

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 356**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2006.01)

C12N 5/0786 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2012 PCT/IL2012/050522**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13088441**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2012 E 12858248 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2790712**

54 Título: **Subpoblación de monocitos humanos para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central**

30 Prioridad:
14.12.2011 US 201161570593 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2017

73 Titular/es:
**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)
At the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:
**EISENBACH-SCHWARTZ, MICHAL;
YOLES, ESTER;
SHECHTER, RAVID y
MILLER, OMER**

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 604 356 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

Subpoblación de monocitos humanos para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a lesiones del sistema nervioso central (SNC) y, en particular, a subpoblaciones de monocitos humanos para uso en el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central, en particular, en el tratamiento de pacientes que padecen lesiones de la médula espinal.

Antecedentes de la invención

10 Las lesiones del sistema nervioso central, incluyendo las lesiones en la médula espinal, están entre las lesiones más devastadoras e incapacitantes posibles. Dependiendo de la gravedad de la lesión, puede ocurrir una parálisis de diversos grados. La paraplejía y la tetraplejía suelen ser la consecuencia de una lesión grave en la médula espinal.

15 La incidencia anual mundial de las lesiones de la médula espinal (LME) se estima en 22 personas por millón y el número total de sobrevivientes de LME se estima en 2,5 millones. Las LME ocurren con mayor frecuencia en personas con unos veinticinco años que pueden anticipar una esperanza de vida casi normal, aunque con dificultades para mantener una calidad de vida aceptable. Esto genera importantes problemas personales, sociales y económicos. Aunque la esperanza de vida es muy buena, los pacientes con LME sufren de algunas desventajas importantes (en función del nivel y la gravedad de la lesión) que disminuyen seriamente su calidad de vida (por ejemplo, parálisis, pérdida de la sensibilidad, dolor intratable, úlceras por presión, e infecciones urinarias y otras). A pesar del intenso trabajo que se ha invertido por las comunidades científicas y clínicas durante las dos últimas décadas, hasta ahora no existe cura o tratamiento que pueda revertir las funciones perdidas después de la LME.

20 Hasta la fecha, los esfuerzos terapéuticos se centraron principalmente en la prevención de los eventos destructivos (neuroprotección) y menos en aumentar los sucesos de reparación espontáneos evocados por las LME. La posterior recuperación de la función requerirá una combinación de intervenciones terapéuticas eficaces de neuroprotección y restauración. Las anteriores consideraciones han llevado a los inventores a seguir un nuevo enfoque fisiológico que emplea el sistema de curación específico del cuerpo, el sistema inmunológico, para luchar con las consecuencias del daño del sistema nervioso central (SNC) que conducen a la neuroprotección y a la restauración.

25 Se ha demostrado en el laboratorio de los inventores que los monocitos derivados de la sangre incubados con segmentos de la piel adquieren un fenotipo no inflamatorio similar a los monocitos M2 antiinflamatorios descritos en la literatura (Bomstein et al., 2003). La inyección de los monocitos en la médula espinal lesionada indujo una mejor recuperación de LME en las ratas (documentos de EE.UU. 5.800.812; 6.117.424; y 6.267.955). Este enfoque fue probado en un estudio clínico en pacientes que padecían lesiones de la médula espinal severa aguda mostrando resultados alentadores (documento WO 03/044037; Knoller et al., 2005). En consecuencia, el tratamiento requiere un procedimiento quirúrgico que incluye la laminectomía para exponer la médula espinal dañada y la inyección de las células de las fronteras de la zona de la lesión, lo cual era difícil de asignar. Los inventores consideraron que el hallazgo de formas de superar la dificultad de asignar el sitio de la lesión y la exposición de los pacientes a un procedimiento invasivo serían útiles en el tratamiento de la LME.

30 Una investigación más reciente realizada en el laboratorio de los inventores mostró que después de una lesión de la médula espinal, a los tres o cuatro días, los monocitos presentes en la sangre después de la lesión se infiltraron en forma espontánea al SNC dañado, preferentemente se acumulan en los márgenes de la zona de la lesión y juegan un papel fundamental en el proceso de recuperación. Estas células modulan la actividad inmune en el tejido lesionado volviéndose menos inflamatorias, y producen moléculas que apoyan la curación y que, por lo tanto, son favorables para la renovación celular y la reparación de tejidos (Shechter et al., 2009). A pesar de su papel positivo, en lesiones graves, fue insuficiente inducir una recuperación completa o incluso la recuperación funcional parcial.

35 La infiltración/reclutamiento de sangre periférica en el lugar de la lesión es controlada por señales provocadas desde el sitio de la lesión, lo que afecta a la barrera cerebro-LCR. La recuperación espontánea limitada después de una lesión del SNC se puede atribuir en parte a un inadecuado reclutamiento prematuro y espontáneo del subconjunto eficaz de los monocitos en el sitio de la lesión. En línea con esto, los inventores han demostrado que el enriquecimiento de un grupo de monocitos de sangre periférica con células CD115 derivadas de la médula ósea aumentaba la recuperación funcional después de LME en ratones (Shechter et al., 2009).

40 Los monocitos de la sangre son una población celular heterogénea, con diferentes características y actividades. La utilización de los monocitos de la sangre con fines terapéuticos requiere la identificación de las células con funciones dañinas y las que son beneficiosas.

45 En los seres humanos, se propuso que la expresión de CD16 en monocitos puede distinguir entre tres subconjuntos, a saber los monocitos CD14++CD16- (clásicos), CD14++CD16++ y CD14dimCD16++ (no clásicos), pero su papel en condiciones fisiológicas y patológicas no se entiende completamente.

50 **Compendio de la invención**

55

En algunos aspectos, la presente invención proporciona una subpoblación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺ y células CD56⁺, o una subpoblación de PBMC sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺, células CD56⁺ y CD16⁺, para su uso en el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central (SNC).

- 5 En otros aspectos, la presente invención proporciona composiciones que comprenden una subpoblación de PBMC sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺ y células CD56⁺, o una subpoblación de PBMC que está sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺, células CD56⁺ y CD16⁺, para uso en el tratamiento de una lesión del SNC.

10 También se describen métodos para el tratamiento de una lesión del SNC que comprende administrar a un individuo en necesidad una cantidad eficaz de una subpoblación de PBMC sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺ y células CD56⁺, o una subpoblación de PBMC sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺, células CD56⁺ y células CD16⁺. Las células se inyectan preferiblemente al LCR mediante punción lumbar o la cisterna magna.

15 También se describen para el aislamiento de una subpoblación de PBMC humana a partir de sangre sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺ y células CD56⁺ o de una subpoblación de PMBC humana sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺, células CD56⁺ y células CD16⁺.

Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 muestra que la inyección por punción lumbar (LP) de macrófagos activados por la piel promueve la recuperación funcional en ratas después de una lesión de la médula espinal severa. Ratas de tipo salvaje fueron sometidas a una lesión de la médula espinal grave (LME). Después de 8 días, a los animales lesionados les fue inyectado $0,5 \times 10^6$ o 1×10^6 macrófagos activados por la piel o con vehículo en el LCR (líquido cefalorraquídeo) a través de LP. Se observó una mejora significativa en la locomoción, representada por un aumento en la puntuación de Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) en el grupo de animales inyectados con la dosis más alta de los macrófagos.

25 La figura 2 muestra que los monocitos inyectados intracerebroventricular (ICV) proporcionan una mejora significativa en la actividad locomotora en ratones de tipo salvaje sometidos a lesión de la médula espinal (LME). BMS, Escala ratón Basso.

30 Las Figs. 3A-D muestran una distribución de monocitos de sangre periférica de acuerdo con su expresión de CD14, CD16 y CD115. La figura 3A muestra una distribución de la población total de monocitos vivos como se mide por FACS (las células delineadas son las células vivas (paso vivo). SSC, dispersión lateral; FSC, dispersión frontal; la figura 3B muestra la distribución de las células CD45 positivas del paso vivo total, es decir, las células de origen hematopoyético (excepto las células eritroides, plaquetas y sus células precursoras). La figura 3C muestra que los monocitos (de la sub-población de monocitos delineada de las células CD45 positivas) marcados por anticuerpos monoclonales anti-CD14 y anti-CD16 se pueden separar en tres subpoblaciones diferentes: CD14⁺ CD16⁻ (80,5%), CD14⁺ CD16⁺ (4,8%) y CD14^{dim} CD16⁺ (3,5%). La figura 3D muestra el nivel de expresión (en intensidad media de fluorescencia) de CD115 en diferentes subpoblaciones de monocitos.

