicamente, administración intramuscular, administración intracerebroventricular, administración en el sitio de la herida (lesionado), administración intratecal o en la médula espinal o administración intravascular. La administración intravascular puede incluir la administración intraarterial o intravenosa.

Una dosis adecuada de la composición farmacéutica puede variar dependiendo de varios factores, tales como el método de formulación, la forma de administración, la edad, el peso corporal, el sexo, la morbilidad y la dieta del paciente, el momento de la administración, la vía de administración, tasa de excreción y sensibilidad de respuesta.

La composición farmacéutica se puede administrar en una sola dosis o en múltiples dosis. Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede administrar a humanos u otros animales en una sola dosis o en múltiples dosis divididas. La composición de una sola dosis puede llenar una dosis diaria que contiene un cierto intervalo de cantidades o un contenido correspondiente a una porción de la misma. Es decir, la composición para uso en el tratamiento de acuerdo con la presente invención puede administrarse a un paciente que necesita un tratamiento en una sola dosis diaria o múltiples dosis diarias, o puede administrarse en una sola dosis o múltiples dosis a intervalos de un tiempo predeterminado (hora, día, semana, etc.).

Como se usa en este documento, el término "administración de una sola dosis" significa el uso de una composición que comprende una dosis única de secretoma o una composición administrada en una forma de una sola dosis, y "administración de múltiples dosis" significa el uso de una composición que comprende una dosis múltiple de secretoma o una composición administrada en forma de dosis múltiple.

De acuerdo con la presente divulgación, en los casos en los que se administró secretoma derivado de células precursoras neurales (NPC) a un modelo animal con accidente cerebrovascular isquémico en una sola dosis, se redujo el área de la lesión isquémica y se observó el efecto de mejora del comportamiento (véanse las Figuras 1 a 4).

Mientras tanto, incluso en los casos en los que se administró secretoma derivado de células precursoras neurales (NPC) a un modelo animal de accidente cerebrovascular isquémico en múltiples dosis, el área de la lesión isquémica disminuyó y se observó el efecto de mejora del comportamiento (véanse las Figuras 6a a 6i y 7). Especialmente, un grupo de dosis múltiple, en comparación con un grupo de una sola dosis, mostró un mayor efecto del tratamiento sobre la mejora del comportamiento (Figuras 6a-6i) y un mayor efecto antiinflamatorio (Figuras 8a-8b y 9a-9b), y se confirmó que la administración repetida de secretoma aumentó significativamente las células madre neurales endógenas y el número de nuevos vasos.

La composición farmacéutica se puede formular en una forma de dosificación unitaria o se puede preparar en un recipiente multidosis mediante el uso de un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable de acuerdo con el método que puede realizar fácilmente una persona con experiencia normal en la técnica a la que pertenece la presente invención. En el presente documento, la forma de dosificación puede ser una solución en un medio aceitoso o acuoso, una suspensión, un jarabe o una emulsión; un extracto, un polvo, un gránulo, una tableta o una cápsula; y puede incluir además un dispersante o un estabilizador.

Efectos ventajosos

Las características y ventajas de la presente invención se resumen a continuación:

(i) La presente invención proporciona una composición que comprende el secretoma de las células precursoras neurales (NPC) como ingrediente activo para su uso en el tratamiento de enfermedad cerebrovascular isquémica, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de cuerpos de Lewy, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica o lesión de la médula espinal.

(ii) El secretoma de las células precursoras neurales de la composición para su uso de acuerdo con la presente invención reduce el área de lesión isquémica y restaura las funciones nerviosas a través de funciones de las mismas, tales como antiinflamatoria, angiogénesis y movilización y proliferación de células madre endógenas y por tanto, el secretoma se puede utilizar como agente terapéutico para enfermedades isquémicas cerebrales, enfermedades de daño neurológico causadas por inflamación y enfermedades degenerativas del sistema nervioso.

(iii) Además, el secretoma de las células precursoras neurales de la composición para uso de acuerdo con la presente invención mostró un efecto de mejora del comportamiento muy excelente en una administración de múltiples dosis en comparación con una administración de una sola dosis.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el tamaño de un sitio de lesión isquémica en un grupo de control con PBS, un grupo de control con medio y un grupo tratado con el secretoma de células precursoras neurales (NPC) derivadas de células madre embrionarias humanas (ESC).

La Figura 2 ilustra el cambio en el peso corporal en el grupo de control con PBS, el grupo de control con medio y el grupo tratado con secretoma.

Las Figuras 3a a 3d ilustran los resultados del análisis de comportamiento en el grupo de control con PBS, el grupo de control con medio y el grupo tratado con secretoma. La Figura 3a muestra el resultado de la prueba de barra de equilibrio; la Figura 3b muestra los resultados de la prueba de tracción prensil; la Figura 3c muestra los resultados de la prueba de falla en las patas; la Figura 3d muestra los resultados del cruce de líneas que indican la actividad del comportamiento por unidad de tiempo.

La Figura 4 muestra un análisis de comportamiento integral de puntuaciones modificadas de gravedad neurológica (mNSS) de los resultados de la Figura 3 en el grupo de control con PBS, el grupo de control con medio y el grupo tratado con secretoma. * Valor $P < 0,05$, ** Valor $P < 0,01$ en las Figuras 1 a 4.

La Figura 5 muestra un programa experimental para investigar los efectos de la administración de múltiples dosis del secretoma derivado de células precursoras neurales (NPC) derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) humanas. Se inyectó BrdU para investigar la movilización de células madre neurales endógenas, que existen en el tejido cerebral, por el secretoma derivado de células madre neurales.

Las Figuras 6a a 6i muestran los resultados experimentales de la administración de una sola dosis frente a la administración de cuatro dosis del secretoma derivado de células precursoras neurales (NPC) derivadas de células madre pluripotentes. 6a, puntuación modificada de la gravedad neurológica (mNSS); 6b, prueba de torsión del torso (izquierda); 6c, prueba de torsión del torso (anillo); 6d, prueba de falla en las patas; 6e, prueba de cruce de línea; 6f, prueba de posición vertical; 6g, prueba de barra de equilibrio; 6h, prueba de tracción prensil; 6i, cambio de peso corporal en un grupo de control y un grupo de tratamiento con secretoma. La pose vertical se refiere a la pose de un animal de pie sobre sus patas traseras, y es un comportamiento general cuando un animal normal explora con curiosidad. La pose vertical está representada por el número por unidad de tiempo.

En las Figuras 6a a 6i, blanco: grupo de control, negro: grupo de control con medio, amarillo: grupo de tratamiento con dosis únicas de secretoma (Secretoma S), rojo: grupo de tratamiento de cuatro dosis de secretoma (Secretoma M), * valor $P < 0,05$, ** Valor $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

La Figura 7 muestra los tamaños de un sitio de lesión isquémica en un grupo de control con PBS, un grupo de control con medio, un grupo de tratamiento con dosis única de secretoma (Secretoma S) y un grupo de tratamiento de dosis múltiple de secretoma (Secretoma M).

Las Figuras 8a a 8b muestran que la administración repetida del secretoma derivado de células precursoras neurales (NPC) (Secretoma M) indujo una reducción significativa en el número de células positivas para ED-1. Barra de escala: 200 μ m, * P <0,001.

Las Figuras 9a a 9b muestran que la administración repetida del secretoma derivado de células precursoras neurales (NPC) (Secretoma M) indujo una reducción significativa en el número de células positivas para GFAP. Barra de escala: 200 μ m, * P <0,05 y *** P <0,001.

La Figura 10 muestra la movilización de células madre neurales endógenas en tejidos de cerebro de rata debido a la administración repetida de secretoma derivado de células precursoras neurales (NPC) (Secretoma M). Barra de escala: 500 μ m.

La Figura 11 muestra que la administración repetida del secretoma derivado de células precursoras neurales (NPC) redujo significativamente el número de vasos positivos para α -SMA. * P <0,005.

La Figura 12 muestra que, cuando se realizó la prueba de BBB en un modelo de lesión de la médula espinal durante 8 semanas o más, el grupo de inyección de secretoma mostró una excelente recuperación del comportamiento en comparación con un grupo de control sin tratamiento.

Modo para llevar a cabo la invención

A continuación, se describirá la presente invención en detalle con referencia a los ejemplos.

Ejemplos

Materiales y métodos

Obtención de células NPC derivadas de ESC humanas o derivadas de iPSC humanas y NPC positivas para PSA-NCAM

El uso de células humanas fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional (IRB No. 4-2008-0643). Para la inducción neural, se cultivaron cuerpos embrioides (EB) derivados de hESC durante 4 días en suspensión con dorsomorfina (DM) 5 μ M (Sigma, St. Louis, MO) y SB431542 (SB) 5-10 μ M (Calbiochem, San Diego, CA) en medio de hESC desprovisto de bFGF (Invitrogen), y luego unido a placas recubiertas con Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA) en medio 1X N2 (Invitrogen) suplementado con 20 ng/mL de bFGF durante 5 días adicionales (Kim, DS, Lee, DR, Kim, HS, et al. (2012). PLoSOne, 7, e39715). Las rosetas neurales que aparecieron en el centro de las colonias de EB unidas se aislaron cuidadosamente utilizando pipetas de vidrio extraídas de las células planas circundantes. Luego se sembraron pequeños grupos de rosetas en placas recubiertas con Matrigel después de una trituración suave y se cultivaron en DMEM/F12 suplementado con 1X N2, 1X B27 (todos de Invitrogen) (denominado medio N2B27) más 20 ng/mL de bFGF (Kim, DS, Lee, JS, Leem, JW, et al. (2010). Stem Cell Reviews and Reports, 6, 270-281).

Se obtuvieron células precursoras neurales (NPC) de rosetas neurales expandidas al alcanzar aproximadamente el 80-90% de confluencia, y luego se expusieron a Y27632 10 μ M (Sigma) durante 1 hora para prevenir la apoptosis antes de someterse al procedimiento MACS. Después de la disociación usando Accutase (Invitrogen), las células (~1 X 10⁸ células) se bloquearon en PBS que contenía BSA al 1% y luego se incubaron junto con anticuerpo anti-PSA-NCAM conjugado con microperlas (Miltenyi Biotec) a 4 °C durante 15 minutos.

Después de un lavado extenso, la suspensión de células se cargó para clasificación de células activadas magnéticamente (MASC), y las células marcadas positivamente que permanecieron en la columna se eluyeron al tubo exclusivo de MACS. Las células precursoras neurales (NPC) aisladas positivas para PSA-NCAM se sembraron en placas a una concentración de 4-5 x 10⁵ células/cm² en medio N2B27 o medio NBG suplementado con 20 ng/mL de bFGF (1X N2, 0,5 X B27 y suplemento de 0,5 X G21) (GeminiBio-Products, WestSacramento, CA). Los medios de cultivo se cambiaron todos los días y las células se pasaron cada 2-3 días.

Separación de secretoma de células precursoras neurales (NPC) derivadas de células madre embrionarias (ESC) pluripotentes humanas

Las células precursoras neurales de células madre embrionarias (ESC) pluripotentes humanas obtenidas (células precursoras neurales positivas para PSA-NCAM) se cultivaron repetidamente y amplificaron durante 4 pases o más en una placa de 60 mm revestida con Matrigel con suplemento N2 libre de suero (100X-concentración final 1X), B-27 (50X-concentración final 0,5X) y Gem21 (50X-concentración final 0,5X) y bFGF (20 ng/mL) en un líquido de cultivo base (DMEM/F-12) y luego se cultivaron en 8-10 placas hasta que las células alcanzaron un 90% de confluencia. Después de la eliminación del líquido de cultivo, las células se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato y se cultivaron durante 24 h en un líquido de cultivo base libre de suero (DMEM/F12) suplementado solo con ITS (100X-concentración final 1X) y bFGF (20 ng/mL). Para un control, se colocó la misma cantidad de líquido de cultivo base con la misma composición (líquido de cultivo base suplementado con la misma cantidad de ITS y bFGF) en una placa sin células, se incubó en una incubadora durante 24 h y luego se recogió. Todo el líquido de cultivo se recogió y se centrifugó (800 g durante 30 min) para eliminar los residuos celulares y las células muertas, y luego se congeló directamente en un congelador a -70 °C y, cuando fue necesario, se descongeló antes de su uso.

Separación del secretoma de las células precursoras neurales (NPC) derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) humanas

Las células precursoras neurales (NPC) derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) pluripotentes humanas en P₀ se subcultivaron hasta P₄ en una placa de 100 mm recubierta con Matrigel con un cultivo base (DMEM/F-12) en el que el suplemento N2 libre de suero, B-27 y Gem21 se colocaron y se añadió bFGF, hasta que las células alcanzaron al menos aproximadamente un 90% de confluencia. Posteriormente, se eliminó el líquido de cultivo y luego las células se lavaron una vez con una solución tampón de fosfato, se separaron de la placa usando enzima Accutase y luego se lavaron dos o tres veces con PBS. Además, solo se añadió ITS al líquido de cultivo base DMEM que no contenía rojo fenol, y luego se cultivaron las células en estado flotante durante 24 horas. Como grupo de control del líquido de cultivo, se utilizó un líquido de cultivo obtenido añadiendo una cantidad igual de ITS a una cantidad igual de un líquido de cultivo base y luego incubando las células en una incubadora durante 24 horas. Se recogió todo el líquido de cultivo con células flotantes y se centrifugó (1.000 g durante 20 min) para eliminar los residuos celulares y las células muertas, y luego se congeló directamente en un congelador a -70 °C y, cuando fue necesario, se descongeló antes de su uso.

