CSA220535
INVE...ARIO

105992

Industria y Comercio

Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD PCT

PATENTE DE INVENCIÓN PCT

EXPEDIENTE: 08-105992

TITULO: COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS Y SUS DERIVADOS, MÉTODOS DE USO Y MÉTODOS DE PREPARACIÓN

CLASIFICACIÓN: A61K 35/48 (2006.01) C12N 5/06 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

SOLICITANTE: GEETA SHROFF

DOMICILIO: GAUTAM NAGAR, NEW DELHI – INDIA.

APODERADO: MAURICIO PATIÑO BONNET

BOGOTA D.C. OCTUBRE DE 2008.

Fw. 07-10-2008

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-105992- -00000-0000
Fecha: 2008-10-06 11:39:24 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 870

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE :

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capitulo I. ☐ Capitulo II.

SOLICITANTE	Nombre: **GEETA SHROFF** Dirección: 487 Hardevpuri, Gautam Nagar, New Delhi 115049 Nacionalidad o Domicilio: INDIA Teléfono: Fax:	**IDENTIFICACIÓN** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ **Número:**
REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: MAURICIO PATIÑO BONNET Dirección: Carrera 9 No 74-08 Oficina 403 Teléfono: 3268600 Fax: 3268610 E-mail: patmarks@prietocarrizosa.com.co	**IDENTIFICACIÓN** C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ **Número** : 11.342.699 **T.P** 73.583
INVENTORES	1) NOMBRE: **SHROFF, Geeta** Nacionalidad: India Dirección: 487 Hardevpuri, Gautam Nagar, New Delhi 115049 - INDIA	

PCT
Solicitud Internacional No: PCT/IB2007/002292 Fecha: 6 de Marzo de 2007
Publicación Internacional No: WO 2007/141657 A2 Fecha: 13 de Diciembre de 2007

Titulo: COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS Y SUS DERIVADOS, MÉTODOS DE USO Y MÉTODOS DE PREPARACIÓN.

Clasificación Internacional: A61K 35/48 (2006.01) C12N 5/06 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

PRIORIDAD: SI ☒ **NO** ☐

País de origen	Fecha	N° de solicitud
INDIA	07/03/2006	582/DEL/2006
INDIA	26/06/2006	1500/DEL/2006
E.E.U.U.	14/09/2006	60/844,350

Comprobantes de pago No: 08-76,449 **Fecha:** 25 de Septiembre de 2008

REF. 63365

ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Documento que acredita existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [ ] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reinvidicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reinvidicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- [ ] Arte final 12x12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros

FIGURA CARACTERÍSTICA

Solicito la concesión de la patente:

NOMBRE: MAURICIO PATIÑO BONNET

FIRMA: _____

C.C. 11.342.699 T.P. 73.583

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario , ver reverso de esta página

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Uhthoff.
6336

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 76,449
FECHA : SEPTIEMBRE 25 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 08-105992- -00000-0000

Fecha: 2008-10-06 11:39:24 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 870

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
PRIETO & CARRIZOSA S.A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	73216	25/09/2008	15,578,000.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL : $	501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

SOLICITUD DE PATENTE PCT – CAPÍTULO I – FASE NACIONAL

"COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS Y SUS DERIVADOS, MÉTODOS DE USO Y MÉTODOS DE PREPARACIÓN"

DOCUMENTACIÓN ANEXA

1. Texto en español para la fase nacional, anexado en el siguiente orden:

    a. Título, Antecedentes y Descripción.
    b. Reivindicaciones.
    c. Resumen.

ANEXO 1 - Textos en traducidos al Español:

1. Traducción al español de la enmienda efectuada por el solicitante en virtud del Artículo 19 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes – PCT.

2. Traducción al español de la segunda republicación de fecha 31 de Julio de 2008, efectuada bajo el número de publicación WO 2007/141657 A3, con especial mención de que se efectúa con el reporte internacional de búsqueda y con las reivindicaciones enmendadas.

    2.1. Traducción al español del formulario PCT/ISA/210 - informe de la búsqueda internacional.

    2.2. Traducción de la publicación de las nuevas reivindicaciones aportadas por el solicitante en virtud del Artículo 19 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes – PCT.

3. Traducción al español de la primera republicación de fecha 24 de Abril de 2008, efectuada bajo el número de publicación WO 2007/141657 A3, con especial mención de que se efectúa con el reporte de búsqueda internacional, antes del vencimiento de la fecha para modificar las reivindicaciones y para ser republicada en caso de que se reciba reporte de modificaciones.

    3.1. Traducción al español del formulario PCT/ISA/210 - informe de la búsqueda internacional.

4. Traducción al español de la solicitud tal como fue publicada en fecha 13 de Diciembre de 2007, bajo el número de publicación WO 2007/141657 A2, con especial mención de que se efectúa sin reporte internacional de búsqueda y para ser republicada en cuanto se recibiese dicho reporte.

5. Traducción al español de la solicitud PCT en formulario PCT/RO/101.

ANEXO 2 - Textos en el Idioma Original de tramitación (Inglés):

1. Copia en inglés de la enmienda efectuada por el solicitante en virtud del Articulo 19 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes – PCT.

2. Copia en inglés de la segunda republicación de fecha 31 de Julio de 2008, efectuada bajo el número de publicación WO 2007/141657 A3, con especial mención de que se efectúa con el reporte internacional de búsqueda y con las reivindicaciones enmendadas.

   2.1. Copia en inglés del formulario PCT/ISA/210 - informe de la búsqueda internacional.

   2.2. Copia en inglés de la publicación de las nuevas reivindicaciones aportadas por el solicitante en virtud del Artículo 19 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes – PCT.

3. Copia en inglés de la primera republicación de fecha 24 de Abril de 2008, efectuada bajo el número de publicación WO 2007/141657 A3, con especial mención de que se efectúa con el reporte de búsqueda internacional, antes del vencimiento de la fecha para modificar las reivindicaciones y para ser republicada en caso de que se reciba reporte de modificaciones.

   3.1. Copia en inglés del formulario PCT/ISA/210 - informe de la búsqueda internacional.

4. Copia en inglés de la solicitud tal como fue publicada en fecha 13 de Diciembre de 2007, bajo el número de publicación WO 2007/141657 A2, con especial mención de que se efectúa sin reporte internacional de búsqueda y para ser republicada en cuanto se recibiese dicho reporte.

5. Copia en inglés de la solicitud PCT en formulario PCT/RO/101.

(espacio en blanco)

COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CELULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS Y SUS DERIVADOS, METODOS DE USO Y METODOS DE PREPARACION

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden células madre embrionarias humanas (hES) o sus derivados, las células madre están libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibrolastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, para usarse en el tratamiento de enfermedades, condiciones o trastornos médicos actualmente incurables o terminales. Más particularmente, la invención se refiere a métodos de tratamiento de trastornos clínicos y condiciones terminales o actualmente incurables usando células hES por medio de un protocolo de transplante. La invención se refiere además a procesos nuevos para preparar líneas de células madre nuevas las cuales están libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos,

suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados. Esta invención se refiere además al aislamiento, cultivo, mantenimiento, expansión, diferenciación, almacenamiento y conservación de las células madre.

Técnica anterior

Un gran número de trastornos, condiciones y enfermedades médicas humanas son ya sea actualmente incurables a través de las terapias de fármaco, cirugía o métodos de transplante existentes, o son terminales.

Las células madre tienen la capacidad de dividirse para generar células "hijas" que conservan las propiedades de la célula madre, o de producir hijas que empiezan a diferenciarse en un tipo de célula más especializado, o de producir una célula hija de cada tipo. Las células madre son entonces cruciales para el crecimiento y desarrollo humano normal, y debido a sus características intrínsecas también son fuentes potenciales de células nuevas para la regeneración de tejido dañado o enfermo. Las células madre están presentes en todas las etapas de desarrollo y en muchos (posiblemente la mayoría) tejidos del adulto. Células madre de diferentes tejidos, y de diferentes etapas de desarrollo, varían en términos del número y tipo de células a las cuales

dan origen normalmente. Las principales clases de células madre de acuerdo con esta clasificación son las células madre embrionarias, células madre somáticas y células germinales embrionarias.

En las primeras etapas después de la fertilización (hasta la octava etapa celular), todas las células del embrión son totipotentes (es decir, tienen la capacidad de desarrollarse en cada tipo de célula requerida para el desarrollo completo, incluyendo tejidos extra-embrionarios tales como la placenta y el cordón umbilical). Después de aproximadamente dos a cinco días se alcanza la etapa de blastocisto. Dentro de esta bola de 50-100 células descansa la masa celular interna, la cual se desarrollará en el embrión adecuado. La masa celular interna comprende aproximadamente un cuarto de todas las células en esta etapa de desarrollo y una clase única de células madre; las células madre embrionarias. Las células madre embrionarias tienen la capacidad innata o potencial de diferenciarse en cada uno de los 200 y tantos tipos de células del cuerpo y se describen como pluripotentes. La capacidad de las células hES para contribuir a todos los tipos de tejidos en desarrollo aún no ha sido completamente establecida, pero pueden hacerse crecer durante largos periodos de tiempo en cultivo y expandirse en número sin cambiar sus genotipos o fenotipos celulares, y conservando su estado pluripotente bajo estas condiciones.

Después de la etapa de blastocisto, las células madre comprenden una proporción descendente de células en el embrión, feto y cuerpo adulto. Muchos si no es que la mayoría de los tejidos en el feto y adulto contienen células madre, las cuales, en su ubicación normal, tienen el potencial de diferenciarse en un número limitado de tipos de células específicos para de esta manera regenerar el tejido en el cual residen normalmente. Estas células madre (células madre somáticas) son multipotentes y pueden tener un potencial más restringido que las células madre embrionarias toda vez que normalmente dan origen a algunos pero no todos los tipos de células del cuerpo humano. Las principales fuentes de células madre somáticas son la médula ósea y sangre de cordón del feto y adulto.

Las células madre embrionarias sirven como un excelente sistema *in vitro* para estudiar eventos de diferenciación celular, tamizado de fármacos y como una fuente primaria de células diferenciadas especializadas para aplicaciones terapéuticas regeneradoras futuras.

Las células madre embrionarias, al ser pluripotentes, tienen el potencial de desarrollo de dar origen a cualquier tipo de célula diferenciada. Así, una enfermedad que resulte de la falla o desregulación, ya sea genética o adquirida, de tipos de células específicas es potencialmente tratable por el transplante de células hES o

sus derivados mediante reemplazo de las células defectuosas y regeneración del órgano o tejido afectado y también al estimular el tejido latente y que muere.

Se ha sugerido que el transplante de células hES o sus derivados en el cuerpo humano tiene el potencial como un medio para resolver necesidades médicas no satisfechas.

Se ha considerado ampliamente que el transplante de células hES revolucionará el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, condiciones y trastornos pero, hasta la fecha, los estudios han sido restringidos a estudios preclínicos en ratones y primates. Es cuestionable si los resultados observados en modelos con animales son verdaderamente representativos de los eventos que pudieran ocurrir después del transplante de estas células en el humano. Además, sin el uso clínico del concepto, las composiciones farmacéuticas, protocolos, rutas de administración y dosis de administración de las células madre siguen sin definir y sin probarse. Más aún, aunque las células madre humanas derivadas de fuentes que no son un embrión o xenotransplante de células, tejidos y órganos de otras especies han sido usadas en el escenario clínico, estos intentos han sido ampliamente inexitosos o presentan una variedad de efectos secundarios debilitadores.

La presente invención proporciona el transplante de una composición farmacéutica que comprende células hES y/o

sus derivados en humanos que sufren de una variedad de condiciones, enfermedades o trastornos actualmente incurables o terminales.

La patente de E.U.A. No. 5,453,457 describe una composición que comprende células pluripotentes de mamífero no murino derivadas de una célula germinal primordial y que incluyen factor de crecimiento de fibroblasto básico, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y factor inhibidor de leucemia.

La patente de E.U.A. No. 6,800,480 reclama una composición que comprende células hES no diferenciadas que proliferan en una matriz extracelular.

La solicitud de patente de E.U.A. No. 2003/0017587 describe la expansión *in vitro* de células madre embrionarias no diferenciadas obtenidas de un feto abortado o de blastocistos en etapa de corte frescos o congelados usando un medio de cultivo que no requiere células alimentadoras. Una vez aisladas, las células madre embrionarias son introducidas en un medio de cultivo de células complementado con factores de crecimiento, suero bovino fetal, factor de crecimiento neuronal, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble o medios acondicionados que no son deseables en vista de potenciales efectos secundarios después de su transplante en un paciente. Igualmente, la mencionada

solicitud de patente no dice nada acerca del protocolo que se usará para el tratamiento de trastornos genéticos o clínicos excepto que el paciente requiere de una dosis de cada tipo de célula.

La solicitud de patente de E.U.A. 2004/0071665 proporciona un método terapéutico que emplea células madre de mamífero para el tratamiento de cardiopatologías. Este ejemplo proporciona células madre embrionarias diferenciadas para formar un racimo cardiomiogénico, cultivada sobre células alimentadoras y luego inyectado en tres sitios del corazón de un ratón que tiene infarto del miocardio.

La solicitud de patente de E.U.A. No. 2004/0107453 describe un método para obtener, mantener y diferenciar células madre adultas y su uso en tratamiento terapéutico.

La solicitud de patente de E.U.A. No. 2005/0124003 describe un método para obtener, mantener y diferenciar células madre fetales y su uso en tratamiento terapéutico.

En particular, y de relevancia particular para la presente invención, el transplante de células madre embrionarias en modelos de Lesión de Médula Espinal (SCI) en ratón han mostrado claramente su futuro potencial como un tratamiento de primera línea de SCI aguda (McDonald et al., (1999) Nature Med. 5:1410; Kerr et al., (2003) J. Neurosci. 23:5131; Roy et al., (2004) Nature Biotechnology, 22:297; Hori et al., (2003) Stem Cells, 21:405; Harper, (2004) Proc.

Natl. Acad. Sci. 101:7123). A pesar de la eficacia demostrada en modelos con animales, el escepticismo con respecto a problemas de rechazo de injerto contra huésped, la necesidad potencial de administración de por vida de inmunosupresores y la formación de tumores y teratomas han retrasado las autorizaciones para reproducir la seguridad y eficacia preclínica en pruebas con humanos experimentales. Un problema adicional que enfrenta el diseño de estudios clínicos y de particular relevancia para la presente invención es que, hasta el momento, no hay protocolos o programas de administración establecidos, no hay estudios de lo que pudiera ser una dosis terapéuticamente efectiva o una composición farmacéutica activa, o qué tipos de células o combinaciones de células deben usarse.

Por lo tanto un objetivo de la presente invención es desarrollar composiciones farmacéuticas que comprendan células hES y sus derivados las cuales estén libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados suspendidos en una solución biocompatible, portadora o matriz, entonces adecuada para uso humano.

Otro objetivo más de la presente invención es desarrollar un protocolo para el tratamiento de trastornos actualmente incurables o terminales.

Un objetivo más de la presente invención es desarrollar un protocolo para el tratamiento de SCI (Lesión de Médula Espinal).

Las composiciones de la presente invención son simples de preparar, seguras, económicas, eficientes, fácilmente transportables, escalables, tienen una vida útil adecuada y están libres de efectos secundarios tales como reacciones antígeno-anticuerpo, enervaciones aberrantes, tumorigenicidad, formación de teratomas o rechazo de injerto contra huésped. Asimismo, la presente invención requiere de sólo un embrión y por consiguiente el suministro continuo de embriones humanos no se requiere. Igualmente, el protocolo para tratamiento de acuerdo con la presente invención no requiere el uso de inmunosupresores, y no depende de tipificación de HLA, no depende de raza, género o edad del sujeto tratado para el tratamiento efectivo de las enfermedades, condiciones o trastornos, no tiene regresión y no tiene la necesidad de un entrenamiento anterior en la técnica de administración. El tratamiento de sujetos con las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la práctica de la presente invención es por lo tanto posible en cualquier instalación clínica adecuadamente equipada a nivel mundial.

Para transplantar células madre embrionarias humanas en humanos para propósitos terapéuticos es importante que estas células estén libres de contaminación tal como bacterias, virus, priones o tiroides. La adopción de prácticas de laboratorio operacionales estándares tales como adecuadas prácticas de fabricación y clínicas reducen el riesgo de estas contaminaciones a un nivel aceptable.

Los riesgos para el paciente existen, no obstante, a través de metodologías de cultivo de células existentes.

Un gran riesgo es que los componentes del medio de cultivo de células, mantenidos en el producto farmacéutico para su administración a sujetos humanos, se administren y por lo tanto representen un riesgo para el paciente a través de efectos secundarios hasta el momento no anticipados que no hubieran podido ser anticipados a través de estudios de "seguridad" en pruebas con animales.

La eliminación de este riesgo es por lo tanto deseable.

Las características de una fuente de cultivo de células madre embrionarias para su administración a sujetos humanos ha sido identificada como teniendo el siguiente diseño: son capaces de proliferación durante un periodo de tiempo extendido sin diferenciación, mantienen un cariotipo en el cual todas las características del donador se conservan fielmente durante el cultivo, mantienen el potencial de

diferenciarse en derivados del endodermo, mesodermo y ectodermo a través del cultivo, no se diferenciarán cuando sean cultivadas en ausencia de factores exógenos, no darán origen a teratomas, no serán inmunogénicas, no formarán conexiones aberrantes y tejido ectópico, actuarán en el tejido dañado y no se dividirán continuamente *in vivo* sino que están programadas para hacerlo en un ciclo de vida natural. No debe haber contaminantes presentes en la metodología de cultivo y la línea de células descrita en la invención.

El principal impulso de investigación hasta ahora ha sido desarrollar condiciones de cultivo que satisfagan estos requerimientos, pero hasta la fecha ninguna de estas condiciones han sido esperanzadoras o validadas a través de pruebas clínicas. En particular, la investigación hasta la fecha se ha enfocado en la eliminación del requerimientos de células alimentadoras de ratón como una matriz para el crecimiento y des-diferenciación de un cultivo de células madre embrionarias humanas. El remedio parcial de proporcionar factores de crecimiento desconocidos a través de la remoción de células alimentadoras y la suplementación de "medios acondicionados" también ha revelado un riesgo inaceptable en el medio de cultivo ideal. Las células madre embrionarias humanas cultivadas en presencia de medios acondicionados alimentadores conservan aún un riesgo

inherente de contaminación y por lo tanto un riesgo inaceptable durante su transplante a humanos.

Un factor adicional en el diseño de condiciones de cultivo de células madre embrionarias humanas destinadas para su administración a humanos es la cuestión de complementos exógenos residuales en los medios que pudieran estar presentes en la composición farmacéutica administrada pero que son esenciales durante la fase de expansión celular.

Estos incluyen factor de crecimiento de fibroblastos, factor inhibidor de leucemia, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble, suero, albúminas u suplementos de albúmina, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, transferrinas o suplementos de transferrina, antioxidantes, insulina o sustitutos de insulina, precursores de colágeno o sustitutos de precursor de colágeno, elementos residuales, residuos de "medios acondicionados", productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos y suplementos vitamínicos.

Los residuos de estos suplementos adicionales se ven como riesgos innecesarios para la seguridad de los pacientes durante el transplante de células madre embrionarias humanas en estos sujetos. Además, la suplementación de estos factores en el medio de cultivo se

añade al riesgo de contaminación del ambiente y se añade al costo futuro de una terapia con células madre y por lo tanto limita su capacidad de aplicación en una amplia gama de enfermedades, condiciones o trastornos médicos.

Un número de enfoques han sido adoptados para reducir estos riesgos incluyendo: las patentes de E.U.A. y solicitudes Nos. 5,843,780; 5,690,926; 6,642,048; 6,800,480; 5,166,065; 6,200,806; 5,453,357; 6,090,622; 6,562,619; 6,921,632, 2006/0073587 y 2002/076747.

Sin embargo, ninguno de estos enfoques ofrecen un sistema para la producción de un producto farmacéutico que contenga células madre embrionarias humanas y sus derivados el cual esté libre de factores potencialmente contaminantes que pudieran afectar la eficacia y seguridad de células madre embrionarias humanas y sus derivados después de administración a humanos.

Es por lo tanto otro objetivo de la invención desarrollar un sistema de cultivo de células simplificado para la expansión de las células hES y sus derivados en un estado sustancialmente no diferenciado para producir así un producto farmacéutico que esté listo para usarse en una amplia variedad de trastornos médicos.

Más particularmente, un objetivo de la presente invención es proporcionar una técnica de cultivo que produzca una línea de células madre libre de productos animales,

células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden células hES y/o sus derivados, y el uso de las células hES y sus derivados para tratar una amplia variedad de condiciones, enfermedades y trastornos en las que las células madre se introducen en el cuerpo humano mediante una variedad de rutas de administración, aplicaciones tópicas o inserción intralesional.

La presente invención proporciona además un método para tratar un sujeto que sufra de una enfermedad, trastorno o condición terminal o actualmente incurable, que comprende un programa de administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES o sus derivados mediante inyección intramuscular, intravenosa, caudal, intravítrea, intraestriatial, intraparenquimal, intratecal, epidural, retrobulbar, subcutánea, intracardiaca, intracística, intra-articular o intratecal, infusión por catéter epidural, infusión por catéter de bloque

subaracnoide, infusión intravenosa, por medio de nebulizador, por medio de aspersor, por medio de rutas intravaginales, por medio de gotas oculares y óticas locales, y un programa de administración de las células hES y sus derivados tópicamente o intralesionalmente.

Es preferible usar células hES o sus derivados que estén libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos vitamínicos, suplementos aminoácidos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, para evitar cualquier probabilidad de contaminación y posibilidades de efectos secundarios negativos. Las células hES y sus derivados pueden obtenerse a través de cualquier metodología de cultivo de células conocida y aprobada, la cual está libre de células alimentadoras, y libre de contaminación de cualquier fuente y segura para transplante a humanos. Los derivados de hES incluyen células diferenciadas más del cuerpo humano.

La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades, trastornos o condiciones terminales o actualmente incurables que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células hES o sus derivados están libres de

productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, suspendidos en una solución farmacéuticamente aceptable y biocompatible o cualquier otro vehículo portador.

La presente invención incluye también células hEs y/o sus derivados libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, atrapados en un material o matriz biocompatible. El material biocompatible o matriz puede seleccionarse de biopolímeros, incluyendo polipéptidos o proteínas, polisacáridos, incluyendo fibronectina, varios tipos de colágeno, laminita, queratina, fibrina, fibrinógeno, ácido hialurónico, sulfato de heparina, sulfato de condroitina, agarosa o gelatina.

Las composiciones de la presente invención pueden estar en una forma de fármaco listo para usar en las cuales las células madre tienen viabilidad adecuada, es decir, tienen una viabilidad lo suficientemente alta como para ser

útiles en uno o más métodos de la presente invención. En una modalidad, las células madre tienen una viabilidad de más de aproximadamente 40%, por ejemplo más de alrededor de 50%, 60%, 70% u 80%. Las composiciones pueden incluir además un agente antimicrobiano, agente antibacteriano, producto hormonal u otro agente farmacéutico.

Para preparar las composiciones, alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o uno o más de sus derivados tales como progenitores de células madre hematopoyéticas, progenitores de células madre neuronales, progenitores de células madre mesenquimáticas, progenitores de células madre productoras de insulina, progenitores de células madre de hepatocitos, progenitores de células madre cardiacas, progenitores de células madre epiteliales o mezclas de los mismos se suspenden en aproximadamente 0.25 mL a alrededor de 100 ml de un vehículo portador. En una modalidad, aproximadamente 750,000 a alrededor de 80 millones de células hES se suspenden en alrededor de 0.25 ml a aproximadamente 10 ml del vehículo portador. En enriquecimiento para tipos progenitores de células madre diferenciados específicos en una población es una prioridad, aunque una proporción de células madre no diferenciadas permanecerá en la composición. En una modalidad, la porción de células madre no diferenciadas será de no más de aproximadamente 80% de la población total de

células. En otra modalidad, la porción de células madre no diferenciadas será de no más de alrededor de 40% de la población total de células.

Las enfermedades terminales y otros trastornos o condiciones que pueden ser tratados o reducidos de acuerdo con la presente invención incluyen, sin limitación, cáncer, trastornos hepáticos y renales, trastornos del sistema nervioso, trastornos de la piel, trastornos autoinmunes, trastornos genéticos, trastornos oculares, trastornos musculoesqueléticos, trastornos de fertilidad y reproductivos y trastornos cardiovasculares y sin limitación incluyen Leucemia Mieloide Aguda, Adenocarcinoma, Artritis, Astrocitoma, Atrofia del Nervio Auditivo, Autismo, Trastornos Autoinmunes, enfermedad de Alzheimer, Espondilitis Anquilosante, Distrofia Muscular de Becker, Daño Cerebral, Quemaduras, Accidente Cerebrovascular, Parálisis Cerebral, Coma, Ulceras Corneales, Rechazo de Injerto Corneal, Degeneración Cortico-Basal del Sistema Nervioso, Enfermedad de Arterias Coronarias, Diabetes, Demencia, Síndrome de Down, Distrofia Muscular de Duchenne, Enfermedad Renal en Etapa Terminal, Parálisis de Erb, Distrofia Muscular Fascio Escapular, Trastornos de Fertilidad, Ataxia de Friederich, Insuficiencia Cardiaca, Carcinoma Hepatocelular, Enfermedad de Neuronas Espino Motoras Hereditaria, Corea de Huntington, Enfermedad de Krabbe, Distrofia del Cíngulo de las

Extremidades, Cirrosis Hepática, Degeneración Macular, Retraso Mental, Esclerosis Múltiple, Enfermedad de Neuronas Motoras, Infarto del Miocardio, Síndrome Nefrótico, Enfermedad de Niemann Pick, Ulceración No Sanadora de la Piel, Atrofia Olivo-Ponto Cerebelar, Atrofia del Nervio Óptico, Mal de Parkinson, Encefalopatía Post Choque Eléctrico, Encefalopatía Post-Vacuna Contra la Rabia, Llagas por Presión, Parálisis Supranuclear Progresiva, Psoriasis, Ptisis Bulbi, Cardiomiopatía Restrictiva, Retinitis Pigmentosa, Bloque de Ramificación del Fascículo Derecho, Sarcoidosis, Bradicardia del Seno, Distrofia Muscular Espinal, Ataxia Espino Cerebelar, Síndrome de Steven Johnson, Lupus Eritematoso Sistémico, Trombocitopenia, Talasemia, Colitis Ulcerativa, Estado Vegetativo, Fibrosis Quística, Enfermedad Pulmonar Intersticial, Azoospermia, Insuficiencia Ovárica Primaria, Ulceras Aftosas, Desequilibrio Hormonal, Osteo-Artritis, Síndrome de Horner y Osteogénica Imperfecta, junto con Canalopatía e Hipogamaglobulinemia.

Más específicamente, la presente invención proporciona un método de tratamiento de SCI en un sujeto, que comprende:

a) administrar aproximadamente 750,000 a alrededor de 80 millones de células hES y/o sus derivados mediante inyección subcutánea;

b) repetir la etapa (a) después de un periodo

predeterminado y posteriormente administrar células hES y/o sus derivados mediante inyección intramuscular;

c) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas, mediante inyección o infusión intravenosa;

d) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección epidural y repetir la dosis después de un periodo predeterminado dependiendo de la condición del sujeto evaluada por examen clínico y/o neurológico;

e) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección caudal;

f) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección intratecal o catéter de bloque subaracnoide;

g) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales,

mediante inyección epidural o catéter epidural;

h) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados mediante inyección espinal profunda sobre cada lado de la espina y

i) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados mediante infusión intravenosa;

en donde las etapas (a) e (b) se llevan a cabo primero y las etapas restantes pueden llevarse a cabo en cualquier orden. En una modalidad, la etapa (f) se repite seguida por la etapa (g), al menos una vez, hasta que el sujeto exhiba señales clínicas de recuperación de la SCI.

La invención proporciona también un método para tratar un sujeto con una enfermedad, trastorno y condición que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados cultivados en medio libre de productos animales, células alimentadoras, medios acondicionados, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana o factor Steel soluble, mediante inyección intramuscular e inyección intravenosa o inyección intraepidural o catéter epidural o inyección retrobulbar inyección subcutánea o inyección intracardiaca o inyección intracística o inyección intratecal o mediante aplicación tópica o aplicación intralesional. En una modalidad, la

enfermedad, trastorno o condición es una enfermedad, trastorno o condición terminal o actualmente incurable.

La invención proporciona también un método para tratamiento de trastornos del sistema nervioso en desarrollo, degenerativos, hereditarios y traumáticos y ataque cerebrovascular que comprende la administración de alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas solos o en combinación, mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intratecal, infusión por catéter epidural e infusión por catéter de bloque subaracnoide.

La invención proporciona también un método para el tratamiento de trastornos de la piel que comprende la administración de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, mediante inyección subcutánea o intravenosa.

La invención proporciona también un método de tratamiento de úlceras por decúbito que comprende la administración de alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados mediante aplicación local o tópica y mediante inyección intramuscular.

La invención proporciona también un método de

tratamiento de trastornos autoinmunes que comprende la administración de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, mediante inyección intramuscular, e inyección intravenosa, o inyección subcutánea o inyección intraarticular o infusión intravenosa o combinaciones de las mismas.

La invención proporciona también un método para el tratamiento de trastornos genéticos, que comprende la administración de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas solos o en combinación, mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intratecal, infusión por catéter epidural o infusión por catéter de bloque sub aracnoide o combinaciones de los mismos.

La invención proporciona también un método de tratamiento de gangrena, que comprende la administración de alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular o aplicación local en la unión de tejido viable y muerto o combinaciones de los mismos.

La invención proporciona también un método para el

tratamiento de condiciones asociadas con envejecimiento, que comprende la administración de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, o aplicación local en suspensión o mezclada con un vehículo biocompatible tal como un gel, ungüento, matriz, pasta o spray de aerosol.

La invención proporciona también un método para el tratamiento de diabetes mellitus, que comprende la administración de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en dónde las células comprenden células progenitoras productoras de insulina, mediante inyección intravenosa o intramuscular o combinaciones de las mismas.

La invención proporciona también un método para tratar trastornos cardiovasculares, que comprende la administración de alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en dónde las células comprende progenitores de células madre hematopoyéticas, mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intracardiaca, angiografía e inyección directa durante cirugía.

La invención proporciona también un método de tratamiento de Trastornos Hepáticos y Renales que comprende la administración de aproximadamente 750,000 a alrededor de

160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprende progenitores de células madre hematopoyéticas, progenitores de células madre productoras de albúmina y progenitores de células madre productoras de bilirrubina, mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, infusión intravenosa o inyección local.

La invención proporciona también un método para el tratamiento de Trastornos de Fertilidad y Reproductivos que comprende la administración de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, mediante inyección intramuscular local, inyección intratesticular o a través de inyección en piel subcutánea cerca del epidídimo.

La invención proporciona también un método de tratamiento de Trastornos Musculoesqueléticos que comprende la administración de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas solos o en combinación, mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular o infusión por catéter intravenoso.

La invención proporciona también un método para el

tratamiento de Trastornos Oculares que comprende la administración de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, progenitores de células madre hematopoyéticas, progenitores de células madre mesenquimáticas solos o en combinación, mediante inyección intravenosa local, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección retrobulbar, inyección intravítrea o aplicación tópica. En una modalidad, aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados que comprenden progenitores de células madre neuronales se administran mediante inyección retrobulbar. En otra modalidad, alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados que comprenden progenitores de células madre neuronales, se administran mediante inyección intravítrea. En otra modalidad, aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados que comprenden progenitores de células madre mesenquimáticas se aplican a lentes de contacto para su colocación en el ojo para el tratamiento de abrasión corneal (por ejemplo, el lente de contacto se cultiva con las células hES y/o sus derivados para recubrir al lente de contacto con células y el lente se pone después en el ojo durante aproximadamente 24 horas).

La invención proporciona también un método de

tratamiento de Trastornos Pulmonares que comprende la administración de 750,000 a 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas solos o en combinación con progenitores de células madre neuronales mediante inyección intramuscular, inyección intravenosa, aspersión o nebulizador. En una modalidad 750,000 a 160 millones progenitores de células madre hematopoyéticas se administran mediante nebulizador en el cual se añaden 2 ml de solución salina normal. En otra modalidad 750,000 a 160 millones de progenitores de células madre hematopoyéticas se administran mediante aspersión (descarga instantánea).

La invención proporciona también un método para el tratamiento de Trastornos Hormonales que comprende la administración de 750,000 a 160 millones de células hES y/o sus derivados en donde las células comprenden células madre hematopoyéticas y neuronales mediante rutas intramusculares intravenosas.

La invención proporciona también un método para el tratamiento de Ulceras Aftosas y otras úlceras, que comprende la administración de 750,000 a 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden células madre hematopoyéticas y neuronales en combinación o solas mediante rutas intramusculares e intravenosas.

La invención proporciona también un método para el

tratamiento de Osteoartritis de la rodilla y cadera, que comprende la administración de 750,000 a 160 millones de células hES y/o sus derivados mediante inyección intramuscular, intravenosa o intra-articular. En una modalidad 750,000 a 160 millones de progenitores de células madre hematopoyéticas se administran intra-articularmente.

La presente invención proporciona una metodología de cultivo de células que es aplicable al cultivo de células hES y sus derivados que se puede usar para el transplante en humanos sin ningún efecto secundario tal como formación de teratomas, formación de tumores, problemas de antigenicidad o rechazo de injerto contra huésped.

El diseño de la metodología de cultivo es específicamente para la producción de células hES y sus derivados de viabilidad suficiente y de características apropiadas para la actividad terapéuticamente óptima después de su transplante en humanos.

En una modalidad preferida, la metodología de cultivo de células se usa para el crecimiento, expansión, diferenciación y almacenamiento de células hES. Además, la invención se refiere a composiciones listas para inyectar que comprenden células hES y/o sus derivados que se almacenan en condiciones de almacenamiento que son adecuadas para transplante directo después de descongelarlas.

En contraste con las metodologías de cultivo de

células existentes para el mantenimiento de células hES en un estado sustancialmente no diferenciado, el medio de cultivo no contiene suplementos tales como factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor inhibidor de leucemia, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble, suero, albúminas o suplementos de albúmina, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, transferrinas o suplementos de transferrina, antioxidantes, insulina o sustitutos de insulina, precursores de colágeno o sustitutos de precursores de colágeno, elementos residuales, residuos de "medios acondicionados", productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos y suplementos vitamínicos.

En contraste adicional con otras metodologías de cultivo de células para la expansión de células hES, la práctica de la presente invención no lleva a la formación de cuerpos embrioides, evitando así la necesidad de disección quirúrgica. Cabe mencionar en este punto que el producto de la invención que es un producto totalmente humano, podría no ser necesario el xenotransplante (por ejemplo, pruebas con animales). La instancia de la primera gestación de fertilización *in vitro* (IVF) es un ejemplo corolario.

A diferencia de otras metodologías de cultivo de células, las técnicas de cultivo de células de la presente

invención permiten la expansión casi ilimitada de células hES sin diferenciación significativa. Una gran ventaja de la presente invención es que un solo embrión es suficiente para proporcionar cantidades terapéuticamente efectivas de células hES y/o sus derivados para tratar multitudes de pacientes. Así, no existe la necesidad de una procuración repetida de embriones humanos, y pueden evitarse muchas de las cuestiones éticas asociadas con el uso de embriones humanos.

Una ventaja más de los métodos de la presente invención es que las células hES y sus derivados son productos universalmente aceptables en términos inmunológicos, por lo que no se requiere una comparación cruzada de pacientes y células y no se requiere inmunosupresión.

Un aspecto de la invención se refiere a métodos para aislar células hES, que comprende:

(a) colectar un embrión de 2 a 7 días de edad en medio esencial mínimo,

(b) aislar células hES del embrión mediante medios mecánicos.

Un aspecto de la invención se refiere a un método para expandir células madre embrionarias humanas libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos,

suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, que comprende las etapas de:

(a) introducir células madre embrionarias humanas en un medio de células que consiste en medio esencial mínimo, una progestina y un agonista de gonadotropina coriónica β (βhCG) humana e

(b) incubar las células madre en una temperatura de aproximadamente 34°C a alrededor de 38°C en un ambiente de alrededor de 3.5% a aproximadamente 6% de dióxido de carbono durante alrededor de 12 horas a aproximadamente 48 horas.

Otro aspecto de la invención se refiere a métodos para cultivar células hES de tal forma que estén en una etapa antes de la etapa parcialmente diferenciada y estén libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarias, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, que comprende las etapas de:

(a) introducir células hES en un medio de cultivo que consiste en medio esencial mínimo y

(b) incubar las células madre a una temperatura de alrededor de 34°C a aproximadamente 38°C en un ambiente de alrededor de 3.5% a aproximadamente 6% de dióxido de carbono

durante aproximadamente 12 horas a alrededor de 48 horas.

Otro aspecto de la invención se refiere a un proceso para preparar una preparación de células madre embrionarias humanas lista para usar para su transplante a humanos, que comprende:

(a) obtener células madre embrionarias humanas libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarias, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados,

(b) centrifugar las células madre para obtener un gránulo y

(c) suspender el gránulo en una solución biocompatible.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para almacenar una célula madre embrionaria humana en una condición viable, que comprende:

(a) tomar células madre preparadas mediante los métodos de la presente invención,

(b) añadir un agente de crioconservación y

(c) congelar las células a -4 a -80°C.

El propósito de cultivar células hES de acuerdo con la práctica de la presente invención en ausencia de estos

complementos es reducir el riesgo de introducir contaminantes bacterianos, fúngicos, virales u otras contaminaciones en el cultivo. Esto reduce el riesgo de infección y variabilidad en las características de las células.

Un propósito más de la presente invención es proporcionar métodos simples, económicos y escalables para la producción y expansión de células hES y sus derivados en una forma que esté libre de cualquier residuo contaminante y se asegura para su uso en humanos.

El propósito de esta invención es por lo tanto proporcionar productos farmacéuticos en los cuales el riesgo de administración de toda la co-contaminación se reduzca, y en los cuales se elimine la contaminación residual de factores complementarios.

Un propósito más de la presente invención es proporcionar una metodología de cultivo de células que reduzca el riesgo de aberraciones cromosómicas o inestabilidad genética.

Otro propósito de la presente invención es proporcionar una metodología de cultivo de células que reduzca el riesgo de formación de teratomas en pacientes en los cuales el cultivo sea transplantado.

Un propósito más de la presente invención es proporcionar una metodología de cultivo de células que reduzca el riesgo de formación de tumores en pacientes en los

cuales el cultivo sea transplantado.

Otro propósito de la presente invención es proporcionar una metodología de cultivo de células que reduzca el riesgo de problemas de antigenicidad o de problemas de rechazo de injerto contra huésped en pacientes en los cuales se transplante el cultivo.

La presente invención proporciona específicamente composiciones que comprenden células hES y sus derivados y un medio biocompatible que están en una forma que cumple con las normas reguladoras internacionales de seguridad y calidad, y por lo tanto en una forma que está lista para su inyección a pacientes humanos para propósitos terapéuticos.

La presente invención proporciona también un producto de manufactura que comprende una suspensión de células hES y/o sus derivados suspendida en una solución biocompatible y contenida en un recipiente para almacenamiento, transporte o transplante directamente a un humano.

La presente invención proporciona también un método para la expansión de células hES y sus derivados.

La presente invención proporciona también un método para la expansión de células hES y sus derivados y la inhibición de su diferenciación.

La presente invención proporciona también un método para el crecimiento de células hES y sus derivados que las

hace terapéuticamente efectivas después de su transplante a un humano que esté sufriendo de una enfermedad, condición o trastorno.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

En la siguiente descripción y ejemplos se usa un número de términos. Para proporcionar un entendimiento claro y conciso de la descripción y reivindicaciones, incluyendo el alcance que se le dará a estos términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

Se debe notar que los términos usados para describir generalmente la presente invención se usan de una manera que se mantenga acorde con su significado común y como el entendido por alguien de capacidad ordinaria en la técnica.