35 Las Figs. 4A-E muestran la distribución de CX₃CR1 y CCR2 en monocitos de sangre periférica (4A) y en las tres subpoblaciones de monocitos: CD14⁺ CD16⁺ (4B), CD14⁺ CD16⁺ (4C) y CD14^{dim} CD16⁺ (4D). (4E) un gráfico que muestra la distribución en las tres subpoblaciones.

40 La figura 5 muestra el enriquecimiento de células CD14^{dim} CD16⁺ por agotamiento de las células CCR2⁺. Las columnas muestran el porcentaje de cada subpoblación de la población total de monocitos. La barra de PBMC representa la distribución de la subpoblación de monocitos en células mononucleares de sangre periférica aisladas a partir de una donación de sangre fresca separada por medio de un gradiente de Ficoll. La columna CD14 representa la distribución de la sub-población de monocitos después de la selección positiva de células CD14 positivas mediante el uso de anticuerpos CD14 conjugados con microperlas magnéticas; la barra de agotamiento de CCR2 representa la distribución de la sub-población de monocitos después de la selección negativa de células positivas CCR2 y la selección positiva de células CD14 positivas.

45 La figura 6 muestra que la inyección ICV de los monocitos derivados de la sangre enriquecida en células CD14^{dim} CD16⁺ células por agotamiento de las células CCR2⁺ no logró mejorar la recuperación de la LME. Por otra parte, hay una tendencia de empeoramiento en el resultado funcional; la puntuación en la Escala de Ratón Basso (BMS) es menor en los animales tratados (monocitos) que en los animales de control inyectados con tampón fosfato salino (PBS).

50 La figura 7 muestra que la inyección ICV de los monocitos derivados de sangre aislados por selección negativa en el día 4 después de la lesión mejora la recuperación funcional en ratones. Sin embargo, los monocitos derivados de sangre aislados por selección positiva de células CD14 positivas fueron menos beneficiosos. BMS, Escala de Ratón Basso.

Las Figs. 8A-B muestran un enfoque secuencial para el aislamiento de células CD14⁺⁺CD16⁻; es decir, primero el agotamiento de los leucocitos utilizando anticuerpos CD3, CD19 y CD56 (A), seguido por el agotamiento de células CD16 positivas. El producto final es una población que comprende células CD14⁺⁺CD16⁻ y menos de 0,1% de las células CD16⁺ (B).

- 5 La figura 9 muestra el efecto de la inyección de $0,5 \times 10^6$ monocitos de sangre activados por la piel CD14⁺⁺CD16⁻ (MQ) o PBS al LCR a través de ICV en ratones sometidos a una lesión de la médula espinal severa controlada. Eje Y, % de animales que muestran una recuperación funcional significativa respecto a los animales totales probados.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención se basa en el hallazgo de que una subpoblación de monocitos que se define por la ausencia, o casi la ausencia, de células que expresan CD3, CD19, CD56 y opcionalmente CD16, es capaz de guiarse desde el líquido cefalorraquídeo (LCR) al sitio de la lesión en la médula espinal, y promover allí la restauración de tejido y la mejora de la recuperación funcional. Los métodos de la técnica anterior enseñan la necesidad de administrar los fagocitos mononucleares con precisión a los bordes de la lesión con el fin de obtener una eficacia satisfactoria (por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.800.812).

15 Además, se ha encontrado de acuerdo con la presente invención que el efecto beneficioso de las células en la curación de la médula espinal dañada se obtiene ya sea mediante la administración de células activadas por la co-incubación con un pedazo de piel o mediante la administración de células de no activadas en el LCR de la médula espinal lesionada.

20 Una célula que expresa en su superficie un determinado marcador identificable, tal como una molécula X de un grupo de diferenciación (CD) se denomina en este documento CD X⁺. Por ejemplo, una célula que expresa en su superficie una molécula CD3 se denomina en este documento CD3⁺. La cantidad relativa de la molécula de CD expresada en la superficie celular se conoce mediante la adición de "+", por ejemplo, CD3⁺⁺ para altas cantidades de moléculas de CD, o el término "dim", que muestra un bajo nivel relativo de moléculas de CD. Una población de células que comprende un tipo de célula definida por la expresión de un determinado CD, una población relativamente enriquecida con estas células, o una población que carece de tales células, se designa CD⁺, CD⁺⁺ o CD⁻, respectivamente.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la subpoblación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) está sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺ y células CD56⁺.

30 En otras realizaciones, también han sido retiradas células CD16⁺ de la sub-población de PBMC resultante en una subpoblación de PBMC que está además sustancialmente desprovista de células CD16⁺, es decir, una subpoblación sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺, células CD56⁺ y células CD16⁺.

35 La expresión "célula mononuclear de sangre periférica (PBMC)" tal como se utiliza en este documento, se refiere a cualquier célula de sangre que tiene un núcleo redondo, tal como un linfocito, un monocito o un macrófago. Los métodos para aislar las PBMC de la sangre son fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Un ejemplo no limitativo es la extracción de estas células de la sangre entera utilizando Ficoll, un polisacárido hidrófilo que separa capas de sangre, formando los monocitos y los linfocitos una capa leucocitaria bajo una capa de plasma o por leucaféresis; la preparación de concentrados de leucocitos con el retorno de glóbulos rojos y plasma pobre en leucocitos al donante.

40 La frase "una población de células sustancialmente desprovista de" se usa en el presente documento de manera intercambiable con la frase "casi ausencia de" y, preferiblemente, incluye una población de células que carecen de un cierto tipo de célula, o que comprenden, alternativamente, una cantidad relativa de un determinado tipo de célula que no excede de aproximadamente 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, o 5% del número total de células en dicha población de células.

45 Así, en ciertas realizaciones, la cantidad relativa de cada una de las células CD3⁺, células CD19⁺ y células CD56⁺ no es superior a aproximadamente 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, o 5% del número total de células en la población de PBMC. En ciertas realizaciones, la cantidad relativa de células CD16⁺ de la subpoblación sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺, células CD56⁺ y células CD16⁺ no es superior a aproximadamente 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, o 5% del número total de células.

50 En ciertas realizaciones, las subpoblaciones sustancialmente desprovistas de células CD3⁺, células CD19⁺ y CD56⁺ y opcionalmente también sustancialmente desprovistas de células CD16⁺, se enriquecen sustancialmente en células CD14⁺.

La frase "una población de células enriquecidas sustancialmente en" se refiere a una población de células que comprende una cantidad relativa de un determinado tipo de célula superior a aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% del número total de células de dicha población de células.