Las condiciones de cultivo celular son las siguientes:

- (1) condiciones básicas de cultivo celular: DMEM/F-12, bFGF 20 ng/mL, N2 100X-concentración final 1X, B-27 50X-concentración final 0,5X, Gem21 50X-concentración final 0,5X.
- (2) condiciones de cultivo para obtener secretoma-DMEM/rojo fenol libre, ITS 100X-concentración final 1X.

Establecimiento del modelo de accidente cerebrovascular

Para medir los efectos protectores neurales contra el daño neural debido a un accidente cerebrovascular isquémico local, se utilizó un método de sutura intraluminal. Este método es un modelo de accidente cerebrovascular isquémico local desarrollado por Zea Longa (Zea Longa, et al, Stroke., 1989, 20, 84-91), y tiene una ventaja de similitud clínica, a diferencia de otros modelos. Por esta razón, este modelo es adecuado para investigar el mecanismo de isquemia-reperusión o para cribar los efectos de varios fármacos. El modelo isquémico local tiene, además de las ventajas anteriores, la ventaja de que tanto la lesión por reperusión debida a la oclusión transitoria de la arteria cerebral media como la lesión celular continua debida a la oclusión permanente de la arteria cerebral media pueden observarse utilizando una sonda. La diferencia entre un núcleo isquémico y una penumbra isquémica está dada por el flujo sanguíneo cerebral. El flujo sanguíneo cerebral es menor al 15% en el primer caso y menor al 40% en el segundo. Las células nerviosas del centro mueren esporádicamente por oclusión durante 10 a 20 minutos; se forma un núcleo y la lesión del tejido cerebral se agranda para su oclusión durante 1 hora; y se produce una lesión similar a la oclusión permanente después de la oclusión durante 2-3 horas.

Después de la aclimatación durante una semana, los animales (rata macho Sprague-Dawley, peso corporal 250-300 g) se anestesiaron usando una máquina de anestesia respiratoria, y se usó isoflurano como fármaco anestésico. Las ratas blancas se sometieron primero a anestesia general usando una mezcla de gas de 80% de N₂O y 20% de O₂, y 5% de isoflurano, que luego se mantuvo al 2-2,5% para la anestesia. Para el establecimiento del modelo de accidente cerebrovascular, se hizo una incisión en la piel del cuello izquierdo de las ratas blancas, y luego se aislaron la arteria carótida común, la arteria carótida externa y la arteria carótida interna, y las arterias respectivas se ataron ligeramente con un hilo de seda negro para bloquear el flujo de sangre. Se corta un pequeño orificio en la arteria carótida común y se inserta a través de la sección cortada la sonda de nailon 4-0 de 25 mm con un extremo de 0,40 mm, obtenida redondeando el extremo de la sutura de nailon con un cauterio. La sonda de nailon insertada en la arteria carótida externa se insertó y se fijó en la arteria cerebral media a través de la arteria carótida interna. Después de insertar la sonda a aproximadamente 18-20 mm del sitio de la ramificación de la arteria carótida común, se bloqueó el origen de la arteria cerebral media y luego se fijó con un hilo para ocluir permanentemente la arteria cerebral media. A continuación, se suturó de nuevo el sitio de la incisión en la piel, y luego las ratas se recuperaron naturalmente de la anestesia.

Inyección de secretoma en modelo de accidente cerebrovascular a través de arteria cerebral y prueba de comportamiento:

a. Inyección de secretoma de células precursoras neurales (NPC) derivadas de ESC humanas

Después de que se estableció la línea de base para la prueba de comportamiento un día después de la inducción del accidente cerebrovascular, se insertó una aguja de jeringa de insulina en la arteria carótida interna a través de la arteria carótida externa derecha de la misma manera que se estableció el modelo de accidente cerebrovascular, y a través de la aguja, se inyectaron intraarterialmente 0,2 mg/kg (volumen de inyección 50 µL) del secretoma, y se administró el mismo volumen del líquido de cultivo o solución salina tamponada con fosfato (PBS) como control. Después de la inyección del líquido con secretoma, se observaron las condiciones de los animales durante 14 días. La medición del peso se realizó una vez antes de la inyección y cuatro veces después de la inyección, y se realizó un análisis de comportamiento.

b. Inyección de secretoma de células precursoras neurales (NPC) derivadas de iPSC humanas - Administración de múltiples dosis

Después de que se estableció la línea base para la prueba de comportamiento un día después de la inducción del accidente cerebrovascular, se insertó una aguja de jeringa de insulina en la arteria carótida interna a través de la arteria carótida externa derecha de la misma manera que en el establecimiento del modelo de accidente cerebrovascular, y a través de la aguja, se inyectaron por vía intravenosa 0,2 mg/kg (60 µg por 300 g de rata, volumen de inyección 200 µL) del secretoma (administrado a través de la vena del pene). Se administró el mismo volumen de un líquido de cultivo a un grupo de control. Como grupo de control del secretoma se utilizó un líquido de cultivo obtenido al agregar una cantidad igual de ITS a una cantidad igual de un líquido de cultivo base y luego se incubaron las células en una incubadora durante 24 horas, como en el aislamiento del proteoma. Después de la inyección del líquido de secretoma, se observaron las condiciones de los animales durante 14 días. La medición del peso se realizó una vez antes de la inyección (día 0) y cuatro veces después de la inyección (día 3, día 7, día 10 y día 14), y se realizó un análisis de comportamiento.

c. Análisis de comportamiento

1) Prueba de torsión del torso: para probar la postura del torso considerada como el sentido de la corteza cerebral y el cuerpo estriado de los animales, se midió el comportamiento asimétrico.

2) Prueba de barra de equilibrio: se evaluó la función vestibulomotora general mediante la postura estable de los animales en la barra estrecha.

3) Prueba de falla en las patas: esta prueba se utiliza cuando se prueban el ajuste (cooperación) y unificación (integración) del movimiento motor. La falla en las patas se define porque la pata cae entre las barras de la rejilla o la rata coloca mal una extremidad anterior o posterior. La falla en las patas es simétrica en animales normales.

4) Prueba de tracción prensil: La parte prensil de la prueba implica la capacidad de la rata para colgarse de la cuerda horizontal mediante sus patas delanteras. La prueba de tracción prensil se utilizó para medir la fuerza muscular de la rata. Esta prueba fue adaptada de pruebas similares descritas anteriormente. La barra de acero (2 cm de diámetro, 100 cm de longitud) se colocó horizontalmente a 70 cm por encima de la almohadilla de goma esponjosa (7,5 cm de espesor). Se colocaron las patas delanteras de la rata sobre la barra de acero y se soltó al animal. Se dejó que los animales colgaran de la barra de acero durante hasta 5 s. Se anotó el tiempo de caída y si los animales llevaron o no la extremidad trasera a la barra con las siguientes puntuaciones; puntaje 0: la rata aguanta durante 5 s y levanta la extremidad trasera, puntaje 1: la rata se agarra durante 5 s y no levanta ninguna extremidad trasera, puntaje 2: la rata se agarra durante 3-4 s, puntaje 3: la rata se mantiene durante 0-2 s.

5) Prueba de campo abierto: esta prueba se utiliza para conocer los niveles generales de actividad de caminata. Los patrones de actividad, emoción y comportamiento de los animales se midieron midiendo directamente los aspectos y características del comportamiento.

6) Puntuación modificada de la gravedad neurológica (mNSS): la puntuación es una puntuación total de los valores de las pruebas motoras, sensoriales, de equilibrio, de reacción y de emoción obtenidas a través de las diversas pruebas anteriores, y la puntuación se calcula mediante los siguientes criterios (mNSS se mide mediante la suma de las puntuaciones para cada sujeto).

- Prueba de campo abierto (medición de los patrones de emoción, actividad y comportamiento de los animales).

Sin movimiento: 3

1-20: 2

21-30: 1

30 o más: 0

- Prueba de tracción prensil (medición muscular)

0-5 s: 3

6-10 s: 2

11-20 s: 1

21 s o más: 0

- Prueba de barra de equilibrio (medición del sentido del equilibrio)

Puntuación 0:

1 = postura estable

2 = agarra el lado de la barra y tiene movimientos inestables

Puntuación 1:

3 = una o más patas se salen de la barra.
4 = intenta mantener el equilibrio en la barra pero se cae

Puntuación 2:

5 = se cuelga de la barra pero se cae.
6 = se cae de la barra sin intentar equilibrarse

- Prueba de falla en las patas (capacidad de cooperación motora)

0-5 s: 0
6-10 s: 1
11-20 s: 2
21 s o más: 3

- Prueba de postura de la parte superior del cuerpo (prueba de comportamiento asimétrico)

0: 2
1-4: 1
5 o más: 0

Las ratas se anestesiaron con zoletil 14 días después de la inducción isquémica y se sometieron a apertura del pulmón e incisión de la aurícula derecha. Se inyectó una aguja en el ventrículo izquierdo, y luego, se perfundió el corazón con PBS usando una bomba para eliminar el flujo sanguíneo, y luego se extrajo el tejido cerebral. Las secciones de tejido para la construcción de la muestra se incrustaron en parafina sobre la base de bregma. Para verificar el tejido cerebral dañado, las secciones de tejido cerebral se tiñeron con hematoxilina y se deshidrataron, y el portaobjetos se fotografió con una cámara digital y luego se transfirió a un ordenador. El porcentaje de área de infarto se calculó mediante la fórmula 1 utilizando un programa de análisis de imágenes (Image J).

Fórmula 1

Porcentaje de infartos (%) = (el área del hemisferio contralateral - el área intacta del hemisferio ipsilateral) / el área del hemisferio contralateral × 100

Análisis inmunohistoquímico y cuantificación

Se fijaron los tejidos cerebrales con formaldehído al 4% durante 24 horas y se lavaron con PBS. Para la preparación de secciones en parafina, los tejidos se deshidrataron en etanol acumulativo y se incrustaron en parafina. Los tejidos cerebrales incrustados en parafina se cortaron en capas de 4 µm de espesor en un micrótomos, se desparafinaron en xileno durante 10 minutos y luego se rehidrataron en alcohol acumulativo. Los cortes se trataron con ácido cítrico 10 mM durante 1 hora y luego se añadió una solución de BSA al 5% que contenía PBS y Triton X-100 al 0,5%. A partir de entonces, los cortes de tejido cerebral se cultivaron a 4 °C durante 15-17 horas junto con anticuerpos primarios contra ED-1 (Abcam) (1:100), doblecortina (DCX; Abcam, 1:100), proteína ácida fibrosa glial (GFAP; Millipore, 1:100) y α-actina de músculo liso (αSMA; Abcam, 1:100) durante 15-17 horas. Los cortes se cultivaron junto con el anticuerpo primario durante la noche y luego se lavaron con PBS y luego los cortes se cultivaron junto con anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia (Alexa-Fluor®488 o 594, 1500, Molecular Probes, Eugene, OR, EE. UU.) durante 1 hora. Se obtuvieron imágenes de fluorescencia de los cortes utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus IX71).

Secretómica

El secretoma de las células precursoras neurales derivadas de hESC y el secretoma de las células precursoras neurales derivadas de iPSC humanas se separaron en SDS-PAGE usando gel Novex Bis-Tris de gradiente 4-12% (Invitrogen), y luego los geles se tiñeron con reactivo de tinción Gel Code Blue (Pierce) para mostrar bandas de proteínas. Los geles teñidos se cortaron en 10 bandas del mismo tamaño, que luego se sometieron a digestión triptica en gel mediante un método conocido.

Los péptidos preparados por digestión triptica en gel se analizaron mediante el espectrómetro de masas con cuadrupolo de trampa lineal (LTQ) (Thermo Finnigan) acoplado con cromatografía líquida de nano ultra rendimiento (Eksigent Technologies). Específicamente, se aplicaron péptidos tripsinizados a una columna analítica (75 µm x 11 cm) empacutada con resina C18 regular de 5 µm de tamaño. Se logró un gradiente lineal de 45 min desde el 97% de disolvente A (ácido fórmico al 0,1% en agua destilada) hasta el 60% de disolvente B (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo) a una velocidad de flujo de 0,3 µL/min. Los iones peptídicos separados se electroasperjaron en la fuente de ionización de nanoelectroaspersión (ESI). Todos los espectros de MS/MS se adquirieron mediante barridos dependientes de datos en los que se seleccionaron los cinco espectros más abundantes del barrido completo de MS para su fragmentación. El recuento de repeticiones para la exclusión dinámica se estableció en 1, la duración de la repetición fue de 30 segundos, la duración de la exclusión dinámica se estableció en 180 segundos, el ancho de la masa de exclusión fue de 1,5 Da y la lista de exclusión dinámica fue de 50.

La identificación de péptidos y proteínas se investigó a partir de la base de datos ipi.HUMAN v3.76 (89.378 entradas) utilizando el algoritmo Turbo-SEQUEST (Thermo Finnigan). Tras la investigación de la base de datos, los péptidos y proteínas identificados se confirmaron utilizando el andamio 2 (Proteome Software). Entre los péptidos obtenidos de la búsqueda por SEQUEST, se seleccionó un conjunto de péptidos con una probabilidad de PeptideProphet mayor que 0,95. Además, una lista de proteínas que tenían una probabilidad de ProteinProphet superior a 0,99 y también tenían más de dos péptidos únicos obtenidos.