"Célula madre embrionaria" se refiere a células pluripotentes de humanos (es decir, células hES). En una modalidad, las células hES son aisladas de un embrión en etapa pre-blastocisto. En otra modalidad, las células hES se preparan mediante diferenciación en células al menos parcialmente diferenciadas (por ejemplo, células multipotentes) y son totipotentes en la práctica. Los métodos para preparar células hES se conocen bien y se enseñan, por ejemplo, en las patentes de E.U.A. Nos.

5,843,780, 6,200,806, 7,029,913, 5,453,357, 5,690,926, 6,642,048, 6,800,480, 5,166,065, 6,090,622, 6,562,619, 6,921,632 y 5,914,268, la solicitud de patente de E.U.A. publicada No. 2005/0176707 y solicitud internacional No. WO2001085917.

"Células madre fetales" se refiere a las células madre derivadas de tejido fetal, es decir, tejidos de un humano en desarrollo después de la implantación del embrión en el útero.

"Multipotentes" se refiere a células madre que producen sólo células de una familia de células estrechamente emparentada.

"Pluripotentes" se refiere a células madre que son descendientes de células totipotentes y pueden crecer en cualquier tipo de célula excepto para las células madre totipotentes.

"Totipotentes" se refiere a células madre que se producen a partir de la fusión de una célula de huevo y espermatozoide. Las células producidas por las primeras pocas divisiones de la célula de huevo fertilizada también son totipotentes. Estas células pueden crecer en cualquier tipo de células sin excepción.

"Cantidad terapéuticamente efectiva" se usa en la descripción para describir concentraciones o cantidades de componentes tales como células madre embrionarias, células

neuroprogenitoras, células neuronales, progenitores de células madre hematopoyéticas, progenitores de células madre cardiacas o cualquier otro derivado de células madre, u otros agentes y mezclas de los mismos que sean efectivos para producir un resultado deseado dentro del contexto de la práctica de uno o más aspectos de la presente invención.

Los términos "transplantar" y "transplante" se usan a lo largo de la descripción indistintamente para describir el proceso mediante el cual células madre embrionarias y/o sus derivados de acuerdo con la presente invención se suministran al sitio dentro del cuerpo humano en dónde las células están destinadas a exhibir un efecto favorable en relación con el tratamiento o disminución de una enfermedad, trastorno o condición descrita en la presente incluyendo, sin limitación, para reparar daño en el sistema nervioso central de un sujeto, tratar una enfermedad neurodegenerativa o tratar los efectos de daño nervioso causado por apoplejía, enfermedad cardiovascular, un ataque cardiaco o lesión o trauma físico o daño genético o insulto ambiental al cerebro y/o médula espinal u otros órganos, causados por, por ejemplo, un accidente u otra actividad, daño hepático, trastorno autoinmune, disfunción sexual o reproductiva, degeneración de varias partes del ojo, daño renal, etc.

"Solución biocompatible" se usa en la descripción para referirse a soluciones en las cuales las células hES y/o

sus derivados se suspenden para usarse en el protocolo de transplante o en cualquier otro uso subsecuente. Estas soluciones biocompatibles incluyen solución salina y pueden comprender además otros ingredientes tales como conservadores, antimicrobianos y similares y otros agentes farmacéuticos.

"Vehículo biocompatible" se usa en la descripción para referirse a vehículos sólidos, soluciones y mezclas en las cuales las células hES y/o sus derivados se suspenden para usarse en el protocolo para tratamiento tópico, transplante o para cualquier otro uso subsecuente. Estos vehículos biocompatibles incluyen geles, ungüentos, pastas y nebulizadores de aerosol.

"Recipiente biocompatible" se usa en la descripción para referirse a contenedores (por ejemplo, recipientes de cultivo o almacenamiento de células) en las cuales las células hES y/o sus derivados se ponen y los cuales no evitan que las células se usen en transplante, es decir, no contaminan las células con compuestos que no pueden ser administrados a sujetos. Ejemplos de materiales recipientes biocompatibles incluyen sin limitación vidrio, acero inoxidable y poliestireno.

Una "progestina" es cualquier hormona natural o sintética que tiene actividad tipo progesterona, es decir, que tiene al menos 25% de la actividad de progesterona en

cualquiera de un ensayo conocido para actividad biológica. Ejemplos incluyen sin limitación progesterona, didrogesterona, medroxiprogesterona, noretisterona, levonorgestrel, norgesterel, gestodeno y drospirenona. Ejemplos de otras progestinas se describen en las patentes de E.U.A. Nos. 7,091,234, 7,084,151, 7,081,457, 7,071,205, 6,562,857, 6,319,911, 6,245,757, 6,043,235 y 6,028,064.

"Agonistas de gonadotropina coriónica β (βhCG) humana" se definen como cualquier βhCG que ocurre naturalmente o sintética o fragmento derivado de la misma que tiene al menos 25% de la actividad de βhCG natural en uno de cualquier ensayo conocido para actividad biológica. Ejemplos de agonistas de βhCG incluyen sin limitación βhCG y aquellos descritos en las patentes de E.U.A. Nos. 6,635,445, 6,585,982, 6,583,109, 6,469,139 y 5,997,871.

"Medio esencial mínimo" se usa en la descripción para referirse a un medio de cultivo de células que comprende aminoácidos, sales, glucosa y vitaminas. Ejemplos incluyen RPMI, DMEM, EMEM y GMEM.

"Nebulización" significa la administración de un fármaco o sustancia en los pulmones mediante un nebulizador.

Intra-articular significa la administración en el espacio intra-articular.

Retrobulbar significa administración en el espacio retrobulbar.

Infusión intravenosa significa administración en la vena usando un fluido intravenoso que comprende el producto o fármaco.

Inyección o infusión por catéter "epidural" significa la administración en la región fuera de la duramadre de las meninges.

Inyección o infusión con catéter "intratecal" significa administración en la capa más interior de las meninges, es decir, la materia aracnoide dentro del fluido cerebroespinal, la cual es continua con el cerebro.

Inyección "caudal" significa administración a través de la membrana sacral, la cual está aproximadamente tres centímetros arriba de la punta del cóccix que es continua con el espacio epidural.

"Inyección Espinal Profunda" significa inyección en los músculos espinales erectores sobre cada lado de la espina.

Inyección "intramuscular" significa administración entre las láminas musculares.

Inyección "intravenosa" significa administración dentro de una vena.

"SCI aguda" significa hasta tres meses después de la fecha de la SCI.

"SCI Sub Aguda" significa a partir de tres meses después de la fecha de la SCI hasta nueve meses después de la

fecha de la lesión.

"SCI Crónica" significa más de nueve meses después de la fecha de la SCI.

Los "derivados" de células hES incluyen células madre multipotentes, células madre pluripotentes, células madre adultas y células madre específicas de tejidos y no incluyen células completamente diferenciadas. Ejemplos de células madre específicas de tejidos pueden encontrarse en la siguiente tabla:

Tipo de célula	**Número de patente**
Células madre derivadas de tejido adiposo	6,777,231
Células madre epiteliales de mama	5,814,511
Células madre endoteliales	6,852,533
Células progenitoras de ganglio de la raíz doral	6,835,567
Células progenitoras hematopoyéticas $CD34^-$, $CD7^+$, Lin^-, Lin^-, $CD45RA^+$,	6,537,807
Células madre hematopoyéticas $Thy\text{-}1^+$	5,061,620
Células madre hematopoyéticas $Thy\text{-}1^+$, $CD34^+$	5,750,397
Células madre hematopoyéticas $CD34^+$, $CD38^-$, $HLA\text{-}DR^+$	5,840,580

Tipo de célula	Número de patente
Células linfoides y dendríticas hematopoyéticas $CD34^+$, $CD45RA^+$, $CD10^+$; Células dendríticas hematopoyéticas $CD34^+$, $CD45RA^+$, $CD10^+$	5,972,627
Células madre hematopoyéticas c-kit^-, Thy-1^-	5,876,956
Células madre hematopoyéticas $CD34^+$	5,681,559
Células madre hematopoyéticas HCC-1^+	5,677,136
Células progenitoras hematopoyéticas $CD34^+$, lectina$^+$ específica de galactosa	5,858,782
Células madre hematopoyéticas (quiescentes) $CD34^+$	5,807,686
Células madre queratinocíticas	6,485,971
Células madre hepáticas No expresan OC2	6,129,911 6,872,389
Células madre progenitoras linfohematopoyéticas My 10^-	5,256,560
Células progenitoras linfoides	6,908,763
Células progenitoras neurales de mesencéfalo	6,913,925
Células madre mesenquimáticas $CD45^+$	6,387,367

Tipo de célula	Número de patente
Células madre mesenquimáticas	5,486,359
Células madre mesenquimáticas	5,827,735
Células madre mesenquimáticas	5,908,782
Células madre mesenquimáticas	6,936,281
Células madre mesenquimáticas	6,908,764
Células epiteliales pluripotentes derivadas de ductos Mullerianos	6,416,999
Células progenitoras mieloides c-kit^{hi}, IL-7Rα^-	6,465,247
Células progenitoras mieloides Thy-1$^-$, IL-7Rα^-	6,761,883
Células progenitoras neurales	5,753,505
Células madre neurales	5,851,832
Células progenitoras neuronales	6,251,669
Células madre neuronales	6,969,608
Células progenitoras neuronales que no expresan una proteína Hu	6,852,532
Células precursoras neuronales restringidas en linaje E-NCAM$^+$	6,734,015
Células madre neuroepiteliales	7,037,702

Tipo de célula	Número de patente
Células madre neurales del sistema nervioso central	5,968,829
Células progenitoras neuronales	6,812,027
Células progenitoras neurales	6,913,925
Células precursoras restringidas en neuronas del sistema nervioso central	6,787,353
Células progenitoras de neuronas del mesencéfalo ventral	5,411,883
Células madre de cresta neural	5,589,376
Células multipotentes de cresta neural que contienen proteína RET	6,890,724
Células progenitoras de neutrófilos	5,955,357
Células progenitoras pancreáticas	6,436,704
Células progenitoras de las isletas pancreáticas que expresan ErbB2	6,753,153
Células pluripotentes	5,914,268
Células pluripotentes transformadas con un gen HOX11	5,874,301
Células progenitoras de sangre periférica	5,541,103
Células madre renales	6,410,320

Tipo de célula	Número de patente
Células madre renales	6,458,588
Células madre retinales	6,117,675
Células progenitoras esqueléticas	6,517,872
Células madre $FGFR^+$, no células ES	6,767,737
Células madre que dan origen a células hemáticas $CD34^-$, $MHC\text{-}1^-$, $MHYC\text{-}II^-$	5,744,347
Células progenitoras de linaje T $CD8^{int}$, $CD4^{int}$, c-kit^{hi}, bcl-2 alta; $CD8^{lo}$, $CD4^{lo}$, c-kit^{hi}, bcl-2 alta	5,821,108
Células precursoras de linfocitos T $CD34^+$, $CD7^+$, Leu 8^+	5,622,853

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden células hES y/o sus derivados, las células madre están libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, para usarse en el tratamiento clínico de enfermedades, condiciones

o trastornos actualmente incurables o terminales. En otra modalidad, la invención se refiere a un método de tratamiento de condiciones actualmente incurables o terminales usando células hES y/o sus derivados mediante un protocolo de transplante.

La frase "libre de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinación de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana y medios acondicionados" no excluye las cantidades residuales de progestina y agonista de βhCG que pudieran estar presentes en la composición farmacéutica como resultado de los métodos de cultivo de la presente invención. El término "productos animales" se refiere a cualquier producto no humano.

En otra modalidad, el proceso de esta invención proporciona un método simple, seguro, ampliamente aplicable, reproducible y eficiente para el transplante de una composición farmacéutica, que comprende células hES y/o sus derivados en una forma lista para usar y que está libre de células alimentadoras y cualquier otro contaminante. Estas células pueden derivarse de cualquier metodología de cultivo y transplantarse en el cuerpo humano sin importar el antecedente genético del paciente, edad, raza y género y sin

reacción anticuerpo-antígeno o rechazo de injerto-huésped, sin la formación de teratomas o tumores, u otros efectos secundarios debilitantes, sin el resultado de enervaciones aberrantes y sin la necesidad de administración de inmunosupresores para el tratamiento de una variedad de enfermedades, condiciones y trastornos.

En contraste con otros métodos conocidos, las células hES usadas en la preparación de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se cultivan en un medio de cultivo que está libre de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarias, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, y por lo tanto no tienen ninguna clase de contaminación que pudiera interferir con la seguridad y eficacia del uso clínico deseado.

De acuerdo con la práctica de la invención, las células hES y/o sus derivados se introduce en el cuerpo humano mediante inyección intramuscular, intravenosa, caudal, intravítrea, intraestratial, intraparenquimal, intratecal, epidural, retrobulbar, subcutánea, oral, intracardíaca, intracística, intra-articular o intratecal o catéter epidural, catéter de bloque subaracnoide, infusión

intravenosa, mediante nebulizador, mediante aspersión, mediante rutas intravaginales y/o mediante gotas locales para ojos y oídos. En otra modalidad, las células hES y/o sus derivados se administran tópica o intralesionalmente.

Cada ruta de administración usa un volumen de inyección particular y por lo tanto una escala específica de células a partir de las soluciones de abastecimiento de células hES y/o sus derivados según se indica en la tabla 1. Cuando tipos de células son indicados (por ejemplo, en las tablas de programa de inyección abajo), el tipo de célula indicado es el tipo que está presente predominantemente en la población de células.

Tabla 1

Ruta de administración	**Volumen**	**Número de células**
Intramuscular	0.25 ml	750,000-1.5 millones
Intravenosa	0.25 ml	750,000-1.5 millones
Subcutánea	0.25 ml	750,000-1.5 millones
Caudal	2 ml	6-16 millones

Ruta de administración	**Volumen**	**Número de células**
Epidural	2 ml	6-16 millones
Intratecal	2 ml	6-16 millones
Intra-articular	2 ml	6-16 millones
Retrobulbar	2 ml	6-16 millones
Catéter epidural	4-5 ml	12-40 millones
Infusión intravenosa	0.75 ml	2.25-4.5 millones
Nebulizador	2 ml	6-16 millones
Intravaginal	2 ml	6-16 millones

Entre el laboratorio y el punto de uso final, ya sea en una clínica o cualquier otro lado, las composiciones farmacéuticas deben mantenerse bajo almacenamiento en frío. En una modalidad, las composiciones farmacéuticas se almacenan a aproximadamente +4 a alrededor de -160°C. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se almacenan a alrededor de -15 a aproximadamente -72°C, por ejemplo, a alrededor de -20 a aproximadamente -40°C.

En una modalidad, las células hES usadas en la presente invención se aíslan de un embrión vacío, descartado de un ciclo de fertilización *in vitro* natural y donado a través de consentimiento informado. En una modalidad

alternativa, se usan en la presente invención células madre fetales pluripotentes, tales como aquellas descritas en la solicitud publicada de E.U.A. No. 2005/0124003 aisladas de vello coriónico, fluido amniótico y/o placenta.

Esta invención proporciona un método para el tratamiento de una variedad de enfermedades, condiciones y trastornos incluyendo pero no limitadas a cáncer, apoplejía, trastornos genéticos, trastornos hepáticos, trastornos del sistema nervioso, trastornos vasculares, enfermedades o trastornos de la piel, trastornos autoinmunes, trastornos oculares, trastornos renales, trastornos cardiacos, trastornos musculoesqueléticos, trastornos reproductivos y de fertilidad y artritis usando células hES y/o sus derivados.

Ejemplos no limitativos de cánceres que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen tumor de médula espinal, cáncer de mama, cáncer de próstata, linfoma, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer de colon, melanoma, melanoma maligno, cáncer ovárico, cáncer cerebral, carcinoma cerebral primario, cáncer de cabeza y cuello, glioma, glioblastoma, cáncer hepático, cáncer de vejiga, cáncer pulmonar de células no pequeñas, carcinoma de cabeza o cuello, carcinoma de mama, carcinoma ovárico, cáncer cervical, lesiones metastásicas, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de células pequeñas, tumor de Wilm, carcinoma cervical, carcinoma testicular, carcinoma de

vejiga, carcinoma pancreático, carcinoma de estómago, carcinoma de colon, carcinoma prostático, carcinoma genitourinario, carcinoma de tiroides, carcinoma esofágico, mieloma, mieloma múltiple, carcinoma adrenal, carcinoma de células renales, carcinoma endometrial, carcinoma de corteza adrenal, insulinoma pancreático maligno, carcinoma carcinoide maligno, coriocarcinoma, hipercalcemia maligna, hiperplasia cervical, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia granulocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia de células pilosas, neuroblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma de Kaposi, vera policitemia, trombocitosis esencial, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma osteogénico, macroglobulinemia primaria y retinoblastoma.

En una modalidad, las células hES no son tratadas con un agente de diferenciación ya que, al ser embrionarias, las células están programadas, y una vez administradas al sujeto, las células migran al sitio de la lesión. En ese sitio, las células se diferencian en respuesta a señales de diferenciación *in vivo*. En el sitio de la lesión, las células hES y sus derivados no proliferan indefinidamente, requiriendo entonces de un programa de inyecciones repetidas. El hecho de que las células hES y sus derivados no proliferen indefinidamente elimina la posibilidad de tumorigenicidad y

formación de teratomas.

Después del tratamiento con células hES y/o sus derivados de acuerdo con la práctica de la presente invención, el paciente debe descansar y adoptar un estricto régimen de abstinencia de consumo de cualquier sustancia tal como alcohol o tabaco que pudiera deteriorar la función celular e impedir los procesos de regeneración desencadenados por la migración de las células hES y sus derivados al sitio de la lesión. El paciente debe evitar también tomar cualquier medicamento que se sepa sea dañino durante el embarazo, ya que los medicamentos pueden tener efectos adversos en las células transplantadas.

Uso de células hES y sus derivados en el tratamiento de SCI

Actualmente no existen curas efectivas para el tratamiento de SCI incluyendo Daño a Médula Espinal Agudo, Daño a Médula Espinal Subagudo o Daño a Médula Espinal Crónico, lo cual frecuentemente da como resultado paraplejía, tetraplejia y cuadriplejia. El transplante de células hES para el tratamiento de pacientes de SCI presenta una oportunidad única para resolver una necesidad médica no satisfecha y mejora dramáticamente las vidas de los millones de personas a nivel mundial quienes sufren las consecuencias de SCI. El volver a tener las funciones perdidas de los sistemas nerviosos central y autonómico a través del

transplante de células hES y sus derivados en un estado sustancialmente progenitor permitirá la recuperación de vías parasimpáticas, simpáticas, motoras, autonómicas y sensoriales a través del reemplazo de la función de células perdidas, regeneración de células neurales perdidas, remoción de barreras físicas tales como tejido cicatricial, bloqueo de vías de señalización inhibidoras y la liberación de factores neurotróficos de los progenitores de células hES transplantadas.

Entre los beneficios de restablecimiento de una función neurológica a través del transplante de células hES de acuerdo con la práctica de la presente invención están: una mejora en la función motora y sensorial, la calidad de vida en general, reducción en el sistema de soporte proporcionado generalmente por parientes, la reducción en la dependencia en otras composiciones farmacéuticas y otros dispositivos y auxiliares médicos, mejora en el estado mental y psicológico y también en independencia económica. Existe también una reducción en los costos de equipo médico y auxiliares de discapacidad y dependencia a medicamentos a través de una recuperación de las funciones parasimpáticas, simpáticas, sensoriales y motoras. Existe un incremento en autosuficiencia, mejora en estado social, estado marital y capacidad de ejercer derechos reproductivos, sólo con un número limitado de visitas clínicas al año para tratamiento.

El tratamiento mediante la administración de células hES y sus derivados de acuerdo con la presente invención no lleva a problemas de antigenicidad, formación de tumores, formación de teratomas o conexiones neurales aberrantes.

Asimismo, la administración de células hES y sus derivados especialmente para sujetos con SCI resulta en la cura de úlceras por decúbito, reducción en su necesidad por hipertensos o antidepresivos, restablecimiento de sensación y control de la vejiga, restablecimiento de la sensación intestinal y sensación de dolor y tacto, restablecimiento de reflejos perdidos; reducción en síntomas de sudoración fría; reducción en la sensación de mareo; normalización de la presión sanguínea y normalización de la respiración con implicación diafragmática completa.

Un procedimiento para la administración de las células hES a pacientes que sufren de Daño en Médula Espinal Sub-Agudo, o Daño en Médula Espinal Crónico y para quienes mecanismos de recuperación naturales han fallado se da en detalle a continuación. Un procedimiento diferente para el tratamiento de SCI aguda es un tratamiento de primera línea dentro de los tres meses de la lesión de acuerdo con la práctica de la presente invención también es provisto en detalle abajo.

La dosis terapéuticamente efectiva, el programa de administración y ruta de administración de células hES que se

administrará depende principalmente de tres factores; en particular tipo de trastorno, estado clínico del paciente y la severidad de los síntomas presentes. Durante la práctica de la presente invención se ha encontrado que las dosis y programas terapéuticamente efectivos no dependen de la edad, género, peso corporal o raza. El protocolo para cada paciente se establece individualmente con base en un proceso de evaluación continua del paciente.

En una modalidad de la práctica de la presente invención, una composición farmacéutica que contiene células hES y/o sus derivados se administra a un sujeto que sufre de un trastorno actualmente incurable o condición Terminal u otro trastorno clínico como el mencionado arriba a través de una serie de inyecciones para de esta manera tratar el trastorno.

Varias modalidades para el tratamiento de trastornos clínicos y condiciones terminales de acuerdo con la presente invención se describirán ahora con referencia a los siguientes ejemplos.

Tratamiento, dosis, programa, rutas de administración, evaluación y seguimiento de pacientes que sufren de SCI

En una modalidad, células hES y/o sus derivados se administran a un sujeto que ha sufrido de un SCI por más de

tres meses (SCI Sub Aguda y Crónica) a través de una serie de inyecciones para tratar el trastorno. En otra modalidad, los derivados de hES son células madre progenitoras hematopoyéticas. En otra modalidad, los derivados de hES son células madre progenitoras neuronales.

Dosis de prueba

En una modalidad, aproximadamente 750,000 a alrededor de 80 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden células madre progenitoras hematopoyéticas y células madre progenitoras neuronales, diluidas en solución salina normal estéril hasta un volumen final de aproximadamente 0.25 a alrededor de 0.1 ml se prueban para contaminación y viabilidad y para conteo usando protocolos estándares y posteriormente se administran mediante inyección subcutánea como una dosis de prueba en el antebrazo. Se hacen observaciones para analizar si existe hecho anafiláctico, dolor e inflamación en el sitio de la inyección, comezón generalizada, salpullido o fiebre después de cinco minutos, diez minutos, quince minutos, treinta minutos, una hora y veinticuatro horas. En una modalidad, la proporción de células hES a células madre progenitoras hematopoyéticas y células madre progenitoras neuronales varía de alrededor de 4:1 a aproximadamente 1:4. En otra modalidad, la proporción es de aproximadamente 1:1.

Dosis inicial

El protocolo implica la administración de una inyección inicial subcutánea, intramuscular y/o intravenosa de una composición farmacéutica que contiene aproximadamente 750,000 a alrededor de 80 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden células madre progenitoras hematopoyéticas y células madre progenitoras neuronales, resuspendidas en un volumen de aproximadamente 0.25 ml a alrededor de 1.0 ml de solución salina normal estéril. La inyección inicial se administra a través de una inyección de una composición farmacéutica que contiene el mismo número de células hES y sus derivados diariamente durante una semana a 10 días.

Inyección epidural y catéter epidural

Aproximadamente 750,000 a 80 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden células madre progenitoras neuronales, suspendidas en un volumen de 2 ml de solución salina estéril normal y diluidas más a 5 ml a 40 ml de solución salina estéril normal se administran mediante inyección epidural o catéter epidural sobre o debajo del sitio de la lesión dos veces al día durante un periodo de tres días consecutivos, siete a diez días después de la primera inyección inicial. La

administración por inyección epidural/catéter epidural se repite sobre o debajo del sitio de la lesión de acuerdo con el progreso clínico en el desarrollo de síntomas presentados por el paciente y la opinión del médico. Se ha observado también que si el paciente se hace reposar sobre su espalda después de la inyección epidural, una mejora sensorial es sustancial y si se le hace apoyarse boca abajo, la mejora motora es sustancial. En ambos casos, el paciente tiene que tener las piernas mantenidas en una posición elevada.

Intratecal

Aproximadamente 750,000 a 11 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, suspendidas en 2 ml de solución salina estéril normal y diluidas más por 2 ml de solución salina estéril normal hasta un volumen total de 4 ml se administran mediante inyección intratecal sobre o debajo del sitio de lesión en periodos de dos, cinco, ocho, doce, diecisiete y veintidós meses después del inicio de las inyecciones iniciales.

En una modalidad, el tratamiento de SCI se continúa mediante la administración de células por inyección epidural con un catéter sobre o debajo del sitio de la lesión, por ejemplo, quince días después de la lesión. En una modalidad, una suspensión de aproximadamente 750,000 a 80 millones de

células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, en un volumen de 2 ml de solución salina estéril normal y luego se diluye más a 15 ml a 40 ml de solución salina estéril normal son inyectados. Este tratamiento puede repetirse uno y medio meses más tarde.

Inyección espinal profunda

De acuerdo con el progreso observado en la inversión de los síntomas, inyecciones de refuerzo adicionales de la composición farmacéutica pueden administrarse que comprendan aproximadamente 750,000 a alrededor de 80 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden tanto células madre hematopoyéticas como células madre progenitoras neuronales, suspendidas en un volumen de 0.25 ml a 1.0 ml de solución salina estéril normal. En una modalidad, la composición farmacéutica se administra mediante inyección espinal profunda en la parte posterior de la espina semanalmente o una semana sí y otra no. Este tratamiento reforzará los músculos de la espalda e incrementará la rehabilitación física una vez que el paciente haya vuelto a obtener movilidad.

Inyección caudal

De acuerdo con la práctica de la presente invención, una composición farmacéutica de aproximadamente 750,000 a alrededor de 80 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, resuspendidas en 2 ml de solución salina y diluidas en 10 ml sola o en combinación con hasta 20 ml de DEPOMEDROL (acetato de metilprednisolona) se administra mediante inyección caudal. Este tratamiento reforzará los músculos de la región lumbar y permitirá volver a obtener potencia sensorial y motora en las áreas lumbares y sacras.

Además de transplante continuo de células hES, la recuperación del paciente es auxiliada por fisioterapia diaria y una re-educación en su uso de la función motora perdida e instrucción para mantener un estilo de vida saludable que promueva la función celular y procesos de regeneración celular.

Administración local

Además del tratamiento directo de SCI usando células hES y/o sus derivados de acuerdo con la práctica de la presente invención, las úlceras por decúbito que se originan como resultado de inmovilización a largo plazo del paciente pueden ser tratadas rápidamente y en forma efectiva a través de la aplicación tópica de una composición

farmacéutica que contenga células hES y/o sus derivados.

El tratamiento de las úlceras por decúbito puede lograrse mediante la aplicación tópica de una composición farmacéutica que contenga aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden células progenitoras hematopoyéticas. Dosis de carga o iniciales se dan mediante inyección intravenosa e intramuscular para permitir un sanado interno así como para promover neovascularización. Como alternativa, las células hES y sus derivados son resuspendidas en 2 ml de solución salina, diluidas con 2 a 4 ml de solución salina y aplicadas intralesionalmente.

Infusión intravenosa

De acuerdo con la práctica de la presente invención, una composición farmacéutica que comprende 750,000 a 80 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden células progenitoras hematopoyéticas y neuronales, es resuspendida en 100 ml de solución salina normal y administrada mediante la ruta intravenosa. Este tratamiento asegura un flujo continuo de células madre en el cuerpo y puede ser especialmente útil si las otras rutas directas no son accesibles debido a cualquier razón, por ejemplo, una úlcera por decúbito en el sitio, el paciente muy debilitado, etc.

Protocolo para el tratamiento de SCI Aguda

Una rápida intervención en el tratamiento de SCI aguda incrementa ampliamente las probabilidades de supervivencia para el paciente. Además, la rápida intervención en el tratamiento de cualquier enfermedad, condición o trastorno incurable a través de la práctica de la presente invención incrementa las probabilidades de recuperación. En una modalidad más de la presente invención, pacientes que sufren de SCI aguda durante menos de tres meses después de la lesión espinal también pueden ser tratados exitosamente como se describe en detalle abajo. Una composición farmacéutica de células hES y/o sus derivados junto con una fisioterapia efectiva, rehabilitación y programa de re-educación de acuerdo con la práctica de la presente invención es una primera línea de tratamiento efectiva para SCI aguda.

El tratamiento de SCI aguda comprende todas las etapas usadas para el tratamiento de SCI Sub-Aguda y Crónica más dos etapas adicionales. Durante la intervención inicial para la SCI inmediatamente después de que ocurre la lesión (por ejemplo, cirugía), células hES y/o sus derivados se administran directamente al sitio de la lesión. El tratamiento de seguimiento comprende dos inyecciones intratecales y una inyección epidural dentro de tres meses de la lesión.

Evaluación clínica y observaciones

Para pacientes que hayan perdido la función motora en sus piernas durante un periodo de tiempo extendido, mientras sean tratados de acuerdo con la presente invención, los programas para su re-educación para caminar y otra terapia física deben implementarse al regresar la función motora a sus piernas. Como una primera etapa en estos programas, el uso de andaderas y calibres ha probado ser efectivo en la re-educación. Un programa adicional de la muscularización de los brazos y cuerpo superior debe implementarse para que el paciente sea capaz de soportar su peso corporal sin ayuda al caminar. Los programas de re-educación pueden reducirse al continuar el tratamiento y mejorar la condición del paciente.

Además de la reducción en la necesidad de un soporte por dispositivos médicos y terapia física, debido a mejoras en los síntomas simpáticos y parasimpáticos del paciente, a través del tratamiento de acuerdo con la práctica de la presente invención, existe una reducción en el requerimiento de medicamentos, incluyendo medicamentos para la fluctuación de la presión sanguínea, medicamentos contra la depresión, medicamentos para úlceras por decúbito, medicación y dispositivos médicos para complicaciones intestinales y de vejiga, medicamentos antiespasmódicos y bombas.

Además de una reducción en la necesidad de medicamentos para el tratamiento de los síntomas directa o indirectamente asociados con la SCI, se observa que los diabéticos con SCI y tratados de acuerdo con la presente invención muestran una reducción en la necesidad de sus medicamentos anti-diabéticos.

Una evaluación clínica de la progresión en la mejora de los síntomas presentados por el paciente que sufre de SCI y tratado de acuerdo con la presente invención se monitorea regularmente durante el curso del tratamiento y después de la revisión. Un número de parámetros fisiológicos, simpáticos, parasimpáticos, motores, autonómicos y fisiológicos se evalúan para de esta manera establecer la eficacia de la técnica para invertir los síntomas de SCI y éstos se describen en detalle abajo.

Se hace un examen de los registros médicos referentes, incluyendo descripción de síntomas, sitio de categorización de lesión, progresión de síntomas, intervenciones clínicas, tratamientos e historial general de la lesión. Con base en este examen y una cuidadosa auscultación del paciente, incluyendo un escaneo de Imágenesde Resonancia Magnética (MRI), Electromiografía (EMG), Velocidad de Conducción Nerviosa (NCV) y otros exámenes neurológicos e investigaciones que incluyen examen neurológico para evaluar el grado de daño y para obtener un

registro de la lesión antes del tratamiento, metodologías para la descripción semi-cuantitativa de mejoras después del transplante de acuerdo con las prácticas de la presente invención se hacen y se describen en detalle abajo.

Se registran parámetros simpáticos y bienestar neurológico incluyendo el estado mental del paciente, ya sea deprimido o de otra manera, características de comportamiento, función de nervio craneal y comportamiento generales como parte de una evaluación fisiológica.

Una evaluación de signos y síntomas ligados al daño neurológico en el sitio de la lesión y funcionamiento del sistema nervioso autonómico se hace. Esto incluye un examen neurológico, que prueba la capacidad para detectar presión profunda, sentido del tacto, sensibilidad, equilibrio, capacidad para detectar dolor, capacidad para sentir cambios de temperatura, movimientos involuntarios, presencia de sudor frío, mareo, presión sanguínea, dificultad para respirar, postura anormal mientras se está acostado y capacidad para sentarse sin ayuda.

Se hace una evaluación de la función de la vejiga e intestinal. Esto incluye control de vejiga, chorro de vejiga y sensación de llenura en la vejiga, control de intestinos, tiempo para evacuación del intestino y sensación en el intestino.

Se hace una evaluación de la función motora del

cuerpo superior para evaluar el grado de daño al sistema nervioso central. Esto incluye movimiento de hombros, movimiento de muñeca y dedos, reflejos de tendones y fuerza de movimiento de extremidades, atrofia muscular y agarre manual.

Se hace una evaluación de la función motora del cuerpo inferior para evaluar el grado de daño al sistema nervioso central. Esto incluye movimiento de caderas, movimiento de rodillas, movimiento de pies, reflejos de tendones y fuerzas de las extremidades, atrofia muscular y respuesta plantar. También se lleva a cabo un examen neurológico detallado a intervalos regulares durante el tratamiento para monitorear así el progreso de enervación de extremidades.

Para ayudar a la recuperación del paciente durante el curso de visitas clínicas, las técnicas de terapia física estándares se usan para de esta manera tonificar al paciente al regresar la función motora, de tal manera que pueda recuperar el uso de sus extremidades y articulaciones y se haga más móvil.

La prueba de regeneración neural es demostrada por el restablecimiento de función neurológica y evaluación neurológica. Ejemplos para el protocolo de tratamiento de SCI han sido proporcionados en estudios de casos en la presente solicitud.

Tratamiento de trastornos de desarrollo del sistema nervioso

Las células hES y/o sus derivados de acuerdo con la práctica de la presente invención se administran en una cantidad de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células para el tratamiento de trastornos de desarrollo tales como autismo y retraso mental. En otra modalidad, aproximadamente 750,000 a alrededor de 80 millones de células se administran mediante rutas intramusculares o intravenosas después de una dosis de prueba. También se puede usar la ruta intratecal. En una modalidad más, se puede usar también transplante intracraneal. Las células hES y/o sus derivados son células progenitoras predominantemente neuronales. En otra modalidad, células progenitoras hematopoyéticas y neuronales se administran mediante rutas intramuscular o intravenosa. Este tratamiento continúa durante un periodo de un año empezando con inyecciones diarias mediante rutas intramuscular o intravenosa durante un periodo de 3 meses. Después las mismas inyecciones continúan una vez a la semana durante los siguientes 3-6 meses y luego una vez cada quince días durante los siguientes 3 meses y después una vez al mes de acuerdo con las observaciones del médico. La inyección intratecal está incluida en el protocolo sólo 6-8 meses después del inicio del tratamiento y entonces también sólo si el paciente no está mostrando respuesta a las inyecciones intramusculares e intravenosas.

En otra modalidad de la presente invención, 750,000 a 80 millones de células hES y/o sus derivados se resuspenden en 100 ml de solución salina normal y se administran mediante infusión intravenosa.

Ejemplo 1

Un paciente diagnosticado con autismo que tiene temblores de aleteo, estado hiperactivo, sin habilidades sociales, sin contacto visual, movimientos erráticos, incapacidad para seguir instrucciones, sin disposición a aprender, mostró una mejora después de la administración de una composición farmacéutica que comprendía células hES y sus derivados incluyendo progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 2. para esta tabla y todas las tablas consiguientes con respecto a programas de inyección, el indicador de tipo de célula "neuronal" se refiere a una población celular de células hES que han sido parcialmente diferenciadas en un medio (por ejemplo, DMEM) que promueve diferenciación para células madre progenitoras neurales. La población de células comprende células hES y células madre que son predominantemente células madre progenitoras neuronales. El indicador "no neuronal" se refiere a una población de células de células hES que han sido parcialmente

diferenciadas en un medio (por ejemplo, DMEM) que promueve diferenciación para células madre progenitoras diferentes de las células madre progenitoras neuronales. La población de células comprende células hES y varias células madre que son predominantemente células madre progenitoras neuronales.

Tabla 2

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
3/13	dosis de prueba	no neuronal
3/14	im	neuronal
3/16	im	neuronal
3/17	im	neuronal
3/18	im	neuronal
3/20	im	neuronal
3/21	im	neuronal
3/22	im	neuronal
3/23	im	no neuronal
3/24	im	neuronal
3/27	im	neuronal
3/28	im	no neuronal
3/29	im	no neuronal
3/30	im	no neuronal
3/31	im	neuronal
4/3	im	neuronal
4/4	im	neuronal
4/5	im	neuronal
4/6	im	neuronal
4/7	im	neuronal
4/11	im	neuronal
4/12	im	neuronal
4/13	im	neuronal
4/14	im	neuronal
4/17	iv	neuronal
4/19	im	neuronal
4/21	iv	neuronal
4/24	im	neuronal

4/25	im	neuronal
4/28	iv	neuronal
5/1	iv	neuronal
5/3	iv	neuronal
5/5	im	neuronal
5/8	iv	neuronal
5/10	im	neuronal
5/12	im	neuronal
5/15	iv	neuronal
5/17	im	neuronal
5/29	im	neuronal
5/31	iv	neuronal
6/2	iv	no neuronal
6/5	im	neuronal
6/7	iv	neuronal
6/9	iv	no neuronal
6/12	iv	neuronal
6/14	infusión iv	neuronal
6/16	im	neuronal
6/19	im	no neuronal
6/21	im	neuronal
6/23	iv	neuronal
7/3	iv	neuronal
7/5	infusión iv	neuronal
7/7	im	no neuronal
7/10	im	no neuronal
7/12	im	neuronal
7/14	im	neuronal
7/17	infusión iv x 2	neuronal
7/18	im	no neuronal
7/20	im	no neuronal
7/24	im	no neuronal
7/28	im	no neuronal
7/31	im	no neuronal
8/2	im	no neuronal
8/4	im	no neuronal
8/7	im	no neuronal
8/10	im	no neuronal
8/11	im	no neuronal
8/14	im	no neuronal
8/18	im	no neuronal
8/21	im	neuronal
8/23	im	no neuronal
8/28	im	no neuronal
8/30	im	no neuronal
9/1	im	no neuronal

Tratamiento de Trastornos degenerativos del sistema nervioso

Las células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas de acuerdo con la práctica de la presente invención, son administradas en una cantidad de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células para el tratamiento de trastornos degenerativos del sistema nervioso que incluyen pero no están limitados a degeneración cortico-basal, atrofia cerebelar olivo ponto, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, demencia, atrofia del nervio de audición y enfermedad de neurona motora. En otra modalidad, se administran aproximadamente de 750,000 a alrededor de 80 millones células.

Ya que los protocolos de administración pueden variarse para adecuarse al paciente particular, un protocolo típico para el tratamiento de trastornos degenerativos del sistema nervioso en niños comprende inyecciones intramusculares e intravenosas diarias en el primer mes, inyecciones tres veces por semana durante los meses 2-4, inyecciones semanales en los meses 5 y 6 e inyecciones de refuerzo semanales en los meses 9-12. Para adultos un protocolo típico incluye inyecciones intramusculares e intravenosas diarias junto con administración mediante catéter epidural, punción lumbar, rutas intratecal o caudal.

Esto seguido por dos infusiones intravenosas con un espacio mínimo de por lo menos 7 días. Finalmente, se administran inyecciones de refuerzo una vez al mes durante 6 meses y después una vez cada 2 meses por al menos 6 meses. El tratamiento puede continuarse durante periodos largos e incluso puede ser de por vida toda vez que las enfermedades sean progresivas.

En el caso de trastornos progresivos y degenerativos, la detención o estabilización de la progresión de la enfermedad a través de intervención rápida de conformidad con la práctica de la presente invención permite una autodependencia incrementada del paciente. Sólo después del efecto de estabilización se pueden observar algunas mejoras.

Ejemplo 2

Un paciente que sufre de un historial de dos años de esclerosis múltiple progresiva repetitiva que toma SOLUMEDROL (metilprednisolona) diaria no fue capaz de caminar, no tiene control de vejiga o intestino y sufrió de trastornos respiratorios frecuentemente.