- 5 En ciertas realizaciones, la subpoblación de PBMC sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺ y células CD56⁺ comprende al menos aproximadamente 60% de células CD14⁺, y la subpoblación sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺, células CD56⁺ y células CD16⁺ comprende al menos aproximadamente 80% de células CD14⁺. Así, la subpoblación sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺, células CD56⁺ y células CD16⁺ también se denomina en este documento como una población de CD14⁺⁺, CD16⁻.
- En la presente invención, la subpoblación de PBMC es para uso en el tratamiento de la degeneración neuronal provocada por la lesión del SNC.
- En consecuencia, en ciertas realizaciones, la subpoblación de PBMC de la presente invención puede ser para uso en el tratamiento de una lesión de la médula espinal, y el tratamiento puede comprender la promoción de la restauración del tejido de la médula espinal, la recuperación funcional, o ambas.
- 10 En otras realizaciones, la lesión del SNC es un traumatismo, tal como un traumatismo cerrado, traumatismo penetrante, golpe o contragolpe cerebral, trauma sufrido durante una operación de neurocirugía u otro procedimiento, o un derrame cerebral tal como un accidente cerebrovascular hemorrágico o accidente cerebrovascular isquémico.
- 15 En una realización diferente, la subpoblación de PBMC humanos se aísla de PBMC autólogos, es decir, se recoge la sangre de un paciente en necesidad de tratamiento de una lesión del SNC, se prepara una subpoblación PBMC para uso de acuerdo con la presente invención como se define en este documento más abajo, y después se administra de nuevo al paciente.
- 20 En otra realización, la subpoblación de PBMC humanos se aísla de PBMC alogénicos, es decir, la sangre se recoge de un donante genéticamente similar, pero no idéntico, se prepara una subpoblación de PBMC para uso según la presente invención como se define en este documento a continuación y opcionalmente se almacena en un banco de células antes de ser administradas al paciente.
- En ciertas realizaciones, la subpoblación de PBMC se formula para inyección, preferiblemente para inyección en el LCR.
- 25 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente no tóxico, auxiliar de formulación de cualquier tipo, o simplemente un medio acuoso estéril, tal como una solución salina. Algunos ejemplos de los materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables son azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa, almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata, celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta, gelatina, talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol, polioles tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo, agar; agentes tamponantes tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua sin pirógenos; solución salina isotónica, solución de Ringer; alcohol etílico y soluciones de tampón fosfato, así como otras sustancias compatibles no tóxicas utilizadas en formulaciones farmacéuticas.
- 30
- 35
- Estos componentes adicionales inactivos, así como las formulaciones eficaces y los procedimientos de administración, son bien conocidos en la técnica y se describen en libros de texto estándar, tales como Goodman y Gillman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8ª Ed, Gilman et al.. Eds. Pergamon Press (1990), y Remington Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1990).
- 40
- En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una subpoblación de PBMC como se define en este documento anteriormente para uso en el tratamiento de la lesión del SNC. La composición puede comprender células de una subpoblación de PBMC en suspensión en un vehículo farmacéuticamente aceptable adaptado para la inyección, preferiblemente para la administración en el LCR. Un ejemplo no limitante de un vehículo farmacéuticamente aceptable es PBS o un medio de cultivo. Sin embargo, vehículos farmacéuticamente aceptables alternativos serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.
- 45
- En ciertas realizaciones, la administración de las células o la composición en el LCR es a través de una inyección intratecal, punción lumbar (LP), inyección a través de la cisterna magna (CM), inyección intracerebroventricular (ICV), o una combinación de las mismas.
- 50 Además, se ha encontrado de acuerdo con la presente invención que la subpoblación PBMC migra con éxito desde el LCR a los límites de una lesión en la médula espinal, mitiga la lesión y mejora la recuperación funcional, tanto si las células han sido previamente activadas por co-cultivo con un pedazo de piel, es decir, son las células activadas por la piel como si son indiferenciadas, es decir, no manipuladas o no activadas.
- 55 Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las células de la subpoblación de PBMC de acuerdo con la presente invención inyectadas en el LCR son células activadas por la piel.

En otras realizaciones, las células de la subpoblación para uso de acuerdo con las PBMC de la presente invención inyectadas en el LCR son células no activadas.

5 La subpoblación de PBMC para uso de acuerdo con la presente invención, y la composición que la comprende, se usan para el tratamiento de una lesión del SNC, tal como una lesión de la médula espinal. En particular, el tratamiento comprende la promoción de la restauración del tejido de la médula espinal, incluyendo, por ejemplo, prevenir o inhibir la degeneración neuronal, la promoción de la supervivencia neuronal, la regeneración y/o el brote axonal, la neurogénesis en una médula espinal lesionada, y/o la promoción de la recuperación funcional, tal como se mide por ejemplo por la puntuación de Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) en ratas o por la escala de ratón Basso (BMS) en ratones, tal como se define en el presente documento a continuación.

10 En otra realización, la lesión del SNC puede ser un traumatismo, como un traumatismo cerrado, traumatismo penetrante, golpe o contragolpe cerebral, trauma sufrido durante una operación de neurocirugía u otro procedimiento, o un derrame cerebral, tal como un accidente cerebrovascular hemorrágico o accidente cerebrovascular isquémico.

15 Además se describe un método para el tratamiento de una lesión del SNC, particularmente una lesión de la médula espinal, que comprende administrar a un individuo en necesidad una cantidad eficaz de una subpoblación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como se define en este documento.

20 Tal como se utiliza en este documento, los términos "tratamiento" o "tratar" de una lesión abarcan el alivio de al menos un síntoma de la misma, una reducción en la gravedad de la misma, o el retraso, la prevención o inhibición de la progresión de la misma. El tratamiento no tiene por qué significar que la lesión esté totalmente curada. Para ser un tratamiento eficaz, una composición útil en la presente memoria sólo tiene que reducir la gravedad de una lesión, reducir la gravedad de los síntomas asociados con la misma o proporcionar una mejora a un paciente o la calidad de vida del sujeto.

25 Además se describe un método para el aislamiento de una subpoblación de PMBC humanas de la sangre que está sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺ y células CD56⁺, que comprende las etapas: (i) aislar las células mononucleares de la sangre; y (ii) retirar las células CD3⁺, células CD19⁺ y células CD56⁺ de las células mononucleares de (i) poniendo en contacto dichas células mononucleares con anticuerpos anti-CD3⁺, anticuerpos anti-CD19⁺ y anticuerpos anti-CD56⁺, cada uno de los cuales está unido a microperlas, mediante lo cual se unen dichas células a dichos microperlas, y eliminando las microperlas, obteniendo de este modo una subpoblación de células mononucleares de sangre periférica humana (PMBC) a partir de sangre que está sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺ y células CD56⁺.

30 También se describe un método para el aislamiento de una subpoblación de células mononucleares de sangre periférica humana (PMBC) a partir de sangre que está sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺, células CD56⁺ y células CD16⁺, que comprende las etapas de: (iii) aislar las células mononucleares de la sangre; y (iv) eliminar las células CD3⁺, células CD19⁺, células CD56⁺ y células CD16⁺ de las células mononucleares de (iii) poniendo en contacto dichas células mononucleares con anticuerpos anti-CD3⁺, anticuerpos anti-CD19⁺, anticuerpos anti-CD56⁺ y anticuerpos anti-CD16⁺, cada uno de los cuales está unido a microperlas, mediante lo cual se unen dichas células a dichos microperlas, y eliminando las microperlas, obteniendo de ese modo una subpoblación de PMBC humanas de la sangre que está sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺, células CD56⁺ y CD16⁺.

40 En ciertas realizaciones, la etapa (iv), es decir, la eliminación de células CD3⁺, células CD19⁺, células CD56⁺ y CD16⁺, comprende las subetapas: (v) retirar las células CD3⁺, células CD19⁺ y células CD56⁺ de las células mononucleares de (iii) obteniendo de esta manera una subpoblación de PMBC humanas de sangre que está sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺ y células CD56⁺; y (vi) retirar las células CD16⁺ de la población PMBC de (v), obteniendo con ello una subpoblación de PMBC humana de la sangre que está sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺, células CD56⁺ y células CD16⁺.

En una realización, la etapa (iv) se realiza en un solo paso.

50 Los anticuerpos que capturan las células que expresan el antígeno deseado en su superficie, tales como CD3, CD19, CD56 y/o CD16, pueden ser biotinilados y luego ligados a microperlas que comprenden avidina o estreptavidina o proteínas de unión a biotina equivalentes, o los anticuerpos pueden ser suministrados a las células cuando ya estén unidos a las microperlas. Las microperlas pueden ser magnéticas o no magnéticas y las células, cuando se unen a las microperlas, pueden ser retiradas de la solución en la que se suspenden las células, por centrifugación, si las microperlas no son magnéticas, o por la exposición al campo magnético de un imán, si lo son.

55 En realizaciones preferidas, los anticuerpos están unidos a microperlas magnéticas cuando se ponen en contacto con las células y las células se separan mediante la eliminación de las microperlas a las que las células se unen tirando de ellas desde la solución con un imán.

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

Ejemplos

Materiales y métodos

(i) Animales. Los animales utilizados en los experimentos, si no se indica otra cosa, fueron suministrados por Harlan Laboratories, SPF Animales de Laboratorio en Israel, criador ISO acreditado, y el Centro de Reproducción Animal del Instituto de Ciencia de Weizmann (Rehovot, Israel). Todos los animales fueron manipulados de acuerdo a los reglamentos formulados por el Comité del Cuidado y Uso de Animales del Instituto Weizmann.