Establecimiento del modelo de lesión de la médula espinal (SCI), inyección de secretoma y prueba de recuperación del comportamiento (prueba de puntuación de BBB)

Después de que los animales experimentales (ratas macho Sprague-Dawley, peso corporal: 250-300 g) fueran anestesiados, se llevó a cabo la extirpación del hueso espinal (laminectomía). Se dejó caer una varilla de 10 g sobre la médula espinal expuesta utilizando un impactador NYU, lo que provocó una lesión de la médula espinal (modelado de SCI). Después de que la herida estuvo bien desinfectada, se suturó la piel. Después de la lesión de la médula espinal, el secretoma de células madre embrionarias pluripotentes (es decir, células precursoras neurales (NPC) derivadas de ESC) de la presente invención se inyectó en un sitio de la herida. Posteriormente, el secretoma se administró por vía intravenosa dos veces más con un intervalo de aproximadamente 3 días. Después de la inyección del secretoma, la prueba de BBB se realizó cada semana. Después de la prueba de BBB durante 8 semanas o más, se llevó a cabo la comparación con el grupo de control.

Análisis estadístico

La significancia estadística entre los grupos se obtuvo usando análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con corrección de Tukey, y se determinó que un valor $p < 0,05$ era estadísticamente significativo.

Resultado 1: Secretoma de células precursoras neurales derivadas de células madre embrionarias (ESC) humanas

Para investigar el alivio de una enfermedad a través del secretoma de células precursoras neurales (NPC) derivadas de ESC humanas en el modelo de accidente cerebrovascular, se probaron los siguientes tres grupos durante 2 semanas. A las 24 h después de la inducción del accidente cerebrovascular, las ratas blancas con la enfermedad inducida confirmada por la prueba de comportamiento se asignaron arbitrariamente en tres grupos y un volumen igual (50 μ L) de secretoma (0,2 mg/kg, volumen 50 μ L), medio o PBS se inyectó en la arteria carótida externa derecha. Se controlaron las condiciones y pesos de los animales a los 3, 7, 10 y 14 días después de la inyección de cada material y se realizó un análisis de comportamiento.

[Tabla 1]

Grupo	Descripción
control con PBS	Grupo tratado con PBS después de la inducción del accidente cerebrovascular
Control con medio	Animal con accidente cerebrovascular tratado con medio basal
Grupo tratado con secretoma	Animal con accidente cerebrovascular tratado con medio cultivado (secretoma) derivado de cultivo de células precursoras neurales

Resultados del análisis de lesiones isquémicas

La inducción de accidente cerebrovascular a través de MCAO permanente en ratas indujo una lesión cerebral extensa. El cerebro se extrajo 14 días después de la inducción del accidente cerebrovascular, y luego se confirmaron el daño y los sitios dañados del cerebro mediante tinción con TTC (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio). La tinción con TTC se produce por una reacción con el sistema de enzimas oxidativas mitocondriales normales en las células, y las mitocondrias dañadas por daño isquémico no se tiñen debido a la alteración del sistema oxidativo, mostrándose de color blanco, lo que puede diferenciar los sitios dañados del cerebro.

Como se muestra en la Figura 1, el daño inducido por la oclusión de la arteria cerebral media apareció principalmente en la corteza y el cuerpo estriado (Figura 1). La inyección del secretoma de células precursoras neurales redujo el área de la lesión isquémica (tamaño del infarto). El control con PBS mostró aproximadamente el daño del 60% del cerebro derecho y el control con medio mostró aproximadamente el 46%, pero el grupo tratado con secretoma mostró un sitio dañado de aproximadamente el 29%, que se redujo significativamente en comparación con los controles.

Resultados del análisis de peso corporal

La inducción del accidente cerebrovascular reduce el rendimiento motor de las ratas, la pérdida de peso inmediata avanzó 7 días y varios agentes de tratamiento indujeron el aumento de peso corporal a través de la recuperación del rendimiento motor. La inyección del secretoma también indujo un aumento de peso corporal similar al trasplante de células (Figura 2). La recuperación del peso corporal fue notable en la recuperación del daño neural. El grupo tratado con secretoma mostró una mejora significativa en comparación con el control con PBS.

Resultados del análisis de comportamiento

El grupo tratado con secretoma mostró un efecto de mejora del comportamiento estadísticamente significativo en comparación con los dos controles en la prueba de barra de equilibrio, y hubo un efecto inmediato, por ejemplo, el efecto se mostró desde el día 3 después del tratamiento (Figura 3a).

Además, el grupo tratado con secretoma mostró un efecto estadísticamente significativo en comparación con los dos controles en el día 7 después del tratamiento (inyección) en la prueba de tracción prensil (Figura 3b).

Además, la inyección del secretoma mostró el efecto de reducción en la frecuencia de falla en las patas en una red (Figura 3c). La inyección del secretoma también mostró una mejora en cruce de línea para medir la actividad del comportamiento por unidad de tiempo (Figura 3d).

Análisis de la puntuación modificada de la gravedad neurológica (mNSS)

La prueba de puntuación modificada de la gravedad neurológica (mNSS) es una tabla compuesta para medir funciones neurológicas. Se evaluaron los ítems motor (estado muscular) y sensorial (visión, tacto y propioceptivo). La puntuación normal es 0 y cuanto más alta es, más graves son las disfunciones. Como se muestra en la Figura 4, el grupo tratado con secretoma mostró un efecto de tratamiento significativamente mayor (mejora del comportamiento) desde el tratamiento temprano en el análisis de mNSS, en comparación con el control con PBS y el control con medio (Figura 4).

En la prueba de mNSS, el control con PBS mostró que la puntuación media fue 5,4 el día 1 y 5,5 el día 14 después de la inducción isquémica, lo que indica que los trastornos neuroconductuales provocados por el accidente cerebrovascular se mantuvieron. El control con medio mostró un efecto de mejora temporal del comportamiento en el día 3 de tratamiento, pero no ejerció un efecto de mejora adicional. Mientras que, el grupo tratado con secretoma mostró un efecto de mejora continua del comportamiento desde el día 3 de tratamiento (puntuación de mNSS: 4,5) hasta el día 10 de tratamiento (puntuación de mNSS: 3).

Análisis del secretoma

El secretoma obtenido a partir de células precursoras neurales derivadas de iPSC incluye las siguientes proteínas: Agrina, anexina A5, BSG (Basigina), biglicano, calponina 3, proteína de tipo coactosina, cofilina 1, colágeno alfa-2, cullina 3, destrina, distroglicano, efrina B2, exportina 2, ezrina, fibronectina, fibulina 1, proteína relacionada con el encrespado, proteína de unión a galectina 3, granulinas, factor 11 de crecimiento/diferenciación, haptoglobina, hemopexina, proteína B2 del grupo de alta movilidad, hornerina, importina 9, proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, proteína La de lupus, factor inhibidor de la migración de macrófagos, midquina, moesina, neuropilina 2, pleiotrofina, profilina 1, proteína DJ-1, radixina, proteína 2 secretada relacionada con el encrespado, septina 11, talina 1, testicano, timopoyetina, transgelina 3 y vimentina.

El secretoma obtenido a partir de células precursoras neurales derivadas de células madre embrionarias humanas incluye las siguientes proteínas: agrina, anexina A2, atractina, biglicano, ceruloplasmina, cofilina 1, colágeno alfa-1, coronina 1X, dermicidina, DERP12, efrina B3, exostosina 2, ezrina, proteína de unión a galectina 3, granulinas, factor 11 de crecimiento/diferenciación, haptoglobina, hemopexina, proteína B2 del grupo de alta movilidad, hornerina, proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, proteína La de lupus, midquina, moesina, proteína 8 de los dominios similares al factor de crecimiento epidérmico múltiple, nidógeno 1, paratimosina, profilina 2, proteína DJ-1, proteína 2 secretada relacionada con el encrespado, secretogranina, talina 1, timosina beta-4, TGFBI (proteína ig-h3 inducida por el factor beta de crecimiento transformante), transgelina y vimentina.

Efecto del tratamiento de la lesión de la médula espinal

Se estableció el modelo de lesión de la médula espinal (SCI) y se inyectaron directamente aproximadamente 30 μ L del secretoma de células precursoras neurales (NPC) derivadas de células madre pluripotentes (ESC) en cinco sitios de lesión. A continuación, se inyectaron por vía intravenosa aproximadamente 200 μ g (200 μ L) del secretoma dos veces a intervalos de aproximadamente 3 días. La recuperación del comportamiento semanal se evaluó de acuerdo con la prueba de recuperación de lesión de la médula espinal (prueba de BBB). La prueba de BBB es un método de prueba que los investigadores de lesiones de la médula espinal conocen bien. La prueba de BBB se realizó durante 8 semanas o más, y mostró una excelente recuperación del comportamiento en el grupo de inyección de secretoma en comparación con el control sin tratar (Figura 12).

Resultado 2: Secretoma de células precursoras neurales derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) humanas + Administración de múltiples dosis

Con el fin de investigar el alivio de una enfermedad mediante la administración de una sola dosis y la administración de múltiples dosis del secretoma de las células precursoras neurales (NPC) en el modelo de accidente cerebrovascular, se probaron los siguientes cuatro grupos durante 2 semanas. El programa experimental se muestra en la Figura 5.

[Tabla 2]

Grupo	Descripción
Grupo de control	Sin tratamiento después de la inducción del accidente cerebrovascular
Grupo de control con medio	Tratamiento con medio utilizado para el cultivo de células precursoras neurales después de la inducción del accidente cerebrovascular
Grupo de tratamiento con una sola dosis de secretoma	Tratamiento con una sola dosis de un medio acondicionado de células precursoras neurales después de la inducción del accidente cerebrovascular
Grupo de tratamiento con cuatro dosis de secretoma	Tratamiento con cuatro dosis de un medio acondicionado de células precursoras neurales después de la inducción del accidente cerebrovascular

Las Figuras 6a a 6i muestran los resultados experimentales de la administración de una sola dosis frente a la administración de cuatro dosis del secretoma de células precursoras neurales derivadas de células madre pluripotentes inducidas. Puede verse que se observaron excelentes efectos de mejora del comportamiento en el grupo de tratamiento de cuatro dosis de secretoma (Secretoma M) en comparación con los otros grupos en casi todas las condiciones. Es decir, se confirmó que, con respecto a la mejora del comportamiento, el grupo de administración de múltiples dosis mostró efectos de tratamiento muy significativos en comparación con el grupo de administración de una sola dosis.

Análisis de peso corporal

El grupo de administración de una sola dosis de secretoma y el grupo de administración de dosis múltiple de secretoma mostraron una mejora significativa en el día 3 de tratamiento en comparación con el grupo de control con PBS (Figura 6i). Sin embargo, la diferencia de peso corporal entre los grupos perdió significancia estadística con el paso del tiempo.

Análisis de comportamiento

En la prueba de torsión del torso, el grupo de tratamiento de múltiples dosis de secretoma indujo un efecto de mejora estadísticamente significativo en el movimiento asimétrico del torso izquierdo, que corresponde al sitio de la lesión cerebral, en comparación con los otros grupos (Figura 6b). Mientras que, no se observó una significancia estadística en el movimiento asimétrico del torso derecho, que corresponde al sitio no lesionado, excepto el día 10 en el grupo de administración de múltiples dosis del secretoma (Figura 6c).

La administración repetida del secretoma mostró una tendencia a reducir la frecuencia de falla en las patas en una red, pero no se mostró una significancia estadística del grupo de control excepto el día 14 (Figura 6d). La administración de una sola dosis y la administración de múltiples dosis del secretoma también mostraron una tendencia de mejora en el cruce de línea, que mide la actividad conductual por unidad de tiempo (Figura 6e).

Se confirmó que la administración de una sola dosis y la administración de múltiples dosis del secretoma tienen una tendencia a inducir una mejora en la puntuación de posición vertical cuando se compara con los otros grupos experimentales (Figura 6f). La administración de múltiples dosis del secretoma mostró un efecto de mejora del comportamiento estadísticamente significativo en la prueba de barra de equilibrio en comparación con los dos grupos de control, y este efecto se mostró desde el día 3 de tratamiento, lo que indica un efecto inmediato (Figura 6g). Además, la administración de múltiples dosis del secretoma mostró un efecto estadísticamente significativo en la prueba de tracción prensil el día 7 de tratamiento (inyección) en comparación con los dos grupos de control (Figura 6h).

Análisis de puntuación modificada de la gravedad neurológica (mNSS)

Como se muestra en la Figura 6a, en el análisis de mNSS, el grupo de tratamiento de múltiples dosis de secretoma mostró un efecto de tratamiento significativamente mayor (mejora del comportamiento) desde el tratamiento temprano en comparación con el control con PBS y el control con medio. El grupo de tratamiento con una sola dosis de secretoma también ejerció un efecto de tratamiento significativo en comparación con los grupos de control durante el período experimental, y mostró un efecto de mejora del comportamiento superior en comparación con el grupo de control con medio.