De conformidad con el tratamiento de acuerdo con la presente invención, la condición del sujeto mejoró, el paciente fue capaz de caminar y existió un restablecimiento del control de vejiga e intestino y el uso de SOLUMEDROL se

redujo. El MRI ha mostrado un 50% de mejora.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
7/15	dosis de prueba	neuronal
7/25	im	neuronal
7/26	im	neuronal
7/27	im	no neuronal
7/28	im	neuronal
7/29	im	neuronal
8/1	im	neuronal
8/2	im	neuronal
8/3	im	neuronal
8/4	im x 2	neuronal
8/5	im x 2	neuronal
8/9	im x 2	neuronal
8/10	im x 2	neuronal
8/11	im	neuronal
8/12	im x 2	neuronal
8/16	iv im	neuronal
8/22	im x 4	hES
8/24	iv im	neuronal
9/2	iv	neuronal
9/8	im	neuronal
9/15	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/19	iv	neuronal
9/22	im	neuronal
9/26	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/29	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/3	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/6	im	no neuronal
10/13	iv	mezcla neuronal y no neuronal
10/17	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/20	iv	neuronal
10/24	iv	mezcla neuronal y no neuronal
10/31	iv	mezcla neuronal y no neuronal
11/3	iv im	mezcla neuronal y no neuronal
11/7	im	no neuronal

11/21	iv	no neuronal
11/24	im	no neuronal
1/19	im x 2	no neuronal neuronal
1/25	im x 2	neuronal
2/2	im iv	no neuronal neuronal
2/15	im x 2 iv	neuronal no neuronal
2/23	im x 2 iv	neuronal no neuronal
3/2	im x 2 iv	neuronal no neuronal
3/8	im x 2 iv	no neuronal
3/16	im x 2 iv	neuronal no neuronal
5/2	im x 2	no neuronal
5/12	im x 2 iv	neuronal no neuronal
6/8	im x 2 iv	neuronal no neuronal
6/16	im x 2 iv	neuronal no neuronal
7/3	im	neuronal
7/4	im	neuronal
7/5	im	neuronal
7/6	im	neuronal
7/7	im	neuronal
7/18	im x 2 iv	neuronal no neuronal
7/22	im x 2 iv	neuronal no neuronal
7/24	im x 2 iv	neuronal no neuronal
8/1	im x 2 iv	no neuronal
8/4	im x 2 iv	no neuronal
8/7	im x 2 iv	no neuronal
8/24	im x 2 iv	no neuronal
8/28	im x 2 iv	no neuronal
9/2	im x 2 iv	no neuronal
9/6	im x 2 iv	no neuronal
9/9	im x 2 iv	no neuronal

Ejemplo 3

Un hombre de 60 años de edad presentado con ALS (enfermedad de neurona motora) dos años atrás con deterioración rápida en sus brazos y manos. Existieron espasmos continuos y fasciculaciones en sus brazos, manos y lengua. No podía rotar y poner boca abajo el brazo izquierdo o elevarlo arriba de su cabeza. Su brazo derecho podía ser elevado con un reflejo y tenía manos esqueléticas.

Año y medio después del tratamiento, sus manos se habían recuperado del marco esquelético con regeneración de músculos hipotecar y tenar de ambas manos. La supinación y pronación son posibles con ambos brazos. Tuvo la misma dificultada para tragar, la cual no ha empeorado desde entonces. No existe deterioro con sus piernas, respiración y habla.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 4.

Tabla 4

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
8/2	im	neuronal (dosis de prueba)
8/4	im	neuronal no neuronal
8/5	im	neuronal
8/8	im	neuronal
8/9	im	neuronal
8/10	im	neuronal
8/11	im	neuronal
8/12	im	neuronal
8/16	im	neuronal
8/17	im	hES
8/22	im	neuronal
8/23	im	neuronal
8/24	im x 3	no neuronal
8/25	im x 3	no neuronal
8/26	im	neuronal
8/29	im	neuronal
8/31	im iv	neuronal
9/2	im	neuronal
9/5	im iv	neuronal
9/7	im	neuronal
9/9	im	neuronal

	iv	mezclado
9/12	im iv	neuronal no neuronal
9/13	im iv	neuronal no neuronal
9/16	im	mezclado
9/19	im iv	neuronal mezclado
9/22	iv	neuronal
9/23	im iv	neuronal no neuronal
9/26	im	mezclado
9/27	im	mezclado
9/28	im iv	neuronal no neuronal
9/30	im iv	mezclado no neuronal
10/3	iv	mezclado
10/7	im	no neuronal
10/10	iv	neuronal
10/12	iv	mezclado
10/17	im iv	neuronal mezclado
10/20	epidural	neuronal
10/21	iv	neuronal
10/24	iv	mezclado
10/27	iv	neuronal
10/28	iv	mezclado
10/31	iv	mezclado
11/2	iv	mezclado
11/3	epidural	neuronal
11/4	iv	mezclado
11/7	im	no neuronal
11/9	im	no neuronal
11/11	im	neuronal
11/14	im	neuronal
11/17	im	no neuronal
11/21	im	no neuronal
11/23	im	no neuronal
12/13	im	no neuronal
12/19	im	neuronal
12/21	im	neuronal
12/23	im	neuronal
12/29	im	neuronal
1/3	im	neuronal
1/9	im	neuronal
1/12	im	neuronal
1/13	iv	no neuronal
1/16	iv	neuronal

1/19	im iv	neuronal no neuronal
1/23	epidural	neuronal
1/27	im iv	neuronal no neuronal
1/29	im iv	neuronal no neuronal
2/1	iv	neuronal
2/3	im iv	neuronal no neuronal
2/6	im iv	neuronal no neuronal
2/8	iv	no neuronal
2/10	iv	no neuronal
2/13	iv	no neuronal
2/15	iv	no neuronal
2/17	im iv	neuronal no neuronal
2/20	im iv	neuronal no neuronal
2/22	im iv	neuronal no neuronal
2/24	im iv	neuronal no neuronal
2/27	iv oral spray	neuronal no neuronal
3/1	im iv	neuronal no neuronal
3/6	iv	no neuronal
3/8	epidural	neuronal
3/9	epidural	neuronal
3/10	epidural	neuronal
3/11	iv	neuronal
3/22	im	no neuronal
3/24	im	no neuronal
3/27	iv	no neuronal
3/29	im iv	no neuronal
3/31	im aspersión oral	neuronal no neuronal
4/3	im iv	neuronal no neuronal
4/5	im iv	neuronal no neuronal
4/7	im iv	neuronal no neuronal
4/10	im iv	neuronal no neuronal
4/12	im	neuronal

	iv	no neuronal
4/19	epidural	neuronal
4/24	iv	neuronal
4/26	iv	no neuronal
4/28	im iv	neuronal no neuronal
5/2	im	no neuronal
5/3	im	neuronal
5/5	im iv	neuronal no neuronal
5/8	iv	no neuronal
5/11	infusión intravenosa	neuronal
5/12	im	no neuronal
5/14	im iv	neuronal no neuronal
5/15	im iv	neuronal no neuronal
5/16	im iv	neuronal no neuronal
5/17	im iv	neuronal no neuronal
5/19	im iv	neuronal no neuronal
5/22	im iv	neuronal no neuronal
5/24	im iv	neuronal no neuronal
5/26	im iv	neuronal no neuronal
5/29	im iv	neuronal no neuronal
6/1	im iv	neuronal no neuronal
6/2	im iv	neuronal no neuronal
6/5	catéter epidural	neuronal
6/6	catéter epidural	neuronal
6/7	catéter epidural	neuronal
6/12	im	neuronal no neuronal
6/14	im iv	neuronal no neuronal
6/16	infusión intravenosa	neuronal
6/21	im	neuronal
6/24	im	neuronal
7/3	iv	neuronal
7/5	iv	neuronal
7/7	iv	neuronal
7/10	iv	neuronal

7/12	iv	neuronal
7/14	iv	neuronal
7/17	iv	no neuronal
7/20	iv	no neuronal
7/24	iv	no neuronal
7/25	epidural (intratecal)	no neuronal
7/31	iv	neuronal
8/2	iv	neuronal
8/3	iv	no neuronal
8/8	iv	no neuronal
8/11	iv	no neuronal
8/16	iv	neuronal
8/23	iv	neuronal
8/28	iv	no neuronal
8/29	iv	no neuronal
9/5	iv	no neuronal
9/6	iv	no neuronal
9/8	iv	no neuronal
9/13	iv	no neuronal
9/15	im iv	no neuronal
9/18	im iv	no neuronal
9/19	infusión intravenosa	neuronal
9/20	infusión intravenosa	no neuronal
9/22	im iv	no neuronal
9/25	im iv	no neuronal
9/27	im iv	no neuronal
9/29	im iv	no neuronal
10/2	im iv	no neuronal
10/4	im iv	no neuronal
10/9	im iv	no neuronal
10/13	im iv	no neuronal
10/16	im iv	no neuronal
10/18	im iv	no neuronal
10/20	im iv	no neuronal
10/23	im iv	no neuronal

10/25	infusión iv	mezclado
10/27	infusión iv	no neuronal
11/1	im iv	no neuronal
11/6	im iv	no neuronal
11/8	im iv	no neuronal
11/10	intratecal	neuronal
11/13	im iv	no neuronal
11/15	im iv	no neuronal
11/17	im iv	neuronal no neuronal
11/20	im iv	no neuronal
11/22	im iv	no neuronal
11/24	iv	neuronal
11/27	im iv	mezclado
12/1	im iv	mezclado
12/4	infusión iv	mezclado
12/6	im iv	no neuronal
12/8	iv	neuronal
12/11	im iv	no neuronal
12/14	infusión iv	no neuronal
12/15	infusión iv	no neuronal
12/18	im iv	no neuronal
12/20	iv	neuronal
12/27	im iv	neuronal
12/29	im iv	neuronal
1/4	im iv	no neuronal
1/8	infusión iv	mezclado
1/9	infusión iv	mezclado
1/10	infusión iv	mezclado
1/12	im iv	no neuronal
1/16	im iv	no neuronal
1/19	im	no neuronal

	iv	
1/22	im iv	mezclado

Ejemplo 4

El paciente fue diagnosticado sufriendo de enfermedad de Parkinson. El paciente no respondió al tratamiento estándar y su condición se volvió peor mientras progresaba el tiempo. El tenía una braquibasia típica. Temblores unilaterales estuvieron presentes en el brazo derecho y él estuvo fisiológicamente mucho muy deprimido. No podía abrir sus ojos. Desde que empezó el tratamiento, el paciente ha mostrado mejora gradualmente y después de un año de tratamiento con células hES el paciente mejoró notablemente. El caminar es normal, los temblores en la mano son mínimos y psicológicamente está contento. Él abre sus ojos completamente. Ahora puede firmar y escribir, lo cual fue imposible al inicio del tratamiento. Ahora es menos dependiente de los demás.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 5.

Tabla 5

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
1/30	im iv	neuronal (dosis de prueba)
1/31	im	neuronal
2/1	iv	neuronal
2/2	iv im	no neuronal neuronal
2/3	iv im	neuronal
2/4	iv im	neuronal
2/5	iv im	neuronal
2/6	iv im	no neuronal neuronal
2/8	iv im	no neuronal neuronal
2/9	iv im	no neuronal neuronal
2/10	iv im	no neuronal neuronal
2/11	iv im	no neuronal
2/12	iv im	neuronal no neuronal

2/13	iv im	neuronal no neuronal
2/14	iv	neuronal
2/15	iv im	neuronal no neuronal
2/16	iv im	neuronal no neuronal
2/17	iv im	neuronal no neuronal
2/18	iv im	neuronal no neuronal
2/19	iv im	neuronal no neuronal
2/20	iv im	neuronal no neuronal
2/21	iv im	neuronal no neuronal
2/23	iv im	neuronal no neuronal
2/25	iv im	neuronal no neuronal
2/26	iv im	neuronal no neuronal
2/27	iv im	neuronal no neuronal
2/28	iv	neuronal
3/1	iv im	neuronal no neuronal
3/2	iv im	neuronal no neuronal
3/3	iv	neuronal
3/4	im	neuronal
3/5	iv	neuronal
3/7	im	neuronal
3/9	iv	no neuronal
3/10	iv im	neuronal no neuronal
3/11	iv im	neuronal no neuronal
3/12	iv im	neuronal no neuronal
3/13	iv im	neuronal no neuronal
3/28	iv	neuronal
3/29	iv im iv im	neuronal no neuronal
3/30	iv im im	neuronal no neuronal
3/31	iv	neuronal

	im	no neuronal
4/1	iv im	neuronal no neuronal
4/2	iv im	neuronal no neuronal
4/3	iv im	neuronal no neuronal
4/4	iv im im	neuronal no neuronal
4/5	iv im	neuronal no neuronal
4/6	iv im	neuronal no neuronal
4/7	iv im im	neuronal no neuronal
4/8	iv im	neuronal no neuronal
4/9	iv im	neuronal no neuronal
4/10	iv im	neuronal no neuronal
4/11	iv im	neuronal no neuronal
4/12	iv im	neuronal no neuronal
4/13	iv im	neuronal no neuronal
4/14	iv im	neuronal no neuronal
4/15	iv im	neuronal no neuronal
4/16	iv im	neuronal no neuronal
5/20	iv im	neuronal no neuronal
5/21	infusión	no neuronal
7/10	iv im	neuronal no neuronal
7/11	iv im	neuronal no neuronal
7/12	iv im	neuronal no neuronal
7/13	iv im	neuronal no neuronal
7/14	iv im	neuronal no neuronal
7/15	infusión iv	no neuronal
7/16	infusión iv	no neuronal
7/17	iv	neuronal

	im	no neuronal
7/18	iv im	neuronal no neuronal
7/19	iv im	neuronal no neuronal
7/20	iv im	neuronal no neuronal
7/21	iv im	neuronal no neuronal
7/22	infusión iv	neuronal
7/23	infusión iv	neuronal
7/24	infusión iv	no neuronal
7/25	iv im	neuronal no neuronal
7/26	iv im	neuronal no neuronal
7/27	iv im	neuronal no neuronal
7/28	iv im	no neuronal
7/29	infusión iv	neuronal
7/30	im	neuronal no neuronal
9/9	im iv	no neuronal
9/12	im iv	no neuronal
9/13	iv im	no neuronal
9/14	im iv	no neuronal
9/15	im iv	no neuronal
9/16	im iv	no neuronal
9/17	infusión iv	neuronal
9/18	infusión iv	neuronal
9/19	iv	neuronal
9/20	im iv	no neuronal
9/21	im iv	no neuronal
9/22	im iv	no neuronal
9/23	infusión iv	no neuronal
9/24	infusión iv	no neuronal
9/25	iv im	no neuronal
9/26	iv	no neuronal

	im	
9/27	iv im	no neuronal
9/28	iv im	no neuronal
9/29	iv infusión iv	neuronal
9/30	iv im	no neuronal
11/9	iv im	no neuronal
11/10	iv im	no neuronal
11/11	iv im	no neuronal
11/12	iv im	no neuronal
11/14	infusión iv	mezclado
11/16	iv im	no neuronal
11/17	iv im	no neuronal
11/18	infusión iv	neuronal
11/19	infusión iv	neuronal
11/20	iv im	no neuronal
11/21	iv im	no neuronal
11/22	iv im	no neuronal
11/23	iv im	no neuronal
11/24	infusión iv	neuronal
11/25	infusión iv	neuronal
11/26	im iv	mezclado
11/29	iv im	no neuronal
1/9	iv im	no neuronal
1/10	iv im	no neuronal
1/11	iv im	no neuronal
1/12	iv im	no neuronal
1/13	infusión iv	mezclado
1/14	infusión iv	mezclado
1/15	iv	no neuronal

	im	
1/16	iv im	no neuronal
1/17	iv im	no neuronal
1/18	iv	no neuronal
1/19	iv	no neuronal
1/20	infusión iv	no neuronal
1/21	infusión iv	mezclado
1/22	im iv	mezclado
1/23	im iv	mezclado
1/24	iv im	neuronal
1/25	iv im	neuronal
1/26	iv im	neuronal
1/27	infusión iv	mezclado
1/28	infusión iv	mezclado
1/29	iv im	neuronal
1/30	iv im	neuronal

Tratamiento de parálisis cerebral

Las células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas de acuerdo con la práctica de la presente invención, son administradas en una cantidad de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células para el tratamiento de parálisis cerebral. El protocolo y la dosificación son la

misma que para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

Ejemplo 5

Un hombre de 48 años de edad diagnosticado con AIIMS como CP al nacer tiene pronunciación inarticulada, caminado arrastrando los pies, dificultad al tragar, y semiparálisis del lado izquierdo. Se hizo el diagrama de tono muscular, reflejo y poder para confirmar lo mismo.

Seis meses después del tratamiento tiene una pronunciación más clara, no tiene dificultad para tragar, es capaz de usar el lado izquierdo de su cuerpo y su caminar ha mejorado. Es capaz de rasurarse con la mano izquierda y también de usar su mano izquierda para alzar tazas, etc. Su equilibrio es mejor y es capaz de hacer caminatas largas.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 6.

Tabla 6

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
3/8	dosis de prueba	no neuronal
3/10	iv im	neuronal
3/17	iv im	neuronal
4/8	iv im x 2	neuronal
4/9	iv x 3 im x 3	neuronal no neuronal
4/10	iv x 3 im x 3	neuronal no neuronal
5/10	iv im	neuronal no neuronal
5/11	im x 2 iv	neuronal
5/12	infusión iv x 2	neuronal
5/13	infusión iv	no neuronal
5/14	infusión iv iv im	neuronal no neuronal
5/15	infusión iv	no neuronal
7/19	iv im	neuronal no neuronal
7/20	infusión iv	no neuronal
7/21	infusión iv x 2	no neuronal
7/22	iv im	neuronal no neuronal
7/24	iv im	neuronal no neuronal
7/25	espinal profunda	neuronal
7/26	iv im	neuronal no neuronal
7/27	iv im	neuronal no neuronal
7/28	iv im	no neuronal
7/31	iv im	neuronal no neuronal
8/1	iv im	no neuronal
8/2	iv	no neuronal

	im	
8/3	iv im	no neuronal
8/4	infusión iv x 2	no neuronal
8/5	infusión iv	no neuronal
8/7	iv im	no neuronal
8/8	iv im	no neuronal
8/9	iv im	no neuronal
8/10	iv im	no neuronal
8/11	iv im	no neuronal
8/12	iv im	no neuronal
8/14	espinal profunda	neuronal
8/16	infusión iv	neuronal
8/17	infusión iv	neuronal
8/18	iv im	neuronal
8/19	espinal profunda	neuronal
8/20	iv im	no neuronal
8/21	iv im	no neuronal
8/22	iv im	no neuronal
8/24	infusión iv	no neuronal
8/25	infusión iv	no neuronal
8/26	iv im	no neuronal

Ejemplo 6

Una niña de 3 años de edad se trajo a la clínica con CP y parecía y se comportaba como una bebé de un mes de edad sin control de cuello, llanto débil sin respuesta e incapaz de succionar a través del biberón. Ella estaba absolutamente blanda.

Después de un año y medio de tratamiento ella ha crecido y parece una niña de 2 años de edad. Ella tiene control del cuello, reconoce a sus progenitores, gatea en la cama, come comida normal, sonríe al reconocer y se sienta con soporte y ha dado algunos pasos con su madre deteniéndola. Su caminar es un caminado de tijera y ella también ha empezado a llamar a sus padres.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 7.

Tabla 7

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
8/4	im	neuronal (dosis de prueba)
8/5	im	neuronal
8/8	im	neuronal
8/9	im	neuronal
8/10	im	neuronal
8/11	im	neuronal
8/12	im	neuronal
8/16	im	neuronal
8/17	im	neuronal
8/18	im	neuronal
8/19	im	no neuronal
8/22	im	mezclado
8/23	im	mezclado
8/25	im	mezclado
8/26	im	neuronal
8/29	im	neuronal
8/30	im	neuronal
8/31	im	neuronal
9/1	im	neuronal
9/2	im	neuronal
9/5	im	no neuronal
9/6	im	neuronal
9/7	im	neuronal
9/8	im	neuronal
9/12	im	mezclado
9/14	im	no neuronal
9/16	im	mezclado
9/19	im	neuronal
9/23	im	neuronal

9/26	im	mezclado
9/28	im	mezclado
9/30	im	mezclado
10/3	im	mezclado
10/5	im	neuronal
10/10	im	no neuronal
10/17	im	mezclado
10/19	im	no neuronal
10/21	im	neuronal
10/24	im	mezclado
10/28	im	mezclado
10/31	im	mezclado
11/4	im	mezclado
11/7	im	no neuronal
11/9	im	no neuronal
11/11	im	neuronal
11/14	im	neuronal
11/15	im	no neuronal
11/16	im	no neuronal
11/18	im	no neuronal
11/22	im	no neuronal
11/23	im	no neuronal
11/25	m	no neuronal
11/28	im	mezclado
11/29	im	mezclado
12/2	im	mezclado
12/7	im	no neuronal
12/9	m	no neuronal
12/12	im	no neuronal
12/14	m	neuronal
12/16	im	neuronal
12/19	im	no neuronal

12/21	m	neuronal
12/23	im	neuronal
12/26	m	no neuronal
12/30	im	neuronal
1/5	im	neuronal
1/11	im	neuronal
1/13	im	neuronal
1/16	im	neuronal
1/18	im	neuronal
1/23	im	neuronal
1/25	im	neuronal
1/27	m	neuronal
1/30	im	neuronal
2/1	im	neuronal
2/3	im	neuronal
2/6	im	neuronal
2/8	im	neuronal
2/10	im	neuronal
2/13	im	neuronal
2/15	im	neuronal
2/17	im	no neuronal
22.2.06	im	neuronal
2/24	im	neuronal
2/27	im	neuronal
3/1	m	neuronal
3/3	im	neuronal
3/6	im	no neuronal
3/8	im	no neuronal
3/22	im	no neuronal
3/24	im	neuronal
3/27	im	no neuronal
3/29	im	neuronal

3/31	im	neuronal
4/7	im	neuronal
4/10	im	neuronal
4/12	im	neuronal
4/14	im	neuronal
4/17	im	neuronal
4/19	im	neuronal
4/21	im	neuronal
4/24	im	neuronal
4/26	im	neuronal
5/1	im	neuronal
5/8	im	no neuronal
5/18	im	neuronal
5/22	im	neuronal
5/26	im	neuronal
5/29	im	neuronal
5/31	im	neuronal
6/2	im	neuronal
6/5	im	neuronal
6/12	im	neuronal
6/16	im	neuronal
6/19	im	neuronal
6/21	im	neuronal
6/28	im	neuronal
6/30	im	neuronal
7/4	im	neuronal
7/7	im	neuronal
7/17	im	neuronal
7/19	m	neuronal
7/21	im	neuronal
7/24	im	neuronal
7/26	im	neuronal

7/31	im	no neuronal
8/2	im	no neuronal
8/4	im	no neuronal
8/7	im	no neuronal
8/9	im	no neuronal
8/11	im	no neuronal
8/14	im	no neuronal
8/16	im	no neuronal
8/18	im	no neuronal
8/21	im	no neuronal
8/23	im	no neuronal
8/25	im	no neuronal
8/28	im	no neuronal
8/30	im	no neuronal
9/1	im	no neuronal
9/4	im	no neuronal
9/11	im	no neuronal
9/13	im	no neuronal
9/15	im	no neuronal
9/20	im	no neuronal
9/25	im	no neuronal
9/27	im	no neuronal
10/3	im	no neuronal
10/4	im	no neuronal
10/13	im	no neuronal
10/16	im	no neuronal
10/18	im	no neuronal
10/19	im	no neuronal
10/23	im	no neuronal
10/25	im	no neuronal
10/27	im	no neuronal
10/30	im	no neuronal

10/31	im	no neuronal
11/3	im	no neuronal
11/6	im	no neuronal
11/8	im	no neuronal
11/10	im	no neuronal
11/13	im	no neuronal
11/15	im	no neuronal
11/17	im	no neuronal
11/20	im	no neuronal
11/22	im	no neuronal
11/24	im	no neuronal
11/27	im	no neuronal
11/29	im	no neuronal
12/1	im	no neuronal
12/8	im	no neuronal
12/11	im	no neuronal
12/15	im	no neuronal
12/26	im	neuronal
12/27	im	neuronal
1/3	im	no neuronal
1/7	im	no neuronal
1/15	im	neuronal
1/24	im	neuronal
1/25	im	neuronal
1/29	im	neuronal

Ejemplo 8

Una niña de 8 años de edad fue diagnosticada con parálisis cerebral con retraso mental severo y fue incapaz de caminar por sí misma. No podía identificar objetos y tenia una duración de atención muy corta. Existía mucho babeo incontrolado y ella mantenía la boca abierta.

Después del tratamiento, ella ya no babea incontroladamente, su duración de atención ha mejorado y ella se ve más alerta. Ella está caminando con soporte mínimo.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 8.

Tabla 8

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
10/9	im	no neuronal (dosis de prueba)
10/10	im	no neuronal
10/11	im	no neuronal x 2
10/12	im	no neuronal
10/13	im	no neuronal
12/5	im	no neuronal
12/6	im iv	no neuronal
12/7	im x 3	no neuronal
12/8	im iv	no neuronal
12/9	im iv	no neuronal
12/10	im x 3	no neuronal
12/11	im iv	no neuronal
12/12	im x 3	no neuronal
12/13	im iv	no neuronal
12/14	im	no neuronal
12/15	im iv	no neuronal
12/16	im x 3	no neuronal
12/17	im iv	no neuronal
12/18	im	no neuronal
12/19	im iv	no neuronal
12/20	im x 3	no neuronal
12/21	im iv	no neuronal
12/22	im iv	no neuronal
12/23	im iv	no neuronal
12/24	im iv	no neuronal neuronal
12/25	im iv	neuronal
12/26	im iv	neuronal mezclado
12/27	im x 3	neuronal
12/28	im	neuronal

	iv	
12/29	im x 3	neuronal
12/30	im iv	neuronal
12/31	im x 3	neuronal
1/1	im iv	mezclado
1/9	infusión iv	mezclado
1/10	infusión iv	mezclado
1/11	im iv	no neuronal
1/12	im iv	no neuronal
1/13	im iv	no neuronal
1/14	im iv	no neuronal
1/15	im x 3	no neuronal
1/16	im iv	no neuronal
1/17	im x 3	no neuronal
1/18	im	no neuronal
1/19	im	no neuronal
1/20	im	no neuronal
1/21	im	mezclado
1/22	im	mezclado
1/23	im	mezclado
1/24	im	neuronal
1/25	im	neuronal
1/26	im	mezclado
1/27	im	mezclado
1/28	im iv	neuronal
1/29	im iv	neuronal
1/30	im iv	neuronal
1/31	im	no neuronal
1/2	iv	no neuronal
2/2	im	no neuronal

Tratamiento de trauma en el sistema nervioso

Las células hES y/o sus derivados, en donde las

células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas de acuerdo con la práctica de la presente invención, son administradas en una cantidad de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células para el tratamiento de trauma en el sistema nervioso, incluyendo pero no limitado a daño cerebral, coma y estado vegetativo. En otra modalidad se administran aproximadamente de 750,000 a alrededor de 80 millones de células.

Aunque se pueden variar los protocolos de administración para adecuarse al paciente particular, un protocolo típico para el tratamiento de trauma en el sistema nervioso comprende inyecciones intramusculares e intravenosas diarias durante los primeros 2 meses junto con inyecciones intratecales y epidurales.

Tratamiento de apoplejía o accidente vascular cerebral

Las células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas de acuerdo con la práctica de la presente invención, son administradas en una cantidad de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células para el tratamiento de apoplejía o accidente vascular cerebral. En otra modalidad, se administran alrededor de 750,000 a aproximadamente 80

millones de células.

Aunque se pueden variar los protocolos de administración para adecuarse al paciente particular, un protocolo típico para el tratamiento de accidente vascular cerebral comprende inyecciones intramusculares e intravenosas durante dos semanas e infusión intravenosa durante 3 días en lo sucesivo durante el primer mes, infusión intravenosa durante 2 días cada 15 días durante los mese 2 y 3, infusión intravenosa durante 2 días e inyección intratecal durante el mes 5, e infusión intravenosa durante 4 días seguida por inyección intramuscular durante 4 días durante los meses 8, 10 y 12.

Ejemplo 9

Un paciente diagnosticado con apoplejía o accidente vascular cerebral sufría de semiparálisis del lado derecho con babeo incontrolado, dificultad al tragar e incapacidad para hablar o caminar. Además, el paciente tiene cáncer de colon. Después del tratamiento de acuerdo con la presente invención, el paciente mostró signos de mejora toda vez que la pronunciación y actividades motoras mejoraron, la espina se alineó, y se curó la semiparálisis.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 9.

Tabla 9

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
8/17	dosis de prueba	no neuronal
8/22	im	hES
8/23	im x 2	neuronal hES
8/24	im x 2	hES
8/25	im	hES
8/26	im x 2	neuronal
8/29	im	neuronal
8/30	iv	neuronal
8/31	im	neuronal
9/2	im x 2	neuronal
9/5	iv	no neuronal
9/6	iv	neuronal
9/7	im	neuronal
9/8	iv	neuronal
9/9	iv	neuronal
9/12	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/13	iv	neuronal
9/14	im	no neuronal
9/19	iv	neuronal
9/22	iv	neuronal
9/26	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/29	iv	neuronal
10/3	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/6	im	no neuronal
10/10	iv	neuronal
10/13	iv	neuronal
10/17	iv	mezcla neuronal y no neuronal
10/20	iv	no neuronal
10/24	iv	mezcla neuronal y no neuronal
10/27	iv	neuronal
10/31	iv	mezcla neuronal y no neuronal
11/3	iv	mezcla neuronal y no neuronal
11/7	im	no neuronal
11/10	iv	no neuronal
11/14	im	neuronal
11/17	im	no neuronal
11/21	im	no neuronal
11/24	im	no neuronal
12/4	iv	mezcla neuronal y no neuronal
12/12	iv	no neuronal
12/19	iv	neuronal
12/26	iv	no neuronal
1/4	iv	neuronal
1/11	infusión iv	neuronal
8/18	iv im	neuronal

8/21	iv im	no neuronal
8/22	iv im	no neuronal
8/24	im iv	no neuronal
9/1	infusión iv	no neuronal
9/2	infusión iv	no neuronal

Ejemplo 9

Un hombre de 82 años de edad que sufrió una apoplejía cerebral 5 años atrás y se presentó con semiparálisis del lado derecho, con asimetría facial y pronunciación inarticulada. Él caminaba con un bastón y un gran cojeo y no era capaz de comer con su mano derecha debido a la dificultad en coordinación. No podía sentarse o pararse por sí solo y arrastraba los pies al caminar. Existía babeo incontrolado de saliva y tampoco podía tragar bien.

Dos meses después del tratamiento, él es capaz de caminar sin soporte, se sienta y se para por sí solo, come con su mano izquierda, no tiene pronunciación inarticulada y no tiene asimetría facial. Es capaz de levantarse de una silla. Está doblando la rodilla afectada al caminar mientras mantiene el equilibrio.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 10.

Tabla 10

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
11/4	im	no neuronal (dosis de prueba)
11/6	im	no neuronal
11/7	im	neuronal
11/8	im	no neuronal
11/9	im	neuronal
11/10	im	neuronal
11/11	im	no neuronal
11/13	im	no neuronal
11/14	im	no neuronal
11/15	iv im	neuronal
11/16	iv im	neuronal
11/18	iv im	no neuronal
11/22	infusión iv	neuronal
11/23	infusión iv	neuronal
11/24	im	neuronal
11/27	im	neuronal
11/28	im	no neuronal
11/29	im	neuronal
11/30	im	neuronal
12/2	im	no neuronal
12/4	im	no neuronal
12/5	infusión iv	neuronal
12/6	infusión iv im	mezclado
12/7	im	mezclado
12/8	im	mezclado
12/9	im	mezclado
12/11	im	mezclado
12/12	im	mezclado
12/14	im iv	mezclado
12/15	im	mezclado
12/16	im	mezclado
12/18	im	mezclado
12/19	im iv	mezclado
12/20	im	mezclado
12/21	im	mezclado
12/22	im	mezclado
12/23	im	mezclado
12/25	im	neuronal
12/26	im	neuronal
12/27	iv	mezclado
12/28	im	neuronal
12/29	im	neuronal
12/30	im	neuronal
1/1	im	mezclado
1/2	im	mezclado
1/3	iv	no neuronal
1/4	im	no neuronal

Tratamiento de trastornos del sistema nervioso hereditarios

Las células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas de acuerdo con la práctica de la presente invención, son administradas en una cantidad de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso hereditario, incluyendo pero no limitando a atrofia cerebral olivo ponto y corea de Huntington. En otra modalidad, se administran de alrededor de 750,000 a aproximadamente 80 millones de células. Las rutas de administración son intramuscular e intravenosa junto con intratecal, catéter epidural e infusión intravenosa. Esto podría muy probablemente continuar para toda la vida de la persona pero el primer año podría ser un programa intensivo como sigue - inyecciones intramusculares e intravenosas durante al menos tres meses tiempo durante el cual también son administradas intratecal, catéter epidural e infusión intravenosa. El mismo conjunto de inyecciones son administradas después de un espacio de un mes y medio durante un periodo de 21 días. Las inyecciones intramusculares e intravenosas diarias se continúan y después se reducen a tres veces por semana, dos veces por semana, una vez por semana, una vez durante la noche y después mensualmente dependiendo de la condición del paciente. La inyección intratecal se

puede repetir en un espacio de 4-6 meses igual que el catéter epidural. Las infusiones intravenosas pueden darse cada dos semanas, cada mes o cada dos meses.

Ejemplo 10

Un paciente diagnosticado con ataxia espino cerebral esporádica con incapacidad de voltearse en la cama, caminar o cambiar su posición mientras está sentado, tiene dificultad al pronunciar, tiene temblores e incapacidad de levantar su cuello.

Después del tratamiento con células madre de acuerdo con la práctica de la presente invención, fueron notadas mejoras en todos los síntomas y el paciente fue capaz de equilibrarse y caminar algunos pasos. La pronunciación se volvió coherente.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 11.

Tabla 11

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
8/8	dosis de prueba	no neuronal
8/9	im	neuronal
8/10	im x 2	neuronal
8/11	im x 2	neuronal
8/12	im x 2	neuronal
8/13	im x 2	neuronal
8/16	im x 2	neuronal
8/17	im x 2	no neuronal
8/18	im espinal profunda	neuronal
8/19	im	hES
8/23	im	neuronal hES

8/24	im x 2	hES
8/25	im x 2	hES
8/26	im x 2	neuronal
8/29	im x 2	neuronal
8/31	im x 2	neuronal
9/5	im iv	no neuronal
9/7	im	neuronal
9/12	im	neuronal
9/15	epidural	neuronal
9/16	im	neuronal
9/19	iv	neuronal
9/22	iv	neuronal
9/28	im	neuronal
9/30	iv	neuronal
10/3	im iv	neuronal
10/4	im iv	no neuronal mezcla neuronal y no neuronal
10/5	iv	neuronal
10/13	im	neuronal
10/14	intra-articular	neuronal
10/17	iv	neuronal
11/15	iv	neuronal
11/18	im	no neuronal
11/21	iv	no neuronal
11/23	im	no neuronal
12/1	im iv	mezcla neuronal y no neuronal
12/6	im	mezcla neuronal y no neuronal
12/8	im	no neuronal
12/13	im	no neuronal neuronal
12/15	epidural	neuronal
12/16	im	neuronal
12/21	im	neuronal
12/22	im iv	neuronal
12/25	im iv	no neuronal
3/5	espinal	no neuronal

Ejemplo 11

Un paciente con atrofia cerebral olivo ponto hereditaria se diagnosticó en la Universidad John Hopkins. Su padre, hermana gemela y hermano estaban afectados por la misma enfermedad. Ella no podía hablar al expirar, estaba atada en silla de ruedas con goteo continuo de orina y se tenía que hacer evacuación de heces manualmente. Ella tenía temblores sobre todo el cuerpo y no podía mantener el equilibrio por sí misma incluso mientras estaba sentada. Existía hipotensión de posición severa.

Después de 2 años de tratamiento el paciente va al baño para sus funciones corporales, habla bien, no tiene temblores y es capaz de caminar con soporte. No ha existido deterioro aún incluso a pesar de que su hermana gemela está postrada en cama con la misma enfermedad. No existe hipotensión de postura y ella definitivamente no se ha deteriorado.

Tratamiento de trastornos dérmicos

Las células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas de acuerdo con la práctica de la presente invención, son administradas en una cantidad de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células para el tratamiento de trastornos

dérmicos, incluyendo pero no limitados a ulceras no sanadas, psoriasis, llagas por presión y sarcoidosis. En el caso de trastornos dérmicos, también pueden usarse células hES tópicamente para tratar el trastorno o daño dérmico. En otra modalidad, se administran aproximadamente 750,000 a alrededor de 80 millones de células.

En una modalidad, las células hES o células dérmicas y extracto embrional diferenciados pueden mezclarse con un vehículo biocompatible, tal como un gel, ungüento o pasta y aplicarse a la piel dañada o tejido mucoso para acelerar la curación así como para sanar heridas resistentes a curación, tales como ulceras por decúbito o diabetes. Como alternativa, las células se pueden proporcionar en una suspensión o emulsión. En una modalidad, el vehículo también contiene agentes antimicrobianos, analgésicos u otros agentes farmacéuticos.

Como alternativa, en una modalidad diferente, las células hES se cultivan en un substrato poroso artificial estéril tal como gasa y se aplican directamente a la herida. Después de 12-24 horas la gasa se remueve y las células madre continúan creciendo y curando la herida. Al aplicar intralesionalmente, las células hES diferencian y eventualmente reemplazan las células dañadas.

Ejemplo 12

Una mujer de 70 años que sufre de una lesión por quemadura en su tobillo izquierdo que no ha sanado a pesar de terapia convencional. Después de la aplicación de las células hES en el sitio de quemadura, su herida empezó a sanar y tres años después la piel está absolutamente bien.

Tratamiento trastornos autoinmune

Las células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas de acuerdo con la práctica de la presente invención, son administradas mediante inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intra-articular o infusión intravenosa o combinaciones de las mismas, en una cantidad de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células para el tratamiento de trastornos autoinmunes incluyendo pero no limitados a lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, cardiomiopatía, sarcoidosis, artritis y colitis ulcerativa. En otra modalidad, se administran alrededor de 750,000 a aproximadamente 80 millones de células. La administración de células hES es altamente efectiva no únicamente en el tratamiento de enfermedades autoinmunes sino también en el restablecimiento de un sistema inmune suprimido. Como una alternativa al

tratamiento con inmunosupresores o como un método para pacientes "preinyectados" para transplante de órgano y otra intervención médica, se pueden usar las células hES y sus derivados para permitir aceptación del órgano a través de reducción en los procesos de rechazo de injerto-huésped.

Aunque se pueden variar los protocolos de administración para adecuarse al paciente particular, un protocolo típico para el tratamiento de trastornos autoinmunes comprende inyecciones diarias durante los primeros 2 meses, día alternado inyecciones junto con una infusión intravenosa durante el mes 3, inyecciones semanales junto con una infusión intravenosa de 2 días continuos cada 15 durante los meses 5-7 y 10-12, e inyecciones de refuerzo cada 3 meses durante un año y después cada 6 meses durante 1 año.

Ejemplo 13

Un paciente que sufre de psoriasis desde hace 26 años estaba confinado a una silla de ruedas con hipertensión, diabetes melitus y artritis psoriática con grandes úlceras en su pierna que no eran curables y no tratables con injerto de piel.

Después de recibir terapia durante 6 mese ella no tiene úlceras ni artritis. Su diabetes e hipertensión estaban bajo control. Ella ha empezado a caminar por sí

misma y ha empezado todas las actividades y está recibiendo inyecciones de refuerzo durante el último año. Ella a citado que ha caminado por primera vez desde hace 26 años y es capaz de hacer todos sus quehaceres cotidianos por sí misma.

El tratamiento con células madres fue hecho localmente a las llagas y las llagas se curaron. También después del tratamiento no se han detectado más llagas. La escamosidad y comezón de la piel y la hinchazón de las piernas también fueron reducidas. La condición diabética también fue curada con presión sanguínea controlada que llevó a una reducción en la medicación.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 12.