(ii) Lesión de la médula espinal. Ratas (ratas de tipo salvaje Sprague-Dawley) fueron anestesiadas (ketamina 70 mg/kg, Bedford Laboratories, OH, EE.UU., xilacina 10 mg/kg, VMP, Bioulab, Francia), laminectomizadas en T9, y contusionadas utilizando un impactador NYU (Gruner (1992). Un modelo de contusión de la lesión medular monitoreado en rata. *J Neurotrauma*. Summer; 9 (2): 123-6; discusión 126-8. Revisión) que deja caer una barra de metal de 10 g desde una altura de 50 mm sobre la médula espinal expuesta (considerado que causa un grave daño). Las ratas fueron anestesiadas, sus médulas espinales fueron expuestas por laminectomía a nivel de T12, y una fuerza de 200 kdyn (2 N) se colocó durante 1 s sobre la columna laminectomizada utilizando el impactador de la médula espinal Infinite Horizon (Precision Systems and Instrumentación, Lexington, KY), un dispositivo que se ha mostrado que infringe una lesión contusiva bien calibrada de la médula espinal.

(iii) Preparación de la piel e incubación conjunta con monocitos. Pequeños trozos de piel (2 x 6 mm) se preparan a partir de las partes posteriores de las mismas ratas donantes a las que se les había sacado sangre para preparar los monocitos. El pelaje de la espalda superior se afeitó y la piel se esterilizó con etanol antes de cortar. Dos piezas del tejido de la piel se colocaron con 5×10^6 células de la fracción de monocitos homóloga (véase arriba) en 5 ml de DCCM-1 (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel) y se incubaron durante 16 horas a 37°C, 5% CO₂. Al final de la incubación, las piezas de piel se retiraron y las células se recuperaron por centrifugación.

(V) Puntuación BBB: el análisis del comportamiento de las ratas se realizó mediante la locomoción en campo abierto de la puntuación de Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) [Basso, D. M., Beattie, M. S. y Bresnahan, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma* 12,1-21 (1995).] El análisis del comportamiento de los ratones se realizó utilizando la Escala de ratón Basso (BMS) para la evaluación de la función motora de las extremidades posteriores en campo abierto [Basso MS, LC Fisher, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neuro trauma*. 2006 May; 23 (5): 635-59].

(vii) Análisis estadístico: se utilizó ANOVA de medidas repetidas para la puntuación BBB y BMS con la comparación de seguimiento de los tratamientos para cada semana por el contrario t-test y corrección para comparaciones múltiples por el método de Holm ($p = 0,05$).

Ejemplo 1: La inyección por punción lumbar de macrófagos activados de la piel promueve la recuperación funcional en ratas después de una lesión de médula espinal severa.

Al principio, los inventores estaban buscando una manera clínicamente factible para aumentar el número de monocitos derivados de la sangre con el fenotipo deseado en la médula espinal lesionada usando una forma mínimamente invasiva. Se examinó la eficacia de la inyección de los monocitos derivados de la sangre activados de la piel en el líquido cefalorraquídeo (LCR) por punción lumbar (PL) en la reducción de los déficits funcionales después de una lesión de la médula espinal en la rata.

Tabla 1: Recuperación funcional en ratas después de una lesión de médula espinal severa

Tratamiento	No. total de animales	No. de animales recuperados (BBB >6)	% recuperación
PBS	20	6	30%
0.5×10^6 MQ	17	3	18%
1×10^6 MQ	16	10	63%

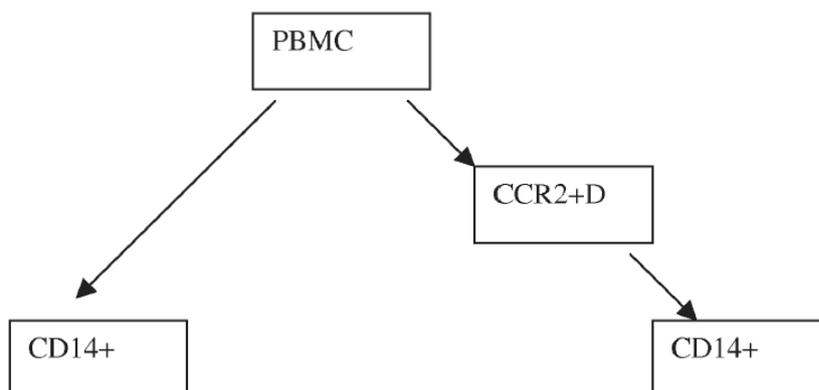
Fueron sometidas ratas tipo salvaje Sprague-Dawley a contusión severa de la médula espinal (véase Materiales y Métodos). Después de 8 días, a los animales dañados les fueron inyectados en el LCR $0,5 \times 10^6$ o 1×10^6 macrófagos activados por la piel-(MQ) o con vehículo (PBS), a través de LP. Un efecto dependiente de la dosis se muestra en la facilitación de la recuperación motora, con una mejora significativa en la locomoción observada para el grupo de animales inyectados con la dosis más alta de los macrófagos (Fig. 1, Tabla 1).

Ejemplo 2: La inyección de monocitos de ratón derivados de médula ósea no activados en el LCR promueve la recuperación funcional en ratones después de una lesión de médula espinal.

Además los inventores probaron si los monocitos derivados de médula ósea no activados inyectados en el líquido cefalorraquídeo vía intracerebro-ventrículos (ICV) se guiarían al parénquima de la médula espinal lesionada. Los ratones tipo salvaje fueron sometidos a contusión de la médula espinal (véase Materiales y Métodos). Después de 3

- días, a los animales dañados les fueron inyectados por ICV monocitos derivados de la médula ósea sin diferenciar que expresaban proteína aislada fluorescente verde (GFP) ($0,5 \times 10^6$ monocitos $Cx_3cr1^{GFP/+}$), y se analizaron para detectar la presencia de las células inyectadas en el sitio de la lesión. El análisis inmunohistoquímico del sitio de la lesión 4 días después de la inyección reveló la presencia de células que expresaban GFP inyectadas en el parénquima lesionado, en las proximidades de los márgenes de la zona de la lesión (no mostrada [Véase la explicación en Breve descripción de los dibujos]). Del mismo modo, los animales tratados fueron seguidos según su actividad locomotora evaluada mediante una escala motora (BMS): el aumento del grupo de monocitos dio como resultado una recuperación que superó los niveles de recuperación espontánea como puede verse a partir de la mejora significativa en la locomoción en los ratones (Fig. 2).
- Estos resultados sugieren que los monocitos derivados de médula ósea no activados se pueden guiar al parénquima lesionado desde el LCR, y por lo tanto, que la barrera sangre-LCR podría ser una ruta mediante la cual los monocitos entren espontáneamente al SNC dañado.
- Ejemplo 3: Aislamiento de células mononucleares humanas que expresan un alto nivel de CX_3CR1 y un bajo nivel de $CCR2$ a partir de PBMC
- En los seres humanos, tres poblaciones de monocitos se definen por la expresión de $CD14$ y $CD16$, a saber: $CD14^+CD16^-$, $CD14^+CD16^+$ y $CD14^{dim}CD16^+$. Los monocitos $CD14^+CD16^-$ representan del 80% al 90% de los monocitos de la sangre, y expresan altos niveles del receptor de quimioquinas $CCR2$ y niveles bajos del receptor de quimioquinas CX_3CR1 (el receptor de fractalquina). En contraste con este importante subconjunto, los monocitos $CD16^+$ humanos expresan altos niveles de CX_3CR1 y bajos niveles de $CCR2$ (Cros et al., 2010). Según Cros et al (2010), los análisis de la expresión génica indicaron similitudes entre monocitos $CD14^{dim}CD16^+$ humano y $Gr1^{dim}$ murino de patrullaje. Las células $CD14^{dim}CD16^+$ son monocitos “de buena fe” que participan en la vigilancia local innata de los tejidos y la patogénesis de enfermedades autoinmunes.

Esquema I



- Con el fin de aislar a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) las células $CD14^{dim}CD16^+$ que expresan altos niveles de CX_3CR1 y bajos niveles de $CCR2$, se ha utilizado el método combinado de la selección negativa de $CCR2$ (agotamiento de $CCR2^+$) y selección positiva de $CD14^+$ ($CD14^+$), mientras que el aislamiento de $CD14^+$ a partir de PBMC se utilizó como control, como se ilustra en el Esquema I.