Análisis del sitio de la lesión isquémica

La Figura 7 muestra el efecto del secretoma derivado de células precursoras neurales (NPC) sobre el tamaño del infarto 14 días después de la administración en el modelo pMCAo de rata. Se muestran imágenes representativas después de 14 días de tratamiento en ratas a las que se les administró PBS (Control), medio (Blanco), administración de una sola dosis de secretoma derivado de NPC (Secretoma S) o administración repetida de secretoma derivado de NPC (Secretoma M). Se muestra el efecto del secretoma derivado de células precursoras neurales sobre el tamaño del infarto después de 14 días en el modelo pMCAo de rata. * $P < 0,01$ para la administración de una sola dosis y la administración de múltiples dosis en comparación con el grupo de PBS. Especialmente, se confirmó que la administración de múltiples dosis tuvo un efecto de mejora significativo de $P < 0,05$ en comparación con el grupo de control con medio (blanco).

Efecto antiinflamatorio: reducción de células positivas para ED-1

5 Las Figuras 8a-8b muestran que el tratamiento con el secretoma derivado de NPC redujo la frecuencia de células positivas para ED-1 en el cuerpo estriado ipsilateral, y la administración repetida de secretoma indujo significativamente la reducción de células positivas para ED-1. Barra de escala: 200 μ m. El número de células positivas para ED-1 se midió en al menos cinco regiones microscópicas separadas. Los valores de medición son la media $\pm$ S.E.M. * P <0,001 cuando se compara entre el grupo de control y el grupo de administración repetida de secretoma

10 Efecto antiinflamatorio: reducción de células positivas para GFAP

15 Las Figuras 9a-9b muestran que el tratamiento con el secretoma derivado de NPC redujo la frecuencia de células positivas para GFAP en el cuerpo estriado ipsilateral, y la administración repetida del secretoma indujo significativamente la reducción de células positivas para GFAP. Especialmente, la expresión de GFAP también indujo una reducción significativa en el grupo de tratamiento repetido con secretoma en comparación con el grupo de control con medio (Blanco). Barra de escala: 200 μ m. El número de células positivas para GFAP se midió en al menos cinco regiones microscópicas separadas. Los valores de medición son la media $\pm$ S.E.M. * P <0,05 y *** P <0,001 cuando se realizaron comparaciones múltiples entre los grupos.

20 Efecto de movilización de las células madre endógenas

25 La Figura 10 muestra la movilización de células madre neurales endógenas debido a la administración del secretoma en tejidos cerebrales de rata. La prueba se llevó a cabo después de 14 días de la administración del secretoma. Se observaron células positivas para DCX (rojo) en el cerebro isquémico de rata. Barra de escala: 500 μ m.

Efecto de aumento de vasos nuevos

30 La Figura 11 muestra que el tratamiento con secretoma derivado de NPC redujo la frecuencia de vasos positivos para α -SMA en el cuerpo estriado ipsilateral, y la administración repetida de secretoma aumentó significativamente el número de vasos. El número de vasos positivos para α -SMA se midió en al menos en cinco regiones microscópicas separadas. Los valores de medición son la media $\pm$ S.E.M. * P <0,005 cuando se compara entre el grupo de control y el grupo de administración repetida de secretoma (Secretoma M).

REIVINDICACIONES

1. Una composición para uso en el tratamiento de enfermedad cerebrovascular isquémica, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de cuerpos de Lewy, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica o lesión de la médula espinal, comprendiendo la composición el secretoma de células precursoras neurales (NPC) positivas para la molécula de adhesión celular neural polisialiladas (PSA-NCAM) como ingrediente activo,
 5 en la que las células precursoras neurales positivas para PSA-NCAM se separan de las rosetas neurales diferenciadas de células madre pluripotentes, y las células madre pluripotentes son células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas (iPSC),
 10 en la que el secretoma está contenido en un líquido de cultivo celular obtenido mediante el cultivo de células precursoras neurales positivas para PSA-NCAM en medio de cultivo celular,
 en la que el secretoma se obtiene eliminando las células del medio de cultivo celular.
- 15 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las células precursoras neurales son células precursoras neurales antes o después de una etapa de rosetas neurales diferenciadas de las células madre pluripotentes.
- 20 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el medio acondicionado celular se obtiene cultivando las células precursoras neurales en un medio de cultivo celular libre de suero que comprende insulina/transferrina/selenio (ITS) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGT) y luego eliminando las células.
- 25 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el secretoma comprende las siguientes proteínas: agrina, anexina A5, basigina (BSG), biglicano, calponina 3, proteína similar a la coactosina, cofilina 1, colágeno alfa-2, cullina 3, destrina, distroglicano, efrina B2, exportina 2, ezrina, fibronectina, fibulina 1, proteína relacionada con el encrespado, proteína de unión a galectina 3, granulinas, factor 11 de crecimiento/diferenciación, haptoglobina, hemopexina, proteína B2 del grupo de alta movilidad, hornerina, importina 9, proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, proteína La de lupus, factor inhibidor de la migración de macrófagos, midquina, moesina, neuropilina 2, pleiotrofina, profilina 1, proteína DJ-1, radixina, proteína 2 secretada relacionada con el encrespamiento, septina 11, talina 1, testicano, timopoyetina, transgelina 3 y vimentina.
- 30 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el secretoma comprende las siguientes proteínas: agrina, anexina A2, atractina, biglicano, ceruloplasmina, cofilina 1, colágeno alfa-1, coronina 1X, dermicidina, DERP12, efrina B3, exostosina 2, ezrina, proteína de unión a galectina 3, granulinas, factor 11 de crecimiento/diferenciación, haptoglobina, hemopexina, proteína B2 del grupo de alta movilidad, hornerina, proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a insulina, proteína La de lupus, midquina, moesina, proteína 8 de dominios múltiples similares al factor de crecimiento epidérmico, nidógeno 1, paratimosina, profilina 2, proteína DJ-1, proteína 2 secretada relacionada con el encrespado, secretogranina, talina 1, timosina beta-4, proteína ig-h3 inducida por el factor beta de crecimiento transformante (TGFBI), transgelina y vimentina.
- 35 6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad cerebrovascular isquémica es accidente cerebrovascular isquémico.
- 40 7. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición es para administración de una sola dosis.
- 45 8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición es para administración de múltiples dosis.
- 50 9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las células precursoras neurales positivas para PSA-NCAM se separan de las rosetas neurales, que se diferencian de las células madre pluripotentes, utilizando un anticuerpo anti-PSA-NCAM.