Tabla 12

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
12/27	dosis de prueba	no neuronal
1/22	im	no neuronal
2/20	im	neuronal
2/23	im	neuronal
2/28	m	neuronal
4/1	im	neuronal
4/7	im	mezcla neuronal y no neuronal
4/10	im	mezcla neuronal y no neuronal
4/21	m	mezcla neuronal y no neuronal
6/29	im	no neuronal
7/6	m	no neuronal
7/29	im	no neuronal
10/17	aspersión im	no neuronal
11/1	aspersión im	mezcla neuronal y no neuronal
11/2	aspersión im	mezcla neuronal y no neuronal
11/3	aspersión im	mezcla neuronal y no neuronal
11/4	im x 2	neuronal
11/5	aspersión iv	no neuronal
11/6	aspersión im	no neuronal
11/7	aspersión im	no neuronal
11/11	aspersión iv	neuronal
11/14	aspersión iv	neuronal
11/15	aspersión	no neuronal
	im	
11/16	im	no neuronal
11/21	iv	no neuronal
11/23	im	no neuronal
11/29	im	mezcla neuronal y no neuronal
1/4	im	no neuronal
3/28	im	no neuronal

Tratamiento de trastornos hemáticos

Aún otra modalidad del método de acuerdo con la práctica de la presente invención es en el tratamiento de trastornos hemáticos tales como trombocitopenia, talasemia, leucemia mieloide aguda mediante inyección intravenosa de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden células progenitoras de células madre hematopoyéticas. Las células se administran durante 10 días a 14 días y después se repite como una inyección semanal para condiciones benignas. Para condiciones malignas las inyecciones son suministradas diario durante 40 días y después se repite si existe una recaída.

Tratamiento de trastornos genéticos

Otra modalidad de métodos de transplante de células hES de acuerdo con la práctica de la presente invención es en el tratamiento de trastornos genéticos incluyendo pero no limitados a síndrome de Down, ataxia de Friedereich, Corea de Huntington, síndrome de Asperger y atrofia espinomuscular.

Los síntomas de trastornos genéticos se manifiestan mediante retraso mental, disfunción musculoesquelética y falla de órganos en combinación o solos y dan como resultado debilidad incurable seria y expectativa de vida reducida. En el caso de pacientes que sufren de un trastorno genético, las células hES se administran al paciente de conformidad con la

práctica de la presente invención y, una vez administradas, se diferencias para proporcionar al paciente con una población de células que expresan el producto génico faltante o comprometido con un restablecimiento consiguiente de homeostasis intracelular.

Aunque se pueden variar los protocolos de administración para adecuarse al paciente particular, un protocolo típico para el tratamiento de trastornos genéticos comprende inyecciones intramusculares e intravenosas diarias durante el primer mes, inyecciones alternando día durante el mes 2, inyecciones dos veces a la semana durante el mes 3, inyecciones una vez por semana durante los meses5, 7, 9, 11 y 12 e inyecciones de refuerzo cada 3 meses durante un año. También se suministran infusiones intravenosas cada 15 días.

Ejemplo 14

Un paciente con síndrome de Down, no mostró respuesta a órdenes verbales, no fue capaz de subir y bajar escaleras y tuvo peso corporal bajo como resultado de dificultades al comer. El paciente no era capaz de comer, presentaba una postura holgada típica, y sufría de tos y resfriados frecuentes. Los ojos eran mongoloides.

De conformidad con el tratamiento de acuerdo con la presente invención, el paciente es capaz de entender y llevar a cabo órdenes verbales, empezó a hablar y empezó a subir y

bajar escaleras. Pruebas de DQ han mostrado que la edad mental es de 1 año atrás de su edad cronológica como contra 2 años 6 meses atrás dentro de un intervalo de menos de 1 año. Socialmente, ella va a la escuela y juega con otros niños. También se puede alimentar por sí misma.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 13.

Tabla 13

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
7/8	dosis de prueba	no neuronal
7/16	im	neuronal
7/25	im	neuronal
7/26	im	neuronal
7/27	im	neuronal
7/30	im	neuronal
8/3	im	neuronal
8/10	im	neuronal
8/12	im	neuronal
8/16	im	neuronal
8/18	im	neuronal
8/22	im	hES
8/26	im	neuronal
8/29	im	neuronal
8/31	im	neuronal
9/2	im	neuronal
9/6	im	neuronal
9/8	im	no neuronal
9/13	im	no neuronal
9/19	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/22	im	no neuronal

9/30	im	no neuronal
10/3	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/10	im	no neuronal
10/18	im	no neuronal
10/27	im	neuronal
11/7	im	no neuronal
11/8	im	no neuronal
11/9	im	no neuronal
11/10	im	no neuronal
11/11	im	neuronal
11/14	im	neuronal
11/17	im	no neuronal
11/18	im	no neuronal
11/21	im	no neuronal
11/22	im	no neuronal
11/23	im	no neuronal
11/25	im	no neuronal
11/28	im	mezcla neuronal y no neuronal
12/4	im	mezcla neuronal y no neuronal
12/8	im	no neuronal
12/12	im	no neuronal
12/15	im	neuronal
12/19	im	neuronal
12/27	iv	neuronal
1/4	im iv	no neuronal
1/11	im	no neuronal neuronal
1/19	im	neuronal
1/20	im	no neuronal
1/23	im	no neuronal
1/30	im	neuronal
2/9	im	neuronal
2/13	im	neuronal
2/23	im	neuronal
2/27	im	neuronal
3/10	im	neuronal
3/14	im	neuronal
3/20	im	neuronal
5/11	im	neuronal
5/15	im	neuronal
5/16	im	neuronal
5/17	im	neuronal
5/18	im	neuronal
5/22	im	neuronal
5/23	im	neuronal
7/3	im	neuronal
7/5	im	neuronal

7/11	im	neuronal
7/13	im	neuronal
7/17	im	neuronal
7/19	im	neuronal
7/21	iv	neuronal
7/24	im	neuronal
7/28	im	no neuronal
7/31	im	neuronal
8/2	im	no neuronal
8/21	im	no neuronal
8/23	im	no neuronal
8/28	im	no neuronal
8/30	im	no neuronal

Ejemplo 15

Una niña de 3 años de edad fue diagnosticada con síndrome de Down. Ella no era capaz de hablar, comprender o subir y bajar escaleras. Ella no podía comer por sí sola y su vocabulario de monosílabas limitado era muy poco claro.

Después de 8 meses de tratamiento ella entiende todo, habla oraciones de tres palabras y reconoce colores, formas y tamaños. Ella es capaz de subir y bajar escaleras por sí sola y ha empezado a comer por sí sola.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 14.

Tabla 14

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
1/30	im	neuronal (dosis de prueba)
2/6	im	neuronal
2/7	im	neuronal
2/8	im	neuronal
2/9	im	neuronal
2/10	im	no neuronal
2/13	im	neuronal
2/15	im	neuronal
2/16	im	neuronal
2/17	im	neuronal
2/20	im	neuronal
2/22	im	neuronal
2/24	im	no neuronal
2/27	im	neuronal
3/1	im	neuronal
3/3	im	no neuronal
3/6	im	no neuronal
3/13	im	neuronal

3/15	im	neuronal
3/22	im	neuronal
3/24	im	neuronal
3/26	im	neuronal
3/27	im	no neuronal
3/29	im	neuronal
4/3	im	neuronal
4/5	im	neuronal
4/7	im	neuronal
4/10	im	neuronal
4/12	im	no neuronal
4/14	im	no neuronal
4/21	im	neuronal
4/24	im	neuronal
4/26	im	neuronal
4/28	im	neuronal
5/1	im	neuronal
5/10	im	neuronal
5/12	im	neuronal
5/13	im	no neuronal
5/22	im	neuronal
5/24	im	neuronal
5/29	im	neuronal
6/5	im	neuronal
6/7	im	neuronal
6/10	im	neuronal
6/14	im	neuronal
6/16	im	neuronal
6/19	im	neuronal
6/21	im	neuronal
6/23	iv	no neuronal
6/27	im	neuronal
6/29	im	neuronal
7/3	im	neuronal
7/5	im	neuronal
7/12	im	neuronal
7/14	im	neuronal
7/17	im	neuronal
7/19	im	neuronal
7/21	im	neuronal
7/27	im	neuronal
7/28	im	no neuronal
8/1	im	no neuronal
8/3	im	no neuronal
8/5	im	no neuronal
8/7	im	no neuronal
8/19	im	no neuronal
8/24	im	no neuronal

8/26	im	neuronal
8/28	im	no neuronal
8/31	im	no neuronal
9/2	im	no neuronal
9/7	im	no neuronal
9/9	im	no neuronal
9/11	im	no neuronal
9/14	im	no neuronal
9/21	im	no neuronal
9/23	im	no neuronal
9/25	im	no neuronal
9/28	im	no neuronal
9/29	im	no neuronal
10/4	im	no neuronal
10/7	im	no neuronal
10/10	im	no neuronal
10/14	im	no neuronal
10/16	im	no neuronal
10/18	im	no neuronal
10/22	im	no neuronal
10/26	im	no neuronal
10/28	im	no neuronal
11/1	im	no neuronal
11/4	im	no neuronal
11/7	im	no neuronal
11/9	im	no neuronal
11/13	im	no neuronal
11/16	im	no neuronal
11/17	im	no neuronal
11/20	im	no neuronal
11/23	im	no neuronal
11/27	im	no neuronal
11/30	im	no neuronal
12/3	im	no neuronal
12/4	im x 2	no neuronal
12/7	im	no neuronal
12/9	im	no neuronal
12/11	im	no neuronal
12/14	im x 2	no neuronal
12/16	im	no neuronal
12/21	im	no neuronal
12/24	im	no neuronal
12/27	im	neuronal
1/1	im	mezclado
1/3	im	no neuronal
1/6	im	no neuronal
1/9	im	no neuronal
1/12	im	no neuronal

1/15	im	no neuronal
1/18	im	no neuronal
1/22	im	mezclado
1/25	im	neuronal
1/28	im	neuronal

Ejemplo 16

Un niño de 13 años de edad que sufre de un defecto genético con carencia de concentración, convulsiones frecuentes y deterioro visual. Tiene visión en túnel total. Tiene dificultad para sentarse en clase y observar el pizarrón aún cuando él estaba sentado en la fila de adelante. Tiene retraso en desarrollo y si lee algo él tiene que leerlo tres veces para recordar qué leyó. Él también tiene dificultad para ubicar cosas en una habitación.

Desde que empezó con las células hES su visión ha mejorado y él se sienta dos filas atrás en el salón de clases y puede ver el pizarrón mucho mejor. Él es capaz de recordar mucho más y su tiempo de respuesta a órdenes verbales ha mejorado. No tiene convulsiones tanto como antes y se ha reducido su medicación. Reportes del oftalmólogo muestran que las áreas muertas en la periferia han sido reestablecidas.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 15.

Tabla 15

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
6/8	im	neuronal (dosis de prueba)
6/9	im	neuronal
6/12	im	neuronal
6/13	im	neuronal
6/14	im	no neuronal
6/15	im	no neuronal
6/16	im	neuronal
6/20	im	neuronal
6/21	im	no neuronal
6/22	im	neuronal
6/23	iv	no neuronal
6/27	im	neuronal
6/28	im	neuronal
6/29	im	neuronal
7/3	im	no neuronal
7/4	im	neuronal
7/5	im	neuronal
7/6	im	neuronal

7/7	im	neuronal
7/10	im	neuronal
7/11	im	neuronal
7/12	im	neuronal
7/13	im	no neuronal
7/14	im	neuronal
7/17	im	neuronal
7/18	im	neuronal
7/20	im	neuronal
7/21	infusión iv	neuronal
7/22	infusión iv	neuronal
7/24	im	neuronal
7/25	im	neuronal
7/26	im	neuronal
7/27	im	neuronal
7/28	im	no neuronal
7/31	im	no neuronal
8/2	im	no neuronal
8/3	im	no neuronal
8/4	im	no neuronal
8/7	im	no neuronal
8/8	im	no neuronal
8/9	im	no neuronal
8/10	im x 2	no neuronal
8/11	infusión iv	no neuronal
8/12	infusión iv	no neuronal
8/13	im	no neuronal
8/14	im	no neuronal
8/17	im x 2	no neuronal
8/18	im	no neuronal
8/21	im	no neuronal
8/22	im	no neuronal
8/23	im	no neuronal
8/24	im	no neuronal
8/25	im	no neuronal
8/2/	im	no neuronal
8/29	im	no neuronal
8/30	im	no neuronal
9/2	infusión iv	no neuronal
9/3	infusión iv	no neuronal
9/4	im x 3	no neuronal
9/5	im	no neuronal
9/6	im	no neuronal
9/7	im	no neuronal
9/8	im	no neuronal
9/11	im	no neuronal
9/13	im	no neuronal
9/14	im	no neuronal

9/16	im	no neuronal
9/18	im	no neuronal
9/19	im	no neuronal
9/21	im x 2	no neuronal
9/22	infusión iv	no neuronal
9/23	infusión iv	no neuronal
10/3	im	no neuronal
10/4	im	no neuronal
10/5	im	no neuronal
10/6	im	no neuronal
10/9	im	no neuronal
10/10	im	no neuronal
10/11	im	no neuronal
10/12	im	no neuronal
10/13	retroorbital	neuronal
10/16	im	no neuronal
10/17	im	no neuronal
10/18	im	no neuronal
10/20	im	no neuronal
10/23	im	no neuronal
10/24	im	no neuronal
10/25	im	no neuronal
10/26	im	no neuronal
10/27	infusión iv	no neuronal
10/28	infusión iv x 3	no neuronal
10/31	im x 2	no neuronal
11/2	im x 2	no neuronal
11/3	im x 2	no neuronal
11/6	im x 2	no neuronal
11/8	im	no neuronal
11/9	im	no neuronal
11/10	im	no neuronal
11/13	im	no neuronal
11/14	retroorbital	neuronal
11/15	im	no neuronal
11/16	im	no neuronal
11/17	im	no neuronal
11/20	im	no neuronal
11/21	im	no neuronal
11/23	im	no neuronal
11/24	im	no neuronal
11/29	im	no neuronal
11/30	iv	mezclado
12/1	infusión iv	mezclado
12/4	im	no neuronal
12/5	iv	mezclado
12/6	im	no neuronal
12/7	im	no neuronal

12/8	im	no neuronal
12/11	im	no neuronal
12/12	im	no neuronal
12/13	im	no neuronal
12/14	im	no neuronal
12/18	im	no neuronal
12/19	iv	no neuronal
12/21	im	no neuronal
12/22	retroorbital	neuronal
12/29	im	neuronal
2/2	im	no neuronal

Ejemplo 17

El paciente es un hombre de 32 años de edad que sufre de ataxia de Fredrick y cuya hermana murió de esta enfermedad. Él no puede pararse, tiene pronunciación que se apaga, dificultad al tragar, estaba confinado a una silla de ruedas y necesitaba ayuda para ir al baño. Había sido tratado en Alemania y Estados Unidos de Norteamérica sin resultados. Su corazón estaba dilatándose y funcionaba de 15 a 20%.

Desde que empezó las células hES, él ha mostrado mejora. Él es capaz de hablar mucho más claro y no tiene dificultad al tragar. Su corazón ha mejorado con todas las dimensiones regresando a la normalidad y la capacidad de funcionamiento hasta 58 a 60%. No ha habido deterioro.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 16.

Tabla 16

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
2/17	im	no neuronal (dosis de prueba)
2/20	im iv	neuronal no neuronal
2/21	im iv	neuronal no neuronal
2/22	im iv	neuronal no neuronal
2/23	im iv	neuronal no neuronal
2/24	im iv	neuronal no neuronal
2/25	im iv	neuronal no neuronal
2/26	im iv	neuronal no neuronal
2/27	epidural	neuronal
2/28	im	neuronal

	iv	no neuronal
3/1	im iv	neuronal no neuronal
3/2	im iv	neuronal no neuronal
3/3	im iv	neuronal no neuronal
3/4	im iv	neuronal no neuronal
3/5	im iv	neuronal no neuronal
3/6	im	neuronal no neuronal
3/7	epidural (catéter)	neuronal
3/8	epidural (catéter)	neuronal
3/9	epidural (catéter)	neuronal
3/10	epidural (catéter)	neuronal
3/13	im iv	neuronal no neuronal
3/14	im	no neuronal
3/16	im	no neuronal
3/17	im iv	neuronal no neuronal
3/18	im iv	neuronal no neuronal
3/19	im iv	neuronal no neuronal
3/20	im iv	neuronal no neuronal
3/21	im	no neuronal
3/22	im	no neuronal
3/24	im iv	neuronal no neuronal
3/25	im	no neuronal
3/26	im	no neuronal
3/27	im	neuronal
3/28	im	no neuronal
3/29	im	no neuronal
3/30	im	no neuronal
3/31	im	no neuronal
4/1	im	no neuronal
4/2	im	no neuronal
4/3	im	no neuronal
4/4	im iv	neuronal no neuronal
4/5	im	no neuronal
4/6	im	no neuronal
4/7	im	no neuronal
4/8	im	no neuronal

4/9	im iv	neuronal no neuronal
4/10	im iv	neuronal no neuronal
4/11	im	no neuronal
4/15	im	no neuronal
4/16	im	no neuronal
4/18	im iv	neuronal no neuronal
4/19	im iv	neuronal no neuronal
4/20	im iv	neuronal no neuronal
4/21	im	no neuronal
4/22	im	no neuronal
4/24	im	no neuronal
4/25	im	no neuronal
4/26	iv im	neuronal no neuronal
4/27	iv im	neuronal no neuronal
4/29	iv	neuronal
4/30	iv im	neuronal no neuronal
502	im	no neuronal
5/3	iv	neuronal
5/5	iv epidural	neuronal
5/7	iv im	neuronal no neuronal
5/9	iv im	neuronal no neuronal
5/10	iv im	neuronal no neuronal
5/12	iv im	neuronal no neuronal
5/13	iv im	neuronal no neuronal
5/14	iv im	neuronal no neuronal
5/16	epidural (intratecal)	neuronal
5/18	iv im	neuronal no neuronal
8/26	im iv	no neuronal
8/27	im iv	no neuronal
8/28	iv infusión iv	no neuronal

8/29	iv infusión iv	no neuronal
8/30	im iv	no neuronal
8/31	im iv	no neuronal
9/4	im iv	no neuronal
9/6	im iv	no neuronal
9/7	im iv	no neuronal
9/9	im iv	no neuronal
9/10	epidural (intratecal)	neuronal
9/12	im iv	no neuronal
9/14	im iv	no neuronal
9/15	epidural (catéter)	neuronal,
9/16	epidural (catéter)	neuronal,
9/17	epidural (catéter)	neuronal
9/18	im iv	no neuronal
9/19	im iv	no neuronal
9/20	iv infusión iv	no neuronal
9/21	iv infusión iv	no neuronal

Tratamiento de trastornos oculares

Otro uso del transplante de células hES de acuerdo con la práctica de la presente invención es en el tratamiento de trastornos oculares que incluyen pero no están limitados a atrofia del nervio óptico, degeneración macular, daño ocular, rechazo a injerto de córnea y retinitis pigmentosa a través de inyección directa de progenitores neuronales y células hES

de acuerdo con la práctica de la presente invención a la porción retrobulbar del ojo, área superficial del ojo y cámara interna del ojo.

Aunque se pueden variar los protocolos de administración para adecuarse al paciente particular, un protocolo típico para el tratamiento trastornos oculares comprende 10 días de inyecciones intramusculares e intravenosas seguidas por una inyección retrobulbar o intravítrea, 15 días de inyecciones intramusculares e intravenosas seguidas por una inyección retrobulbar, 2 infusiones intravenosas y una inyección retrobulbar después de 2 meses. Un total de 4 inyecciones retrobulbares se suministran durante un periodo de 8 meses a un año antes de que se observen resultados pero en algunos casos los resultados son observados antes. Se pueden usar rutas intravítreas. También se puede reparar la córnea mediante el uso de lentes de contacto en los cuales se ha cultivado la córnea. También se pueden usar gotas oculares que comprenden células madres.

Ejemplo 18

Un paciente diagnosticado con atrofia de nervio óptico tenía condiciones que incluían dificultada al leer letras pequeñas y no ser capaz de ver objetos ubicados lejos. Tampoco eran visibles los colores azul oscuro y violeta. La

visión era nula con percepción de luz y ahora es 6/24.

Conforme a la terapia de células madre de acuerdo con la presente invención, es decir, células hES y sus derivados que incluyen progenitores de células madre neuronales administradas por inyección retrobulbar y células ges y sus derivados que incluyen progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas de acuerdo con la práctica de la presente invención se administra mediante inyección intravenosa local o inyección subcutánea o inyección intramuscular, inyección intravítrea o aplicación tópica en una cantidad de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células, el paciente mostró mejoras significativas. Él es capaz de leer la hora y puede ver carteles así como ver la televisión desde una distancia.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 17.

Tabla 17

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
2/14	im	neuronal
2/15	iv	neuronal no neuronal
3/20	iv x 2 im	neuronal
3/21	iv retrobulbar	neuronal
4/30	iv	no neuronal
5/1	iv im	neuronal

5/2	retrobulbar	no neuronal

Tratamiento de trastornos en hígado y riñón

Aún otro uso de transplante de células hES de acuerdo con la práctica de la presente invención es para el tratamiento de trastornos de hígado y trastornos de riñón incluyendo pero no limitados a nefrosis renal de etapa final y síndrome nefrótico a través de la transplantación de acuerdo con la práctica de la presente invención. Las rutas de administración son intravenosa, intramuscular y mediante infusión intravenosa.

Ejemplo 19

Un paciente diagnosticado con síndrome nefrótico exhibió niveles de urea, creatina y proteína P elevados. La diferenciación corticomedular no se mantuvo y el cuerpo fue hinchado. Las células hES y sus derivados incluyendo progenitores de célula madre hematopoyética, progenitores de células madre productores de albúmina y progenitores de células madre productores de bilirrubina de acuerdo con la práctica de la presente invención se administraron mediante inyección intravenosa o inyección subcutánea o inyección intramuscular o infusión intravenosa en una cantidad de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células. Después del tratamiento con células madre, el

cuerpo estaba menos hinchado y la diferenciación corticomedular fue reestablecida. También se normalizaron los niveles de urea, creatina y proteína P.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 18.

Tabla 18

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
8/10	dosis de prueba	neuronal
8/11	im	neuronal
8/12	im	neuronal
8/16	im	hES
8/22	im	hES
8/24	im	hES
8/25	im	neuronal
8/29	im	neuronal
9/1	im	neuronal
9/7	im	neuronal
9/8	im	no neuronal
9/12	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/19	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/3	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/10	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/11	iv	mezcla neuronal y no neuronal
10/31	iv	no neuronal
11/10	im	no neuronal
11/21	im	no neuronal
12/8	im	no neuronal
12/23	iv	no neuronal
2/7	im	no neuronal
8/24	im	no neuronal
8/25	im	no neuronal
9/9	im	no neuronal

Tratamiento de trastornos músculo-esqueléticos

Otro uso de transplante de células hES de acuerdo con la práctica de la presente invención es para el tratamiento de trastornos músculo-esqueléticos incluyendo pero no limitados a artritis, distrofia muscular de Duchenne, distrofia de Limb Girdle, atrofia muscular espinal y atrofia muscular de Becker.

Aunque se pueden variar los protocolos de administración para adecuarse al paciente particular, un protocolo típico para el tratamiento de trastornos músculo-esqueléticos comprende inyecciones intramusculares e intravenosas diarias durante el primer mes, inyecciones dos veces por semana durante los meses 3, 5, 6 y 7, inyecciones semanales durante los meses 9-12 e inyecciones de refuerzo cada 3 meses. Se suministran infusiones intravenosas cada 10 a 15 días y se suministran inyecciones musculares espinales profundas cada 15 a 30 días.

Ejemplo 20

La historia del caso de un paciente diagnosticado con distrofia muscular de Duchenne mostró síntomas tales como languidez, cara y muslos hinchados y signo de Gower positivo, con niveles

altos de creatina fosfocinasa (CPK) en 10,000 unidades.

Después del tratamiento del paciente con células hES y sus derivados incluyendo progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticos solos o en combinación mediante inyección intravenosa o inyección subcutánea o inyección intramuscular, o infusión de catéter intravenoso, o infusión de catéter epidural o infusión de catéter de bloque sub-aracnoide durante un periodo predeterminado, los niveles CPK caen drásticamente a 1198 unidades y el signo de Gower fue negativo.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 19.

Tabla 19

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
3/18	dosis de prueba	no neuronal
3/19	im	neuronal
3/20	im x 2	neuronal
3/25	im x 2	no neuronal
3/26	im x 2	no neuronal
3/27	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
3/28	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
3/29	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
3/30	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
3/31	im x 4	neuronal no neuronal x 3
4/1	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/2	im x 3	neuronal no neuronal x 2
4/3	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/4	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/5	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/6	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/7	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/8	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/9	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/10	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/11	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/12	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2

4/13	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/14	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/15	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/16	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/17	im x 5	neuronal x 3 no neuronal x 2
4/18	im x 3	neuronal no neuronal x 2
4/19	im x 3	neuronal x 2 no neuronal
4/20	im x 3	neuronal no neuronal x 2
4/21	im x 3	neuronal no neuronal x 2
4/22	im x 3	neuronal no neuronal x 2
4/23	im x 3	neuronal x 2 no neuronal
4/24	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
4/25	im x 3	neuronal no neuronal x 2
4/26	im x 2	neuronal no neuronal
7/1	im x 2	neuronal no neuronal
7/2	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/3	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/4	im x 2	neuronal no neuronal
7/5	infusión iv x 2	neuronal
7/6	infusión iv x 2	neuronal
7/7	im x 2	neuronal
7/8	im x 2	neuronal
7/9	im x 2	neuronal no neuronal
7/10	im x 2	neuronal no neuronal
7/11	im x 2	neuronal no neuronal
7/12	im x 2	neuronal no neuronal
7/13	im x 2	neuronal

		no neuronal
7/14	im x 2	neuronal no neuronal
7/15	im x 2	neuronal no neuronal
7/16	im x 3	neuronal
7/17	infusión iv im x 2	neuronal no neuronal
7/18	infusión iv im x 2	neuronal no neuronal
7/19	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/20	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/21	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/22	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/23	iv x 2 im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 4
7/24	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/25	iv im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 4
7/26	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/27	iv im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 4
7/28	im x 4	neuronal no neuronal x 3
7/29	iv im x 4	no neuronal
7/30	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
7/31	iv im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 3
8/1	im x 4	neuronal x 2 no neuronal x 2
8/2	im x 4	no neuronal
8/3	infusión iv x 2	no neuronal
8/4	infusión iv x 2	no neuronal
8/5	im x 4	no neuronal
8/6	im x 4	no neuronal
8/7	infusión iv im x 2	no neuronal
8/8	infusión iv im x 2	no neuronal
8/9	infusión iv x 2 im x 2	no neuronal

8/10	im x 4	no neuronal
8/11	im x 4	no neuronal
8/12	infusión iv im x 2	neuronal

Ejemplo 21

Un joven de 14 años de edad diagnosticado con un caso de DMD estaba postrado en cama sin fuerza en ambas manos y piernas y con atrofia muscular. Él también tenía escoliosis.

Después de 8 meses de terapïa él ha desarrollado músculos en los bíceps, tríceps y brahui-radiales y es capaz de elevar sus brazos al nivel del codo. Él ha subido de peso y está creciendo sin ninguna escoliosis espinal asociada. Sus niveles CPK, los cuales indicaron la velocidad de falla muscular, han sido reducidos.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 20.

Tabla 20

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
4/13	im	no neuronal (dosis de prueba)
4/14	im	no neuronal
4/15	im	neuronal
4/16	im	neuronal
4/17	im	neuronal no neuronal
4/18	im	no neuronal
4/19	im	neuronal no neuronal
4/20	im	neuronal no neuronal
4/21	im	neuronal no neuronal
4/22	im	neuronal no neuronal
4/23	im	neuronal no neuronal
4/24	im	neuronal no neuronal
4/25	im	neuronal no neuronal
4/26	im	no neuronal
4/27	im	no neuronal
4/28	im	neuronal no neuronal

4/29	im	neuronal no neuronal
4/30	im	neuronal no neuronal
5/1	im	no neuronal
5/2	im	no neuronal
5/3	im	neuronal no neuronal
5/4	im	no neuronal
5/5	im	neuronal no neuronal
5/6	im	neuronal
5/7	im	neuronal no neuronal
5/8	im	neuronal no neuronal
5/9	iv infusion im	neuronal
5/13	im	neuronal no neuronal
5/15	im	no neuronal
5/16	im	no neuronal
5/17	im	neuronal no neuronal
5/18	im	neuronal no neuronal
5/19	im	neuronal no neuronal
5/20	im	neuronal no neuronal
5/21	im	neuronal no neuronal
5/22	im	neuronal no neuronal
5/23	im	neuronal no neuronal
5/24	im	neuronal no neuronal
5/26	im	neuronal no neuronal
5/27	im	neuronal no neuronal
5/28	im	neuronal no neuronal
5/29	im	neuronal no neuronal
5/30	im	neuronal no neuronal
6/1	im	neuronal

		no neuronal
6/2	im	neuronal no neuronal
6/3	im	neuronal no neuronal
6/4	im	neuronal no neuronal
6/5	im	neuronal no neuronal
6/6	im	neuronal no neuronal
6/7	im	neuronal no neuronal
6/8	im	neuronal no neuronal
6/9	im	neuronal no neuronal
6/10	im	neuronal no neuronal
6/11	im	neuronal no neuronal
6/12	im	no neuronal
6/13	im	neuronal no neuronal
6/14	im	neuronal no neuronal
6/15	im	neuronal no neuronal
6/16	im	neuronal no neuronal
6/17	im	neuronal no neuronal
6/18	im	neuronal no neuronal
6/19	im	neuronal x 2
6/20	im	neuronal no neuronal
6/22	im	neuronal x 2
6/23	iv	no neuronal x 2
6/24	iv	no neuronal x 2
6/25	iv	no neuronal x 2
6/27	im	neuronal no neuronal
6/28	im	neuronal no neuronal
6/29	im	neuronal no neuronal
6/30	im	neuronal no neuronal

7/1	im	neuronal no neuronal
7/2	im	neuronal no neuronal
7/3	im	neuronal no neuronal
7/4	im	neuronal no neuronal
7/5	im	neuronal x 2
7/6	im	neuronal x 2
7/7	im	neuronal x 2
7/8	im	neuronal no neuronal
7/9	im	neuronal no neuronal
7/10	im	neuronal no neuronal
7/11	im	neuronal no neuronal
7/12	im	neuronal no neuronal
7/13	im	neuronal no neuronal
7/14	im	neuronal no neuronal
7/15	im	neuronal no neuronal
8/18	im	no neuronal x 3
8/19	im	no neuronal x 2
8/20	im	no neuronal x 3
8/21	im	no neuronal x 3
8/22	im	no neuronal x 3
8/23	im	no neuronal x 3
8/24	im	no neuronal x 3
8/25	im	neuronal no neuronal x 2
8/26	im	neuronal x 3
8/27	im	no neuronal x 3
8/28	iv	no neuronal 7
8/29	iv	no neuronal 7x 2
8/30	im	no neuronal x 2
8/31	im	no neuronal x 3
9/1	infusión iv	no neuronal
9/2	infusión iv	no neuronal
9/3	im	no neuronal x 3
9/4	im	no neuronal x 3
9/5	im	no neuronal x 3
9/6	im	no neuronal x 3
9/7	im	no neuronal x 3

9/8	im	no neuronal x 3
9/9	im	no neuronal x 3
9/10	im	no neuronal x 3
9/11	im	no neuronal x 3
9/12	im	no neuronal x 3
9/13	im	no neuronal x 3
9/14	im	no neuronal x 3
9/15	im	no neuronal x 3
9/16	im	no neuronal x 3
9/17	im	no neuronal x 3
9/18	im	no neuronal x 3
9/19	im	no neuronal x 3
9/20	im	no neuronal x 3
9/21	im	no neuronal x 3
9/22	infusión iv	no neuronal
9/23	infusión iv	no neuronal
9/24	im	no neuronal x 3
9/25	im	no neuronal x 3
9/26	im	no neuronal x 3
9/27	im	no neuronal x 3
9/28	im	no neuronal x 3
9/29	im	no neuronal x 3
9/30	im	no neuronal x 3
10/1	im	no neuronal x 3
10/2	im	no neuronal x 3
10/3	im	no neuronal x 3
10/4	im	no neuronal x 3
10/5	im	no neuronal x 3
10/6	im	no neuronal x 3
10/7	im	no neuronal x 3
10/8	im	no neuronal x 3
10/9	im	no neuronal x 3
10/11	im	no neuronal x 3
10/12	im	no neuronal x 3
10/13	im	no neuronal x 3
10/14	im	no neuronal x 3
10/15	im	no neuronal x 3
10/16	im	no neuronal x 3
10/17	im	no neuronal x 3
10/18	im	no neuronal x 3
10/19	im	no neuronal x 3
10/20	im	no neuronal x 3
10/21	im	no neuronal x 3
10/23	im	no neuronal x 3
10/24	im	no neuronal x 3
10/25	im	no neuronal x 3
10/26	im	no neuronal x 3
10/27	im	no neuronal x 3

10/28	im	no neuronal x 3
10/29	im	no neuronal x 3
10/30	im	no neuronal x 3
10/31	im	no neuronal x 5
11/2	im	no neuronal x 4
11/3	im	no neuronal x 3
11/4	im	no neuronal x 3
11/5	im	no neuronal x 3
11/7	im	no neuronal x 3
11/8	im	no neuronal x 2
11/9	im	no neuronal
11/10	im	no neuronal x 3
11/11	im	no neuronal x 3
11/12	im	no neuronal x 3
11/13	im	no neuronal x 3
11/14	im	no neuronal x 3
11/15	im	no neuronal x 3
11/30	im	mixed x 3
12/1	im	no neuronal x 3
12/2	im	no neuronal x 3
12/3	im	no neuronal x 3
12/4	im	no neuronal x 3
12/5	im	no neuronal x 3
12/6	im	no neuronal x 3
12/7	im	no neuronal x 3
12/8	im	no neuronal x 3
12/9	im	no neuronal x 3
12/10	im	no neuronal x 3
12/12	im	no neuronal x 3
12/13	im	no neuronal x 3
12/14	im	no neuronal x 3
12/15	im	no neuronal x 3
12/16	iv infusion	no neuronal
12/17	iv infusion im	no neuronal x 3
12/18	im	no neuronal
12/19	iv im	no neuronal
12/20	im	no neuronal x 3
12/21	iv im	no neuronal x 3
12/22	iv	no neuronal x 3
12/23	im	no neuronal x 3
12/24	im	no neuronal x 3
12/25	im	mezclado x 3
12/26	iv im	no neuronal x 3
12/27	iv	mezclado

12/28	im	no neuronal x 3
12/29	im	no neuronal x 3
12/30	im	no neuronal
12/31	im	no neuronal x 3
1/1	im	mezclado x 3
1/2	im	mezclado x 3
1/3	im	no neuronal x 3
1/4	im	no neuronal x 3
1/5	infusión iv	no neuronal
1/6	infusión iv	no neuronal
1/7	im	no neuronal x 3
1/8	im	no neuronal x 3
1/9	im	no neuronal x 3
1/10	im	no neuronal x 3
1/11	im	no neuronal x 3
1/12	im	no neuronal x 3
1/13	im	no neuronal x 3
1/14	im	no neuronal x 3
1/15	im	no neuronal x 3
1/16	infusión iv	mezclado
1/17	infusión iv	mezclado
1/18	im	no neuronal
1/19	im	no neuronal
1/20	im	no neuronal
1/21	infusión iv	mezclado
1/22	im	mezclado
1/23	im	mezclado
1/24	im	neuronal
1/25	im	neuronal
1/26	im	mezclado
1/27	im	mezclado
1/28	im	neuronal x 3
1/29	infusión iv	mezclado
1/30	infusión iv	no neuronal

Ejemplo 22

Un niño de 8 años de edad confinado a una silla de ruedas debido a DMD no fue capaz de caminar o levantarse. Después de 6 meses de tratamiento su nivel CPK fue reducido. Él no se ha deteriorado y es capaz de mover sus brazos. Él empezó a caminar con soporte mínimo.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 21.

Tabla 21

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
4/29	im	neuronal no neuronal
4/30	im	no neuronal
5/1	im	neuronal no neuronal
5/3	im	neuronal
5/4	im	neuronal no neuronal
5/5	im	neuronal no neuronal
5/6	im	neuronal no neuronal
5/7	im	no neuronal
5/8	im	neuronal no neuronal
5/9	im	neuronal no neuronal
5/10	im	neuronal no neuronal
5/11	im	neuronal no neuronal
5/12	im	neuronal no neuronal
5/13	im	neuronal no neuronal
5/14	im	neuronal no neuronal
5/15	im	neuronal no neuronal
5/16	im	neuronal no neuronal
5/17	im	neuronal no neuronal
5/18	im	neuronal no neuronal
5/19	im	neuronal no neuronal
5/20	im	neuronal no neuronal
5/21	im	neuronal no neuronal
5/22	im	neuronal no neuronal
5/23	im	neuronal no neuronal
5/24	im	neuronal no neuronal
5/25	im	neuronal no neuronal

5/26	im	neuronal no neuronal
5/27	im	neuronal no neuronal
5/28	im	neuronal no neuronal
5/29	im	neuronal no neuronal
5/30	im	neuronal no neuronal
6/1	im	neuronal no neuronal
6/2	im	neuronal no neuronal
6/3	im	neuronal no neuronal
6/4	im	neuronal no neuronal
6/5	im	neuronal no neuronal
6/6	im	neuronal no neuronal
6/7	im	neuronal no neuronal
6/8	im	neuronal no neuronal
6/9	im	neuronal no neuronal
11/15	im	no neuronal
11/16	infusión intravenosa	neuronal
11/17	infusión intravenosa	neuronal
11/18	im	no neuronal
11/19	im	no neuronal
11/20	im	no neuronal
11/21	infusión intravenosa	mezclado
11/22	infusión intravenosa	mezclado
11/23	im	no neuronal
11/25	im	mezclado
11/26	im	mezclado
11/27	im	mezclado
11/29	im	no neuronal
12/1	im	no neuronal
12/2	im	no neuronal
12/3	im	no neuronal
12/5	im	no neuronal
12/6	im	no neuronal
12/7	im	no neuronal
12/8	infusión intravenosa	mezclado
12/9	infusión intravenosa	no neuronal

12/10	im	no neuronal
12/11	im	no neuronal
12/12	im	no neuronal
12/15	im	no neuronal
12/16	infusión intravenosa	no neuronal
12/17	infusión intravenosa	no neuronal
12/18	im	no neuronal
12/19	im iv	no neuronal
12/20	im	no neuronal
12/21	im	no neuronal
12/22	im	no neuronal
12/23	im	no neuronal
12/24	im	no neuronal
12/25	im	neuronal
12/26	im	neuronal
12/27	iv	mezclado
12/28	im	neuronal
12/29	im	neuronal
12/30	im	neuronal
12/31	im	neuronal
1/1	im	neuronal
1/2	im	mezclado
1/4	im	no neuronal
1/5	iv	no neuronal
1/6	infusión intravenosa	no neuronal
1/7	im	no neuronal
1/8	im	no neuronal

Ejemplo 23

Un niño de 10 años de edad diagnosticado con DMD quien fue capaz de dar algunos pasos con soporte se trajo para terapia. Él no era capaz de voltearse por sí solo en la cama o sentarse por sí solo. Él podía levantar sus brazos hasta 30° hasta el nivel del codo. Después de pocos meses de tratamiento, su nivel de CPK ha comenzado a caer y él es capaz de voltearse sólo y puede levantar un tarro con agua arriba de su cabeza para bañarse. Él no ha perdido peso.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 22.