3.1 Enriquecimiento de la población de células $CD14^{dim}CD16^+$:

- (i) Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana: Sangre fresca (8 ml) recogida de donantes sanos se diluyó 1:1 con 2,5% de FCS en PBS, y se cargó en un gradiente de Ficoll (Ficoll-Paque plus, Amersham Biosciences). Los tubos se centrifugaron durante 20 min a 1000 g, a 20°C. Se recogió la fase de células mononucleares y se lavó dos veces con PBS.
- (ii) Agotamiento de $CCR2^+$: En primer lugar las células mononucleares se bloquearon a través del receptor Fc por el tratamiento con reactivo de bloqueo FcR ($2,5 \mu\text{l}/10^6$ células) (130-059-901, Miltenyi Biotec) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Entonces, sin lavado, el reactivo de $CCR2$ -biotina anti-humano monoclonal (FAB151B, R & D Systems) se añadió ($10 \mu\text{l}/10^6$ células) y se incubó durante 35 minutos a 2°- 8°C. A continuación, se lavaron las células con tampón MACS™ frío (EDTA 1 mM, 2% de FCS en PBS) y microperlas de estreptavidina (130-048-101, Miltenyi Biotec) se añadieron ($20 \mu\text{l}/10^7$ células) durante 20 minutos a 2°- 8°C. La células se lavaron y se resuspendieron con 0,5 ml de tampón MACS™. El agotamiento de las células $CCR2^+$ se realizó con una columna LD (130-042-901, Miltenyi Biotec) de acuerdo con los protocolos de los fabricantes.
- (iii) Aislamiento de células $CD14^+$: Las células se resuspendieron con tampón de MACS™ ($80 \mu\text{l}/10^7$ células) y se añadieron microperlas de $CD14^+$ (130-050-201, Miltenyi Biotec) ($20 \mu\text{l}/10^7$ células) durante 15 minutos a 2°- 8°C. A continuación, las células se lavaron y se resuspendieron con 0,5 ml de tampón MACS. La selección positiva de las

células CD14⁺ se realizó mediante el uso de la separación magnética en la columna LS (130-042-401, Miltenyi Biotec) de acuerdo con los protocolos del fabricante.

(iv) Tinción por clasificación de células activada por fluorescencia (FACS™) de las células mononucleares humanas

5 Todas las muestras se tiñeron de acuerdo con los protocolos de los fabricantes. Todas las muestras se filtraron a través de una de malla de nylon de 70µm y se bloquearon con reactivo de bloqueo FCR (30 µl/10⁶ células) (130-059-901, Miltenyi Biotec) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los siguientes anticuerpos monoclonales anti-humanos marcados con fluorocromo se utilizaron de acuerdo con los protocolos del fabricante: anti CD45 PerCP conjugado (345809, BD), anti CD115 FITC conjugado (FAB329F, R & D Systems), anti CD14 Pacific Blue™ conjugado (BLG-325616), anti CD16 Alexa Fluor® 700 conjugado (BLG-302026), anti CX3CR1 PE conjugado (MBL-D070-5) y antiCCR2 PerCP conjugada (BLG-335303).

3.2 Resultados

15 La población de monocitos se analizó de la población celular en vivo (Fig. 3A) y se identificó usando la distribución de dispersión de sitio de las células CD45⁺ (Fig. 3B), delimitada por la línea negra delgado). La distribución de la sub-población de monocitos fue presentada por su expresión de antígenos CD14 y CD16 (Fig. 3C). El análisis de la subpoblación de monocitos de PBMC de donante sano de acuerdo con la tinción de CD 14 y CD16 por FACS revela la distribución de las siguientes subpoblaciones: CD14⁺CD16⁻ (80,5%), CD14⁺CD16⁺ (4,8%) y CD14^{dim}CD16⁺ (3,5%), las Figs. 3A-C. Curiosamente, la subpoblación de la CD14^{dim}CD16⁺ también se tiñó con el marcador CD115 que pertenece al receptor LCR-1 y caracteriza los monocitos derivados de médula ósea (Fig. 3D).

20 El análisis de la subpoblación de monocitos de PBMC de donante sano de acuerdo con la tinción de CCR2 y CX3CR1 por FACS reveló que los monocitos que no expresan CD16 (subpoblación CD16⁻) expresan CCR2 altamente mientras que los monocitos que expresan CD16 (subpoblaciones CD14⁺CD16⁺ y CD14^{dim}CD16⁺) muestran una baja expresión de CCR2 y CX3CR1 alta (Figs. 4A-E).

Este resultado animó a los inventores a eliminar la subpoblación de células CCR2⁺ con el fin de enriquecer la subpoblación de células CD16⁺.

25 Como se puede ver en la Fig. 5, el agotamiento de las células CCR2⁺ revela un enriquecimiento de la subpoblación CD14^{dim}CD16⁺ de aproximadamente 9 veces (de 8% a 73%) y un enriquecimiento de la subpoblación CD14⁺CD16⁺ de 10 veces (de 1% a 10%), mientras una reducción de la subpoblación CD14⁺CD16⁺ de aproximadamente 5 veces (de 91% a 17%).

30 Para examinar el papel de los monocitos CD16⁺ en el proceso de recuperación después de una lesión de la médula espinal, los monocitos enriquecidos para la subpoblación CD16⁺ se inyectaron ICV (en el LCR) en ratones 4 días después de la lesión. La actividad motora de las extremidades posteriores se monitorizó dos veces por semana durante un máximo de 4 semanas después de la lesión mediante el sistema de escalado de BMS. Los animales de control tratados con el vehículo (PBS) mostraron una recuperación espontánea moderada con el tiempo, alcanzando aproximadamente 2,5 en la escala de BMS en promedio. Las puntuaciones del grupo tratado (monocitos enriquecidos con CD16⁺) fueron más bajas que el grupo de control en cada punto de tiempo después de la lesión lo que indica que su actividad motora se redujo en comparación con el grupo control. Se llegó a la conclusión de que esta subpoblación, tras la inyección en el LCR de los animales en el día 4 post LME atenúa la recuperación espontánea (fig. 6).

40 Contrariamente a los efectos destructivos sobre la recuperación que se han encontrado para los monocitos CD16⁺, el tratamiento con el total de las sub-poblaciones monocíticas fue beneficioso para la recuperación de la lesión de la médula espinal, dependiendo del método de aislamiento (Fig. 7).

45 Discusión. Para el aislamiento de monocitos, se utilizó la tecnología de MACS desarrollada por Miltenyi Biotec que se basa en la separación magnética. En principio, la muestra de sangre se marca con microperlas magnéticas conjugadas a anticuerpos diferentes. Las células se cargan en una columna MACS colocada en un campo magnético. Las células marcadas magnéticamente se retienen dentro de la columna mientras que las células no marcadas corren a través de ésta. Las células retenidas se pueden eluir mediante la retirada de la columna del campo magnético, denominado selección positiva. La fracción no marcada, denominada como la selección negativa, se puede recoger también.

50 Los monocitos se aislaron utilizando dos enfoques; la selección positiva o negativa. Para la selección positiva se utilizaron microperlas de CD14 de Miltenyi y para la selección negativa se utilizó el Kit II de Aislamiento de monocitos de Miltenyi. Al parecer, los monocitos que se aislaron mediante selección negativa muestran mejores efectos beneficiosos y con más consistencia respecto a la recuperación de los animales de una lesión de médula espinal que las células aisladas mediante selección positiva.

55 En resumen, con respecto al tratamiento después de una lesión de médula espinal, se puede utilizar CD16 como marcador para distinguir entre monocitos de sangre beneficiosos (CD16⁻) y destructivos (CD16⁺). Los monocitos

CD16 son conocidos como los monocitos clásicos y los CD16⁺ como los monocitos proinflamatorios que comportan sólo el 10% de todos los monocitos.

Ejemplo 4: La inyección de una subpoblación de monocitos, agotados de células CD3, CD19, CD56 y CD16, en el LCR promueve la recuperación funcional en ratones después de una lesión de médula espinal.