Fig. 1

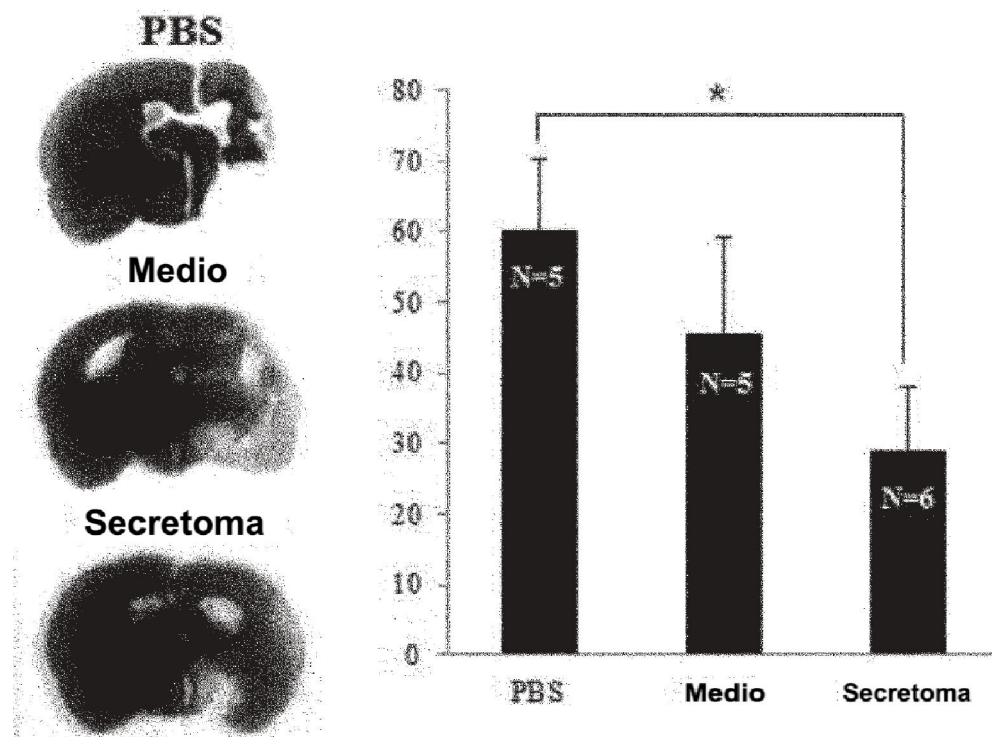


Fig. 2

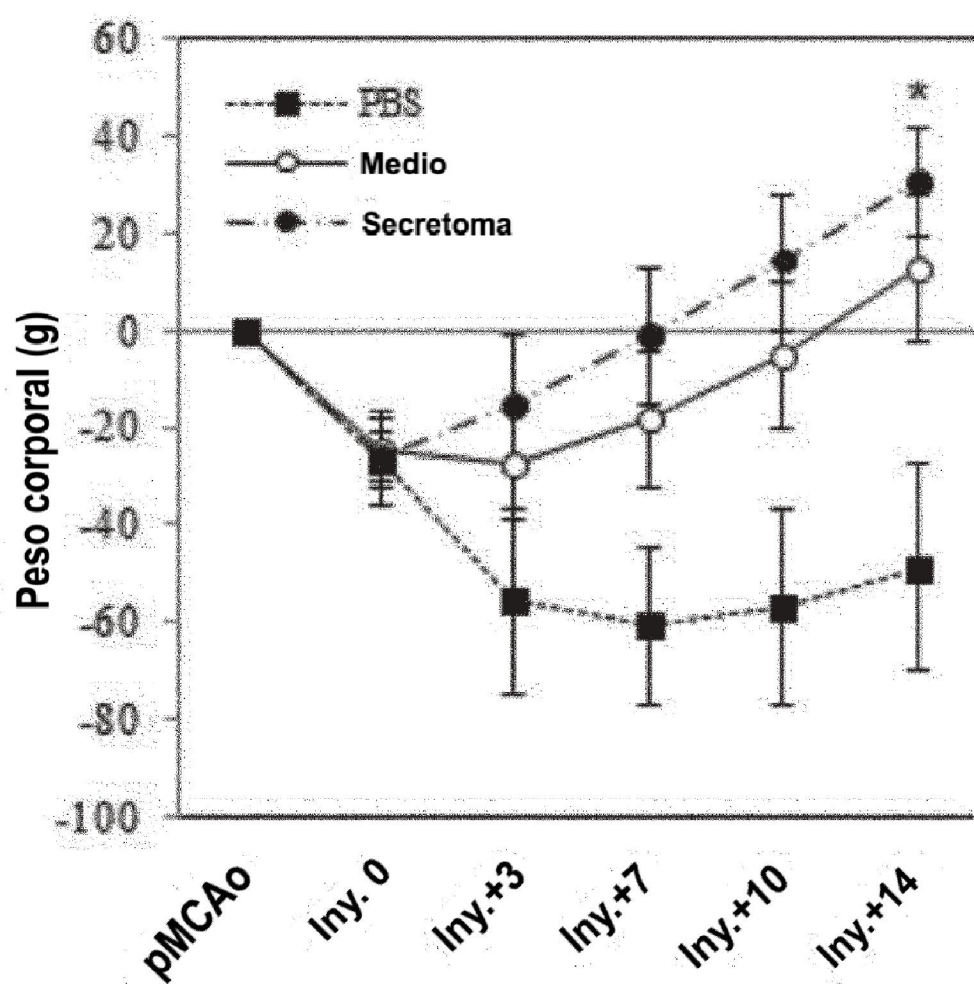


Fig. 3a

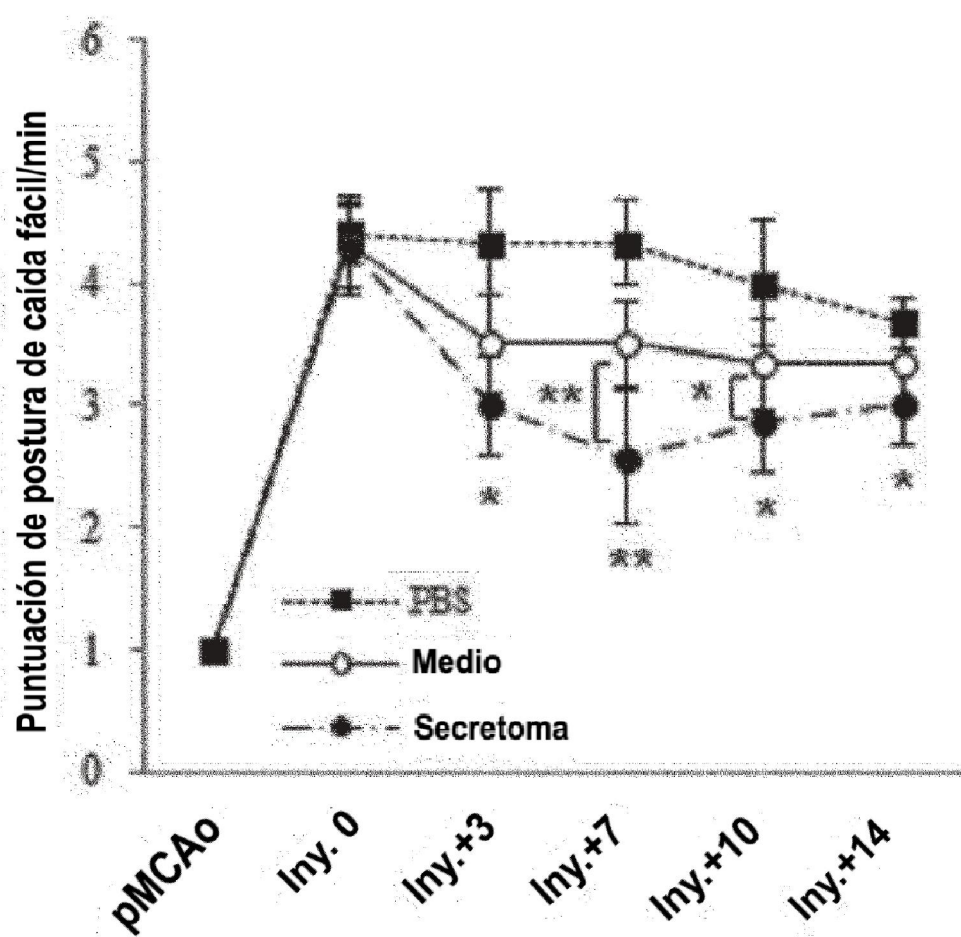


Fig. 3b

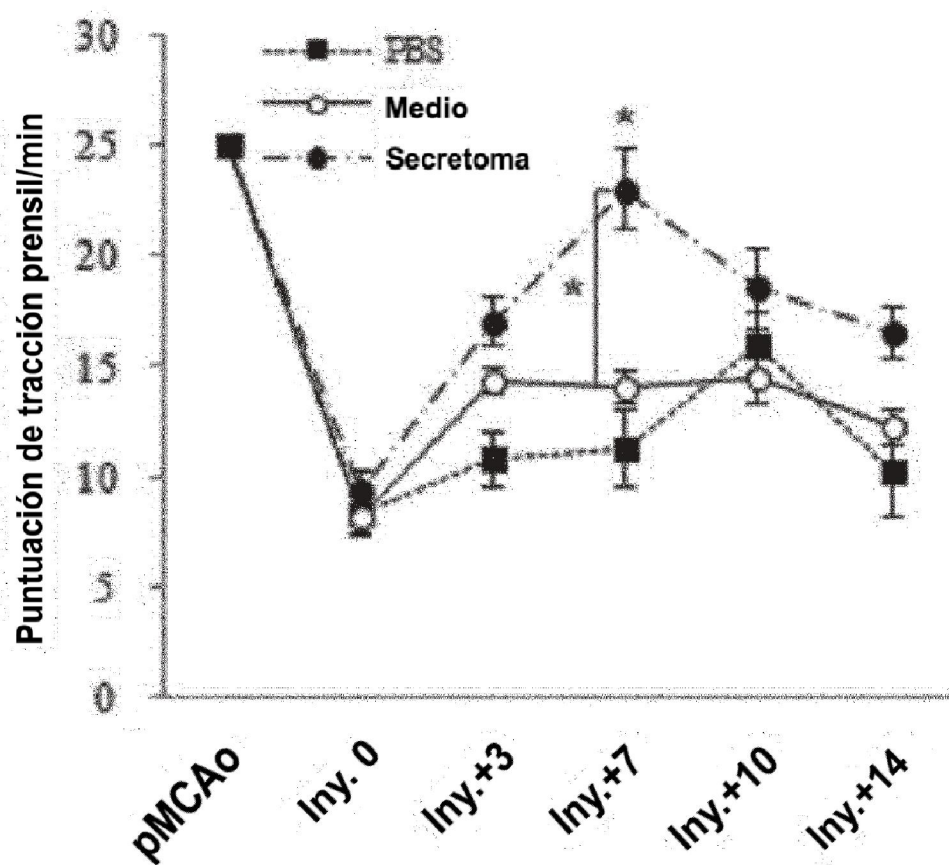


Fig. 3c

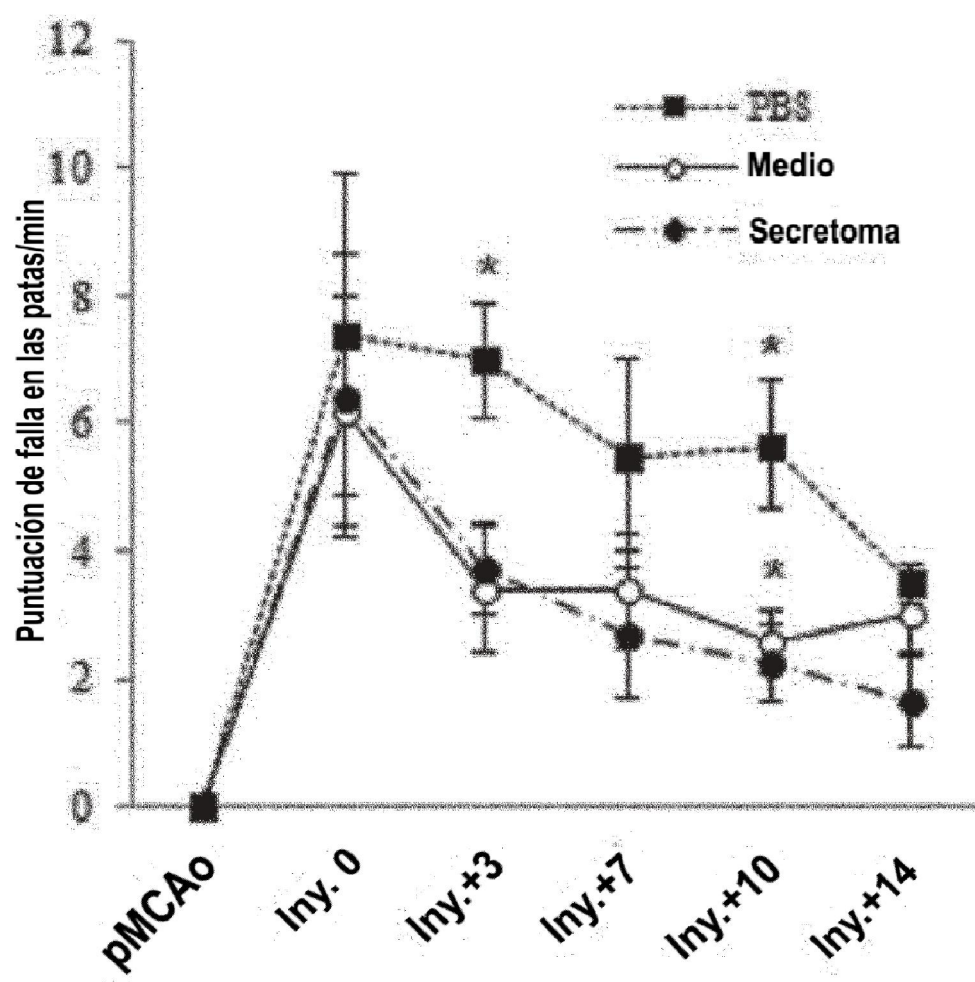


Fig. 3d

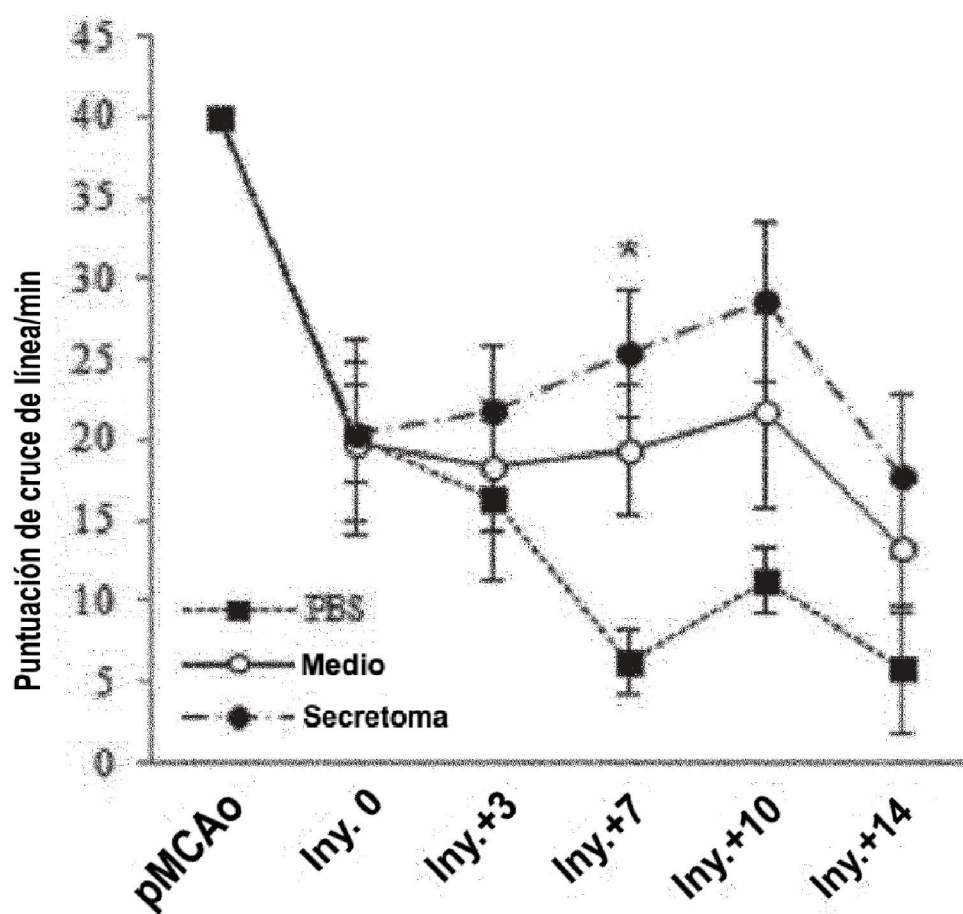