Tabla 22

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
1/20	im	no neuronal (dosis de prueba)
1/23	im	no neuronal
1/24	im	no neuronal
	iv	
1/25	im	no neuronal
1/26	im	neuronal no neuronal
1/27	im	no neuronal
2/1	im	no neuronal
2/2	im	neuronal no neuronal
2/3	im	no neuronal
2/4	im	neuronal no neuronal
2/5	im	neuronal
2/6	im	no neuronal
2/7	im	no neuronal
2/8	im	neuronal no neuronal
2/10	im	neuronal no neuronal
2/11	im	neuronal no neuronal
2/12	im	neuronal no neuronal
2/14	im iv	neuronal no neuronal
2/15	im	neuronal no neuronal
2/16	im	neuronal no neuronal
2/17	im	neuronal no neuronal
2/18	im	neuronal no neuronal
2/21	im	neuronal no neuronal
2/22	im	neuronal no neuronal
2/23	im	neuronal no neuronal
2/24	im	no neuronal
2/25	im	neuronal
2/26	im	neuronal no neuronal
2/27	im	neuronal no neuronal
2/28	im	neuronal no neuronal
3/28	im	neuronal no neuronal
3/29	im	neuronal

3/30	im	neuronal no neuronal
4/4	im	neuronal
4/5	im	neuronal no neuronal
4/6	im	neuronal no neuronal
4/7	im	neuronal no neuronal
4/8	im	neuronal no neuronal
4/9	im	neuronal no neuronal
5/16	im	neuronal no neuronal
5/17	im	neuronal no neuronal
5/18	im	neuronal no neuronal
5/19	infusión iv	no neuronal
5/20	infusión iv	no neuronal
5/21	im	neuronal no neuronal
5/22	im	neuronal no neuronal
5/23	im	neuronal no neuronal
7/27	infusión iv	neuronal
7/28	infusión iv im	neuronal no neuronal
7/29	im	neuronal no neuronal
7/30	im	neuronal no neuronal
7/31	im	no neuronal
8/1	im	no neuronal
8/24	im	neuronal no neuronal
8/25	im	neuronal no neuronal
8/26	infusión iv m	no neuronal
8/27	infusión iv im	no neuronal
8/28	iv	neuronal no neuronal
8/29	infusión iv im	no neuronal
8/30	im	no neuronal

8/31	im	no neuronal
9/1	im	no neuronal
9/2	infusión iv im	no neuronal
9/3	infusión iv im	no neuronal
9/4	im	no neuronal
9/5	im	no neuronal
11/17	iv im	mezclado no neuronal
11/18	infusión iv im	neuronal no neuronal
11/19	infusión iv im	neuronal no neuronal
11/20	im	no neuronal
11/22	infusión iv	neuronal
11/23	iv im	mezclado no neuronal
11/24	iv im	mezclado no neuronal
11/25	im iv	mezclado
11/26	im iv	mezclado
11/27	iv im	no neuronal
11/28	iv	mezclado
11/29	iv	mezclado
11/30	im	mezclado
12/1	iv im	no neuronal
12/2	iv im	no neuronal
12/3	iv im	no neuronal
12/4	iv	mezclado
12/5	im iv	no neuronal
1/2	im	mezclado
1/3	im	no neuronal
1/4	im	no neuronal
1/5	infusión iv im	no neuronal
1/6	infusión iv im	mezclado no neuronal
1/7	infusión iv	mezclado
1/8	infusión iv im	mezclado no neuronal
1/9	im	no neuronal

Tratamiento de enfermedades y trastornos cardiacos

Otro uso de transplante de células hES de acuerdo con la práctica de la presente invención es para el tratamiento de enfermedades y trastornos cardiacos incluyendo pero no limitados a cardiomiopatía restrictiva, insuficiencia cardiaca, bradicardia de seno y enfermedad de arteria coronaria. Alguna porción de las células diferenciadas son incorporadas en el tejido cardiaco del paciente., reproduciendo y reparando el músculo dañado.

Aunque se pueden variar los protocolos de administración para adecuarse al paciente particular, un protocolo típico para el tratamiento de enfermedades y trastornos cardiacos comprende inyecciones intramusculares e intravenosas cada tercer día durante 2 semanas y después cada 3 días durante las siguientes 2 semanas, e inyecciones intramusculares una vez al mes junto con infusiones intravenosas durante los meses 3, 6, 10 y 12. Se pueden suministrar inyecciones intracardiacas alrededor del área dañada durante cirugía de derivación.

Ejemplo 23

Un paciente diagnosticado con síndrome de Sinus Corda con bradicardia de seno se informó que tiene un marcapasos implantado. El paciente se trató de acuerdo con la práctica de la presente invención en donde las células hES y sus derivados incluyendo progenitores de células madre hematopoyéticos mediante inyección intravenosa o inyección subcutánea o inyección intramuscular o inyección intracardiaca o durante angiografía fueron administradas en una cantidad de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células. El paciente mostró signos de mejoría después de someterse al tratamiento con células hES y la necesidad de un marcapasos fue eliminada.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 22.

Tabla 22

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
7/6	dosis de prueba	no neuronal
7/19	im x 2	neuronal
7/21	im x 2	neuronal
7/26	im x 2	neuronal

8/4	im x 2	neuronal
8/10	im x 4	neuronal
8/26	im x 2	neuronal
9/1	im x 2	neuronal
9/8	iv	neuronal
9/15	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/22	iv im	neuronal no neuronal
9/28	caudal	neuronal
10/13	iv x 2	mezcla neuronal y no neuronal
10/27	im x 2	mezcla neuronal y no neuronal neuronal
11/8	im x 2	no neuronal
3/23	intra-articular en meniscos	neuronal
4/14	intra-articular en meniscos	neuronal
5/18	intra-articular en meniscos	neuronal
6/14	caudal	neuronal

Tratamiento de células cancerígenas y tejidos oncogénicos

Como alternativa, las células hES pueden administrarse de acuerdo con la práctica de la presente invención para complementar tratamiento de quimioterapia convencional de pacientes con cáncer. En quimioterapia convencional, se administran agentes citotóxicos para destruir las células cancerígenas. Sin embargo, los agentes citotóxicos no distinguen entre células normales y células cancerígenas y pueden destruir las células no cancerígenas del paciente, incluyendo las células del sistema inmune del paciente. Como consecuencia, mientras se somete a

quimioterapia, y por algún periodo después de detener la quimioterapia, pacientes con cáncer son susceptibles de infección debido a su sistema inmune comprometido. Al administrar células madre hematopoyéticas, células madre neuronales y células hES a pacientes sometidos a quimioterapia alguna porción de las células inyectadas se diferenciaran en un nuevo sistema inmune, reemplazando los glóbulos blancos, glóbulos rojos, plaquetas y otras células destruidas por la quimioterapia. También, regeneración de médula ósea aplásica como resultado de radioterapia y quimioterapia, a través de la regulación de los mecanismos de mitosis, y restauración de trayectorias de comunicación celular normal refuerzan el sistema inmune y detiene mitosis desrregulada adicional. Las células hES y/o sus derivados pueden ser administradas mediante inyección intravenosa o intramuscular o administración directa en el cultivo. Estas células también actúan en la trayectoria hedgehog aberrante y la controlan para permitir la detención de la multiplicación excesiva.

Ejemplo 24

Un paciente que se reporta con adeno-carcinoma grado III que fue sometido a tratamiento de quimioterapia y cirugía sin éxito. Debido al ataque de metástasis hepáticas múltiples con apariencia nodular y nodos celiacos y

retropancreáticos, el paciente necesitó cuidado de apoyo.

Las células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica de la presente invención se administraron en una cantidad de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células al paciente lo que dio como resultado en mejoras notables incluyendo restauración de un hígado uniformemente heterogéneo que anteriormente era nodular y un área ecogénica incrementada en los nodos linfáticos.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 23.

Tabla 23

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
3/23	dosis de prueba	no neuronal
3/24	im	no neuronal
3/25	im	no neuronal
3/26	im	no neuronal
3/27	im	no neuronal
3/28	iv	no neuronal
3/29	iv	no neuronal
3/30	iv	no neuronal
3/31	iv	neuronal
4/1	iv	no neuronal
4/2	im	no neuronal
4/3	iv	no neuronal
4/4	iv	no neuronal
4/5	iv im x 2	neuronal no neuronal
4/6	iv im	no neuronal neuronal
4/7	iv	no neuronal
4/8	iv	no neuronal
4/9	iv	no neuronal
4/10	iv	no neuronal
4/11	iv im	no neuronal neuronal

4/12	iv im	no neuronal neuronal
4/13	iv im	neuronal no neuronal
4/14	iv	neuronal
4/15	iv im	no neuronal neuronal
4/16	iv im	no neuronal neuronal
4/17	iv	no neuronal
4/19	iv im	no neuronal neuronal
4/20	iv im	no neuronal neuronal
4/21	iv im	no neuronal neuronal
4/23	iv infusion	neuronal
4/24	iv	no neuronal
4/25	im	no neuronal
4/26	iv	no neuronal
4/27	im	no neuronal
5/2	iv	no neuronal
5/3	iv	no neuronal
5/6	im iv	neuronal no neuronal
5/7	im	neuronal no neuronal
5/8	iv	no neuronal
5/12	iv	no neuronal
5/16	im iv	neuronal no neuronal
5/18	iv infusion	no neuronal
5/19	iv	no neuronal
5/20	im iv	neuronal no neuronal
5/22	iv infusion iv x 2	no neuronal
5/23	iv infusion iv x 2	no neuronal

Tratamiento de úlceras aftosas/liquen plano

Aún otro uso de células hES y/o sus derivados en el

tratamiento de cualquier úlcera en las áreas mucosas del cuerpo, tales como úlcera aftosa de la boca. Las células se administran intravenosamente, intramuscularmente y localmente. Las inyecciones diarias se suministran intramuscular o intravenosamente durante los primeros 4 meses e infusión intravenosa cada 15-30 días. También se hace aplicación local directamente o mediante mezclado con un gel.

Ejemplo 25

Una mujer de 65 años de edad llegó con una lengua completa de tejido necrótico y úlceras aftosas las cuales eran dolorosas. Ella tenía dificultada al comer y tragar y al hablar. Al recibir células hES ella está mejor; resultando más fácil tragar y hablar y abrir su boca mejor. Ella también mostró recuperación con las úlceras y el tejido necrótico.

Tratamiento de osteoartritis, artritis y coyunturas anquilosantes

Aún otro uso de las células hES y sus derivados es el tratamiento de osteoartritis, artritis y coyunturas anquilosantes. Se suministran inyecciones intramusculares diarias durante cebado x 10 días. Inyección intra-articular de 750,000 a 80 millones de células hES mezcladas con salumedrol se suministran y se repite 1½ a 3 meses después.

Tratamiento de lesión de plexo braquial

Otro uso adicional de las células hES y sus derivados es el tratamiento de lesiones de plexo braquial en donde el brazo afectado es paralizado. Las células se administraron intramuscularmente, intrevenosamente y en el plexo braquial y se repitió cada 1½ mes durante un año o hasta que el brazo mejore. También se usaron infusiones intravenosas.

Ejemplo 26

El paciente es un hombre de 26 años quien sufrió de lesión de plexo braquial (Lt.) en la mano y que ha perdido la función de ésta durante los últimos 7-8 años. Con tratamiento de células madre su mano izquierda ha mejorado mucho con más fuerza motora hasta el codo y muñeca. Es capaz de mover su muñeca y la mano no está tan flácida como estaba antes. Él es capaz también de mover su brazo hacia arriba.

Tratamiento de trastornos reproductivos

Aún otro uso de transplante de células hES de acuerdo con la práctica de la presente invención es para el tratamiento de trastornos reproductivos, a través de la restauración de fertilidad en pacientes que sufren de atrofia testicular, falla ovárica y azoospermia.

Ejemplo 27

El tratamiento de un paciente azoospermático con células hES y sus derivados incluyendo progenitores de células madre hematopoyéticos mediante inyección intramuscular local de acuerdo con la práctica de la presente invención dio como resultado la producción de espermatozoides. También se usaron inyecciones intramusculares e intravenosas así como inyecciones directas en los testículos y también se usó inyección subcutánea cerca del epidídimo.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 24.

Tabla 24

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
2/1	dosis de prueba	no neuronal
8/4	im	no neuronal
2/5	im	no neuronal
8/7	im	no neuronal
2/2	im	mezcla neuronal y no neuronal
7/27	im	neuronal
3/6	im	no neuronal
9/1	im	neuronal
9/2	im	neuronal
9/6	im	neuronal
9/7	im	neuronal
9/12	im	neuronal
9/13	im	mezcla neuronal y no neuronal
1/17	iv	no neuronal
3/27	im	no neuronal
4/26	im	neuronal
5/8	im	no neuronal
5/25	im	no neuronal
8/11	im	no neuronal
8/17	im	no neuronal
9/7	im	no neuronal

Regeneración tisular

Se pueden administrar las células hES de acuerdo con la práctica de la presente invención para la inducción de regeneración tisular, incluyendo pero no limitados a regeneración muscular, el tratamiento de cirrosis de hígado y en la formación de nuevos vasos sanguíneos (neo-vascularización) la cual es efectiva en el tratamiento de enfermedades degenerativas y al tratar úlceras que no cicatrizan.

Tratamiento de diabetes

Otra modalidad para la invención es el uso de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden células progenitoras que producen insulina, en el tratamiento de diabetes. Los pacientes diabéticos tienen cuatro veces más alto riesgo de sufrir un ataque al corazón o apoplejía y también tienen un riesgo incrementado de degeneración e insuficiencia de órganos múltiples, incluyendo riñones, ojos, sistema nervioso e inmunidad general. Al tratar la diabetes a través de transplantación de células hES productoras de insulina y restablecimiento de producción de insulina en el cuerpo, existe una reducción en la necesidad de insulina y una reducción en los efectos secundarios debilitantes.

Aunque se pueden variar los protocolos de

administración para adecuarse al paciente particular, un protocolo típico para el tratamiento de diabetes comprende inyecciones intramusculares e intravenosas dos veces a la semana durante el primer mes e inyecciones una vez a la semana durante los meses 3, 6, 11 y 12. También pueden ser suministradas las infusiones intravenosas durante el mes 6.

Ejemplo 28

El paciente es un hombre de 70 años de edad con diabetes y quien ha sufrido de hipercetoacidosis y estaba con 52 unidades de insulina y un hipoglucemiante oral. Dentro de 6 meses de terapia se le retiraron todos los medicamentos e insulina y ahora actualmente es capaz de mantener su azúcar en sangre en una dieta normal durante el último 1½. Él recibe inyecciones de refuerzo.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 25.

Tabla 25

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
9/5	dosis de prueba	no neuronal

9/6	im	neuronal
9/7	im	neuronal
9/8	im	no neuronal
9/9	im	no neuronal
9/12	iv	neuronal
9/13	im	no neuronal
9/19	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/22	iv	no neuronal
9/26	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/29	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/3	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/5	im	no neuronal
10/10	im	no neuronal
10/13	iv	no neuronal
10/17	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/20	iv	no neuronal
10/24	iv	mezcla neuronal y no neuronal
10/31	iv	mezcla neuronal y no neuronal
11/3	iv	mezcla neuronal y no neuronal
11/7	im	no neuronal
11/10	im	no neuronal
11/14	iv	neuronal
11/17	im	no neuronal
11/21	im	no neuronal
12/12	iv	no neuronal
12/19	iv	neuronal
12/26	iv	no neuronal
1/4	im	no neuronal
8/18	im	no neuronal
8/21	im	no neuronal
8/22	im	no neuronal
8/24	im	no neuronal
8/26	im	no neuronal

Ejemplo 29

Un hombre de 54 años de edad presentado con diabetes mellitus no controlada durante los últimos tres años y que estaba tomando 42 unidades de insulina junto con un hipoglucemiante oral. Su azúcar en sangre en ayunas fue de 200 mg/dl y su azúcar post prandial fue de 280 mg/dl con

todas las medicaciones.

Después de tomar células hES durante tres semanas él ha dejado de tomar insulina y está con una dosis reducida de fármacos hipoglucemiantes. Él se siente mucho mejor y está más alerta.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 26.

Tabla 26

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
1/18	im	neuronal (dosis de prueba)
1/19	im	no neuronal
1/20	im	no neuronal
1/21	im	mezclado
1/22	im	mezclado
1/23	im	mezclado
1/24	im	neuronal
1/25	im	neuronal
1/26	im	no neuronal
1/27	im	no neuronal
1/28	im	neuronal
1/29	im	neuronal
1/30	im	neuronal
1/31	im	mezclado

Ejemplo 30

Un hombre de 45 años de edad tenía angina y era diabético. Él tomaba insulina y un hipoglucemiante oral y fue sometido a angioplastía.

Tres meses después de haber recibido tratamiento de células hES él ha dejado la insulina y está con una dosis reducida de hipoglucemiante oral. Sus registros de azúcar en sangre y medicación están mostrando niveles de azúcar en sangre bien controlados.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 27.

Tabla 27

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
8/21	im	no neuronal (dosis de prueba)
8/22	im	no neuronal
8/23	im	no neuronal
8/24	im	no neuronal
8/25	im	no neuronal

8/28	im	no neuronal
8/30	im	no neuronal
9/1	im	no neuronal
9/4	im	no neuronal
9/6	iv	no neuronal
9/8	im	no neuronal
9/11	im	no neuronal
9/13	im	no neuronal
9/18	im	no neuronal
9/20	im	no neuronal
9/25	im	no neuronal
9/28	im	no neuronal
9/29	im	no neuronal
9/30	im	no neuronal
10/9	im	no neuronal
10/11	im	no neuronal
10/18	im	no neuronal
10/23	im	no neuronal
10/25	im	no neuronal
10/31	im	no neuronal
11/2	im	no neuronal
11/08	im	no neuronal
11/11	infusión iv	mezclado
11/12	infusión iv	mezclado
11/13	im	no neuronal
11/15	im	no neuronal
11/17	im	no neuronal
11/18	infusión iv	neuronal
11/19	infusión iv	neuronal
11/20	im	no neuronal
11/22	im	no neuronal
11/25	infusión iv	neuronal
11/26	infusión iv	neuronal
11/27	im	no neuronal
11/29	iv im	neuronal no neuronal
11/30	infusión iv	neuronal
12/1	infusión iv	neuronal
12/10	infusión iv	mezclado
12/11	im	no neuronal
12/13	im	no neuronal
12/16	infusión iv	neuronal
12/17	infusión iv	neuronal
12/18	im	no neuronal
12/20	im	neuronal
12/21	im	neuronal
12/22	iv	neuronal
1/5	im	no neuronal

1/6	im iv	no neuronal
1/8	im	no neuronal

Tratamiento de enfermedad pulmonar intersticial

Ejemplo 31

Una mujer de edad mediana vino a la clínica sufriendo de ILD (enfermedad pulmonar intersticial). Ella estaba en etapa terminal con 69% de SPO_2 en descanso. Hasta el presente con tratamiento de células hES su enfermedad ha parado de progresar. La paciente se siente mucho mejor en general e incluso su respiración ha mejorado. El tratamiento continúa. Existen sonidos al respirar que pueden escucharse en auscultación y su prueba de función pulmonar general mostraron alguna mejoría.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 28.

Tabla 28

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
10/16	im	no neuronal (dosis de prueba)
10/17	im	no neuronal
10/18	im	no neuronal
10/19	iv epidural nebulización	neuronal no neuronal
10/20	nebulización iv	neuronal
10/21	nebulización iv	neuronal
10/22	im nebulización iv	neuronal no neuronal
10/23	nebulización iv	neuronal
10/24	nebulización im	no neuronal
10/25	im nebulización iv	mezclado
10/26	nebulización iv	mezclado
10/27	nebulización iv	mezclado

10/28	nebulización iv	neuronal
10/29	nebulización iv	neuronal
10/30	nebulización iv	mezclado
10/31	nebulización iv	mezclado
11/2	nebulización iv	mezclado
11/3	nebulización iv	mezclado
11/4	nebulización iv	mezclado
11/5	nebulización iv	mezclado
11/6	nebulización iv	mezclado
11/7	nebulización iv	mezclado
11/8	nebulización iv	no neuronal
11/9	nebulización iv	mezclado
11/10	nebulización iv	no neuronal
11/11	nebulización iv	mezclado
11/12	nebulización iv	mezclado
11/13	nebulización iv	mezclado
11/14	nebulización iv	mezclado
11/15	nebulización iv	neuronal
11/16	im nebulización iv	neuronal no neuronal
11/17	im nebulización iv	no neuronal
11/18	im nebulización iv	no neuronal
11/19	im nebulización iv	no neuronal
11/20	IM	no neuronal

	nebulización iv	
11/21	im nebulización iv	no neuronal
11/22	im nebulización iv	no neuronal
11/23	nebulización iv	neuronal
11/24	nebulización iv	no neuronal
11/25	nebulización iv	no neuronal
11/26	nebulización iv	no neuronal
11/27	nebulización iv	no neuronal
11/28	im nebulización iv	no neuronal
11/29	im nebulización iv	no neuronal
11/30	im nebulización iv	no neuronal
12/1	nebulización iv	no neuronal
12/2	nebulización iv	no neuronal
12/3	nebulización iv	no neuronal
12/4	nebulización iv	no neuronal
12/5	nebulización iv	no neuronal
12/6	nebulización iv	no neuronal
12/7	nebulización iv	no neuronal
12/8	nebulización iv	no neuronal
12/9	nebulización iv	neuronal
12/10	nebulización iv	neuronal
12/11	nebulización iv	no neuronal

12/12	nebulización iv	no neuronal
12/13	nebulización iv	no neuronal
12/14	nebulización iv	no neuronal
12/15	nebulización iv	no neuronal
12/16	nebulización iv	no neuronal
12/17	nebulización iv	no neuronal
12/18	nebulización iv	no neuronal
12/19	nebulización iv	no neuronal
12/20	nebulización iv	no neuronal
12/21	nebulización iv	no neuronal
12/22	nebulización iv	neuronal no neuronal
12/23	im nebulización iv	neuronal no neuronal
12/24	im nebulización iv	neuronal no neuronal
12/25	im iv	mezclado
12/26	nebulización iv	mezclado
12/27	nebulización iv	mezclado
12/28	nebulización iv	mezclado
12/29	im iv	neuronal mezclado
12/30	im nebulización iv	neuronal
12/31	im nebulización iv	neuronal mezclado
1/1	im nebulización iv	mezclado
1/2	im iv	mezclado

	nebulización	
1/3	im nebulización iv	no neuronal
1/4	im nebulización iv	no neuronal
1/5	im nebulización iv	neuronal no neuronal
1/6	im nebulización iv	mezclado no neuronal
1/7	im nebulización iv	mezclado no neuronal
1/8	im nebulización iv	mezclado no neuronal
1/9	im nebulización iv	mezclado no neuronal
1/10	im iv nebulisation	mezclado no neuronal
1/11	im nebulización iv	mezclado no neuronal
1/12	im nebulización iv	mezclado no neuronal
1/13	iv	mezclado
1/14	im nebulización iv	mezclado no neuronal
1/15	im nebulización iv	neuronal no neuronal
1/16	im nebulización iv	mezclado no neuronal
1/17	im nebulización iv	mezclado no neuronal
1/18	IM nebulización iv	mezclado no neuronal
1/19	im iv	mezclado no neuronal

	nebulización	
1/20	im nebulización iv	no neuronal
1/21	im nebulización iv	mezclado
1/22	im nebulización iv	mezclado
1/23	im nebulización iv	neuronal mezclado
1/24	im nebulización iv	neuronal mixed
1/25	im nebulización iv	neuronal mezclado
1/26	im nebulización iv	neuronal mezclado
1/27	im nebulización iv	neuronal mezclado
1/28	im nebulización iv	neuronal mezclado
1/29	im nebulización iv	neuronal mezclado
1/30	im nebulización iv	no neuronal
1/31	im nebulización iv	no neuronal

Desarrollo de nuevo fármaco

Otro uso adicional para las células hES es desarrollar y evaluar nuevos fármacos. Por ejemplo, las

células hES se pueden cultivar de acuerdo con la práctica de la presente invención y usarse como un substrato para evaluar los objetivos, modo de acción, absorción, metabolismo, excreción, toxicidad y seguridad de nuevas entidades químicas, candidatos de fármacos y nuevos farmacéuticos durante búsqueda y desarrollo farmacéutico. En una modalidad, la presente invención se refiere a métodos para evaluar el efecto de un compuesto en las células hES y/o sus derivados que comprende cultivar células hES y/o sus derivados obtenidos por los métodos de la presente invención en presencia del compuesto y determinar el efecto del compuesto en las células.

Ejemplo 32

Los efectos de los antibióticos tetraciclina y ceftriaxona en células hES cultivadas fueron analizados junto con suero del paciente. Estos fármacos fueron introducidos en forma separada así como juntos en concentraciones diferentes y los efectos se estudiaron en las células madre. Finalmente, la dosis de la medicación y la eficacia de los fármacos se determinó.

Suministro de fármaco

Otro uso de las células hES y/o sus derivados es portar fármacos al sitio de una lesión o enfermedad para

suministro localizado. Las células hES y/o sus derivados pueden incubarse en presencia de un fármaco de forma que las células absorban el fármaco. Las células cargadas pueden entonces suministrarse localmente al sitio de tratamiento en donde el fármaco se propaga fuera de las células y el tratamiento de la lesión o enfermedad será efectuado. En otra modalidad, las células cargadas pueden suministrarse a un sitio diferente del área dañada o enferma si el área dañada o enferma no es adecuada para aplicación directa del fármaco (por ejemplo, el área está muy dañada para inyección directa del fármaco). Este método de suministro de fármaco permite el uso de fármacos que podrían ser tóxicos si se administran sistemáticamente a un sujeto. El método también permitiría ser administradas concentraciones más altas del fármaco al sitio que las que pueden ser posibles por otras rutas de administración. En una modalidad más, las células hES y/o sus derivados se pueden cargar con uno o más fármacos que podrían mejorar el tratamiento producido por el transplante de células por sí mismas. Ejemplos no limitativos incluyen cargar células con agentes anti-hipertensos para tratamiento de enfermedades cardiacas, cargar células con agentes quimioterapéuticos para tratamiento de pacientes con cáncer y cargar células con factores neurotróficos para tratamiento de SCI. En una modalidad, la presente invención se refiere a métodos para

suministrar un fármaco a un sujeto que comprende cultivar células hES y/o sus derivados obtenidos mediante los métodos de la presente invención en presencia del fármaco, en donde las células absorben el fármaco, y administrar las células a un sitio en el sujeto, en donde se suministra el fármaco.

En un aspecto de la invención, las metodologías de cultivo de la presente invención permiten la exposición de las células hES y/o sus derivados para fármacos y otros agentes activos *in vitro* antes del transplante, en comparación con administración de fármacos o agentes activos directamente a pacientes. La exposición de las células *in vitro* proporciona ventajosamente los efectos positivos de los fármacos (por ejemplo, los efectos neurotróficos del ácido valproico) mientras que se evita la toxicidad de la administración sistémica del fármaco.

Tratamiento de lesión en médula espinal: Estudios de casos

Tratamientos clínicos usando células hES y sus derivados para SCI han mostrado resultados notables. Dado la naturaleza de la práctica de la presente invención y que los pacientes fueron voluntarios incurables y que su condición fue SCI crónica ASIA A y por lo tanto más allá de la etapa en la cual son posibles proceso de regeneración neural neutral, pruebas controladas de doble ciego o placebo no han sido

llevadas a cabo, con respecto al juramento de los doctores. Los resultados del protocolo fueron demostrados a través de ejemplos detallados provistos como estudios de casos abajo.

Estudio de caso 1

La práctica de la presente invención dio como resultado el cambio de los síntomas de SCI en un sujeto que sufría de SCI mediante transplantación de células hES de acuerdo con el protocolo descrito en la presente.

ReRo 1.3.4/000/220905/α, un sujeto de 29 años de edad con una fractura C6-C7 y dislocación se declaró intratable mediante diferentes prácticas médicas. El sujeto no tenía sensación desde el área inter mamaria hacia abajo y fue incapaz de sentarse por sí mismo, no tenía control de vejiga o intestino, no fue capaz de mover sus brazos y dedos y no tenía fuerza o tono en sus piernas. El sujeto ha desarrollado úlceras por prolongada estadía en cama bilaterales no cicatrizantes durante un periodo de tres años. La administración de células hES y sus derivados de acuerdo con las prácticas de la presente invención fue iniciada bajo estas condiciones como sigue.

Una composición farmacéutica que contenía aproximadamente alrededor de 750,000 a aproximadamente 80 millones de células hES y sus derivados que incluyen progenitores de células madre hematopoyéticos y progenitores

de células madre neuronales fueron diluidas en solución salina estéril normal hasta un volumen final de 0.25 a 1.0 ml, cariotipificadas, probadas para contaminación, viabilidad y conteo usando protocolos estándares y después administrados mediante inyección subcutánea en el antebrazo. El sujeto fue observado para choque anafiláctico, dolor o inflamación en el sitio de la inyección, comezón generalizada, ruborización o fiebre después de cinco minutos, diez minutos, quince minutos treinta minutos, una hora y veinticuatro horas.

El tratamiento del sujeto fue mediante administración de una inyección de cebado subcutánea de una composición farmacéutica que contenía 750,000 a 80 millones de células hES y sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas y progenitores de células madre neuronales, se volvieron a suspender en un volumen de 0.25 ml a 1.0 ml de solución salina normal estéril. Una inyección de cebado adicional portando el mismo número de células madre hematopoyéticas y células madre neuronales se volvieron a suspender en 0.25 ml a 1.0 ml de solución salina estéril normal se administró mediante inyección intramuscular. Una inyección de cebado final de 750,000 a 80 millones de progenitores de células madre neuronales resuspendidos en un volumen de 0.25 ml a 1.0 ml de solución salina normal estéril fue administrada mediante inyección intravenosa.

El tratamiento directo de SCI de acuerdo con la práctica de la presente invención se llevó a cabo mediante resuspensión de un composición farmacéutica que comprende 750,000 a 80 millones de células hES y sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, resuspendidas en un volumen de 2 ml de solución salina normal estéril y diluidas además de 15 ml a 40 ml de solución salina estéril normal y administradas mediante inyección epidural en el sitio, bajo del sitio y arriba del sitio de la lesión sietes días después de la primera inyección de cebado. El tratamiento mediante administración de inyección epidural fue repetida después de un mes y medio de cebado, cuatro meses después de cebado y seis meses después de cebado.

Además de la administración epidural, el sujeto fue tratado mediante inyección intratecal de una composición farmacéutica que comprendía 750,000 a 11 millones de células hES y sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticos y progenitores de células madre neuronales resuspendidos en 2 ml de solución salina estéril normal dos y cinco meses después de iniciar el tratamiento.

Más aún, el sujeto se trató con una inyección epidural de una composición farmacéutica que comprendía 750,000 a 11 millones de células hES y sus derivados, en

donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, resuspendidos en 2 ml de solución salina estéril normal y diluidos además hasta un volumen final de 4 ml, dos veces diario durante tres días consecutivos.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 29.

Tabla 29

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
8/24	dosis de prueba	no neuronal
8/25	im x 3	hES
8/27	im x 2	neuronal
8/28	aspersión para antidecúbito	neuronal
8/29	im x 4	neuronal
9/6	im x 2	neuronal
9/8	epidural	neuronal
9/9	iv	neuronal
9/10	im	no neuronal
9/14	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/4	im intratecal	no neuronal
10/7	im espinal profunda	no neuronal
10/15	im	neuronal
10/21	im	no neuronal
10/26	iv	neuronal
11/7	im	no neuronal
3/1	im espinal profunda x 3	neuronal
3/2	im x 2	neuronal
3/3	im x 2	neuronal
3/5	im	neuronal
3/6	im x 2	neuronal
3/7	im x 2	neuronal
3/8	im epidural x 2	neuronal
3/9	catéter epidural	neuronal
3/10	catéter epidural	neuronal
3/11	catéter epidural	neuronal
3/12	espinal profunda	neuronal
3/13	espinal profunda	neuronal

3/14	im	neuronal
3/15	im	neuronal
3/16	im	neuronal
3/17	im	neuronal
3/18	im	neuronal
3/19	im	neuronal
3/20	im	neuronal
3/21	im	neuronal
3/22	im	neuronal
3/23	im	neuronal
3/24	im	neuronal
3/25	im	neuronal
3/26	im	neuronal
3/27	im	neuronal
3/28	im	neuronal
3/29	im	neuronal
3/30	im	neuronal
3/31	im	neuronal
5/1	im	neuronal
5/2	im	neuronal
5/3	catéter epidural	neuronal
5/4	catéter epidural	neuronal
5/5	catéter epidural	neuronal
5/6	im	neuronal
5/8	im	no neuronal
5/12	im	neuronal

El bienestar neurológico del sujeto fue evaluado a intervalos regulares después de iniciar el tratamiento, y un mejoramiento notable del estado mental e higiene general del sujeto se observó después de dos semanas como se muestra en la tabla 30.

Tabla 30

Periodo de Tiempo	Estado Mental	Higiene	Comporta-miento	Nervios Craniales
0 día	Deprimido	Pobre	Correcto	Normal
3 días	Deprimido	Pobre	Correcto	Normal
15 días	Optimista	Promedio	Correcto	Normal
2 meses	Contento	Promedio	Correcto	Normal
3 meses	Optimista	Promedio	Correcto	Normal
10 meses	Muy contento y deseando vivir	Promedio	Correcto	Normal

Los signos y síntomas típicos de daño del sistema nervioso autónomo como resultado de una fractura C6-C7 fueron evaluados durante el curso del tratamiento. Una mejoría marcada y progresiva en todos los parámetros evaluados, incluyendo la capacidad de sentir presión profunda, sentido del tacto, sensación, equilibrio, capacidad para sentir dolor, capacidad APRA sentir cambio en la temperatura, movimientos involuntarios, presencia de sudores fríos, vértigo, presión sanguínea, dificultada al respirar, postura anormal mientras se está acostado y capacidad de sentarse sin ayuda, se observaron como se muestra en la tabla 31.

Tabla 31

Periodo de tiempo	Presión profunda	Tacto	Sensación	Equilibrio	Dolor	Temp.
0 días	Inter-mamaria	Borde inferior de clavícula	Borde inferior de clavícula	No sentado	Borde superior de clavícula	Borde superior de clavícula
3 días	Ombligo	Brazo inter-mamario	Antebrazo brazo inter-mamario	No sentado	Inter-mamario	Inter-mamario
15 días	Ombligo inferior	Xifi-esternón	Xifi-esternón y brazo interior	Sentado	Xifi-esternón y brazo interior	Xifi-esternón y brazo interior
2 meses	Espina isquial	Espina isquial	Xifi-esternón y brazo interior	Muy bien sentado	Espina isquial	Espina isquial
3 meses	Borde superior de muslo	Espina isquial	Xifi-esternón y brazo interior	Sentado	Espina isquial	Espina isquial
10 meses	"	Perineal	Ombligo	Bien sentado	Perineal	Perineal
05.06	Perineal	Mitad inferior hacia abajo de muslo	Ombligo	Bien sentado	Perineal	Perineal

Tabla 31 (cont.)

Periodo de tiempo	Sudor frío	Vértigo	BP	Respiración	Postura anormal mientras está acostado
0 días	++++	++++	fluctuante	Respiración diafragmática	Incapaz de sentarse
3 días	+++	+++	fluctuante	Respiración diafragmática	Incapaz de sentarse
15 días	++	+	Estable	Normal	Estable sentado
2 meses	Nulo	+ al sentarse	Estable	Normal	Muy bien sentado
3 meses	Nulo	+ al sentarse	Estable	Normal	Muy bien sentado
10 meses	Nulo	+ al levantarse	Estable	Normal	Se levanta con compás y andadera
05.06	Nulo	Nulo	Estable	Normal	Se levanta con compás y andadera y da un paso hacia adelante

Disfunción de vejiga e intestino se asocia comúnmente con daño neurológico como resultado de SCI. Este daño da como resultado control de vejiga malo, corriente de vejiga y sensación de llenura en vejiga, control de intestino, tiempo para evacuación del intestino y sensación en el intestino. Durante el curso del tratamiento mejoras marcadas y progresivas en todos los parámetros evaluados fueron observadas como resultado del tratamiento como se muestra en la tabla 32.

Tabla 32

Periodo de tiempo	Movimientos involuntarios	Control de vejiga	Corriente de vejiga	Sensación (vejiga)	Control de intestino	Tiempo de evacuación	Sensación (intestino)
0 días	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	3 horas	Nulo
3 días	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	3 horas	Nulo
15 días	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	2.5 horas	Nulo
2 meses	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	2 horas	+
3meses	Nulo	Nulo	Nulo	Inicio	+	0.5 horas	++

Cambios en la función motora del cuerpo superior, como evidencia de regeneración neural en el sitio de la lesión C6-C7 fueron evaluados durante el curso del tratamiento. Se observaron mejorías marcadas y progresivas en movimiento de hombre, muñeca y movimiento de dedos, fuerza en los dedos, reflejos de tendón, fuerza de movimiento de extremidad, atrofia muscular y asimiento manual como se muestra en la tabla 33.

Tabla 33

Periodo de tiempo	Hombro I D	Muñeca Dedos I D	Reflejo de tendones I D	Fuerza H AN M D	Atrofia H AN M D	Asimiento manual
0 días	Encogimiento +	Caída de muñeca Dedos debilitados Sin movimiento	Bíceps bilaterales activos	4 2 3 0	0 3+ 4+ 4+	Nulo B/L
3 días	Encogimiento +	Caída de muñeca Dedos debilitados Sin movimiento	Bíceps bilaterales activos	4 2 3 0	0 3+ 4+ 4+	Nulo B/L
15 días	Encogimiento +	Mejor caída de muñeca Puede asir Puede mover muñeca	Activos	4 3 4 3	0 3+ 4 4+	Presente Puede sostener vaso
2 meses	+	"	Ambiguo	4 4 4 4	0 2+ 3+ 3+	Puede poner comida en la boca
3 meses	+	Mucho mejor movimiento	Ambiguo	4 4 4 4	0 2+ 3+ 3+	

Cambios en la función motora del cuerpo inferior, como evidencia de regeneración neural en el sitio de la lesión C6-C7 fueron evaluados durante el curso del tratamiento, incluyendo movimiento de cadera, movimiento de rodilla, movimiento de dedo del pie, reflejos de tendones, fuerza del muslo, atrofia muscular y respuesta de la planta del pie. Aunque no existió mejoría en cualquiera de los parámetros probados durante el curso del estudio, después de tres meses de tratamiento, el sujeto fue capaz de levantarse con la ayuda de una andadera como se muestra en la tabla 34.

Tabla 34

Periodo de tiempo	Cadera		Rodilla		Tobillo		Reflejo		Fuerza		Atrofia		Planta del pie	
	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
0 día	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+	4+	Ambiguo	
3 días	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+	4+	Ambiguo	
15 días	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+	4+	Ambiguo	
2 meses	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+	4+	Ambiguo	
3 meses	SE LEVANTÓ CON ANDADERA DURANTE 10 MINUTOS												Ambiguo	

Estudio de caso 2

ReRo 1.3.4./001/051004/α001, un sujeto de veintidós años que sufrió de SCI con paraplejia post traumática como resultado de una fractura D6-D7 después de una caída desde un terraza en segundo piso. El sujeto cayó en coma durante dos días después de la caída y recuperó la conciencia, pero desarrollo parálisis bilateral con pérdida de sensibilidad y

motora total del la mitad inferior del cuerpo desde la región inter mamaria hasta los pies, y fue incapaz de levantar sus pies o piernas y fue incapaz de sentarse sin ayuda o levantarse en una posición de sentado. El sujeto fue confinado a la cama permanentemente, tuvo pérdida de vejiga e intestino y fue completamente dependiente del suporte de su familia aunque sus extremidades superiores no fueron afectadas.

La administración de una composición farmacéutica que comprendía células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica de la presente invención fue iniciada después de cinco meses de la lesión. En un periodo de cinco meses, el sujeto recuperó control de vejiga e intestino y capacidad para sentarse sin soporte, y deslizarse arriba y abajo al levantar la cadera. La percepción sensorial se reestableció al nivel perineal. El sujeto puede levarse en una andadera sin ayuda y puede levantarse con facilidad en la andadera sin la necesidad del soporte de las rodillas. El tratamiento dio como resultado la capacidad del sujeto para caminar usando la andadera sin el soporte de un aparato ortopédico para la rodilla y regresó a trabajar, es decir, él ha recuperado un estilo de vida regular.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 35.