5 A la luz de las observaciones anteriores, se desarrolló un procedimiento para el aislamiento de monocitos CD16- utilizando el procedimiento de selección negativa MACS. Fueron marcadas las PBMC con microperlas conjugadas con CD3, CD19 y CD56 para agotar las células T, células B y células NK. Se recogieron las células no marcadas que pasaron a través de la columna magnética. Esta fracción se marcó con microperlas CD16 y se cargó de nuevo en la columna magnética. Se recogieron las células que pasaron a través de la columna y se tiñeron para el análisis en el FACS con anticuerpos fluorescentes de CD14 y CD16. La figura de la izquierda representa las PBMC antes del aislamiento (fig. 8A) y la figura de la derecha (Fig. 8B) representa el producto final después de la selección negativa como se describió anteriormente. En las PBMC, el 19% de células vivas totales son monocitos (CD14⁺). Fuera de los monocitos, alrededor del 10% son CD16⁺. En el producto final aproximadamente el 90% de las células vivas son monocitos, de los cuales CD16⁺ es menor que el 0,1%.

15 Las dos subpoblaciones mostraron que alcanzaban diferentes etapas de maduración después de una estimulación in vitro (Carmen Sánchez-Torres, et. al. CD16⁺ and CD16⁻ human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4⁺ T cells. *Int. Immunol.* (2001) 13 (12): 1571-1581) y por lo tanto que puede explicar el efecto diferente en la médula espinal lesionada.

20 A continuación, se examinó el efecto de la subpoblación descrita anteriormente en la reducción de los déficits funcionales después de una lesión de médula espinal en ratones CD1 desnudos. Los ratones fueron sometidos a una lesión en la médula espinal severa controlada usando el dispositivo de contusión OSU ESCID (Ma M, Basso DM, Walters P, BT Stokes, Jakeman LB. Behavioral and histological outcomes following graded spinal cord contusion injury in the C57B1/6 mouse. *Exp Neurol.* 2001 Jun; 169 (2): 239-54). Las células o PBS se aplicaron al LCR a través de la inyección ICV en el día 4 después de la lesión. La recuperación locomotora después de la lesión se midió dos veces a la semana durante 4 semanas después de la lesión utilizando la Escala de ratón Basso para la locomoción (BMS).

25 Los ratones mostraron una ligera recuperación locomotora espontánea en las primeras 3 semanas después de la lesión. Una recuperación por encima de 3 (colocación plantar de la pata y apoyo del peso en la postura se obtuvo con una puntuación 4 en una escala de 0 a 9) en el BMS se consideró una recuperación funcional significativa. El tratamiento con los monocitos purificados incrementó la tasa de recuperación del aparato locomotor de los animales (Fig 9). El 42% de los animales tratados con monocitos se recuperó (5 de 12) en comparación con el 14% (2 de 14) en el grupo tratado con PBS de control.

Referencias

35 Bomstein Y, Marder J. B., Vitner K, Smirnov I, Lisaey G, Butovsky O, Fulga V, Yoles E. (2003) Features of skin-coincubated macrophages that promote recovery from spinal cord injury. *Journal of Neuroimmunology* 142:10-16

Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang S Y, Senechal B, Puel A, Biswas S K, Moshous D, Picard C, Jais J P, D'Cruz D, Casanova J L, Trouillet C, Geissmann F. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity.* 2010 Sep. 24; 33(3):375-86

40 Knoller N, Auerbach G, Fulga V, Zelig G, Attias J, Bakimer R, Marder J. B., Yoles E, Belkin M, Schwartz M, and Hadani M (2005) Clinical experience using incubated autologous macrophages as a treatment for complete spinal cord injury: Phase I study results *J Neurosurg Spine* 3:173-181.

Shechter R, London A, Varol C, Raposo C, Cusimano M, Yovel G, Rolls A, Mack M, Pluchino S, Martino G, Jung S, Schwartz M. (2009) Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *6(7)*.

45

REIVINDICACIONES

1. Una subpoblación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺ y células CD56⁺, para su uso en el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central (SNC).
- 5 2. La subpoblación de PBMC de acuerdo con la reivindicación 1, que está además sustancialmente desprovista de células CD16⁺.
3. Una subpoblación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) sustancialmente desprovista de células CD3⁺, células CD19⁺, células CD56⁺ y células CD16⁺, para su uso en el tratamiento de una lesión del SNC.
4. La subpoblación de PBMC de acuerdo con la reivindicación 1 ó 3, enriquecida sustancialmente en células CD14⁺.
- 10 5. La subpoblación de PBMC para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para uso en el tratamiento de la degeneración neuronal causada por dicha lesión del SNC.
6. La subpoblación de PBMC para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para uso en el tratamiento de una lesión de médula espinal.
7. La subpoblación de PBMC de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, en la que dicho tratamiento comprende la promoción de la restauración del tejido de la médula espinal, la recuperación funcional, o ambos.
- 15 8. La subpoblación de PBMC de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha lesión del SNC es un traumatismo, tales como traumatismo cerrado, traumatismo penetrante, golpe contragolpe cerebral o, traumatismo sufrido durante una operación de neurocirugía u otro procedimiento, o un derrame cerebral tal como un accidente cerebrovascular hemorrágico o accidente cerebrovascular isquémico.
- 20 9. La subpoblación de PBMC para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, formulada para inyección.
10. La subpoblación de PBMC para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, formulada para la inyección en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

Fig. 1

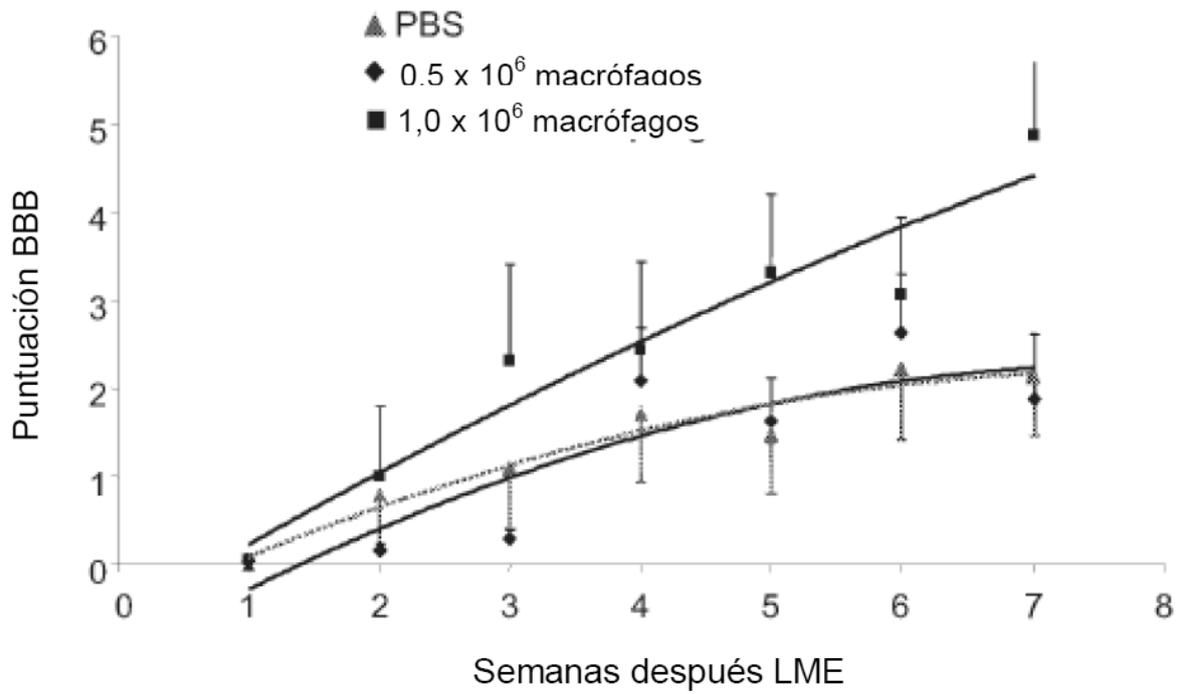
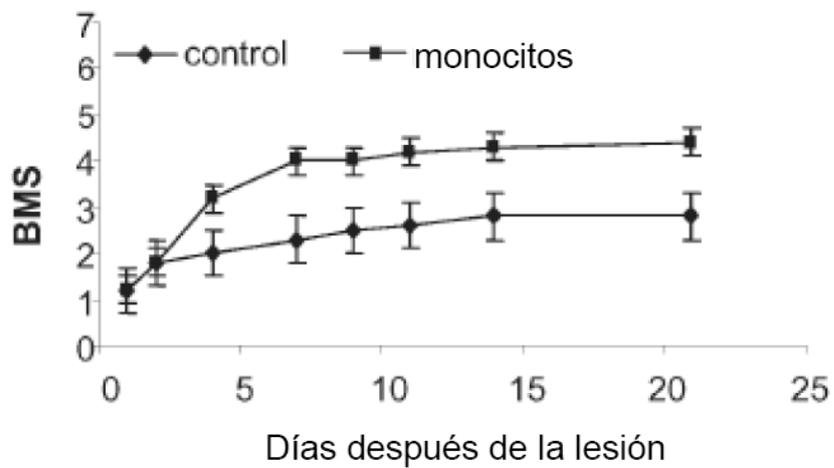