Fig. 4

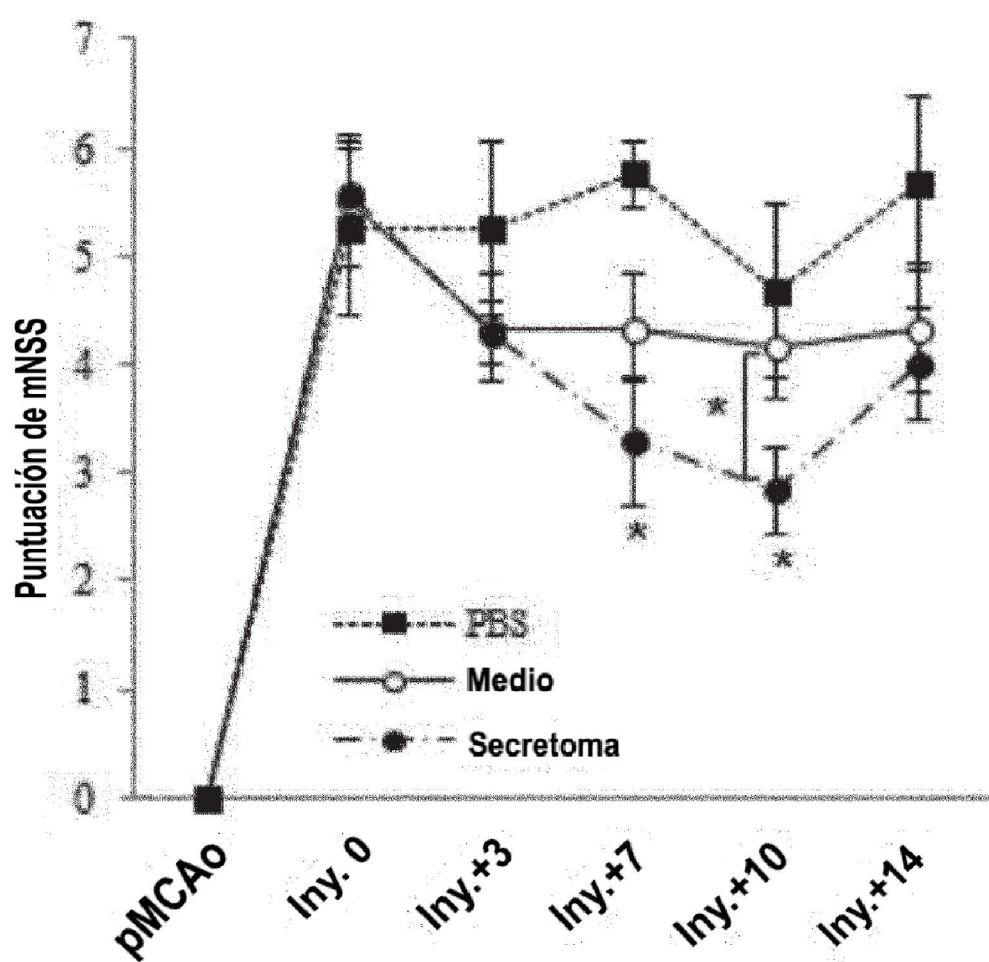


Fig. 5

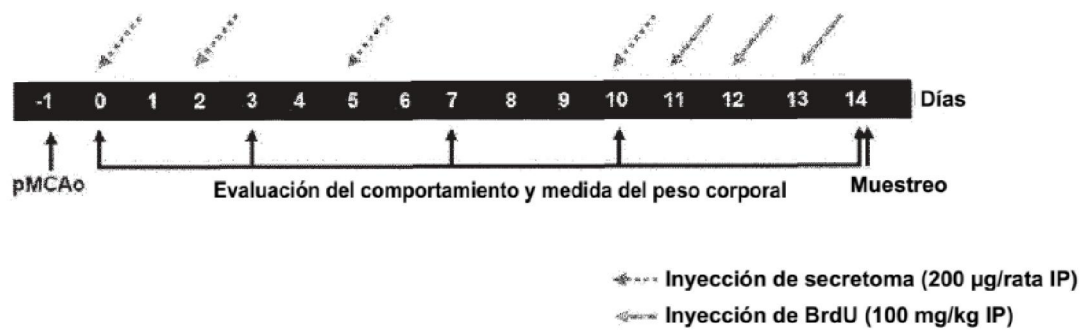


Fig. 6a

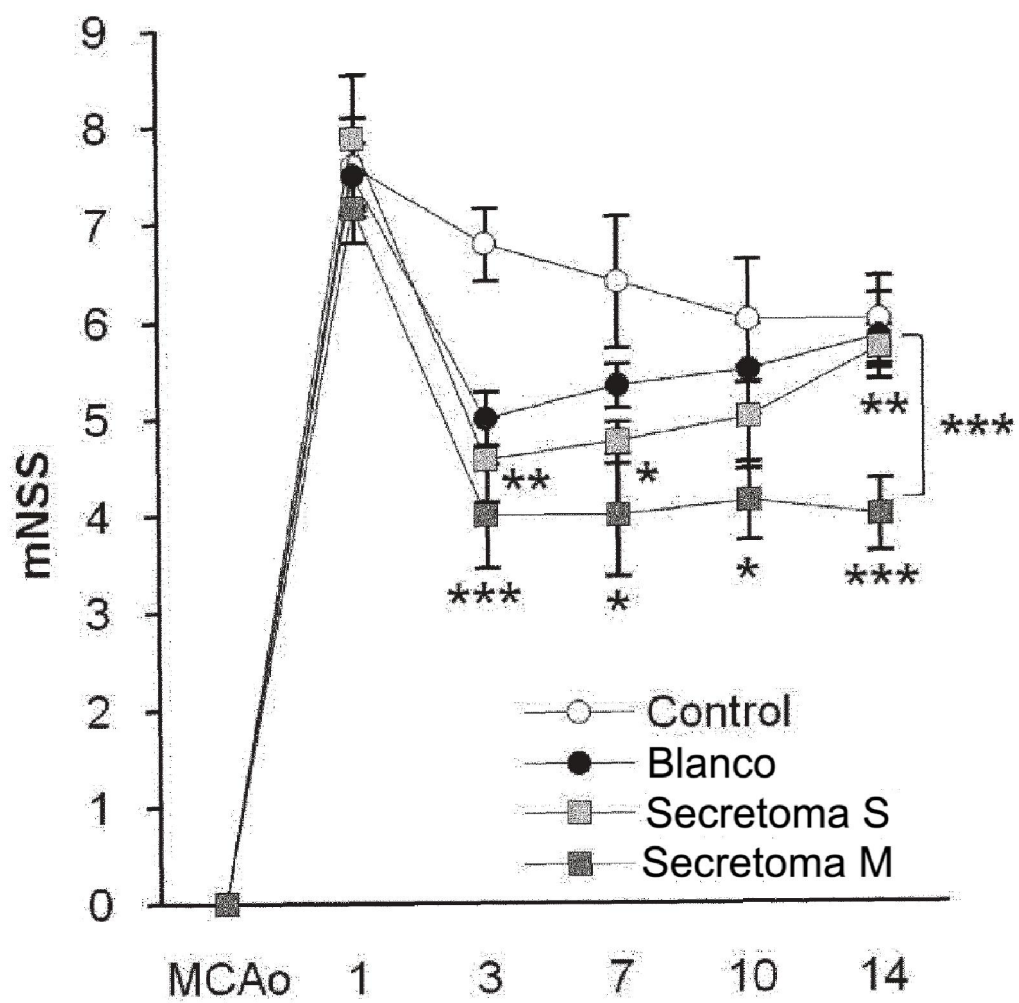


Fig. 6b

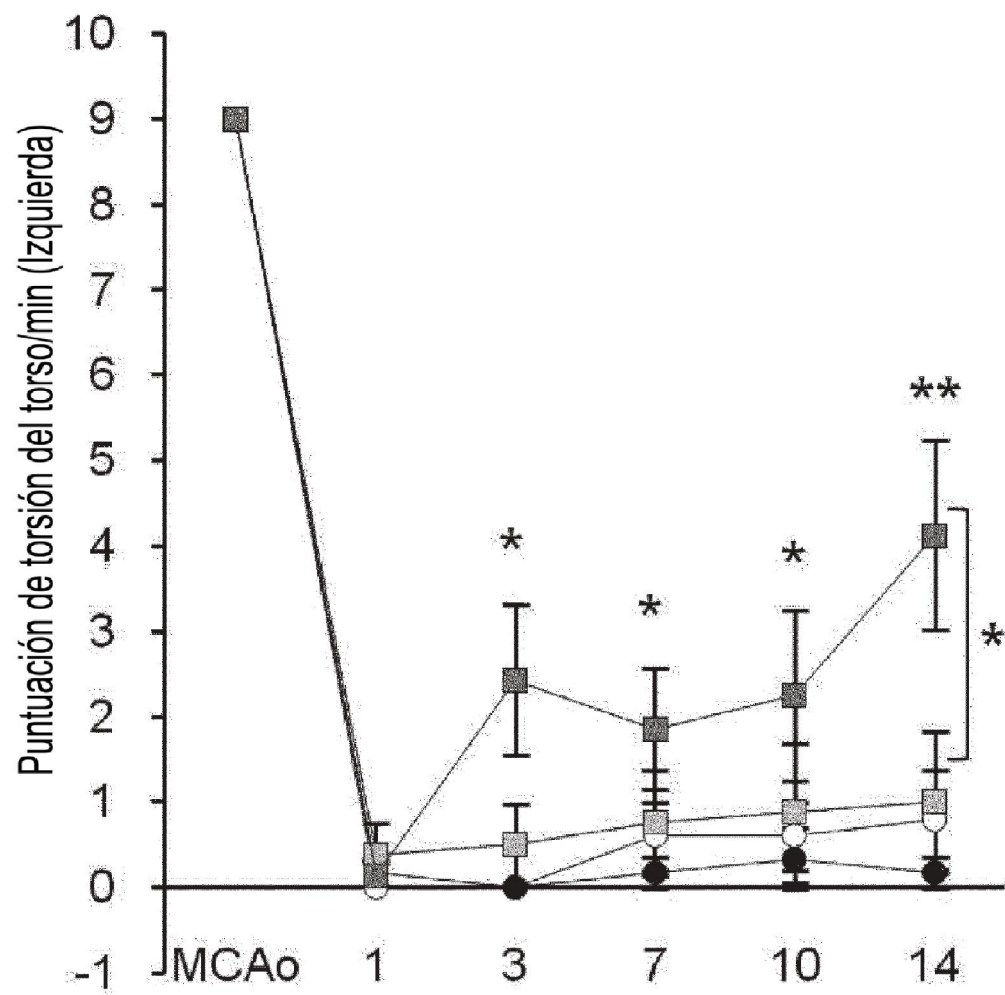


Fig. 6c

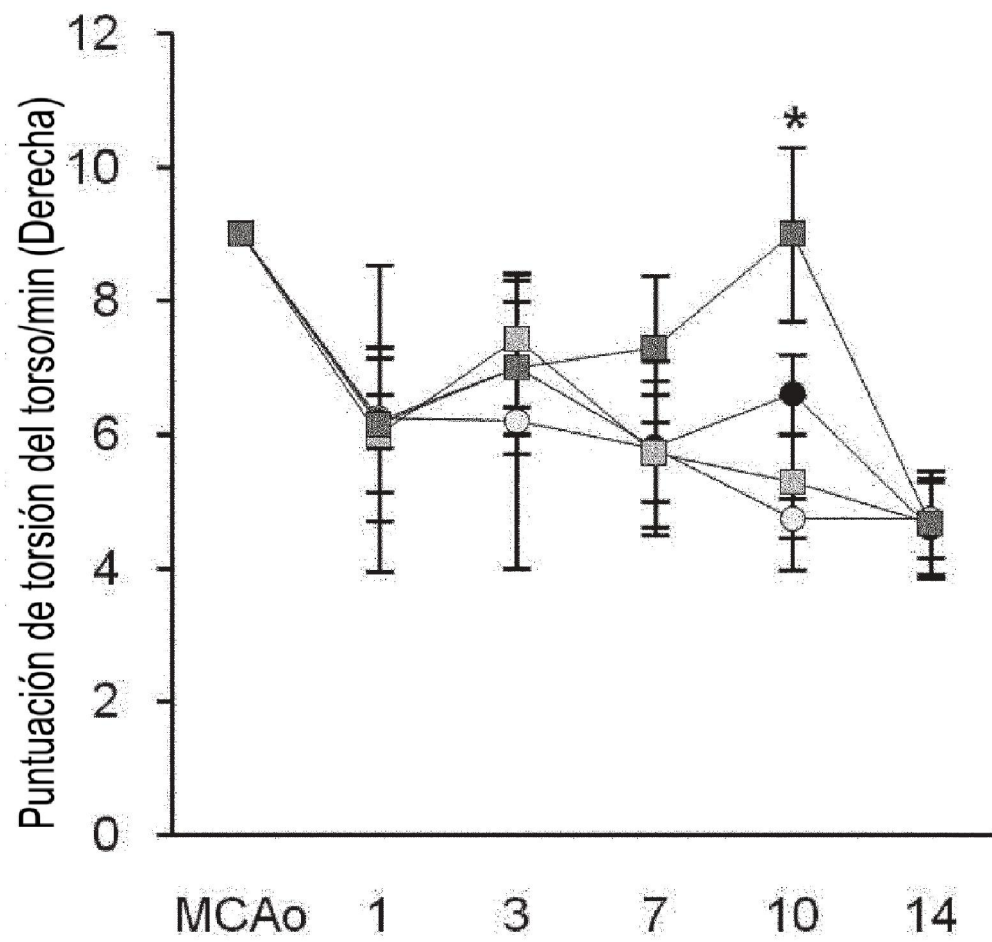


Fig. 6d

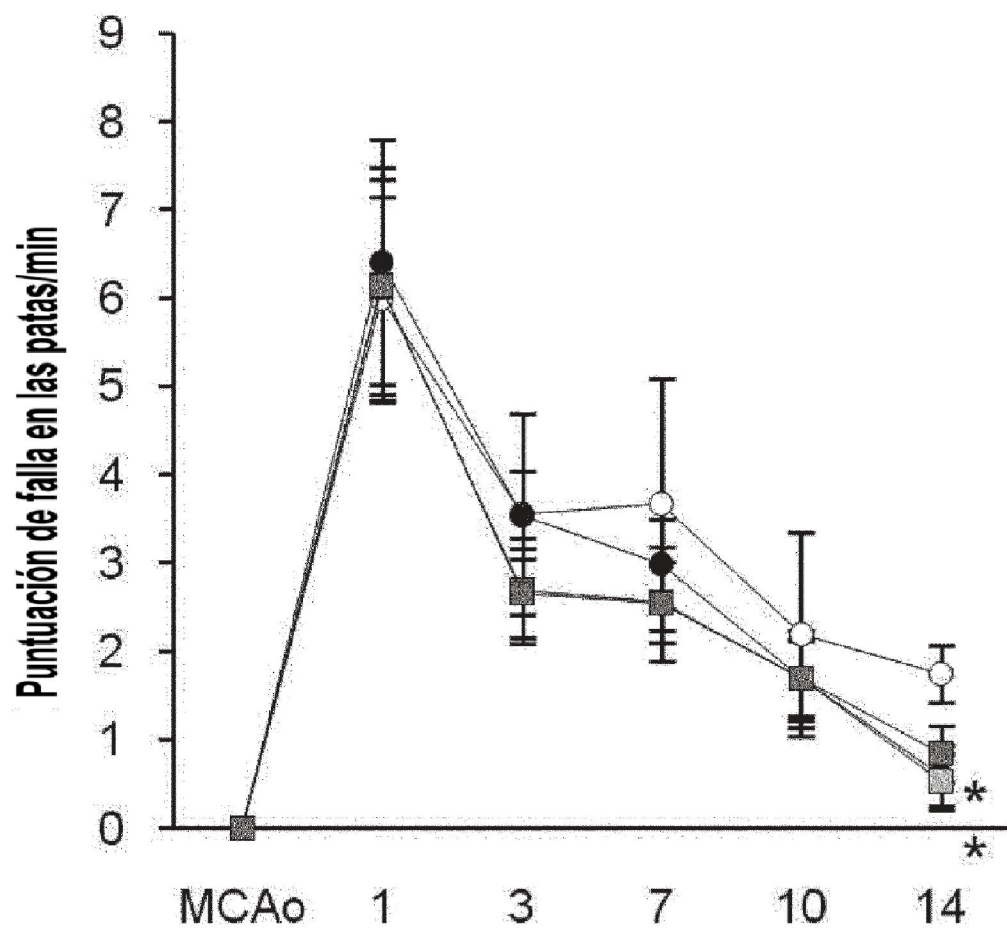


Fig. 6e