Tabla 35

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
10/5	dosis de prueba	neuronal
8/17	im x 3	neuronal
8/18	im	neuronal
8/19	im	neuronal
9/5	im	no neuronal
9/6	im x 2	neuronal
9/7	im	neuronal
9/8	im	neuronal
9/10	im	no neuronal
9/13	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/14	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/15	im	no neuronal
11/6	catéter epidural	neuronal
11/7	catéter epidural x 3	neuronal
11/8	catéter epidural x 3	neuronal
11/9	catéter epidural x 3	neuronal
11/10	catéter epidural x 3	neuronal
11/11	iv	neuronal
11/12	im	neuronal
11/13	iv	neuronal
11/14	iv	neuronal
11/15	iv	neuronal
11/16	im	no neuronal
11/18	im	no neuronal
1/12	im	neuronal
2/14	im	no neuronal
2/15	im	neuronal
2/16	im	no neuronal
2/17	im	no neuronal
2/18	im	neuronal
3/26	im	neuronal
3/27	catéter epidural x 3	neuronal
3/28	catéter epidural x 4	neuronal
3/29	catéter epidural x 2	neuronal
3/30	catéter epidural x 2	neuronal
3/31	iv	neuronal
5/21	im	neuronal
5/24	intratecal	neuronal
5/26	im	neuronal
7/14	im	neuronal
7/15	im	neuronal
7/16	im	neuronal
7/17	im	neuronal
7/18	intratecal	neuronal
7/19	im	neuronal
7/21	im	neuronal
7/22	im	neuronal
7/24	caudal	neuronal

Estudio de caso 3

ReRo 1.3.4/002/040205/α, un sujeto de cuarenta años de edad sufrió de SCI cuadripléjica como resultado de una lesión C5-C6 y rigidez y dolor en el cuello. El sujeto fue sometido a cirugía después de seis meses y fue cuadripléjico desde entonces. El sujeto sufrió de un sentimiento de debilitamiento y mareo si se le hacía sentar con soporte, y tenía sensación desde el borde superior del omóplato hacia arriba, con pérdida total de fuerza en las cuatro extremidades y pérdida de función de intestino y vejiga inmediatamente después de la cirugía.

La administración de una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica de la presente invención se inició después de nueve meses de la cirugía. Como resultado del tratamiento con células hES, el sujeto es capaz de sentirse confortablemente sin necesidad de soporte, y es capaz de moverse y doblarse a un lado mientras esta sentado en una silla con sus piernas colgando confortablemente. El sujeto recuperó una mejoría notoria del control de su cuerpo superior. El sujeto recibió mejoría sustancial en su bienestar psicológico a través de la movilidad incrementada e independencia y actividades. Él es capaz de levantarse con soporte con fuerza en sus extremidades inferiores, control del movimiento del dedo del pie y sin caída de muñeca. El tratamiento está en curso de

acuerdo con las mejorías de la condición del sujeto.

Estudio de caso 4

ReRo 1.3.4/003/260902/β, un sujeto de treinta y siete años de edad quien sufrió de lesión espinal con daño cerebral diecisiete días atrás después de un accidente de circulación por carretera y fue confinado a una silla de ruedas. El sujeto también sufrió de hemiplejía del lado derecho, incapacidad para hablar, parálisis facial, una pérdida total de memoria y sin control de vejiga.

El sujeto fue administrado con composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica de la presente invención durante un año y dos meses lo cual dio como resultado la capacidad de caminar con la ayuda de una andadera, habla de unas pocas palabras, cuello enderezado, remoción de parálisis facial y mejoría de memoria.

Estudio de caso 5

ReRo 1.3.4/004/030505/α, un sujeto de cincuenta y seis años de dad quien sufrió de una fractura post-traumática en C5-C8 con retrovulsión de las vertebras fracturas causando contusión de la médula y asociada hemorragia epidural anterior y fue parapléjico. El sujeto fue incapaz de mover ambas extremidades inferiores y sufrió de dolor agudo en la

espalda.

La administración de una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica de la presente invención se llevó a cabo durante un periodo de un año lo que dio como resultado la recuperación de alguna fuerza en ambas piernas, percepción sensorial tal como vibración en las piernas y capacidad de levantarse con la ayuda de una andadera sin dolor en la espalda. El sujeto puede caminar con la ayuda de una andadera, recuperó el control de la vejiga y sensación y superó ataques de sudoraciones frías y vértigo.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 36.

Tabla 36

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
5/25	dosis de prueba	no neuronal
5/27	im	neuronal - mezclado > hematopoyético
6/3	im	neuronal - mezclado > hematopoyético
6/6	im	neuronal - mezclado > hematopoyético
6/20	im	neuronal - mezclado > hematopoyético
6/22	im	neuronal - mezclado > hematopoyético
6/24	im	neuronal - mezclado > hematopoyético
6/27	im	neuronal - mezclado > hematopoyético
6/29	iv	neuronal - mezclado > hematopoyético
6/30	im iv	neuronal - mezclado > hematopoyético
7/1	iv	neuronal - mezclado > hematopoyético
7/4	im	neuronal - mezclado > hematopoyético
7/5	iv	neuronal - mezclado > hematopoyético
7/6	im	neuronal - mezclado > hematopoyético
7/7	iv	neuronal - mezclado > hematopoyético
7/11	im	no neuronal
7/12	im	hES
7/18	iv	neuronal
7/19	im	neuronal
7/20	im	neuronal
7/21	im x 2	neuronal
7/25	im x 2	neuronal
7/26	im	neuronal
7/27	im x 2	neuronal
7/28	im	neuronal
7/29	im x 2	neuronal
7/30	im x 2	neuronal
8/1	im x 2	neuronal
8/2	im x 2	neuronal
8/16	im x 2	neuronal
8/17	im	neuronal
8/25	im x 2	hES
8/30	im x 2	neuronal
9/1	im x 2	neuronal
9/2	im x 2	neuronal

9/6	intratecal	neuronal - mezclado > hematopoyético
9/7	im	neuronal
9/13	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/14	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/15	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/19	im x 2	neuronal mezcla neuronal y no neuronal
10/4	im	neuronal
10/5	im intratecal	neuronal
10/11	espinal profunda	neuronal
10/13	epidural	neuronal
10/17	lado de la columna	neuronal
11/5	intratecal	neuronal
11/7	im	no neuronal
11/8	im	no neuronal
11/9	espinal profunda	neuronal
11/17	im x 2	no neuronal
paciente en hospital hasta enero		
1/12	im	no neuronal
1/25	im	neuronal
2/8	im	neuronal
3/2	im x 3	neuronal (2) no neuronal
3/8	im	no neuronal
3/9	im	no neuronal
3/10	im	no neuronal
3/13	catéter epidural x 4	neuronal
3/14	catéter epidural x 4	neuronal
3/15	catéter epidural x 4	neuronal
3/16	catéter epidural x 2	neuronal
3/20	im	neuronal
3/22	im	neuronal
3/28	im	no neuronal
3/29	im	no neuronal
4/3	im	no neuronal
4/4	im	no neuronal
4/7	im x 2	neuronal
4/14	im	neuronal
4-20	x 5	neuronal
4/21	x 3	neuronal
4/24	im	neuronal
5/19	im x 2	neuronal no neuronal
5/25	caudal	neuronal
6/5	infusión iv x 2	neuronal
6/6	infusión iv x 2	neuronal

6/9	intratecal	neuronal
6/10	infusión iv	no neuronal
6/11	infusión iv	no neuronal
6/12	iv	no neuronal
6/13	im	no neuronal
6/21	im	neuronal
7/4	im	neuronal
7/10	intratecal	neuronal
7/11	infusión iv x 2	neuronal
7/12	infusión iv x 2	neuronal
7/13	caudal	neuronal
7/14	iv	no neuronal

Estudio de caso 6

ReRo 1.3.4/005/130705/β, un sujeto de veinticinco años de edad quien fue diagnosticado con trastorno espinal de Potts en el nivel D6 con paraplejía de extremidades inferiores, fue sometido a cirugía tres veces con una descompresión anterior de la médula espinal. El sujeto fue confinado a una silla de ruedas, no podía sentarse sin soporte, con parálisis flácida en las piernas, no tenia control de intestino y evacuaba mientras estaba acostado y no tenía sensación de vejiga.

El sujeto fue administrado con una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica de la presente invención, once años y seis meses después de la lesión. El protocolo de tratamiento seguido durante el primer año dio como resultado el

fortalecimiento de la espalda, capacidad para sentarse sin soporte, y sensación de pesadez en las piernas. El sujeto también recuperó dolor de espalda durante menstruación y dolor menstrual. Las sensaciones en los muslos, piernas y recuperación de sensación y control de vejiga fueron observados. El sujeto es capaz de caminar con la ayuda de una andadera con buena recuperación del movimiento de las ambas piernas. El tratamiento está en curso.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 37.

Tabla 37

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
7/13	dosis de prueba	no neuronal
7/27	im	neuronal
7/28	im	no neuronal
7/29	im	neuronal
8/3	im x 2	neuronal

8/4	im x 2	no neuronal
8/5	im	neuronal
8/9	im	neuronal
8/12	im x 2	neuronal
8/16	im	neuronal
8/23	im x 2	hES neuronal
8/30	im x 2	neuronal
9/1	im x 4	neuronal
9/2	im x 2	neuronal
9/8	iv	neuronal
9/12	im	neuronal
9/14	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/22	iv	neuronal
9/27	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/29	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/30	im	neuronal
10/4	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/6	epidural x 2 ampolletas	neuronal
10/10	im	neuronal
10/19	im	no neuronal
10/21	im	neuronal
10/24	epidural	neuronal
11/7	epidural	neuronal
11/14	iv	neuronal
11/15	im	no neuronal
11/18	im	no neuronal
12/1	intratecal	mezcla neuronal y no neuronal
12/7	espinal profunda	no neuronal
12/23	im	neuronal
12/26	im	no neuronal
1/5	im	neuronal
1/11	im	neuronal
1/17	im	neuronal
1/24	iv	neuronal
1/26	im	neuronal
2/1	im	neuronal
2/3	im	neuronal
2/9	im	no neuronal
2/15	im	no neuronal
2/22	im	neuronal
3/1	im	no neuronal
3/9	im	no neuronal
3/21	im	neuronal
3/28	im	neuronal
4/13	catéter epidural	neuronal
4/26	im	neuronal
5/2	im	no neuronal

5/4	catéter epidural	neuronal
5/5	catéter epidural	neuronal
5/6	catéter epidural	neuronal
5/7	im	neuronal
5/21	im	neuronal
6/5	im	neuronal
6/12	im	neuronal
6/26	iv x 2	no neuronal
7/8	im	neuronal

Estudio de caso 7

ReRo 1.3.4./006/220805/α, un sujeto de treinta años de edad que sufre de una SCI parapléjica C6-C7 fue incapaz de mover extremidades inferiores y no tenía control de intestino o sensación de intestino. El sujeto tenía sensación de presión fina y profunda únicamente desde la región inter mamaria hacia arriba. De esta manera, el sujeto tenía dificultada para sentarse. Las manos del sujeto tenían muy poca fuerza, con movimiento de dedos muy débil y el sujeto tenía dificultad para respirar.

El sujeto se trató de acuerdo con la práctica de la presente invención mediante administración de una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados alrededor de tres meses después de la lesión. El sujeto recuperó la capacidad de sentarse sin soporte, no sufrió de vértigo, puede sentir presión en la ingle, tiene sensación en el lado medio del codo y siente dolor en las piernas si el paciente intenta moverse. El sujeto respira fácilmente,

tiene sensación en la vejiga e intestino, tiene sensación en las piernas y ahora puede levantarse por unos pocos minutos con soporte. El sujeto también ha incrementado fuerza y movimiento en los dedos. El tratamiento está en curso.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 38.

Tabla 38

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
2/22	dosis de prueba	no neuronal
2/23	im	neuronal
2/24	im	neuronal
2/27	im	no neuronal
2/28	im	no neuronal
3/2	im	neuronal
3/3	im	neuronal
3/8	catéter epidural	neuronal
3/9	catéter epidural x 2	neuronal
3/10	catéter epidural x 2	neuronal
3/11	iv	neuronal
3/20	im	neuronal
3/22	im	neuronal
3/23	im x 2	neuronal
3/24	im	no neuronal
3/27	im	no neuronal
4/5	intratecal	neuronal
4/12	im	neuronal
5/1	im catéter epidural x 4	neuronal
5/2	im catéter epidural	neuronal
5/10	catéter epidural x 4	neuronal
5/11	catéter epidural x 4	neuronal
5/12	catéter epidural x 4	neuronal

Estudio del caso 8

ReRo 1.3.4/007/221005/β, un sujeto de veintiséis años de edad, parapléjico como resultado de SCI en D6, fue incapaz de mover ambas extremidades inferiores, aunque fue capaz de sentarse sin soporte. El sujeto no tenía control de vejiga o intestino, y sólo tenía sensación dese el área inter mamaria hacia arriba.

El sujeto fue administrado con composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica de la presente invención alrededor de diez meses después de la lesión. El sujeto recuperó sensación en la parte lateral del cuerpo y hasta la región no biliar bilateralmente desde el área de la axila hasta el hueso de la cadera. El sujeto puede caminar con la ayuda de una andadera y un soporte ortopédico con fuerza motora en las piernas.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 39.

Tabla 39

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
9/26	im dosis de prueba	neuronal
9/27	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/28	im	mezcla neuronal y no neuronal
9/29	im	neuronal
9/30	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/1	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/3	im	mezcla neuronal y no neuronal

10/4	im intratecal	no neuronal
10/5	m	neuronal
10/6	epidural	neuronal
10/8	m	no neuronal
10/10	im	neuronal
10/12	im espinal profunda	neuronal
10/15	iv	neuronal
10/19	im	no neuronal
10/24	im	mezcla neuronal y no neuronal
10/25	epidural	neuronal
12/8	espinal profunda	no neuronal
12/10	intratecal	no neuronal
12/11	im	no neuronal
12/12	espinal profunda	no neuronal
12/13	im	neuronal
12/14	epidural	neuronal
12/15	im	neuronal
2/13	im	neuronal
2/15	epidural	neuronal
2/16	iv	neuronal
2/17	im	neuronal
5/24	im iv	neuronal
5/25	im iv	no neuronal neuronal
5/26	im iv x 2	neuronal no neuronal, neuronal
5/27	im x 2 iv x 2	no neuronal neuronal
5/28	im	neuronal, no neuronal
5/29	im	neuronal, no neuronal
5/30	infusión epidural	neuronal
5/31	im	neuronal

Estudio del caso 9

ReRo 1.3.4./008/151005/β, un sujeto de veintisiete años de edad que sufrió de cuadriplejía traumática y ha tenido gran dificultad para hablar y

respirar, con cuello rígido. Las piernas del sujeto fueron paralizadas y el sujeto no tiene movimiento de los dedos y sin sensación en el resto del cuerpo.

El tratamiento mediante administración de una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica de la presente invención se inicio alrededor de dos años después de la lesión. El sujeto experimentó una mejora en el movimiento del cuello, facilidad al hablar y mejoría en el control del tono de voz. El sujeto encontró menos incómodo respirar y la función motora regresó con algo de movimiento de los dedos. Las piernas se volvieron menos espasticas y el sujeto fue capaz de sentarse sin ayuda. También se renovaron los movimientos del dedo del pie y el sujeto puede mover los hombros.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 40.

Tabla 40

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
5/26	dosis de prueba	no neuronal
5/27	im	neuronal
5/28	im	neuronal
5/29	im	neuronal
5/30	im	neuronal
5/31	im	neuronal
6/1	im	neuronal
6/8	im x 2	neuronal no neuronal
6/9	im	neuronal
6/10	im x 2	neuronal no neuronal
6/11	im x 2	neuronal no neuronal
6/12	im x 2	neuronal no neuronal
6/13	im x 2	neuronal no neuronal
6/14	intratecal	neuronal
6/15	im x 2	neuronal no neuronal
6/16	im x 2	neuronal no neuronal
6/17	im x 2	neuronal no neuronal
6/18	im	no neuronal
6/19	im x 2	neuronal no neuronal
6/20	im x 2	neuronal
6/21	im x 2	neuronal no neuronal
6/22	im x 2	neuronal
6/23	iv x 2	no neuronal
6/24	iv x 2	no neuronal
6/25	iv x 2	no neuronal

6/26	catéter epidural x 2	neuronal
6/27	catéter epidural x 2	neuronal
6/28	catéter epidural x 3	neuronal
7/21	im iv	neuronal no neuronal
7/22	im x 2	neuronal no neuronal
7/23	im x 2	neuronal
8/22	intratecal	neuronal

Estudio de caso 10

ReRo 1.3.4/009/300106/α, un sujeto de veinticinco años de edad tuvo un accidente automovilístico y perdió la capacidad de sentarse sin soporte, la columna fue propensa a doblarse, el sujeto perdió control de vejiga e intestino y el sujeto sufrió de una pérdida total de fuerza en las piernas.

El sujeto fue tratado mediante administración de una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica de la presente invención aproximadamente dos años después de la lesión. El sujeto mostró mejoría rápida y puede sentarse sin soporte. El sujeto no sufrió de vértigo, tiene movimiento en ambos pies, recuperó sensación en las puntas de los dedos y puede experimentar frío fluyendo a través de la espina.

Estudio de caso 11

ReRo 1.3.4./010/020206/β, un sujeto de veintiséis años con una SCI en D12-L1 como resultado de un accidente de

tráfico automovilístico fue incapaz de levantase con las rodillas siendo contraídas. El sujeto fue capaz de sentarse sin soporte y tuvo sensaciones normales en las extremidades. El sujeto no tiene control de vejiga o intestino y tuvo espasticidad incrementada.

El sujeto se trató aproximadamente doce años después de la lesión mediante administración de una composición farmacéutica que comprende células hES y sus derivados de acuerdo con la práctica de la presente invención. El sujeto experimentó recuperación admirable en función motora en pierna con espasticidad disminuida, exhibió una pierna derecha completamente estirable y un regreso de fuerza a la pierna izquierda. El sujeto recuperó la capacidad de levantarse y caminar con la ayuda de soporte ortopédico y una andadera. También regresaron al sujeto sensaciones de vejiga e intestino.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 41.

Tabla 41

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
3/27	dosis de prueba	no neuronal
3/29	im iv	no neuronal neuronal
3/30	im	neuronal
3/31	im	neuronal
4/1	im	neuronal
4/2	im	no neuronal
4/3	im	neuronal
4/4	im	neuronal
4/5	caudal	neuronal
4/7	epidural	neuronal
4/8	im	neuronal
4/10	im	neuronal
4/13	im	neuronal
4/14	im	neuronal
4/14	im	neuronal
4/16	im	neuronal
4/18	iv	no neuronal
4/22	im	neuronal
4/23	im	neuronal
4/24	catéter epidural	neuronal
4/25	catéter epidural	neuronal
4/26	iv	neuronal
4/27	im	neuronal
4/28	im	neuronal
4/29	im	neuronal
4/30	im	neuronal
5/1	im	neuronal
5/2	im	no neuronal
5/3	im	neuronal
5/4	im	neuronal
5/5	im	neuronal
5/7	im	neuronal
5/8	im	no neuronal
5/9	im	no neuronal
5/10	im	neuronal
5/11	caudal	neuronal
5/12	im	neuronal
5/13	im	neuronal
5/14	im	neuronal
5/16	im	no neuronal
5/17	im	neuronal

5/20	epidural	neuronal
5/21	im	neuronal
5/22	im	neuronal
5/23	im	neuronal
5/24	im	neuronal

Estudio de caso 12

El paciente fue un hombre de 26 años de edad con paraplejía después de una lesión entre D6-D8. Él sufrió de un accidente automovilístico traumático en septiembre de 2004. El fue completamente confinado a la cama sin sensibilidad debajo del pecho, sin control de vejiga o intestino y sin sensación o fuerza motora desde el pecho hacia abajo. Él tenía una úlcera de cama muy profunda en la espalda baja en la cual su hueso sacro podía ser observado.

El paciente inició células hES el 27 de abril de 2006. toda vez que la úlcera de cama el no podía someterse a cualquiera procedimiento O/T y fueron suministradas dosificaciones diarias de células intravenosa e intramuscularmente y eventualmente se le aplicaron directamente células hES a su úlcera de cama. También fue suministrado con infusiones intravenosas.

En su onceavo día de tratamiento el podía pararse con soporte ortopédico completo (cintura a

tobillo) y una caminadora y dio 2 pasos. Mientras el tiempo continuó su fuerza muscular incrementó y después de 4 meses él podía dar hasta 100 pasos y podía estar parado hasta por 20 minutos. Él es capaz de sentir sus piernas y moverlas también. También es capaz de sentir llenura de vejiga e intestino y es capaz de caminar ahora con solo un aparato ortopédico en la rodilla y la andadera para soporte. Su úlcera de cama ha sanado y él ha renovado sus estudios.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 42.

Tabla 42

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
4/28	im iv	neuronal (dosis de prueba)
4/29	iv im	neuronal no neuronal
4/30	iv im	neuronal no neuronal
5/1	iv im	neuronal no neuronal
5/2	iv im	neuronal no neuronal

5/3	infusión iv im	neuronal no neuronal
5/4	infusión iv im	neuronal no neuronal
5/5	iv im	neuronal no neuronal
5/6	iv im	neuronal no neuronal
5/8	infusión iv im	neuronal
5/9	infusión iv im	neuronal no neuronal
5/10	infusión iv im	neuronal no neuronal
5/11	iv im	neuronal
5/12	iv im	neuronal no neuronal
5/13	iv im	neuronal
5/14	iv im	neuronal no neuronal
5/15	infusión iv im	no neuronal
5/16	infusión iv im	no neuronal
5/17	iv im	neuronal no neuronal
5/18	iv im	neuronal no neuronal
5/19	iv im	neuronal no neuronal
5/20	iv im	neuronal no neuronal
5/21	iv im	neuronal no neuronal
5/22	infusión iv im	no neuronal
5/23	infusión iv im	no neuronal
5/24	iv im	neuronal no neuronal
5/25	iv im	neuronal no neuronal
5/26	iv im	neuronal no neuronal
5/27	iv im	neuronal no neuronal
5/28	iv	neuronal

	im	no neuronal
5/29	infusión iv im	neuronal no neuronal
5/30	infusión iv im	neuronal no neuronal
5/31	iv im	neuronal no neuronal
6/1	iv im	neuronal no neuronal
6/2	iv im	neuronal no neuronal
6/3	iv im	neuronal no neuronal
6/4	iv im	neuronal no neuronal
6/5	infusión iv im	neuronal no neuronal
6/6	infusión iv im	neuronal no neuronal
6/7	iv im	neuronal no neuronal
6/8	im iv	neuronal no neuronal
6/9	im iv	neuronal no neuronal
6/10	im iv	neuronal no neuronal
6/11	im iv	neuronal no neuronal
6/12	infusión iv	neuronal
6/13	infusión iv im	no neuronal
6/14	iv im	neuronal no neuronal
6/15	iv im	neuronal no neuronal
6/16	iv im	neuronal no neuronal
6/17	iv im	neuronal no neuronal
6/18	iv im	neuronal no neuronal
6/20	iv infusión iv im	neuronal
6/21	iv	neuronal no neuronal
6/22	iv im	no neuronal (2)

6/23	iv	no neuronal (2)
6/24	iv	no neuronal (2)
6/25	iv	no neuronal (2)
6/26	iv infusión iv	no neuronal
6/27	iv infusión iv im	no neuronal
6/28	iv im	neuronal
6/29	iv im	neuronal no neuronal x 2
6/30	iv im	neuronal no neuronal x 2
7/1	iv im	neuronal no neuronal x 2
7/2	iv im	neuronal no neuronal x 2
7/3	iv infusión iv im	neuronal no neuronal x 2
7/4	iv infusión iv im	neuronal no neuronal
7/5	iv im	neuronal x 2
7/6	iv im	neuronal x 2
7/7	iv im	neuronal
7/8	iv im	neuronal no neuronal x 2
7/9	iv im	neuronal no neuronal
7/11	iv infusión iv im	neuronal no neuronal
7/12	iv infusión iv	neuronal
7/17	im apósito	neuronal no neuronal
7/18	infusión iv apósito	no neuronal
7/19	infusión iv im	no neuronal
7/20	iv im apósito	neuronal no neuronal
7/21	iv	neuronal

	im apósito	no neuronal
7/22	iv im apósito	neuronal no neuronal
7/23	iv im	neuronal no neuronal
7/24	iv im	neuronal no neuronal
7/25	im apósito	neuronal no neuronal x 2
7/26	m apósito	neuronal no neuronal x 2
7/27	im	neuronal no neuronal
7/28	im apósito	no neuronal
7/29	im apósito	neuronal no neuronal
7/30	im	neuronal no neuronal
7/31	im apósito	no neuronal
8/1	im apósito	no neuronal x 2
8/2	im apósito	no neuronal x 2
8/3	im	no neuronal x 2
8/4	im	no neuronal x 2
8/5	im apósito	no neuronal x 2
8/6	im	no neuronal x 2
8/7	im apósito	no neuronal x 2
8/8	im	no neuronal x 2
8/9	im apósito	no neuronal x 2
8/10	im	no neuronal x 2
8/11	im	no neuronal x 2
8/12	im apósito	no neuronal x 2
8/13	im	no neuronal x 2
8/14	im apósito	no neuronal x 2
8/15	im apósito	no neuronal x 2
8/16	im	no neuronal x 2
8/17	im	no neuronal x 2
8/18	infusión iv	neuronal x 3

	im	
8/19	im apósito	neuronal x 3
12/5	im	no neuronal
12/6	infusión iv	no neuronal
12/7	infusión iv im apósito	no neuronal
12/8	epidural (intratecal)	neuronal
12/9	im apósito	no neuronal x 2
12/10	im apósito	no neuronal x 2
12/11	im apósito	no neuronal x 2
12/12	epidural (catéter)	neuronal x 2
12/13	epidural (catéter)	neuronal x 2
12/14	epidural (catéter)	neuronal x 2
12/15	infusión iv im	neuronal, no neuronal
12/16	infusión iv	neuronal, no neuronal

Estudio de caso 13

El paciente es un hombre de 22 años de edad quien sufrió un accidente cabalgando en junio de 2006 y está parapléjico en T-12 y L-1. Él no tiene fuerza abajo de la cintura, sin control de vejiga o intestino y sin sensación abajo de la cintura.

El paciente inició el tratamiento en septiembre de 2006 admitido durante 6 semanas. Él respondió a células hES y dentro de una semana él fue capaz de levantarse y caminar unos cuantos pasos con soporte ortopédico completo (cintura a tobillo) y andadera. Él ha progresado y está en el aparato

ortopédico en la rodilla con la cual él puede pararse durante hasta 30 minutos con una andadera. Él ahora tiene sensación completa y control de intestino y vejiga. Él también tiene buen equilibrio con el bastón y también las muletas. Él es capaz de subir y bajar escaleras con el soporte ortopédico y las muletas.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 43.

Tabla 43

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
10/4	im	no neuronal (dosis de prueba)
10/5	im	no neuronal
10/6	im	no neuronal
10/7	im	no neuronal
10/8	im	no neuronal

10/9	infusión iv	neuronal
10/10	infusión iv	neuronal
10/11	im	no neuronal
10/12	im	no neuronal
10/13	im	no neuronal
10/14	im	no neuronal
10/15	im	no neuronal
10/16	caudal	neuronal
10/17	im	no neuronal
10/18	im	no neuronal
10/19	infusión iv im	no neuronal
10/20	infusión iv im	no neuronal
10/21	im	no neuronal
10/22	im	no neuronal
10/23	lumbar	neuronal
10/27	im	no neuronal
10/25	im	no neuronal
10/26	im	no neuronal
10/27	im	no neuronal
10/28	im	no neuronal
10/29	im	no neuronal
10/30	catéter epidural	neuronal
10/31	catéter epidural	neuronal
11/1	catéter epidural	neuronal
11/2	im	no neuronal
11/3	im	no neuronal
11/4	im	no neuronal
11/5	im	no neuronal
11/6	im	no neuronal
11/7	im	no neuronal
11/8	im	no neuronal
11/9	caudal	neuronal
11/10	im	no neuronal
11/11	im	no neuronal
11/12	im	no neuronal
11/13	infusión iv im	mezclado no neuronal
11/14	im infusión iv	no neuronal
11/15	im	no neuronal
12/31	iv	mezclado
1/10	im	no neuronal
1/11	infusión iv	mezclado
1/12	infusión iv	mezclado
1/13	im	no neuronal
1/14	im	no neuronal
1/15	caudal	neuronal

1/16	im	no neuronal
1/17	im	no neuronal
1/18	im	no neuronal
1/19	lumbar	neuronal
1/20	im	no neuronal mezclado
1/21	im	mezclado
1/22	im	mezclado
1/23	catéter epidural	neuronal
1/24	im iv	neuronal
1/25	im	neuronal
1/26	infusión im	mezclado neuronal
1/27	infusión im	mezclado neuronal

Estudio de caso 14

El paciente es una mujer de 26 años de edad con parapléjia traumática en T-12 y L-1 quien sufrió de un accidente de tráfico automovilístico en septiembre de 2004. Ella no tiene sensibilidad abajo del pecho y no tiene control de vejiga o intestino. No existió fuerza motora en alguna de las piernas y ella fue confinada a silla de ruedas.

El paciente inició células hES en marzo de 2006. Ella fue capaz de pararse y caminar unos pocos pasos con soporte ortopédico completo (cintura a tobillo) y andadera después de 9 días y continuó progresando. Su estado actual es que ella puede caminar continuamente con soporte ortopédico y

andadera y también se puede levantar usando el aparato ortopédico en la rodilla. Se han recuperado las sensaciones de intestino y vejiga con control y sin el uso de alguna cateterización o supositorio. La sensación ha mejorado para los niveles de tobillo.

El programa de inyecciones para este paciente se muestra en la tabla 44.

Tabla 44

Fecha	Ruta de administración	Tipos de células
3/27	im	no neuronal (dosis de prueba)
3/29	iv im	neuronal no neuronal
3/30	im	neuronal
3/31	im	neuronal
4/1	im	neuronal
4/3	im	neuronal
4/4	im	neuronal

4/5	Epidural (caudal)	neuronal x 2
4/7	epidural (intratecal)	neuronal x 2
4/9	im	neuronal
4/10	im	neuronal
4/12	im	neuronal
4/13	im	neuronal
4/14	im	neuronal
4/15	im	neuronal
4/16	im	neuronal
4/17	im	neuronal
4/18	iv	no neuronal
4/20	im	neuronal
4/21	im	neuronal
4/22	im	neuronal
4/24	Epidural (catéter)	neuronal x 4
4/25	Epidural (catéter)	neuronal x 4
4/26	iv (catéter)	neuronal x 4
4/27	im	neuronal
4/28	im	neuronal
4/29	im	neuronal
4/30	im	neuronal
5/1	im	neuronal
5/2	im	no neuronal
5/3	im	neuronal
5/4	im	neuronal
5/5	im	neuronal
5/7	im	neuronal
5/8	im	no neuronal
5/10	im	neuronal
5/11	EPI (caudal)	neuronal
5/13	IM	neuronal
5/14	IM	neuronal
5/16	IM	no neuronal
5/17	IM	neuronal
5/18	EPI (catéter)	neuronal x 2
5/19	EPI (catéter)	neuronal x 2
5/20	EPI (catéter)	neuronal x 2
5/21	im	neuronal
5/22	im	neuronal
5/23	im	neuronal
5/24	im	neuronal
5/25	im	neuronal
10/25	im	no neuronal mezclado
10/26	im infusión iv	no neuronal mezclado
10/27	im	no neuronal
10/28	im	no neuronal

10/29	im	no neuronal
10/30	caudal	neuronal
10/31	im	non neuronal
11/1	im	no neuronal x 2
11/2	im	no neuronal x 2
11/3	lumbar	neuronal
11/4	infusión	neuronal
11/5	im	no neuronal x 2
11/6	im	no neuronal x 2
11/7	im	no neuronal x 2
11/8	catéter epidural	neuronal
11/9	catéter epidural	neuronal
11/10	catéter epidural	neuronal
11/11	im	no neuronal x 2
11/12	im infusión	no neuronal mezclado
11/13	caudal infusión	neuronal mezclado
11/14	im	neuronal

Metodología de cultivo de célula madre embriónica humana

Las células hES usadas como material de partida para las líneas de células desarrolladas durante la presente invención se derivan a partir de un embrión de 2 a 7 días de edad antes de su implantación en el útero, por ejemplo, un embrión de 2 a 4 días de edad, por ejemplo, un embrión de 3 días de edad.

Para aislamiento embrional, el óvulo fue recolectado con consentimiento de donadores humanos quienes se someten a ciclo IVF regular. El ovario se fertiliza mediante el esperma y se cultiva mediante métodos convencionales para obtener embriones. Los embriones extra son incubados durante periodos variables para desarrollo de la línea celular.

El embrión se suspende en una pequeña cantidad de

medio esencial mínimo (por ejemplo, RPMI, por ejemplo, RPMI 1640 con 2.2 g/L de bicarbonato de sodio) y las células hES son aisladas del embrión mediante medios mecánicos (por ejemplo, agitación). Se añade medio adicional a las células aisladas junto con una progestina y un agonista βhCG. En una modalidad, se añaden progesterona (16-64 µl de 250 mg/ml) y βhCG (16-64 µl de 5000 iu/ml). Las células aisladas son cultivadas durante 12-45 horas, por ejemplo, 24 horas a una temperatura de entre 34-38°C, en un ambiente de 3.5-6% de dióxido de carbono.

En una modalidad, las células hES son cultivadas bajo condiciones anaeróbicas o sustancialmente anaeróbicas para expandir las células mientras se previene diferenciación. "Sustancialmente anaeróbica" se define como menos de aproximadamente 10% de O_2, por ejemplo, menos de 8%, 6%, 4%, 2% o 1 % de O_2. Se pueden crear condiciones bajas de oxígeno usando incubadores de célula de gas múltiple (CO_2, O_2, N_2) en los cuales el nivel de oxígeno se puede ajustar entre 0% y 20% al reemplazar el aire ambiental con gas nitrógeno. Ejemplos de incubadores de gas múltiple incluyen Fisher serie 11-730, el Napco serie 7000, el Sanyo serie MCO, el Jouan IG750 y el Heraeus Heracell 1150. En otra modalidad, las células se cultivan en un incubador de CO_2 y el nivel de oxígeno se controla por la forma y posición del matraz en el cual están contenidas las células. Por ejemplo, cuando un matraz de cultivo celular se mantiene en una posición

vertical, mucho del medio de cultivo en el matraz es sustancialmente anaeróbico. En contraste, cuando el matraz de cultivo celular se mantiene en una posición horizontal, el medio de cultivo es sustancialmente aeróbico. El nivel de oxígeno en el medio de cultivo se puede variar entre sustancialmente anaeróbico y sustancialmente aeróbico al alterar la forma y/o posición del matraz de cultivo celular dentro del incubador o la cantidad de medio en el matraz (por ejemplo, la cantidad de vacío).

Durante la etapa de expansión, los matraces pueden ser mantenidos en una posición vertical en lugar de horizontal. En una modalidad, se lleva cabo la incubación en un recipiente de cultivo en donde el volumen es casi completamente ocupado por el medio y el recipiente se mantiene en una posición vertical. Como consecuencia, una proporción sustancial de las células no se adhiere a las paredes del matraz de cultivo y el medio de cultivo es sustancialmente anaeróbico.

Bajo tales condiciones de cultivo, los ciclos de duplicación de célula o reproducción están en su máximo y los procesos de diferenciación celular son sustancialmente inhibidos. Los ciclos de replicación de células durante expansión proceden durante 12-48 horas, por ejemplo, 24 horas.

Para subcultivo o recultivo de las células hES, la suspensión celular se centrifuga, la pella celular se resuspende en una cantidad pequeña de medio de cultivo fresco

que comprende progesterona y βhCG, las células se alícuotan y se añade medio fresco adicional sin progesterona y βhCG. En una modalidad, la relación de la alícuota de células madre incubadas al medio celular fresco es de aproximadamente 1:3.5 volumen/volumen. Las células se vuelven a incubar a 34-38°C en incubador cubierto con agua complementado con una atmosfera de 3.5-6& de dióxido de carbono bajo condiciones sustancialmente anaeróbicas durante 12 a 48 horas, por ejemplo, 24 horas. En este punto, las células se pueden subcultivar para expansión continua o almacenar para uso futuro.

Las células hES cultivadas bajo esas condiciones permanecen en una forma grandemente indiferenciada como se determina por actividad alcalin fosfatasa y la ausencia de cualquier característica marcadora de especialización o diferenciación celular. Sin embargo, debe notarse que no se obtiene población celular la cual es completamente diferenciada o completamente indiferenciada. La población celular es una mezcla de líneas celulares diferenciadas e indiferenciadas, con una relación que varía de apróximadamente 4:1 a alrededor de 10:1 de células indiferenciadas a diferenciadas.

Para almacenamiento de las células hES expandidas, por ejemplo, en un congelador profundo o en nitrógeno liquido, un agente de crioconservación, incluyendo pero no limitado a 0.2-2% (p/v) de sulfóxido de dimetilo (DMSO), se

puede añadir al medio de cultivo. El nivel de DMSO usado es menor que el típicamente usado para crioconservación (2-84 µl/0.5 ml tubo) para evitar inducir diferenciación o daño a las células. La relación de la cantidad de agente de crioconservación a aquella del medio de cultivo que contiene células madre puede variar de alrededor de 1:500 a aproximadamente 16:1000. Otros agentes de crioconservación incluyen sin limitación glicerol, propanodiol, butanodiol, etanol, glucosa, D-glucosa, sucrosa, trehalosa, manitol, paparavina, formamida, probuchol, curcumina, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, sulfato de condroitina, sulfóxido de glucosaminoglucan dimetilo, glutamina y piruvato de sodio. La temperatura de congelamiento para la suspensión celular puede ser variada de aproximadamente -15 a alrededor de -80°C, por ejemplo, aproximadamente -15 a alrededor de -40°C. En contraste con otras técnicas para el almacenamiento de células madre embrionarias humanas, no existe necesidad de congelamiento instantáneo o almacenamiento en "pajillas". Después de almacenar, las células pueden prepararse para expansión continua o para diferenciación al recolectar las células mediante centrifugación y resuspendiendo la pella celular en medio fresco.

La diferenciación parcial de las células hES expandidas (por ejemplo, depuse de expansión de células frescamente aisladas o almacenamiento de células expandidas

previamente) se lleva a cabo al sedimentar la suspensión celular en una centrífuga (por ejemplo, a entre 70—1400 rpm durante 5-12 minutos), removiendo y desechando el sobrenadante, y resuspendiendo las células en una pequeña cantidad de medio fresco (por ejemplo, RPMI) que contiene un agonista de progestina y βhCG. Las células son entonces alicuotadas y se añade medio de cultivo adicional (por ejemplo, un medio de esencia mínima tal como RPMI o DMEM, por ejemplo, DMEM libre de ácido glutámico IX o DMEM con 4.5 g/L de glucosa y 3.7 g/L de bicarbonato de sodio) sin progestina o βhCG. Las células se cultivan bajo condiciones sustancialmente aeróbicas (por ejemplo, en un matraz en una posición horizontal) durante 12 a 48 horas, por ejemplo, 24 horas. "Sustancialmente aeróbico" se define como al menos aproximadamente 15% de O_2, por ejemplo, por lo menos 18% o 20% de O_2. Bajo condiciones sustancialmente aeróbicas las células hES comenzaran a diferenciarse. La trayectoria de diferenciación para las células hES es dependiente del medio de cultivo usado durante la etapa de diferenciación. Para producir células progenitoras neuronales, las células hES se cultivan en DMEM o su equivalente. Para producir células progenitoras diferentes de progenitoras neuronales, las células hES se cultivan en RPMI o su equivalente. Después de 12-18 horas de ciclo de replicación, las células se pueden recolectar y resuspender en medio fresco para continuar la

diferenciación. En general, la etapa de diferenciación no debe durar más de 48-72 horas ya que diferenciación adicional más allá de este tiempo produce células que no son adecuadas para transplante usando los métodos de la presente invención.