Fig. 2



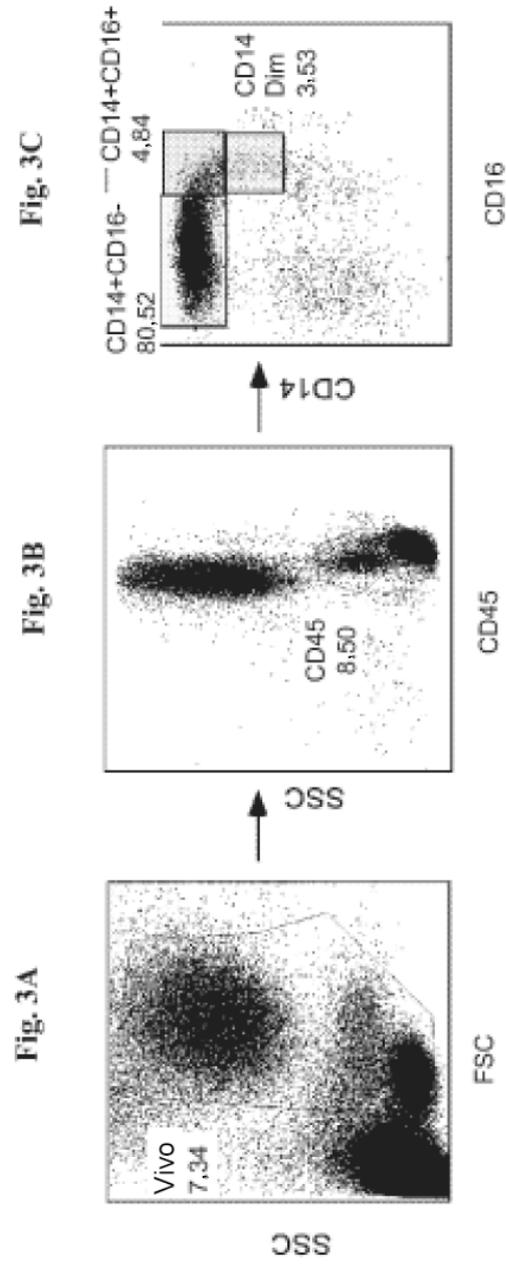


Fig. 3D

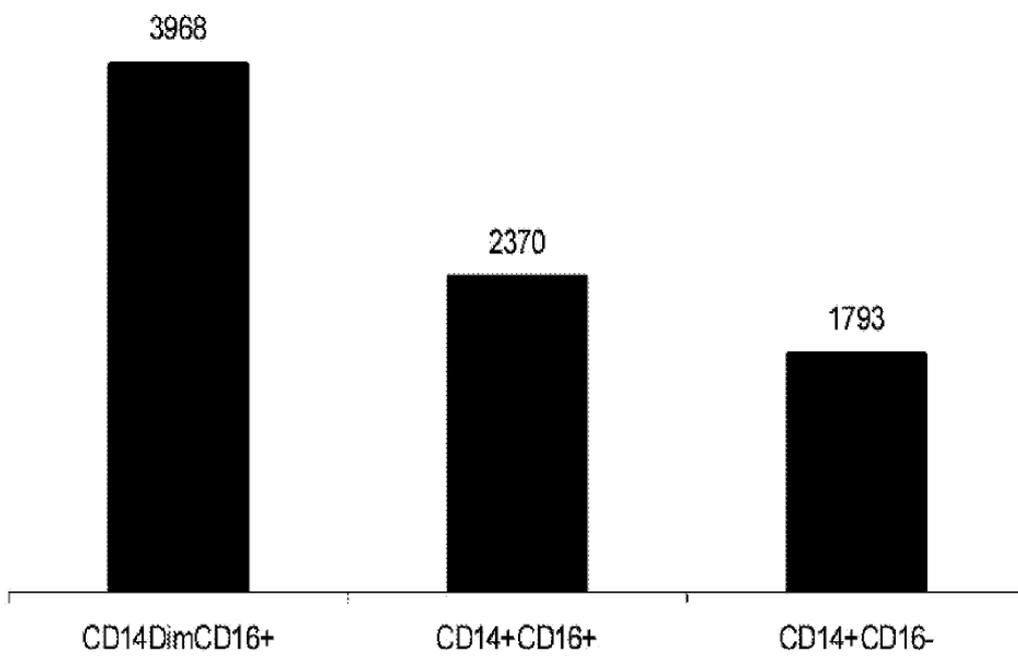


Fig. 4A

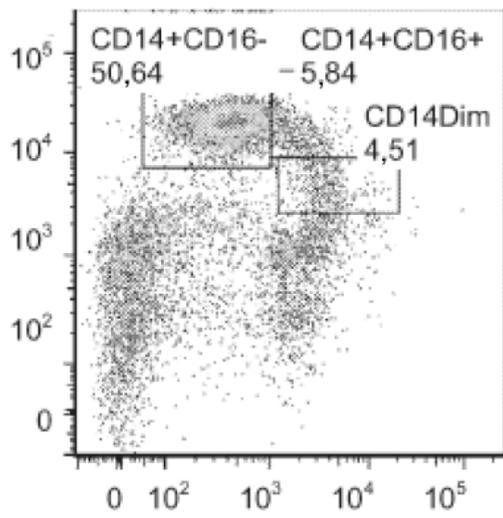


Fig. 4B

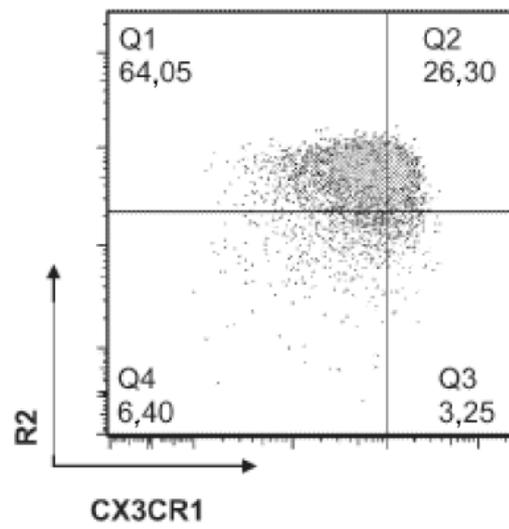


Fig. 4C

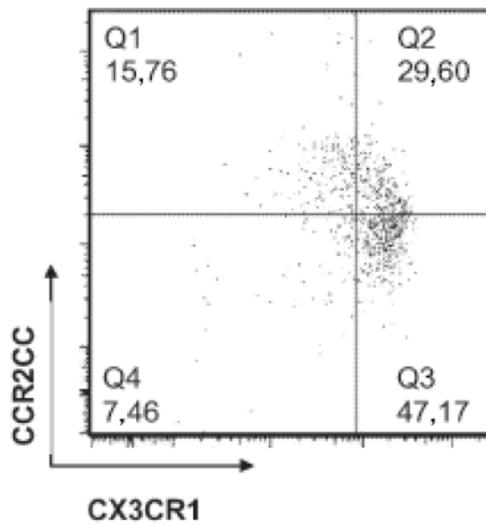


Fig. 4E

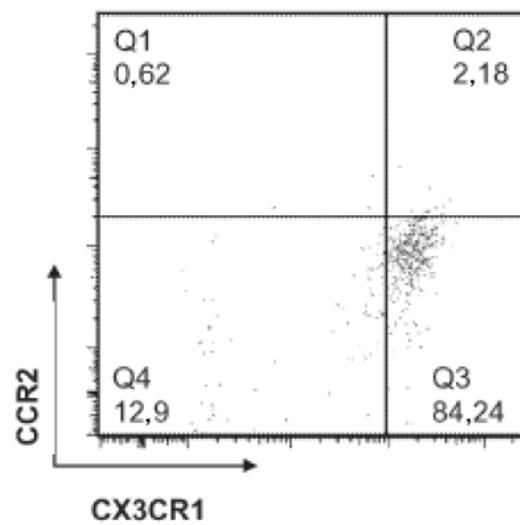