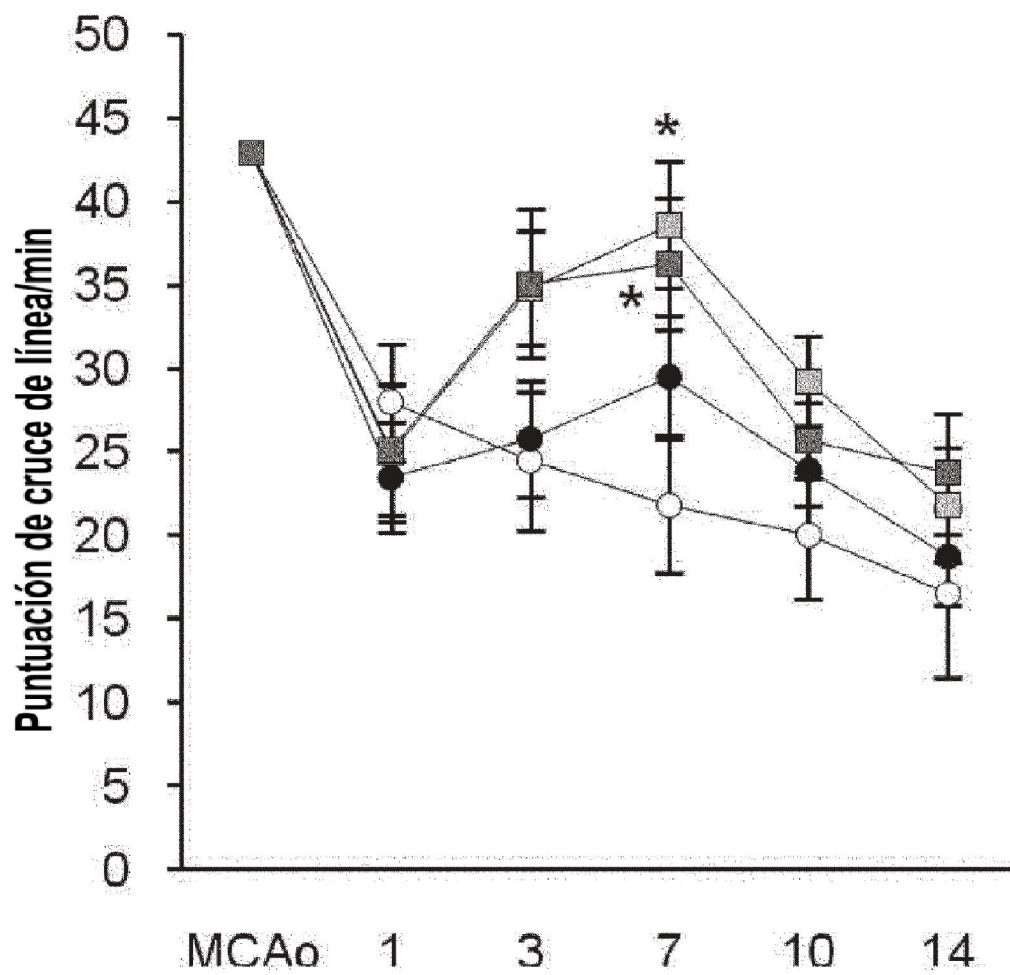


Fig. 6f

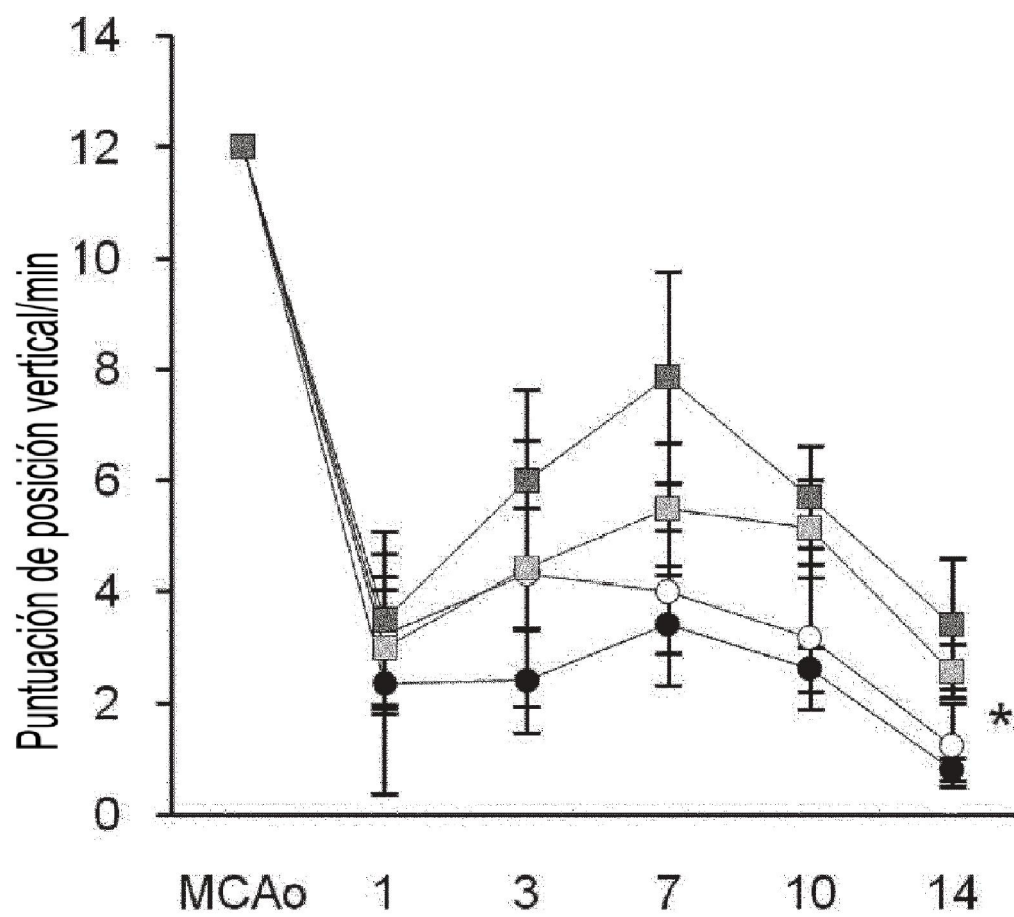


Fig. 6g

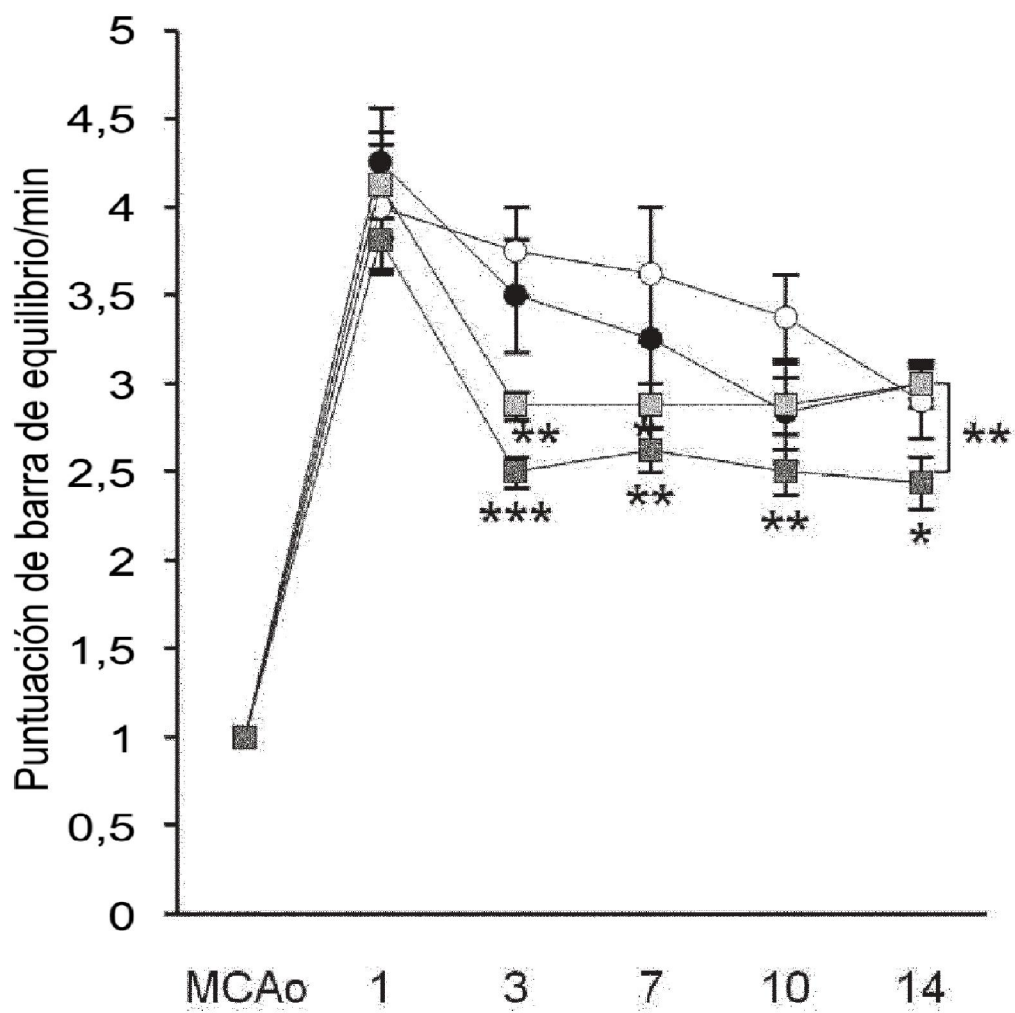


Fig. 6h

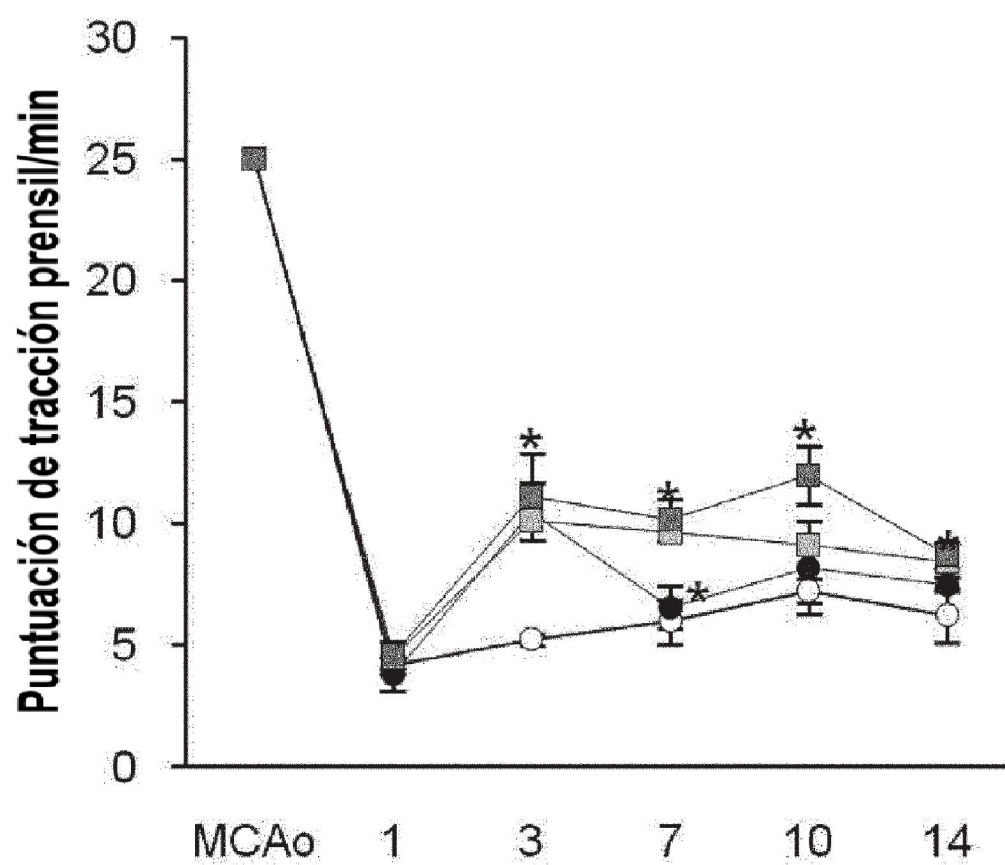


Fig. 6i

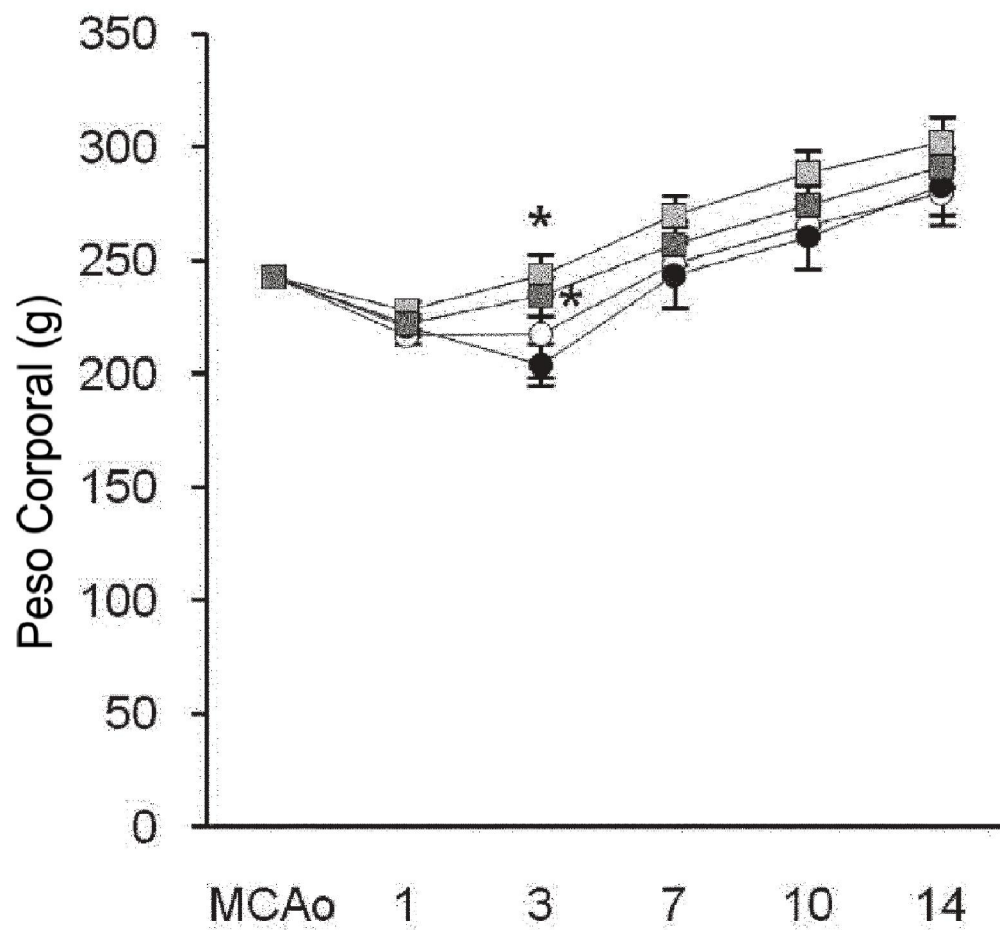


Fig. 7

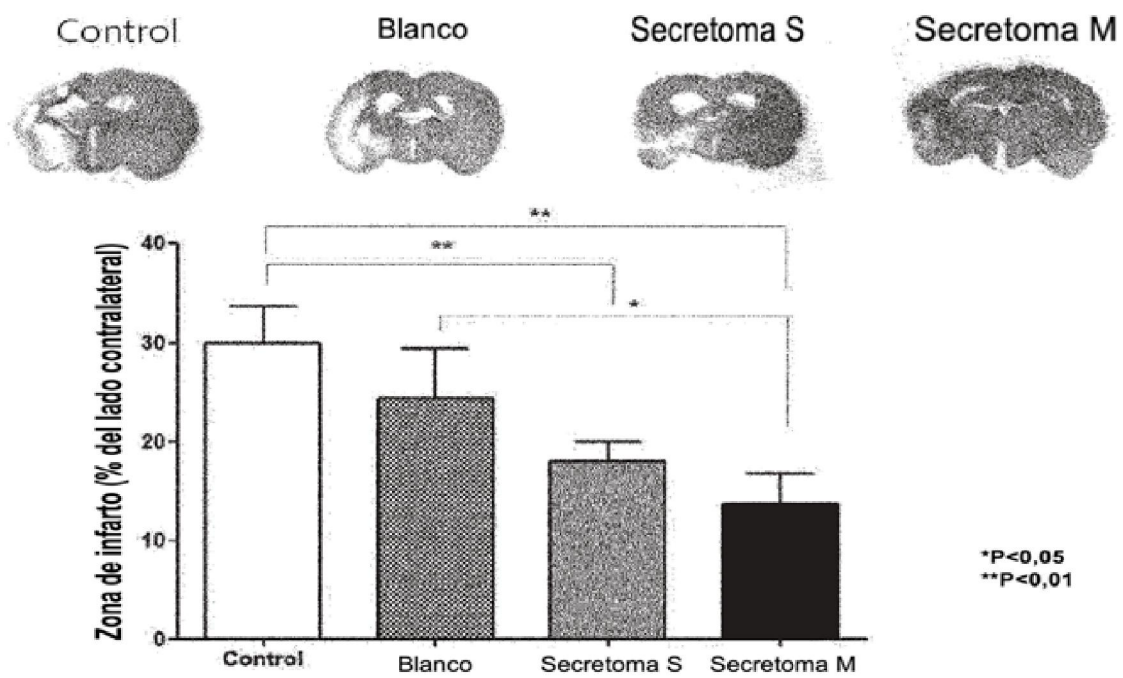


Fig. 8a