Fig. 4E

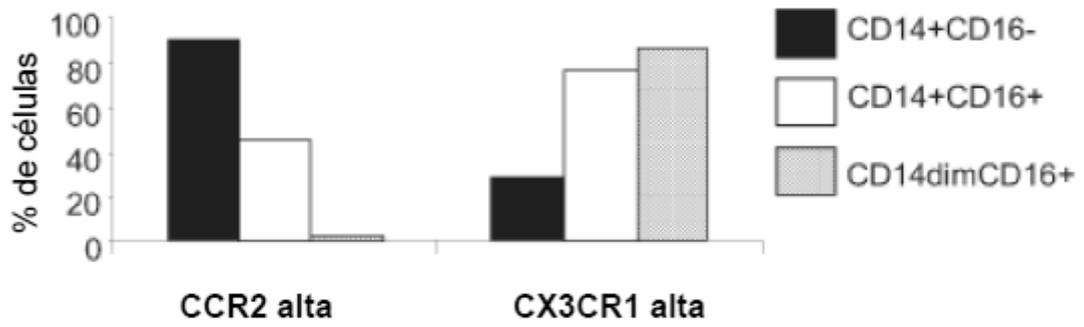


Fig. 5

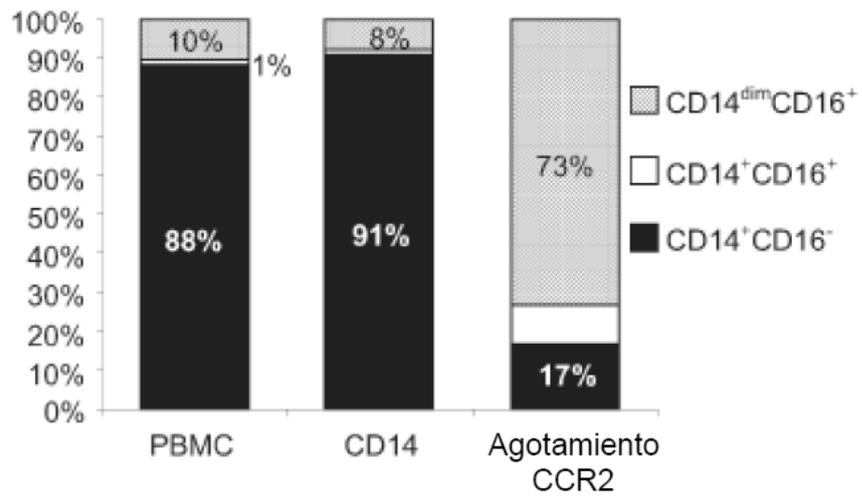


Fig. 6

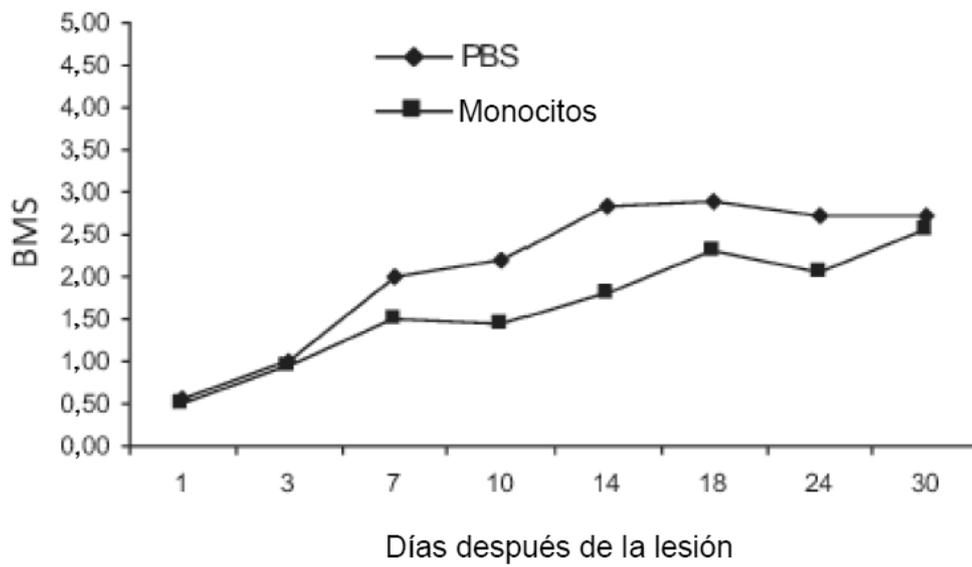


Fig. 7

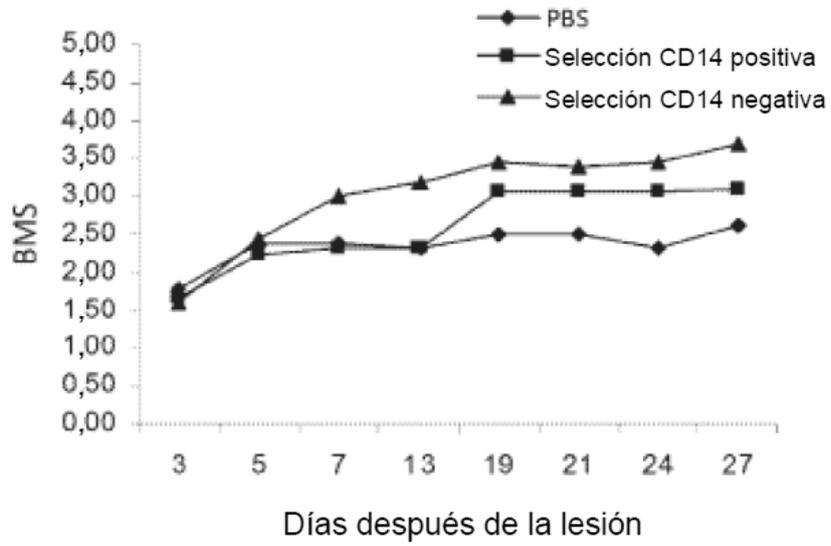


Fig. 8A

Fig. 8B

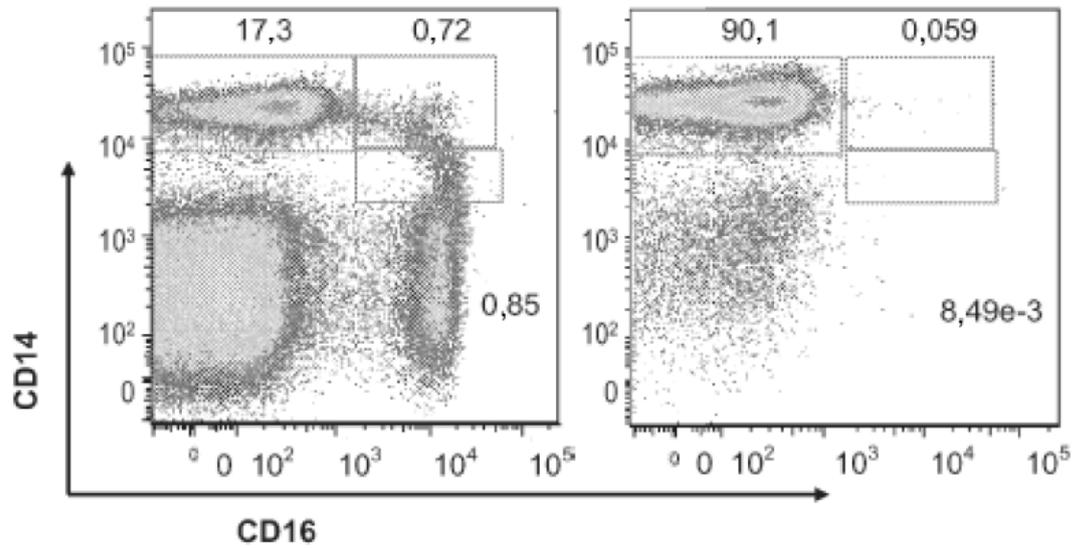


Fig. 9