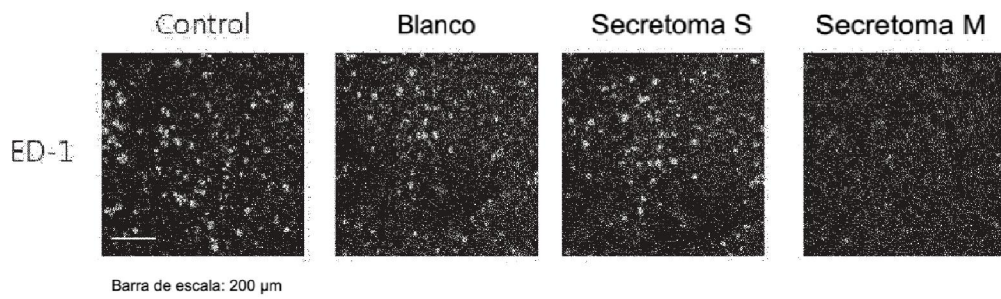


Fig. 8b

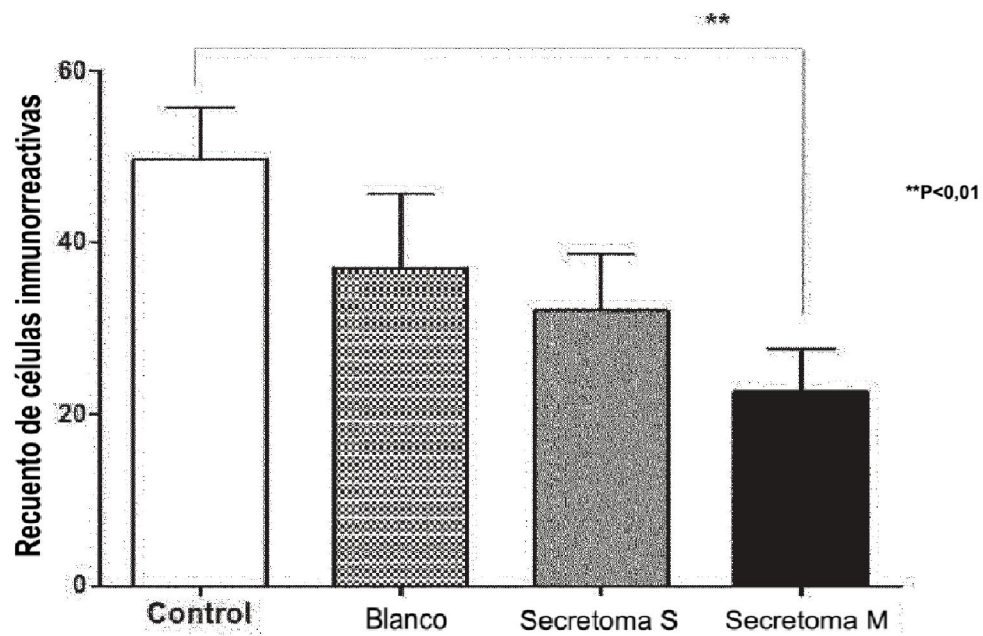


Fig. 9a

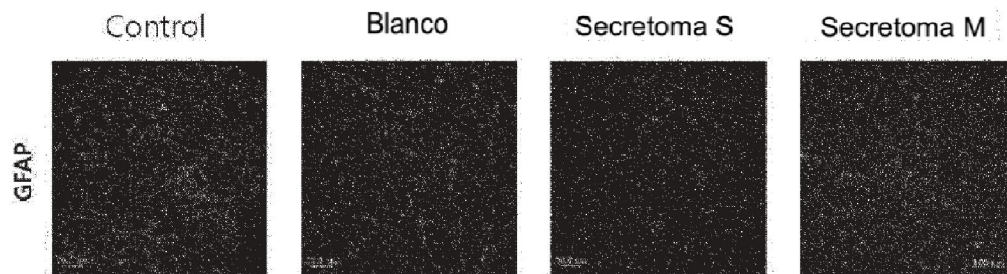


Fig. 9b

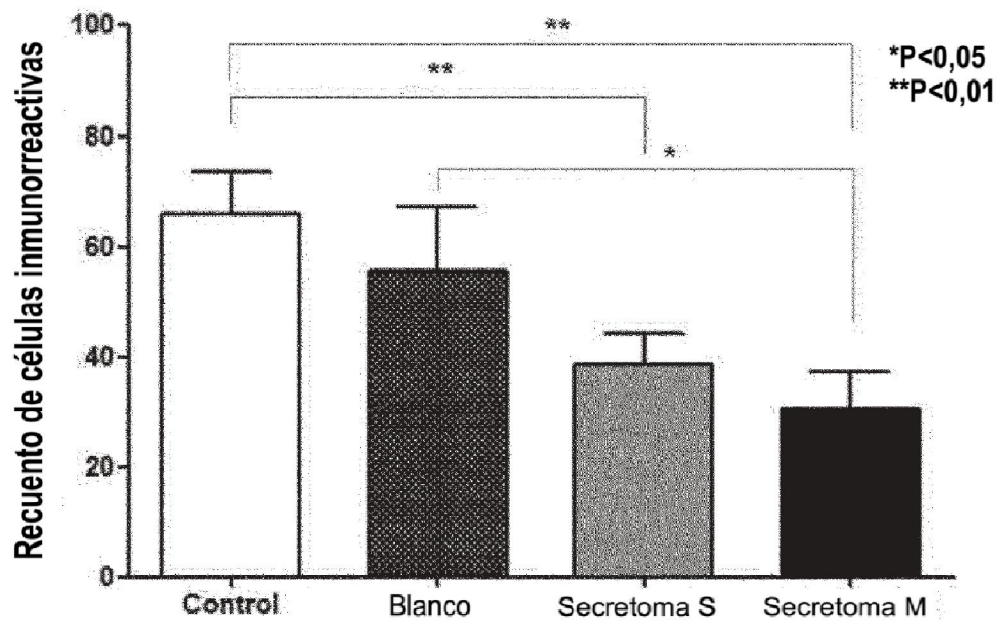


Fig. 10

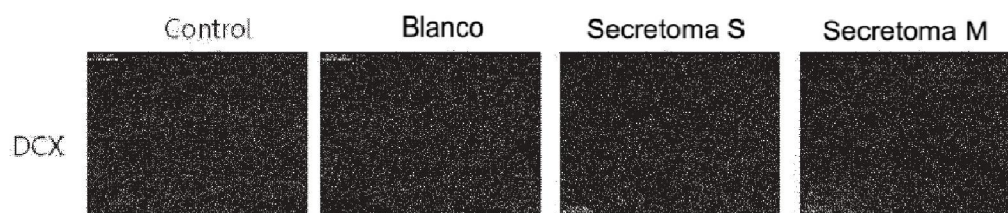


Fig. 11

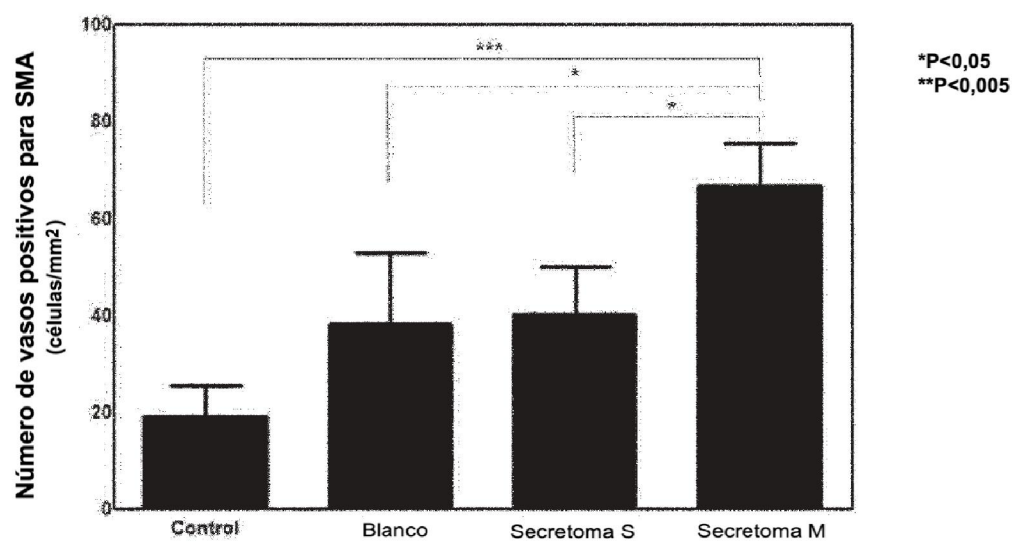


Fig. 12