Una vez que las células están parcialmente diferenciadas, la células pueden ya sea ser almacenadas para uso futuro al añadir un crioconservador y almacenando las células a -15 a aproximadamente -80°C como se describió arriba o preparando las células para uso en los métodos de la invención. Para preparar las células para uso, las células se alicuotan, se añade medio fresco (por ejemplo, DMEM o RPMI según sea adecuado) y las células se cultivan durante 12-48 horas, por ejemplo, 24 horas, bajo condiciones sustancialmente anaeróbicas para prevenir diferenciación adicional. Las células son entonces alicuotadas en medio fresco para expansión continua o recolectadas por centrifugación y resuspendidas en una solución biocompatible (por ejemplo, solución salina) en preparación para transplante. En este punto, las células pueden ser transplantadas en paciente o almacenadas a +4°C a -80°C para transplante futuro. El almacenamiento puede ser en un contenedor adecuado incluyendo pero no limitados a tubos de prueba, recipientes, jeringas, etc., que pueden facilitar transportación o uso clínico. En una modalidad, las células resuspendidas en solución biocompatible son almacenadas en una forma lista para usarse

(por ejemplo, en una jeringa prellenada). Cuando se necesita, alícuotas de células son descongeladas naturalmente sin la necesidad de baños de agua o incubadoras.

Bajo las condiciones de almacenamiento descritas en una solución biocompatible, se observa la viabilidad celular de >40% después de volver a descongelar aún después de seis meses de almacenamiento, sin alteraciones fenotípicas o genotípicas (inestabilidad genética) detectables tales como aneuploidia o heteroploidia.

En cada etapa de expansión, diferenciación y almacenamiento, una alícuota de las células se prueba para viabilidad mediante exclusión de azul tripano y examen microscópico. Una alícuota del cultivo celular también se prueba para contaminación microbiológica. Una alícuota adicional de la suspensión celular también se coloca en un hemocitómetro y se examina microscópicamente para determinar la densidad celular. Una alícuota más también se toma para probar la actividad fosfatasa alcalina como un marcador para el estado de diferenciación del cultivo celular.

Durante el almacenamiento, las células se pueden probar una vez al mes para su cariotipo, para probar su inestabilidad genética que surge como resultado de la metodología de cultivo.

Ejemplos

Ejemplo 1

Para aislamiento embrionario, se recolectaron ovarios con consentimiento de un donador humano quien fue sometido a ciclo IVF regular, lo cual produjo 8 folículos. El ovario fue fertilizado mediante esperma y cultivado por métodos convencionales para obtener embriones. Tres de los embriones fueron transplantados en el donador. Los embriones extra fueron incubados durante periodos variables para desarrollo de una línea celular.

El embrión, ya sea intacto o en condición rota, se suspendió en medio de cultivo. Además, se añadieron 84 µl de progesterona (250 mg/ml) y 84 µl de βhCG (500 iu/ml). El medio con las células embrionarias se probó para cualquier contaminación, y cualquier embrión infectado se descartó. Las células de los embriones en esta forma se usaron para expansión y almacenamiento.

Después de un día de incubación, se introdujo 1 ml del medio que contenía la célula embrionaria en un medio de cultivo celular de 40 ml (DMEM o RPMI) en un contenedor de 50 ml junto con progesterona y βhCG. El medio de cultivo junto con las células madre fue incubado en una posición horizontal a temperatura ambiente en un ambiente que contenía dióxido de carbono. La tabla 45 muestra algunas de las condiciones experimentales seguidas por este método.

Tabla 45

S.No.	(a) Etapa Embrional en días	(b) Estado Embrional	(c) Medio Celular	(d) Cantidad de (c)	(e) Adición a Medio	(f) Tiempo de incubación	(g) alícuota de (f)	(h) Medio Celular	(i) Cantidad de (h)	(j) Volumen de contenedor	(k) Temp de incubación grados C	(l) % de CO_2 en ambiente
1	2	Intacto	IVF media	2.5ml	FF	24 hrs	-	-	-	-	36	4
2	2	Intacto	IVF media	2.5ml	A	24 hrs	-	-	-	-	36.5	4.5
3	3	Roto	RPM!	2.5ml	A	24 hrs	0.5ml	RPM'	45 ml	50 ml	37	5
4	3	Roto	RPM!	2.5ml	A& B	24 hrs	1.0ml	RPMI	46 ml	50 ml	38	5
5	3	Roto	DMEM	2.5ml	B	24 hrs	0.5m!	DMEM	35 ml	50 ml	37	5

231

Tabla 46

S.No.	(a) Cantidad de cultivo ESC	(b) Medio celular	(c) Cantidad de (b)	(d) Adición a Medio	(e) Volumen de contenedor	(f) Temperatura de incubación	(g) % de CO_2 en ambiente	(h) Tiempo de incubación	(i) Alícuota de (h)	(j) Medio de cultivo	(k) Volumen de contenedor	(l) Temp Almac.
1	0.5 ml	RPMI	35 ml	A	50 ml	36.5	5	24	0.5ml	RPMI	0.5 ml	-72
2	1,0 ml	RPMI	38 ml	B	50 ml	37	5	24	.25 ml	RPMI	0.5 ml	-20
3	1.5 ml	DMEM	45 ml	AB	50 ml	37	5	48	1.0 ml	DMEM	1.5 ml	-20
4	2.0 ml	RPM!	46 ml	A	50 ml	37.2	5	48	1.5 ml	RPMI	1.5 ml	-18
5	2.5 ml	DMEM	45 ml	A	50 ml	36.8	5	24	0.5 ml	DMEM	1.5 ml	-72

FF = fluido follicular aspirado junto con el óvulo durante el ciclo IVF, 16-84 µl
A = progesterona; B = βhCG

Después de 24 horas de incubación, números iguales de células nucleadas (parcialmente diferenciadas) y células en blanco (indiferenciadas) se observaron. Alícuotas de aproximadamente 0.5 ml se tomaron para almacenamiento en esta etapa. Después de 48 horas de incubación, células de forma oblonga con algunas cepas fueron observadas con medio DMEM. Sin embargo, cuando se usó medio RPMI, se observaron muchas células nucleadas con formas variadas. El volumen del contendor se encontró que era lleno hasta la marca de 37 ml después de 48 horas de incubación. Las alícuotas de 0.5 ml fueron tomadas para almacenamiento en esta etapa. Después de 72 horas de incubación en DMEM, cepas largas de células entrelazadas tipo tejido nervioso fueron observadas. El medio de incubación RPMI produjo células un poco más pequeñas y unas pocas células acumuladas alrededor de una célula central. Alícuotas de 0.5 ml fueron tomadas para almacenamiento en esta etapa.

Una alícuota del cultivo de células embrionarias en cultivo que contenía medio fue introducida en más medio celular (RPMI o DMEM) con otros componentes de prueba, en un contenedor estéril (matraz estéril Tarsons). Las células madre se incubaron a temperatura ambiente en un ambiente de dióxido de carbono en posición horizontal durante varios periodos de tiempo que variaron de 18 horas a 5 días. Después de 24 horas de incubación, se volvieron a introducir

alícuotas de aproximadamente 0.5 ml en más medio de cultivo y se volvieron a incubar. Se tomaron alícuotas para preparar composiciones listas para usarse así como para almacenamiento después de diferentes etapas de incubación. La tabla 46 ilustra algunas condiciones experimentales seguidas por expansión de células hES.

Ejemplo 2

El embrión, ya sea intacto o en condición rota, se suspendió en medio de cultivo. Además, se añadieron 84 µl de progesterona y 84 µl de βhCG. El medio con las células embrionarias se probó para cualquier contaminación, y cualquier embrión infectado se descartó. Las células de los embriones en esta forma se usaron para expansión y almacenamiento.

Después de un día de incubación, se introdujo 1 ml del medio que contenía célula embrionaria en un medio de cultivo celular de 46 ml (DMEM o RPMI) en un contenedor de 50 ml junto con progesterona y βhCG. Las células madre fueron incubadas en una posición vertical a temperatura ambiente en un ambiente que contenía dióxido de carbono. La tabla 47 muestra algunas de las variables de ejemplo de trabajo usadas en este experimento.

Tabla 47

S.No.	(a) Etapa embrional en días	(b) Estado Embrional	(c) Medio Celular	(d) Cantidad de (c)	(e) Adición a Medio	(f) Tiempo de incubación	(g) alícuota de (f)	(h) Medio Celular	(i) Cantidad de (h)	(j) Volumen de contenedor	(k) Temp de incubación grados C	(l) % de CO_2 en ambiente
1	2	Intacto	IVF media	2.5ml	FF	24 hrs	-	-	-	-	36	4
2	2	Intacto	IVF media	2.5ml	A	24 hrs	-	-	-	-	36.5	4.5
3	3	Roto	RPMI	2.5ml	A	24 hrs	0.5ml	RPM'	45 ml	50 ml	37	5
4	3	Roto	RPMI	2.5ml	B	24 hrs	1.0ml	RPMI	46 ml	50 ml	38	5
5	3	Roto	DMEM	2.5ml	A& B	24 hrs	0.5ml	DMEM	35 ml	50 ml	37	5

Tabla 48

S.No.	(a) Cantidad de cultivo ESC	(b) Medio celular	(c) Cantidad de (b)	(d) Adición a Medio	(e) Volumen de contenedor	(f) Temperatura de incubación	(g) % de CO_2 en ambiente	(h) Tiempo de incubación	(i) Alícuota de (h)	(j) Medio de cultivo	(k) Volumen de contenedor	(l) Temp Almac.
1	0.5 ml	RPMI	35 ml	A	50 ml	36.5	5	24	0.5ml	RPMI	0.5 ml	-40
2	1.0 ml	RPMI	38 ml	A	50 ml	37	5	24	.25 ml	RPMI	0.5 ml	-20
3	1.5 ml	DMEM	45 ml	B	50 ml	37	5	48	1.0 ml	DMEM	1.5 ml	-18
4	2.0 ml	RPMI	46 ml	A	50 ml	37.2	5	48	1.5 ml	RPMI	1.5 ml	-20
5	2.5 ml	DMEM	45 ml	AB	50 ml	36.8	5	24	0.5 ml	DMEM	1.5 ml	-72

234

Después de 24 horas de incubación, se observaron en una relación de aproximadamente 1:4 células nucleadas (parcialmente diferenciadas) y células en blanco (indiferenciadas). Después de 48 horas de incubación, se observaron en una relación de aproximadamente 1:2 células nucleadas y células en blanco. Alícuotas de aproximadamente 0.5 ml se tomaron para almacenamiento en la etapa de 24 horas y 48 horas.

0.5 ml del cultivo de células embrionarias en cultivo que contenía medio fue introducida en 46 ml de medio celular (RPMI o DMEM) con otros componentes de prueba, en un contenedor estéril de 50 ml (matraz estéril Tarsons). Las células madre se incubaron en una posición horizontal a temperatura ambiente en un ambiente que contenía dióxido de carbono. Después de 24 horas de incubación, se volvieron a introducir alícuotas de aproximadamente 0.5 ml en 46 ml de medio de cultivo y se volvieron a incubar. La tabla 48 ilustra algunas condiciones experimentales seguidas por expansión de células hES.

Se tomaron alícuotas para preparar composiciones listas para usarse así como para almacenamiento después de la etapa de incubación por 24 horas.

Ejemplo 3

Almacenamiento

Para almacenamiento, se tomaron células hES en un tubo de almacenamiento de 0.5 ml y se añadió un agente de crioconservación tal como DMSO al 0.2% en una cantidad de 16 µl y depuse de agitar cuidadosamente fueron almacenadas a -20°C. Las células fueron descongeladas naturalmente para hacer composiciones listas para usarse o para expansión adicional. La viabilidad de las células descongeladas se probó y 64% a 84% de las células se encontró que eran viables. Las células almacenadas se evaluaron para contaminación así como viabilidad después de intervalos regulares. La tabla 49 muestra los parámetros reales seguidos por almacenamiento en cinco experimentos diferentes así como la viabilidad de las células después de descongelar.

Tabla 49

No. S	Cantidad de suspensión celular	Cantidad de DMSO	% de DMSO	Medio usado	Viabilidad de células descongeladas
1	0.5ml	16µl	0.2	NaCl	74%
2	0.5ml	32µl	1.4	NaCl	66%
3	0.5ml	64µl	0.4	NaCl	70%
4	0.5ml	48µl	0.2	NaCl	78%
5	0.5ml	16µl	0.2	NaCl	88%

Ejemplo 4

Varias pruebas se llevaron a cabo para verificar cualquier contaminación o infección o anormalidad en las

células embrionarias en varios intervalos de las etapas de expansión y almacenamiento y para identificar los derivados de hES que estuvieron presentes en cada cultivo. Las diferentes pruebas incluyen aquellas para vih, HbSAg (para hepatitis), PCR convencional para prueba de Kochs (para tuberculosis), análisis cromosómico por método CG de agrupamiento de giemsa, bilirrubina mediante el método de Jendrasiik y Grof y albúmina usando método de unión de tincion BCG (para células progenitoras de hígado), insulina vía método CLIA (para células progenitoras neuronales), prueba CD34 mediante método inmunohistoquímico (para células progenitoras hematopoyéticas), alcalin fosfatasa mediante método PNPP (para células indiferenciadas), pruebas de histopatología (para identificación de célula mediante morfología), etc.. La condición de cultivo fue probada mediante el método de placa de cultivo manual y sensibilidad manual e identificación con versatrek/AP1 se llevó a cabo para infección fúngica. Todas las pruebas se llevaron a cabo y el conteo celular y viabilidad de las células se verificó en cada etapa. La tabla 50 proporciona los resultados de algunas de las pruebas.

Ejemplo 5

Preparación de células hES para transplante

15 ml de suspensión de célula madre fue tomado y centrifugado a 1000 r.p.m. durante 7 minutos. El supernadante se descartó. Se añadieron 2 a 15 ml de solución salina a la pella y las células madre de esta manera se suspendieron. La suspensión fue verificada para contaminación microbiana. También se hizo una prueba de viabilidad.

Ejemplo 6

Almacenamiento de células hES en forma lista para usarse

Contenedores (jeringas, tubos de prueba, matraz, recipiente) se llenaron con la suspensión de células hES transplantables fueron etiquetadas y almacenadas a -20°C. La cadena fría fue mantenida hasta la etapa de transplante. La suspensión se descongeló naturalmente inmediatamente antes del transplante.

TABLA 50

Código de Lote	Bilirrubina	VIH	HbSAg	Fos Alq	PCR	Albúmina	Insulina S	Neurófilo	Histo	Conteo celular (en millones)	% de Viabilidad	Estado de cultivo
B77	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.86	72	Estéril
B78	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.18	70	Estéril
B79	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.92	70	Estéril
B80	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.96	68	Estéril
L56	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.12	72	Estéril
L57	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.84	72	Estéril
B81	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.16	70	Estéril
B82	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.72	68	Estéril
B83	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.68	74	Estéril
B84	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.72	72	Estéril
B85	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.86	76	Estéril
B86	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.92	78	Estéril
L58	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.86	82	Estéril
L59	1.27	-ve	-ve	97	-ve	1.9	13.2	-	-	3.12	70	Estéril
B87	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.16	72	Estéril
B88	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.84	70	Estéril
L1/V 1	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.68	78	Estéril
L1/V 2	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.72	74	Estéril
B89	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.68	72	Estéril
B90	0.05	-ve	-ve	14	-ve	0.15	-	-	-	3.76	70	Estéril
B91	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.64	68	Estéril
B92	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.72	72	Estéril
B93	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.74	70	Estéril
B94	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.92	72	Estéril
B95	-	-ve	-ve	-	-ve	-	-	-	-	3.86	70	Estéril

-ve = resultado de prueba negativo

- = no hecho

Líneas celulares

Se repitieron subcultivos más de 100 veces para establecer células hES de la presente invención. Además, los subcultivos fueron evaluados para cualquier contaminación/infección en cada etapa de expansión o almacenamiento adicional. Las líneas de células hES se encontró que eran estables y sin alguna anormalidad durante más de cinco años de ciclos de subcultivo.

La presente invención no se debe limitar en alcance por las modalidades y ejemplos específicos, los cuales son diseñados como ilustraciones de un número de aspectos de la invención y cualesquiera modalidades las cuales son equivalentes funcionalmente están dentro del alcance de esta invención. Aquellos expertos en la técnica conocerán, o serán capaces de constatar el uso de no más experimentación de rutina, muchos equivalentes a las modalidades específicas de la invención descritas en la presente. Estos y todos los otros equivalentes son diseñados para ser abarcados por las siguientes reivindicaciones. Todas las patentes, solicitudes de patentes y publicaciones citadas en la presente, se incorporan en su totalidad a manera de referencia.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades, trastornos o condiciones, caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de células madre embrionarias humanas (hES) y/o sus derivados, en donde las células hES y/o sus derivados están libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana o factor Steel soluble o medios acondicionados, en donde las células hES y/o sus derivados son suspendidas en una solución biocompatible farmacéuticamente aceptable.

2. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque está en una forma lista para usar.

3. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque la forma lista para usar es una jeringa prellenada.

4. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque las células madre tienen suficiente viabilidad para ser terapéuticamente efectivas.

5. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque la viabilidad de

las células madre es de más de 40%.

6. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la solución biocompatible es salina.

7. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la solución biocompatible comprende además un agente antimicrobiano, agente antibacteriano u otro agente farmacéutico.

8. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de progenitores de células madre hematopoyéticas.

9. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de progenitores de células madre neuronales.

10. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de progenitores de células madre hematopoyéticas y progenitores de células madre neuronales.

11. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de progenitores de células madre mesenquimáticas.

12. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de progenitores de células madre productoras de insulina.

13. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de progenitores de células madre hepatocíticas.

14. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de progenitores de células madre cardiacas.

15. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de progenitores de células madre epiteliales.

16. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada porque la cantidad terapéuticamente efectiva de los progenitores de células madre hematopoyéticas en la composición es de alrededor de 750,000 a alrededor de 160 millones de células.

17. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque la cantidad terapéuticamente efectiva de células madre neuronales en la composición es de alrededor de 750,000 a alrededor de 160

millones de células.

18. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados es de alrededor de 750,000 a alrededor de 160 millones de células en alrededor de 0.25 ml a alrededor de 100 ml de la solución biocompatible.

19. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados es 750,000 a alrededor de 80 millones de células en alrededor de 0.25 ml a alrededor de 10 ml de la solución biocompatible.

20. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque las enfermedades, trastornos o condiciones se seleccionan del grupo que consiste en cáncer, apoplejía, trastornos genéticos, trastornos hepáticos, trastornos de desarrollo, trastornos degenerativos, trastornos hereditarios o trastornos traumáticos del sistema nervioso, trastornos vasculares, enfermedades y trastornos de la piel, trastornos autoinmunes, trastornos oculares, trastornos renales, trastornos cardiacos, trastornos musculoesqueléticos, trastornos reproductivos y de fertilidad, y artritis y trastornos hemáticos.

21. La composición farmacéutica de conformidad con

la reivindicación 1, caracterizada porque las enfermedades, trastornos o condiciones se seleccionan del grupo que consiste en Leucemia Mieloide Aguda, Adenocarcinoma, Artritis, Astrocitoma, Atrofia del Nervio Auditivo, Autismo, Trastornos Autoinmunes, enfermedad de Alzheimer, Espondilitis Anquilosante, Distrofia Muscular de Becker, Daño Cerebral, Quemaduras, Accidente Cerebrovascular, Parálisis Cerebral, Coma, Ulceras Corneales, Rechazo de Injerto Corneal, Degeneración Cortico-Basal del Sistema Nervioso, Enfermedad de Arterias Coronarias, Diabetes, Demencia, Síndrome de Down, Distrofia Muscular de Duchenne, Enfermedad Renal en Etapa Terminal, Parálisis de Erb, Distrofia Muscular Fascio Escapular, Trastornos de Fertilidad, Ataxia de Friederich, Insuficiencia Cardiaca, Carcinoma Hepatocelular, Enfermedad de Neuronas Espino Motoras Hereditaria, Corea de Huntington, Enfermedad de Krabbe, Distrofia del Cíngulo de las Extremidades, Cirrosis Hepática, Degeneración Macular, Retraso Mental, Esclerosis Múltiple, Enfermedad de Neuronas Motoras, Infarto del Miocardio, Síndrome Nefrótico, Enfermedad de Niemann Pick, Ulceración No Sanadora de la Piel, Atrofia Olivo-Ponto Cerebelar, Atrofia del Nervio Óptico, Mal de Parkinson, Encefalopatía Post Choque Eléctrico, Encefalopatía Post-Vacuna Contra la Rabia, Llagas por Presión, Parálisis Supranuclear Progresiva, Psoriasis, Ptisis Bulbi, Cardiomiopatía Restrictiva, Retinitis

Pigmentosa, Bloque de Ramificación del Fascículo Derecho, Sarcoidosis, Bradicardia del Seno, Tumor de la Médula Espinal, Distrofia Muscular Espinal, Ataxia Espino Cerebelar, Síndrome de Steven Johnson, Lupus Eritematoso Sistémico, Trombocitopenia, Talasemia, Colitis Ulcerativa, Estado Vegetativo, Fibrosis Quística, Enfermedad Pulmonar Intersticial, Azoospermia, Insuficiencia Ovárica Primaria, Ulceras Aftosas, Desequilibrio Hormonal, Osteo-Artritis, Síndrome de Horner y Osteogénica Imperfecta, Canalopatía e Hipogamaglobulinemia.

22. Una composición de materia caracterizada porque comprende células hES y/o sus derivados, las células hES y/o sus derivados están libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana y/o factor Steel soluble o medios acondicionados, que se obtienen al atrapar las células hES y/o sus derivados en una estructura o matriz biocompatible y selectivamente permeable.

23. La composición de materia de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque las células hES y/o sus derivados comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas.

24. La composición de materia de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque las células hES y/o sus derivados comprenden progenitores de células madre neuronales.

25. La composición de materia de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque las células hES y/o sus derivados comprenden una combinación de células madre hematopoyéticas y progenitores de células madre neuronales.

26. La composición de materia de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque la estructura o matriz biocompatible y selectivamente permeable se selecciona del grupo que consiste en biopolímeros, polipéptidos, proteínas, polisacáridos, fibronectina, colágeno, laminina, queratina, fibrina, fibrinógeno, ácido hialurónico, sulfato de heparina, sulfato de condroitina, agarosa y gelatina.

27. La composición de materia de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque las células hES y/o sus derivados son atrapados en una mezcla de agarosa y colágeno o en una mezcla de agarosa y gelatina.

28. Un método para aislar células hES, caracterizado porque comprende:

(a) colectar un embrión de 2 a 7 días de edad en un medio que consista en medio esencial mínimo,

(b) aislar células hES del embrión por medios mecánicos.

29. El método de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el embrión es un embrión de 2 días de edad.

30. El método de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque los medios mecánicos son agitación.

31. Un método para expandir células hES libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, caracterizado porque comprende las etapas de:

(a) introducir células hES en un medio de cultivo de células que consiste en medio esencial mínimo, una progestina y un agonista de gonadotropina coriónica β (βhCG) humana, e

(b) incubar las células madre a una temperatura de aproximadamente 34°C a alrededor de 38°C en un ambiente de alrededor de 3.5% a aproximadamente 6% de dióxido de carbono durante aproximadamente 12 horas a alrededor de 48 horas.

32. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el medio de cultivo de células es RPMI.

33. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque comprende además:

(c) tomar una alícuota de células madre incubadas de la etapa (b), en donde la alícuota contiene al menos una célula madre,

(d) resuspender las células en medio de cultivo de células junto con progesterona y βhCG a la alícuota,

(e) diluir las células en medio de cultivo de células sin progestina y agonista de βhCG, e

(f) incubar las células a una temperatura de alrededor de 34°C a aproximadamente 38°C en un ambiente de alrededor de 3.5% a aproximadamente 6% de dióxido de carbono durante alrededor de 12 horas a aproximadamente 48 horas.

34. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo en una incubadora de cultivo de células con camisa de agua.

35. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque

las células madre en medio de cultivo se incuban en un recipiente biocompatible bajo condiciones sustancialmente anaeróbicas.

36. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque las células madre no se diferencian después de la proliferación.

37. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque las células hES usadas se aíslan de un embrión de 3 días de edad mediante medios mecánicos.

38. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque comprende además la etapa de probar las células madre expandidas para cualquier contaminación.

39. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el proceso de cultivo se lleva a cabo en recipientes biocompatibles.

40. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque la relación de la alícuota de células madre incubadas al medio de células es aproximadamente 1:3.5 a alrededor de 1:35.

41. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo en un ambiente sustancialmente anaeróbico.

42. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo en un recipiente biocompatible en donde el volumen es casi completamente ocupado por el medio y el recipiente se mantiene en una posición vertical.

43. Un método para diferenciar parcialmente células hES libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, caracterizado porque comprende las etapas de:

(a) introducir células hES en un medio de cultivo de células que consiste en medio esencial mínimo e

(b) incubar las células madre a una temperatura de alrededor de 34°C a aproximadamente 38°C en un ambiente de aproximadamente 3.5% a alrededor de 6% de dióxido de carbono durante alrededor de 12 horas a aproximadamente 48 horas.

44. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el medio de cultivo de células es RPMI o DMEM.

45. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo en un incubador de cultivo de células con camisa de agua.

46. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque las células madre en medio de cultivo se incuban en un recipiente biocompatible bajo condiciones sustancialmente aeróbicas.

47. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 46, caracterizado porque las células madre se diferencian después de la proliferación.

48. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque comprende además la etapa de probar las células madre expandidas para cualquier contaminación.

49. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el proceso de cultivo se lleva a cabo en recipientes

biocompatibles.

50. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque la relación de la alícuota de células madre incubadas al medio de células es de aproximadamente 1:3.5 a alrededor de 1:35.

51. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo en un ambiente sustancialmente aeróbico.

52. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo en un recipiente biocompatible y el recipiente se mantiene en una posición horizontal.

53. Un proceso para preparar una preparación lista para usar de células hES y/o sus derivados para su transplante a humanos, caracterizado porque comprende:

(a) obtener células hES libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor

Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados,

(b) centrifugar las células madre para obtener un gránulo y

(c) suspender el gránulo en una solución biocompatible.

54. El proceso para preparar una preparación lista para usar de células hES y/o sus derivados para transplante a humanos de conformidad con la reivindicación 53, caracterizado porque comprende además:

(d) almacenar la preparación a alrededor de -15°C a aproximadamente -72°C y

(e) descongelar la preparación almacenada naturalmente antes de su transplantación,

en donde la viabilidad de las células es de al menos 40% luego de descongelarlas.

55. El proceso para preparar una preparación lista para usarse de células hES y/o sus derivados para transplante a humanos de conformidad con la reivindicación 53 ó 54, caracterizado porque comprende además probar la preparación para cualquier contaminante antes del transplante.

56. El proceso para preparar una preparación lista para usarse de células hES y/o sus derivados para transplante

en humanos de conformidad con la reivindicación 53, caracterizado porque las células hES y/o sus derivados obtenidos en (a) se producen mediante los métodos de conformidad con las reivindicaciones 31 ó 45.

57. Un método para almacenar una preparación de células hES y/o sus derivados en una condición viable, caracterizado porque comprende:

(a) tomar una preparación de células hES y/o sus derivados preparada por el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45,

(b) añadir una agente de crioconcervación y

(c) congelar las células a alrededor de -15 a aproximadamente -72°C.

58. El método para almacenar una preparación de células hES y/o sus derivados de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque la relación de la cantidad del agente de criopreservación a aquella del medio de cultivo es de aproximadamente 1:500 a alrededor de 16:1000.

59. El método para almacenar una preparación de células hES y/o sus derivados de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el almacenamiento es en un recipiente biocompatible.

60. El método para almacenar una preparación de células hES y/o sus derivados de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque las células se congelan a aproximadamente -18 a alrededor de -20°C.

61. Uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, las células están libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de fibroblastos o medios acondicionados, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o condición en un sujeto.

62. El uso de conformidad con la reivindicación 61, en donde las células hES y/o sus derivados se producen mediante el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45.

63. El uso de conformidad con la reivindicación 61, en donde la enfermedad, trastorno o condición se selecciona del grupo que consiste en cáncer, apoplejía, trastornos genéticos, trastornos hepáticos, trastornos de desarrollo, trastornos degenerativos, trastornos hereditarios o trastornos traumáticos del sistema nervioso, trastornos vasculares, enfermedades y trastornos de la piel, trastornos autoinmunes, trastornos oculares, trastornos renales,

trastornos cardiacos, trastornos musculoesqueléticos, trastornos reproductivos y de fertilidad, artritis y trastornos hemáticos.

64. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos del sistema nervioso son trastornos del sistema nervioso en desarrollo seleccionados del grupo que consiste en Autismo, Parálisis Cerebral, Parálisis de Erb, Retraso Mental y Parálisis Supranuclear Progresiva.

65. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos del sistema nervioso son trastornos del sistema nervioso degenerativos seleccionados del grupo que consiste en Enfermedad de Alzheimer, Degeneración Corticobasal, Sordera (Atrofia del Nervio Auditivo), Demencia, Ataxia de Friedereich, Enfermedad de Neuronas Motoras, Esclerosis Múltiple, Atrofia Olivo Ponto Cerebelar, Mal de Parkinson y Ataxia Espino Cerebelar.

66. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos del sistema nervioso son traumatismos del sistema nervioso seleccionados del grupo que consiste en Daño Cerebral, Coma, Encefalopatía Post Choque Eléctrico, Encefalopatía Después de Vacuna contra la Rabia, Daño o Lesión de Médula Espinal y Estado Vegetativo.

67. El uso de conformidad con la reivindicación 63,

en donde los trastornos del sistema nervioso son Accidente Cerebro Vascular o Apoplejía.

68. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos del sistema nervioso son condiciones hereditarias seleccionadas del grupo que consiste en Enfermedad de Neuronas Espino Motoras Hereditaria y Corea de Huntington.

69. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos hepáticos y renales se seleccionan del grupo que consiste en Cirrosis del Hígado, Enfermedad Renal en Etapa Terminal, Síndrome Nefrótico y Enfermedad de Niemann Pick.

70. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos de la piel se seleccionan del grupo que consiste en Artritis, Arterosclerosis, Quemaduras, Ulceras No Sanadoras, Llagas por Presión, Psoriasis, Lupus Eritematoso Sistémico y Sarcoidosis.

71. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos autoinmunes se seleccionan del grupo que consiste en Trombocitopenia, Lupus Eritematoso Sistémico, Sarcoidosis y Colitis Ulcerativa.

72. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos genéticos se seleccionan del grupo

que consiste en Síndrome de Down, Espondilitis Anquilosante, Talasemia y Corea de Huntington.

73. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos oculares se seleccionan del grupo que consiste en Atrofia del Nervio Optico, Ptisis Bulbi, Degeneración Macular, Retinitis Pigmentosa, Abrasión Corneal, Rechazo de Injerto Corneal y Ulceras Corneales.

74. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos musculoesqueléticos se seleccionan del grupo que consiste en Distrofia Muscular de Duchenne, Distrofia Muscular Facio Escapular, Distrofia del Cíngulo de las Extremidades, Atrofia Muscular Espinal y Distrofia Muscular de Becker.

75. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos cardiacos se seleccionan del grupo que consiste en Infarto del Miocardio, Bloqueo de Ramificaciones del Fascículo Derecho, Cardiomiopatía Restrictiva, Insuficiencia Cardiaca, Bradicardia de Seno y Enfermedad de Arteria Coronaria.

76. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los estados oncológicos se seleccionan del grupo que consiste en Leucemia Mieloide Aguda, Adenocarcinoma de la Glándula Adrenal, Astrocitoma, Carcinoma Hepatocelular y

Tumor de Médula Espinal.

77. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde la enfermedad es Diabetes Mellitus.

78. Uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados cultivados en medios libres de productos animales, células alimentadoras, medios acondicionados, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana o factor Steel soluble, en la preparación de un medicamento para su administración mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa o inyección epidural o catéter epidural o inyección retrobulbar o inyección subcutánea o inyección intracardiaca o inyección intracística o inyección intratecal o mediante aplicación tópica o aplicación intralesional o infusión intravenosa, o por medio de nebulizador, o por aspersión, o mediante rutas intravaginales, o mediante gotas locales para ojos y oídos.

79. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde las células hES y/o sus derivados se producen mediante el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45.

80. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde la cantidad terapéuticamente efectiva de células hES

y/o sus derivados es de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células.

81. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde las células hES y/o sus derivados comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, progenitores de células madre neuronales, progenitores de células madre mesenquimáticas, progenitores de células madre epiteliales, progenitores de células madre renales, progenitores de células madre cardiacas o progenitores de células madre hepáticas, o combinaciones de los mismos.

82. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cáncer, apoplejía, trastornos genéticos, trastornos hepáticos, trastornos de desarrollo, trastornos degenerativos, trastornos hereditarios o trastornos traumáticos del sistema nervioso, trastornos vasculares, trastornos de la piel y enfermedades, trastornos autoinmunes, trastornos oculares, trastornos renales, trastornos cardiacos, trastornos musculoesqueléticos, trastornos reproductivos y de fertilidad, artritis y trastornos hemáticos.

83. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde la enfermedad, trastorno o condición se selecciona

del grupo que consiste en Leucemia Mieloide Aguda, Adenocarcinoma, Artritis, Astrocitoma, Atrofia del Nervio Auditivo, Autismo, Trastornos Autoinmunes, enfermedad de Alzheimer, Espondilitis Anquilosante, Distrofia Muscular de Becker, Daño Cerebral, Quemaduras, Accidente Cerebrovascular, Parálisis Cerebral, Coma, Ulceras Corneales, Rechazo de Injerto Corneal, Degeneración Cortico-Basal del Sistema Nervioso, Enfermedad de Arterias Coronarias, Diabetes, Demencia, Síndrome de Down, Distrofia Muscular de Duchenne, Enfermedad Renal en Etapa Terminal, Parálisis de Erb, Distrofia Muscular Fascio Escapular, Trastornos de Fertilidad, Ataxia de Friederich, Insuficiencia Cardiaca, Carcinoma Hepatocelular, Enfermedad de Neuronas Espino Motoras Hereditaria, Corea de Huntington, Enfermedad de Krabbe, Distrofia del Cíngulo de las Extremidades, Cirrosis Hepática, Degeneración Macular, Retraso Mental, Esclerosis Múltiple, Enfermedad de Neuronas Motoras, Infarto del Miocardio, Síndrome Nefrótico, Enfermedad de Niemann Pick, Ulceración No Sanadora de la Piel, Atrofia Olivo-Ponto Cerebelar, Atrofia del Nervio Óptico, Mal de Parkinson, Encefalopatía Post Choque Eléctrico, Encefalopatía Post-Vacuna Contra la Rabia, Llagas por Presión, Parálisis Supranuclear Progresiva, Psoriasis, Ptisis Bulbi,

Cardiomiopatía Restrictiva, Retinitis Pigmentosa, Bloque de Ramificación del Fascículo Derecho, Sarcoidosis, Bradicardia del Seno, Distrofia Muscular Espinal, Ataxia Espino Cerebelar, Síndrome de Steven Johnson, Lupus Eritematoso Sistémico, Trombocitopenia, Talasemia, Colitis Ulcerativa, Estado Vegetativo, Fibrosis Quística, Enfermedad Pulmonar Intersticial, Azoospermia, Insuficiencia Ovárica Primaria, Ulceras Aftosas, Desequilibrio Hormonal, Osteo-Artritis, Síndrome de Horner y Osteogénica Imperfecta, junto con Canalopatía e Hipogamaglobulinemia.

84. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde la administración de células hES y/o sus derivados no causa tumores, teratomas o cambios cromosómicos.

85. Uso de células hES y/o sus derivados en la preparación de un medicamento para el tratamiento de Lesión de Médula Espinal (SCI) de un sujeto mediante un método que comprende:

(a) administrar alrededor de 750,000 a aproximadamente 80 millones de células hES y/o sus derivados mediante inyección subcutánea;

(b) repetir la etapa (a) después de un periodo predeterminado y posteriormente administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados

mediante inyección intramuscular;

(c) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas, mediante inyección o infusión intravenosa;

(d) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección epidural y repetir la dosis después de un periodo predeterminado dependiendo de la condición del sujeto evaluada por exámenes clínicos y/o neurológicos;

(e) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección caudal;

(f) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección intratecal o catéter de bloque subaracnoide;

(g) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las

células comprenden progenitores de células madre neuronales mediante inyección epidural o catéter epidural;

(h) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados mediante inyección espinal profunda sobre cada lado de la espina y

(i) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados mediante infusión intravenosa;

(j) en donde las etapas (a) e (b) se llevan a cabo primero y las etapas restantes pueden llevarse a cabo en cualquier orden.

86. El uso de conformidad con la reivindicación 85, el cual comprende además repetir la etapa (f) seguida por la etapa (g), hasta que el sujeto exhiba señales clínicas de recuperación de la SCI.

87. El uso de conformidad con la reivindicación 85, en donde las células hES y/o sus derivados se producen mediante el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45.

88. El uso de conformidad con la reivindicación 85, en donde alrededor de 750,000 a aproximadamente 80 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas y

progenitores de células madre neuronales, se suspenden en 0.25 a 1.0 ml de una solución biocompatible en la etapa (a) y etapa (b).

89. El uso de conformidad con la reivindicación 85, en donde aproximadamente 750,000 a alrededor de 11 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas y progenitores de células madre neuronales, se suspenden en 2.0 a 4.0 ml de una solución biocompatible en la etapa (f).

90. El uso de conformidad con la reivindicación 85, en donde alrededor de 750,000 a aproximadamente 80 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas y progenitores de células madre neuronales, se suspenden en 15 a 40 ml de una solución biocompatible en la etapa (g).

91. El uso de conformidad con la reivindicación 85, en donde el tratamiento de sujetos con SCI da como resultado la reducción de úlceras por decúbito.

92. Uso de alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticos, en la preparación de un medicamento para administración mediante

inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intratecal, infusión por catéter epidural o infusión por catéter de bloque subaracnoide, en el tratamiento de trastornos de desarrollo, degenerativos, hereditarios y traumáticos del sistema nervioso y ataque cerebrovascular.

93. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos de la piel mediante inyección subcutánea o intravenosa.

94. El uso de conformidad con la reivindicación 93, en donde las células hES y/o progenitores se mezclan en un vehículo biocompatible que se aplicará a la piel dañada.

95. El uso de conformidad con la reivindicación 94, en donde el vehículo biocompatible es un gel, ungüento, pasta o aspersión por aerosol.

96. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 80 millones de células hES y/o sus derivados en la preparación de un medicamento para el tratamiento de úlceras por decúbito mediante aplicación local o tópica y por medio de inyección intramuscular.

97. Uso de alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos autoinmunes mediante inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intra-articular o infusión intravenosa o combinaciones de los mismos.

98. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprende progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos genéticos mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intratecal, infusión por catéter epidural o infusión por catéter de bloque subaracnoide, o combinaciones de los mismos.

99. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de gangrena mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular o aplicación local en la unión de tejido viable y muerto o combinaciones de los mismos.

100. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados en la preparación de un medicamento para el tratamiento de condiciones asociadas con envejecimiento mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, aplicación local en suspensión o mezclado con un vehículo biocompatible.

101. El uso de conformidad con la reivindicación 100, en donde el vehículo biocompatible es un gel, ungüento, pasta o rocío de aerosol.

102. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células progenitoras productoras de insulina embrionarias humanas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de diabetes mellitus mediante inyección intravenosa o intramuscular o ambas.

103. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para tratar trastornos cardiovasculares mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intracardiaca, angiografía o inyección directa, o combinaciones de los mismos.

104. Uso de conformidad con la reivindicación 102, en donde la administración es durante angiografía.

105. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, progenitores de células madre productoras de albúmina y progenitores de células madre productoras de bilirrubina, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos hepáticos y renales mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, infusión intravenosa o inyección local, o combinaciones de las mismas.

106. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de Fertilidad y Trastornos Reproductivos mediante inyección intramuscular local, inyección intratesticular o a través de inyección en piel subcutánea cerca del epidídimo, o combinaciones de los mismos.

107. Uso de alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales

y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de Trastornos Musculoesqueléticos mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular o infusión por catéter intravenoso, o combinaciones de las mismas.

108. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, progenitores de células madre hematopoyéticas y/o progenitores de células madre mesenquimáticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos oculares mediante inyección intravenosa local, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección retrobulbar, inyección intravítrea o aplicación tópica, o combinaciones de los mismos.

109. El uso de conformidad con la reivindicación 108, en donde aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, se administran mediante inyección retrobulbar.

110. El uso de conformidad con la reivindicación 108, en donde aproximadamente 750,000 a alrededor de 160

millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales se administran mediante inyección intravítrea.

111. El uso de conformidad con la reivindicación 108, en donde alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre mesenquimáticas, se aplican a lentes de contacto para el tratamiento de abrasión corneal.

112. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos pulmonares mediante inyección intramuscular, inyección intravenosa, aspersión o nebulizador, o combinaciones de los mismos.

113. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos hormonales mediante inyección intramuscular o

inyección intravenosa, o combinaciones de los mismos.

114. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de Ulceras Aftosas mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa, o combinaciones de las mismas.

115. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de osteoartritis de la rodilla y unión de la cadera mediante inyección intramuscular, inyección intravenosa o inyección intra-articular, o combinaciones de las mismas.

116. Un método para probar el efecto de un compuesto en células hES y/o sus derivados, caracterizado porque comprende cultivar células hES y/o sus derivados obtenidas mediante el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45 en presencia del compuesto, y determinar el efecto del compuesto en las células.

117. Uso de las células hES y/o sus derivados

obtenidas mediante el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45, en la preparación de un medicamento para el suministro de un fármaco a un sujeto, en donde las células absorben el fármaco en presencia del fármaco, y en donde las células se administran a un sitio en el sujeto, el fármaco es suministrado.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende preparaciones de células madre embrionarias humanas (hES) y sus derivados, y a métodos para su transplante en el cuerpo humano, en donde el transplante da como resultado la inversión clínica de síntomas, cura, estabilización o detención de degeneración de una amplia variedad de condiciones, enfermedades y trastornos médicos actualmente incurables y terminales. La invención se refiere además a procesos nuevos para preparar líneas de células madre nuevas que están libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados. Esta invención se refiere además al aislamiento, cultivo, mantenimiento, expansión, diferenciación, almacenamiento y conservación de estas células madre.

PRIETO & CARRIZOSA
ABOGADOS

ANEXO 1

TRADUCCIONES AL CASTELLANO

AUTORIDAD DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL (IPEA/IB)
BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES

En respuesta a solicitud de: Geeta Shroff
Número de solicitud internacional: PCT/IB2007/002292
Fecha de pres. de internacional: 6 de marzo de 2007
(06.03.2007)
Referencia del agente: 2515.002PC01
Título: **Composiciones que comprenden células madre embrionarias humanas y sus derivados, métodos de uso y métodos de preparación**

Enmienda bajo Artículo 19 del PCT

La Oficina Internacional del WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Ginebra 20
Suiza

Señor:

El solicitante requiere que se ingrese la siguiente enmienda en la solicitud del título.

Enmienda

Favor de ingresar la siguiente enmienda:

En las reivindicaciones:

Favor de reemplazar las páginas 168, 170 y 172 hasta 182 con las hojas de reemplazo 168, 170 y 172 hasta 182 anexas a la presente.

Explicación de la enmienda

Las reivindicaciones 22, 28, 42, 61-115 y 117 han sido enmendadas. No se ha añadido nueva materia por medio de la enmienda actual.

La reivindicación 22 ha sido reescrita como una reivindicación de producto por proceso. Esto para hacer claro que las células hES están libres de productos animales después combinadas con estructura o matriz selectivamente permeable, biocompatible la cual puede contener productos animales.

La reivindicación 28 ha sido enmendada para especificar que el embrión se recolectó en un medio *que consistía de* medio esencial mínimo. Así, el medio no puede contener productos animales. Soporte para esta enmienda se puede encontrar en el párrafo 331 el cual describe asilamiento de células hES en únicamente medio esencial mínimo, es decir, en un medio que consiste de medio esencial mínimo.

La reivindicación 42 ha sido hecha dependiente de la reivindicación 41 en lugar de la reivindicación 31.

Las reivindicaciones 61-115 y 117 han sido reescritas como reivindicaciones de "estilo Suizo".

Además, la numeración de las reivindicaciones en las hojas 179-182 han sido revisadas para tomar en cuenta la presencia de dos reivindicaciones numeradas 98 en la hoja 179 en la solicitud como se presentó.

Resumen

No se ha añadido nueva materia a la solicitud por medio de las enmiendas presentadas en la presente. El solicitante requiere respetuosamente que las hojas de reemplazo provistas con la presente se introduzcan en la solicitud presentada como se indicó arriba.

Respetuosamente presentado,

Greeta Shroff

Fecha:

824972_1. DOC

factor Steel asociado a membrana y/o factor Steel soluble o medios acondicionados, que se obtienen al atrapar las células hES y/o sus derivados en una estructura o matriz biocompatible y selectivamente permeable.

23. La composición de materia de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque las células hES y/o sus derivados comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas.

24. La composición de materia de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque las células hES y/o sus derivados comprenden progenitores de células madre neuronales.

25. La composición de materia de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque las células hES y/o sus derivados comprenden una combinación de células madre hematopoyéticas y progenitores de células madre neuronales.

26. La composición de materia de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque la estructura o matriz biocompatible y selectivamente permeable se selecciona del grupo que consiste en biopolímeros,

polipéptidos, proteínas, polisacáridos, fibronectina, colágeno, laminina, queratina, fibrina, fibrinógeno, ácido hialurónico, sulfato de heparina, sulfato de condroitina, agarosa y gelatina.

27. La composición de materia de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque las células hES y/o sus derivados son atrapados en una mezcla de agarosa y colágeno o en una mezcla de agarosa y gelatina.

28. Un método para aislar células hES, caracterizado porque comprende:

(a) colectar un embrión de 2 a 7 días de edad en un medio que consista en medio esencial mínimo,

(b) aislar células hES del embrión por medios mecánicos.

29. El método de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el embrión es un embrión de 2 días de edad.

30. El método de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque los medios mecánicos son agitación.

31. Un método para expandir células hES libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, caracterizado porque comprende las etapas de:

(a) introducir células hES en un medio de cultivo de células que consiste en medio esencial mínimo, una progestina y un agonista de gonadotropina coriónica β (βhCG) humana, e

(b) incubar las células madre a una temperatura de aproximadamente 34°C a alrededor de 38°C en un ambiente de alrededor de 3.5% a aproximadamente 6% de dióxido de carbono durante aproximadamente 12 horas a alrededor de 48 horas.

32. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el medio de cultivo de células es RPMI.

33. El método para expandir células hES de

conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque comprende además:

(c) tomar una alícuota de células madre incubadas de la etapa (b), en donde la alícuota contiene al menos una célula madre,

(d) resuspender las células en medio de cultivo de células junto con progesterona y βhCG a la alícuota,

(e) diluir las células en medio de cultivo de células sin progestina y agonista de βhCG, e

(f) incubar las células a una temperatura de alrededor de 34°C a aproximadamente 38°C en un ambiente de alrededor de 3.5% a aproximadamente 6% de dióxido de carbono durante alrededor de 12 horas a aproximadamente 48 horas.

34. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo en una incubadora de cultivo de células con camisa de agua.

35. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque

las células madre en medio de cultivo se incuban en un recipiente biocompatible bajo condiciones sustancialmente anaeróbicas.

36. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque las células madre no se diferencian después de la proliferación.

37. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque las células hES usadas se aíslan de un embrión de 3 días de edad mediante medios mecánicos.

38. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque comprende además la etapa de probar las células madre expandidas para cualquier contaminación.

39. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el proceso de cultivo se lleva a cabo en recipientes biocompatibles.

40. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque

la relación de la alícuota de células madre incubadas al medio de células es aproximadamente 1:3.5 a alrededor de 1:35.

41. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo en un ambiente sustancialmente anaeróbico.

42. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo en un recipiente biocompatible en donde el volumen es casi completamente ocupado por el medio y el recipiente se mantiene en una posición vertical.

43. Un método para diferenciar parcialmente células hES libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, caracterizado porque comprende las etapas

de:

(a) introducir células hES en un medio de cultivo de células que consiste en medio esencial mínimo e

(b) incubar las células madre a una temperatura de alrededor de 34°C a aproximadamente 38°C en un ambiente de aproximadamente 3.5% a alrededor de 6% de dióxido de carbono durante alrededor de 12 horas a aproximadamente 48 horas.

44. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el medio de cultivo de células es RPMI o DMEM.

45. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo en un incubador de cultivo de células con camisa de agua.

46. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque las células madre en medio de cultivo se incuban en un recipiente biocompatible bajo condiciones sustancialmente aeróbicas.

47. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 46, caracterizado porque las células madre se diferencian después de la proliferación.

48. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque comprende además la etapa de probar las células madre expandidas para cualquier contaminación.

49. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el proceso de cultivo se lleva a cabo en recipientes biocompatibles.

50. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque la relación de la alícuota de células madre incubadas al medio de células es de aproximadamente 1:3.5 a alrededor de 1:35.

51. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo en un ambiente sustancialmente aeróbico.

52. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo en un recipiente biocompatible y el recipiente se mantiene en una posición horizontal.

53. Un proceso para preparar una preparación lista para usar de células hES y/o sus derivados para su transplante a humanos, caracterizado porque comprende:

(a) obtener células hES libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados,

(b) centrifugar las células madre para obtener un gránulo y

(c) suspender el gránulo en una solución biocompatible.

54. El proceso para preparar una preparación lista para usar de células hES y/o sus derivados para

transplante a humanos de conformidad con la reivindicación 53, caracterizado porque comprende además:

(d) almacenar la preparación a alrededor de -15°C a aproximadamente -72°C y

(e) descongelar la preparación almacenada naturalmente antes de su transplantación,

en donde la viabilidad de las células es de al menos 40% luego de descongelarlas.

55. El proceso para preparar una preparación lista para usarse de células hES y/o sus derivados para transplante a humanos de conformidad con la reivindicación 53 ó 54, caracterizado porque comprende además probar la preparación para cualquier contaminante antes del transplante.

56. El proceso para preparar una preparación lista para usarse de células hES y/o sus derivados para transplante en humanos de conformidad con la reivindicación 53, caracterizado porque las células hES y/o sus derivados obtenidos en (a) se producen mediante los métodos de conformidad con las reivindicaciones 31 ó 45.

57. Un método para almacenar una preparación de células hES y/o sus derivados en una condición viable, caracterizado porque comprende:

(a) tomar una preparación de células hES y/o sus derivados preparada por el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45,

(b) añadir una agente de crioconcervación y

(c) congelar las células a alrededor de -15 a aproximadamente -72°C.

58. El método para almacenar una preparación de células hES y/o sus derivados de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque la relación de la cantidad del agente de criopreservación a aquella del medio de cultivo es de aproximadamente 1:500 a alrededor de 16:1000.

59. El método para almacenar una preparación de células hES y/o sus derivados de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el almacenamiento es en un recipiente biocompatible.

60. El método para almacenar una preparación de células hES y/o sus derivados de conformidad con la

reivindicación 57, caracterizado porque las células se congelan a aproximadamente -18 a alrededor de -20°C.

61. Uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, las células están libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de fibroblastos o medios acondicionados, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o condición en un sujeto.

62. El uso de conformidad con la reivindicación 61, en donde las células hES y/o sus derivados se producen mediante el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45.

63. El uso de conformidad con la reivindicación 61, en donde la enfermedad, trastorno o condición se selecciona del grupo que consiste en cáncer, apoplejía, trastornos genéticos, trastornos hepáticos, trastornos de desarrollo, trastornos degenerativos, trastornos hereditarios o trastornos traumáticos del sistema nervioso, trastornos vasculares, enfermedades y trastornos

de la piel, trastornos autoinmunes, trastornos oculares, trastornos renales, trastornos cardiacos, trastornos musculoesqueléticos, trastornos reproductivos y de fertilidad, artritis y trastornos hemáticos.

64. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos del sistema nervioso son trastornos del sistema nervioso en desarrollo seleccionados del grupo que consiste en Autismo, Parálisis Cerebral, Parálisis de Erb, Retraso Mental y Parálisis Supranuclear Progresiva.

65. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos del sistema nervioso son trastornos del sistema nervioso degenerativos seleccionados del grupo que consiste en Enfermedad de Alzheimer, Degeneración Corticobasal, Sordera (Atrofia del Nervio Auditivo), Demencia, Ataxia de Friedereich, Enfermedad de Neuronas Motoras, Esclerosis Múltiple, Atrofia Olivo Ponto Cerebelar, Mal de Parkinson y Ataxia Espino Cerebelar.

66. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos del sistema nervioso son

traumatismos del sistema nervioso seleccionados del grupo que consiste en Daño Cerebral, Coma, Encefalopatía Post Choque Eléctrico, Encefalopatía Después de Vacuna contra la Rabia, Daño o Lesión de Médula Espinal y Estado Vegetativo.

67. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos del sistema nervioso son Accidente Cerebro Vascular o Apoplejía.

68. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos del sistema nervioso son condiciones hereditarias seleccionadas del grupo que consiste en Enfermedad de Neuronas Espino Motoras Hereditaria y Corea de Huntington.

69. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos hepáticos y renales se seleccionan del grupo que consiste en Cirrosis del Hígado, Enfermedad Renal en Etapa Terminal, Síndrome Nefrótico y Enfermedad de Niemann Pick.

70. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos de la piel se seleccionan del grupo que consiste en Artritis, Arterosclerosis,

Quemaduras, Ulceras No Sanadoras, Llagas por Presión, Psoriasis, Lupus Eritematoso Sistémico y Sarcoidosis.

71. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos autoinmunes se seleccionan del grupo que consiste en Trombocitopenia, Lupus Eritematoso Sistémico, Sarcoidosis y Colitis Ulcerativa.

72. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos genéticos se seleccionan del grupo que consiste en Síndrome de Down, Espondilitis Anquilosante, Talasemia y Corea de Huntington.

73. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos oculares se seleccionan del grupo que consiste en Atrofia del Nervio Optico, Ptisis Bulbi, Degeneración Macular, Retinitis Pigmentosa, Abrasión Corneal, Rechazo de Injerto Corneal y Ulceras Corneales.

74. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos musculoesqueléticos se seleccionan del grupo que consiste en Distrofia Muscular de Duchenne, Distrofia Muscular Facio Escapular, Distrofia del Cíngulo de las Extremidades, Atrofia Muscular Espinal

y Distrofia Muscular de Becker.

75. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos cardiacos se seleccionan del grupo que consiste en Infarto del Miocardio, Bloqueo de Ramificaciones del Fascículo Derecho, Cardiomiopatía Restrictiva, Insuficiencia Cardiaca, Bradicardia de Seno y Enfermedad de Arteria Coronaria.

76. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los estados oncológicos se seleccionan del grupo que consiste en Leucemia Mieloide Aguda, Adenocarcinoma de la Glándula Adrenal, Astrocitoma, Carcinoma Hepatocelular y Tumor de Médula Espinal.

77. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde la enfermedad es Diabetes Mellitus.

78. Uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados cultivados en medios libres de productos animales, células alimentadoras, medios acondicionados, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana o factor Steel soluble, en la preparación de un

medicamento para su administración mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa o inyección epidural o catéter epidural o inyección retrobulbar o inyección subcutánea o inyección intracardiaca o inyección intracística o inyección intratecal o mediante aplicación tópica o aplicación intralesional o infusión intravenosa, o por medio de nebulizador, o por aspersión, o mediante rutas intravaginales, o mediante gotas locales para ojos y oídos.

79. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde las células hES y/o sus derivados se producen mediante el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45.

80. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde la cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados es de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células.

81. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde las células hES y/o sus derivados comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, progenitores de células madre neuronales, progenitores de

células madre mesenquimáticas, progenitores de células madre epiteliales, progenitores de células madre renales, progenitores de células madre cardiacas o progenitores de células madre hepáticas, o combinaciones de los mismos.

82. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cáncer, apoplejía, trastornos genéticos, trastornos hepáticos, trastornos de desarrollo, trastornos degenerativos, trastornos hereditarios o trastornos traumáticos del sistema nervioso, trastornos vasculares, trastornos de la piel y enfermedades, trastornos autoinmunes, trastornos oculares, trastornos renales, trastornos cardiacos, trastornos musculoesqueléticos, trastornos reproductivos y de fertilidad, artritis y trastornos hemáticos.

83. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde la enfermedad, trastorno o condición se selecciona del grupo que consiste en Leucemia Mieloide Aguda, Adenocarcinoma, Artritis, Astrocitoma, Atrofia del Nervio Auditivo, Autismo, Trastornos Autoinmunes, enfermedad de Alzheimer, Espondilitis Anquilosante, Distrofia Muscular de Becker, Daño Cerebral, Quemaduras,

Accidente Cerebrovascular, Parálisis Cerebral, Coma, Ulceras Corneales, Rechazo de Injerto Corneal, Degeneración Cortico-Basal del Sistema Nervioso, Enfermedad de Arterias Coronarias, Diabetes, Demencia, Síndrome de Down, Distrofia Muscular de Duchenne, Enfermedad Renal en Etapa Terminal, Parálisis de Erb, Distrofia Muscular Fascio Escapular, Trastornos de Fertilidad, Ataxia de Friederich, Insuficiencia Cardiaca, Carcinoma Hepatocelular, Enfermedad de Neuronas Espino Motoras Hereditaria, Corea de Huntington, Enfermedad de Krabbe, Distrofia del Cíngulo de las Extremidades, Cirrosis Hepática, Degeneración Macular, Retraso Mental, Esclerosis Múltiple, Enfermedad de Neuronas Motoras, Infarto del Miocardio, Síndrome Nefrótico, Enfermedad de Niemann Pick, Ulceración No Sanadora de la Piel, Atrofia Olivo-Ponto Cerebelar, Atrofia del Nervio Óptico, Mal de Parkinson, Encefalopatía Post Choque Eléctrico, Encefalopatía Post-Vacuna Contra la Rabia, Llagas por Presión, Parálisis Supranuclear Progresiva, Psoriasis, Ptisis Bulbi, Cardiomiopatía Restrictiva, Retinitis Pigmentosa, Bloque de Ramificación del Fascículo Derecho, Sarcoidosis, Bradicardia del Seno, Distrofia Muscular

Espinal, Ataxia Espino Cerebelar, Síndrome de Steven Johnson, Lupus Eritematoso Sistémico, Trombocitopenia, Talasemia, Colitis Ulcerativa, Estado Vegetativo, Fibrosis Quística, Enfermedad Pulmonar Intersticial, Azoospermia, Insuficiencia Ovárica Primaria, Ulceras Aftosas, Desequilibrio Hormonal, Osteo-Artritis, Síndrome de Horner y Osteogénica Imperfecta, junto con Canalopatía e Hipogamaglobulinemia.

84. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde la administración de células hES y/o sus derivados no causa tumores, teratomas o cambios cromosómicos.

85. Uso de células hES y/o sus derivados en la preparación de un medicamento para el tratamiento de Lesión de Médula Espinal (SCI) de un sujeto mediante un método que comprende:

(a) administrar alrededor de 750,000 a aproximadamente 80 millones de células hES y/o sus derivados mediante inyección subcutánea;

(b) repetir la etapa (a) después de un periodo predeterminado y posteriormente administrar una cantidad

terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados mediante inyección intramuscular;

(c) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas, mediante inyección o infusión intravenosa;

(d) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección epidural y repetir la dosis después de un periodo predeterminado dependiendo de la condición del sujeto evaluada por exámenes clínicos y/o neurológicos;

(e) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección caudal;

(f) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las

células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección intratecal o catéter de bloque subaracnoide;

(g) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales mediante inyección epidural o catéter epidural;

(h) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados mediante inyección espinal profunda sobre cada lado de la espina y

(i) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados mediante infusión intravenosa;

(j) en donde las etapas (a) e (b) se llevan a cabo primero y las etapas restantes pueden llevarse a cabo en cualquier orden.

86. El uso de conformidad con la reivindicación 85, el cual comprende además repetir la etapa (f) seguida por la etapa (g), hasta que el sujeto exhiba señales clínicas de recuperación de la SCI.

87. El uso de conformidad con la reivindicación

85, en donde las células hES y/o sus derivados se producen mediante el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45.

88. El uso de conformidad con la reivindicación 85, en donde alrededor de 750,000 a aproximadamente 80 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas y progenitores de células madre neuronales, se suspenden en 0.25 a 1.0 ml de una solución biocompatible en la etapa (a) y etapa (b).

89. El uso de conformidad con la reivindicación 85, en donde aproximadamente 750,000 a alrededor de 11 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas y progenitores de células madre neuronales, se suspenden en 2.0 a 4.0 ml de una solución biocompatible en la etapa (f).

90. El uso de conformidad con la reivindicación 85, en donde alrededor de 750,000 a aproximadamente 80 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre

hematopoyéticas y progenitores de células madre neuronales, se suspenden en 15 a 40 ml de una solución biocompatible en la etapa (g).

91. El uso de conformidad con la reivindicación 85, en donde el tratamiento de sujetos con SCI da como resultado la reducción de úlceras por decúbito.

92. Uso de alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticos, en la preparación de un medicamento para administración mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intratecal, infusión por catéter epidural o infusión por catéter de bloque subaracnoide, en el tratamiento de trastornos de desarrollo, degenerativos, hereditarios y traumáticos del sistema nervioso y ataque cerebrovascular.

93. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para

el tratamiento de trastornos de la piel mediante inyección subcutánea o intravenosa.

94. El uso de conformidad con la reivindicación 93, en donde las células hES y/o progenitores se mezclan en un vehículo biocompatible que se aplicará a la piel dañada.

95. El uso de conformidad con la reivindicación 94, en donde el vehículo biocompatible es un gel, ungüento, pasta o aspersión por aerosol.

96. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 80 millones de células hES y/o sus derivados en la preparación de un medicamento para el tratamiento de úlceras por decúbito mediante aplicación local o tópica y por medio de inyección intramuscular.

97. Uso de alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos autoinmunes mediante inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intra-articular o infusión intravenosa o combinaciones de los mismos.

98. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprende progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos genéticos mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intratecal, infusión por catéter epidural o infusión por catéter de bloque subaracnoide, o combinaciones de los mismos.

99. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de gangrena mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular o aplicación local en la unión de tejido viable y muerto o combinaciones de los mismos.

100. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados en la preparación de un medicamento para el tratamiento de condiciones asociadas con envejecimiento mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, aplicación local en suspensión o mezclado

con un vehículo biocompatible.

101. El uso de conformidad con la reivindicación 100, en donde el vehículo biocompatible es un gel, ungüento, pasta o rocío de aerosol.

102. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células progenitoras productoras de insulina embrionarias humanas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de diabetes mellitus mediante inyección intravenosa o intramuscular o ambas.

103. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para tratar trastornos cardiovasculares mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intracardiaca, angiografía o inyección directa, o combinaciones de los mismos.

104. Uso de conformidad con la reivindicación 102, en donde la administración es durante angiografía.

105. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde

las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, progenitores de células madre productoras de albúmina y progenitores de células madre productoras de bilirrubina, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos hepáticos y renales mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, infusión intravenosa o inyección local, o combinaciones de las mismas.

106. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de Fertilidad y Trastornos Reproductivos mediante inyección intramuscular local, inyección intratesticular o a través de inyección en piel subcutánea cerca del epidídimo, o combinaciones de los mismos.

107. Uso de alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de Trastornos Musculoesqueléticos mediante

inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular o infusión por catéter intravenoso, o combinaciones de las mismas.

108. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, progenitores de células madre hematopoyéticas y/o progenitores de células madre mesenquimáticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos oculares mediante inyección intravenosa local, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección retrobulbar, inyección intravítrea o aplicación tópica, o combinaciones de los mismos.

109. El uso de conformidad con la reivindicación 108, en donde aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, se administran mediante inyección retrobulbar.

110. El uso de conformidad con la reivindicación 108, en donde aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las

células comprenden progenitores de células madre neuronales se administran mediante inyección intravítrea.

111. El uso de conformidad con la reivindicación 108, en donde alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre mesenquimáticas, se aplican a lentes de contacto para el tratamiento de abrasión corneal.

112. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos pulmonares mediante inyección intramuscular, inyección intravenosa, aspersión o nebulizador, o combinaciones de los mismos.

113. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para

el tratamiento de trastornos hormonales mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa, o combinaciones de los mismos.

114. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de Ulceras Aftosas mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa, o combinaciones de las mismas.

115. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de osteoartritis de la rodilla y unión de la cadera mediante inyección intramuscular, inyección intravenosa o inyección intra-articular, o combinaciones de las mismas.

116. Un método para probar el efecto de un

compuesto en células hES y/o sus derivados, caracterizado porque comprende cultivar células hES y/o sus derivados obtenidas mediante el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45 en presencia del compuesto, y determinar el efecto del compuesto en las células.

117. Uso de las células hES y/o sus derivados obtenidas mediante el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45, en la preparación de un medicamento para el suministro de un fármaco a un sujeto, en donde las células absorben el fármaco en presencia del fármaco, y en donde las células se administran a un sitio en el sujeto, el fármaco es suministrado.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial De La Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(Código de barras)

(10) Número de Publicación Internacional:

(43) Fecha de publicación internacional:

13 Diciembre 2007 (13.12.2007)

PCT WO 2007/141657 A3

(51) Clasificación[7] de patente internacional:
A61K 35/48 (2006.01) *C12N 5/06* (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)

(21) Número de solicitud internacional: PCT/IB2007/002292

(22) Fecha de presentación internacional: 6 marzo 2007 (06.03.2007)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos de prioridad:

582/DEL/2006	7 Marzo 2006 (07.03.2006) IN
1500/DEL/2006	26 Junio 2006 (26.06.2006) IN
60/844,350	14 Septiembre 2006 (14.09.2006) US

(71) Solicitante e
(72) Inventor: **SHROFF, Geeta** [IN/IN]; 487 Hardevpuri, Gautam Nagar, New Delhi 115049 (IN).

(81) Estados designados: *(a menos que se indique lo contrario, para cada tipo de protección nacional disponible):* AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados: *(a menos que se indique lo contrario, para cada tipo de protección regional disponible):* Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:
- *con reporte internacional de búsqueda*
- *con reivindicaciones enmendadas*

(88) Fecha de publicación del reporte internacional de búsqueda:
24 de abril de 2008

Fecha de publicación de reivindicaciones enmendadas:
31 de julio de 2008

(54) Título: COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CELULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS Y SUS DERIVADOS, METODOS DE USO Y METODOS DE PREPARACION

(57) **Resumen:** La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende preparaciones de células madre embrionarias humanas (hES) y sus derivados, y a métodos para su transplante en el cuerpo humano, en donde el transplante da como resultado la inversión clínica de síntomas, cura, estabilización o detención de degeneración de una amplia variedad de condiciones, enfermedades y trastornos médicos actualmente incurables y terminales. La invención se refiere además a procesos nuevos para preparar líneas de células madre nuevas que están libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados. Esta invención se refiere además al aislamiento, cultivo, mantenimiento, expansión, diferenciación, almacenamiento y conservación de estas células madre.

WO 2007/141657 A3 (Código de barras)

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

A. CLASIFICACION DEL TEMA

De acuerdo a la Clasificación de Patentes Internacional (IPC) o a la clasificación nacional y a la IPC.

INV. A61K35/48 A61K35/12 C12N5/06 A61P25/00

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido por los símbolos de clasificación):

A61K

Documentación buscada diferente a la documentación mínima, a la extensión que tales documentos están incluidos en los campos buscados:

Base de datos electrónicos consultados durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, en donde sea práctico, términos de búsqueda utilizados):

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERA QUE SON RELEVANTES

Categoría*	Cita del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para la Reiv. No.
X	WANG W-H ET AL: "Human embryonic stem cell renglones are contaminated: What should we do?" HUMAN REPRODUCTION 2005 UNITED KINGDOM, vol. 20, no. 11, 2005, páginas 2987-2989, XP002466325 ISSN: 0268-1161 1460-2350 todo el documento página 2988, columna izquierda, último párrafo ----- -/--	28,29 21-27, 30, 61-84, 92-116

[X] Documentos adicionales se enlistan en la continuación del bloque C [X] Véase familia de patentes anexa.

* Categorías especiales de los documentos citados
"A" documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera ser de particular relevancia.
"E" documento anterior publicado en o después de la fecha de presentación internacional.
"L" documento el cual puede arrojar dudas sobre la(s) reivindicación(es) de prioridad o el cual se cita para establecer la fecha de publicación de otra cita u otra razón especial (como se especifica)
"O" documento que se refiere a una descripción oral, uso, exhibición u otro medio
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada.
"T" documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y no en conflicto con la solicitud, pero citado para entender el principio o teoría fundamental de la invención.
"X" documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede ser considerada nueva o no se puede considerar que involucre una etapa inventiva cuando el documento es considerado de manera aislada.
"Y" documento de particular relevancia; no se puede considerar que la invención involucre una etapa inventiva cuando el documento es combinado con uno o más de tales documentos, tal combinación sería obvia para una persona experimentada en la técnica.
"y" documento miembro de la misma familia de patentes.

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional	Fecha de envío del reporte de búsqueda internacional
4 febrero 2008	18/02/2008

Nombre y dirección de correspondencia de la ISA/US	Funcionario Autorizado
Oficina Europea de Patentes, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016	MATEO ROSELL, A

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

C. (Continuación) DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERA QUE SON RELEVANTES

Categoría	Cita del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para la Reiv. No.
X	WO 02/18549 A (MARIA BIOTECH CO LTD [KR]) 7 marzo 2002 (2002-03-07)	28,29
Y	Abstract página 10, renglón 23 - página 12, renglón 5 página 14, renglón 28 - página 15, renglón 1 página 17, renglón 21 - página 19, renglón 31; ejemplo 7 ----	21-27, 30, 61-84, 92-116
Y	AMIT M ET AL: "Feeder Layer- and Serum-Free Culture of Human Embryonic Stem Cells" BIOLOGY OF REPRODUCTION 2004 UNITED STATES, vol. 70, no. 3, 2004, páginas 837-845, XP002466324 ISSN: 0006-3363 resumen página 837, columna izquierda, párrafo 1 - página 838, columna izquierda, párrafo 1 página 842, columna izquierda, párrafo 2 - página 844, columna derecha, último párrafo ----	21-27 61-84, 92-116
Y	KLIMANSKAYA I ET AL: "Human embryonic stem cells derived without feeder cells" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, vol. 365, no. 9471, 7 Mayo 2005 (2005-05-07), páginas 1636-1641, XP004882308 ISSN: 0140-6736 resumen página 1636, columna izquierda, párrafo 1 - página 1638, columna derecha, último párrafo página 1640, columna derecha, párrafo 2 - página 1641, columna izquierda, párrafo 2 ----	21-27, 61-84, 92-116
Y	STOJKOVIC P ET AL: "HUMAN-SERUM MATRIX SUPPORTS UNDIFFERENTIATED GROWTH OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS" STEM CELLS, ALPHAMED PRESS, DAYTON, OH, US, vol. 23, no. 7, agosto 2005 (2005-08), páginas 895-902, XP009065121 ISSN: 1066-5099 resumen página 895, columna izquierda, párrafo 1 - página 896, columna derecha, párrafo 1 página 900, columna izquierda, párrafo 1 - página 901, columna derecha, párrafo 1 ---- -/--	21-27, 61-84, 92-116

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

C. (Continuación) DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERA QUE SON RELEVANTES

Categoría	Cita del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para la Reiv. No.
Y	EZASHI T ET AL: "Low 02 tensions and the prevention of differentiation of hES cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 29 MAR 2005 UNITED STATES, vol. 102, no. 13, 29 marzo 2005 (2005-03-29), páginas 4783-4788, XP002466326 ISSN: 0027-8424 resumen página 4783, columna izquierda, párrafo 2 - columna derecha, párrafo 2; figure 1 página 4787, columna derecha, párrafo 3 página 4788, columna derecha, párrafo 2	21-27, 61-84, 92-116
Y	WO 2004/007696 A (NISTOR GABRIEL I [US]; KEIRSTEAD HANS S [US]; UNIV CALIFORNIA [US]) 22 enero 2004 (2004-01-22) resumen página 3, renglones 15-25 página 10, renglón 34 - página 20, renglón 2; ejemplos 1-5	21-27, 61-84, 92-116
Y	WO 2004/081172 A (RELIANCE LIFE SCIENCES PVT LTD [IN]; TOTEY SATISH MAHADEORAO [IN]; RAV) 23 septiembre 2004 (2004-09-23) resumen página 7, párrafo 18 página 8, párrafo 20 - página 11, párrafo 29 página 35, párrafo 94 - página 46, párrafo 129	21-27, 61-84, 92-116
Y	ZHANG S-C ET AL: "In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 19, no. 12, diciembre 2001 (2001-12), páginas 1129-1133, XP002268706 ISSN: 1087-0156 resumen página 1130, columna derecha, párrafo 2 página 1131, columna izquierda, párrafo 2 página 1132, columna derecha, párrafo 2 página 1133, columna derecha, párrafo 2	21-27, 61-84, 92-116

-/--

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

C. (Continuación) DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERA QUE SON RELEVANTES

Categoría	Cita del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para la Reiv. No.
Y	REUBINOFF B E ET AL: "Neural progenitors from human embryonic stem cells" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 19, no. 12, diciembre 2001 (2001-12), páginas 1134-1140, XP002971362 ISSN: 1087-0156 resumen página 1138, columna derecha, párrafo 1 - página 1139, columna izquierda, párrafo 2	21-27, 61-84, 92-116

	MCDONALD J W ET AL: "TRANSPLANTED EMBRYONIC STEM CELLS SURVIVE, DIFFERENTIATE AND PROMOTE RECOVERY IN INJURED RAT SPINAL CORD" NATURE MEDICINE, NATURE AMERICA, NEW YORK, US, vol. 5, no. 12, diciembre 1999 (1999-12), páginas 1410-1412, XP002933176 ISSN: 1078-8956 citado en la solicitud resumen página 1411, columna izquierda, párrafo 4 - página 1412, columna derecha, párrafo 4	21-27, 61-84, 92-116

	HARPER J M ET AL: "Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 04 MAY 2004 UNITED STATES, vol. 101, no. 18, 4 Mayo 2004 (2004-05-04), páginas 7123-7128, XP002466977 ISSN: 0027-8424	21-27, 61-84, 92-116
	citado en la solicitud resumen página 7123, columna izquierda, párrafo 1 - columna derecha, párrafo 2; figures 1-3 página 7127, columna derecha, párrafo 2 - página 7128, columna derecha, párrafo 2	21-27, 61-84, 92-116

	-/--	

Forma PCT/ISA/210 (continuación de la segunda hoja) (Julio de 1992)

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

C. (Continuación) DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERA QUE SON RELEVANTES

Categoría	Cita del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para la Reiv. No.
Y	KERR D A ET AL: "Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury" JOURNAL OF NEUROSCIENCE 15 JUN 2003 UNITED STATES, vol. 23, no. 12, 15 Junio 2003 (2003-06-15), pägïnas 5131-5140, XP002466978 ISSN: 0270-6474 citado en la solicitud resumen página 5138, columna derecha, párrafo 3 - página 5139, columna derecha, párrafo 1	21-27, 61-84, 92-116
Y	US 2002/019046 A1 (CARPENTER MELISSA K [US] ET AL) 14 Febrero 2002 (2002-02-14) página 2, párrafo 23 - página 3, párrafo 30 página 6, párrafo 73 - página 11, párrafo 119; ejemplos 1-5	21-27, 61-84, 92-116
Y	WO 2005/099758 A (STANDARD OIL CO [US]; KOFIDIS THEODOROS [DE] TRUSTEES THE LELAND STAND) 27 octubre 2005 (2005-10-27) resumen página 1, renglones 5-10 página 7, renglón 6 - página 10, renglón 20; ejemplos I-V	21-27, 61-84, 92-116
Y	GERECHT-NIR S ET AL: "The promise of human embryonic stem cells" BAILLIERE'S BEST PRACTICE AND RESEARCH. CLINICAL OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY, BAILLIERE TINDALL, LONDON, GB, vol. 18, no. 6, diciembre 2004 (2004-12), páginas 843-852, XP004664903 ISSN: 1521-6934 todo el documento	21-27, 61-84, 92-116
Y	SCHULDINER MAYA ET AL: "Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 97, no. 21, 10 octubre 2000 (2000-10-10), páginas 11307-11312, XP002184277 ISSN: 0027-8424 todo el documento	21-27, 61-84, 92-116

-/-

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

C. (Continuación) DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERA QUE SON RELEVANTES

Categoría	Cita del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para la Reiv. No.
Y	RICHARDS M ET AL: "An efficient and safe Xeno-Free Cryopreservation method for the storage of human embryonic stem cells" STEM CELLS, ALPHAMED PRESS, DAYTON, OH, US, vol. 22, no. 5, 2004, páginas 779-789, XP002376917 ISSN: 1066-5099 todo el documento	21-27, 61-84, 92-116
A	---- HONG S H ET AL: "Expression of estrogen receptor-[alpha] and -[beta], glucocorticoid receptor, and progesterone receptor genes in human embryonic stem cells and embryoid bodies" MOLECULES AND CELLS 31 DEC 2004 GERMANY, vol. 18, no. 3, 31 diciembre 2004 (2004-12-31), páginas 320-325, XP002466327 ISSN: 1016-8478 todo el documento	31-52
A	---- SHI Q J ET AL: "Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts" ENDOCRINOLOGY 1993 UNITED STATES, vol. 132, no. 3, 1993, páginas 1387-1395, XP002466328 ISSN: 0013-7227 todo el documento	31-52
A	---- GERAMI-NAINI BEHZAD ET AL: "Trophoblast differentiation in embryoid bodies derived from human embryonic stem cells." ENDOCRINOLOGY APR 2004, vol. 145, no. 4, April 2004 (2004-04), páginas 1517-1524, XP002466329 ISSN: 0013-7227 todo el documento	31-52
Y	---- G.S. MUDUR: "BIG WONDER CELLS MESS - Medical research guiderenglones in India leave doctors free to do what they wish" INTERNET CITATION, [Online] 20 noviembre 2005 (2005-11-20), XP002466330 Retrieved from the Internet: URL:http://www.telegraphindia.com/1051120/asp/opinion/story_5496960.asp> todo el documento	
	---- -/--	

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

C. (Continuación) DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERA QUE SON RELEVANTES

Categoría	Cita del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para la Reiv. No.
T	"The Stem Cell 'Miracles'" INTERNET CITATION, [Online] 23 Mayo 2006 (2006-05-23), páginas 1-5, XP002466331 Retrieved from the Internet: URL:http://sci.rutgers.edu/forum/showthread.php?t=57401> todo el documento	
T	MANNELLO F ET AL: "Concise review: No breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: Conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not go" STEM CELLS 2007 UNITED STATES, vol. 25, no. 7, 2007, páginas 1603-1609, XP002466979 ISSN: 1066-5099 todo el documento	
T	SKOTTMAN HELI ET AL: "Culture conditions for human embryonic stem cells" REPRODUCTION (CAMBRIDGE), vol. 132, no. 5, noviembre 2006 (2006-11), páginas 691-698, XP002466980 ISSN: 1470-1626 todo el documento	
T	DE SOUSA PAUL A ET AL: "The road to providing human embryo stem cells for therapeutic use: the UK experience" REPRODUCTION (CAMBRIDGE), vol. 132, no. 5, noviembre 2006 (2006-11), páginas 681-689, XP002466981 ISSN: 1470-1626 todo el documento	
T	GRUEN LORI ET AL: "Concise review: Scientific and ethical roadblocks to human embryonic stem cell therapy" STEM CELLS (MIAMISBURG), vol. 24, no. 10, octubre 2006 (2006-10), páginas 2162-2169, XP002466982 ISSN: 1066-5099 todo el documento	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

Bloque II Observaciones cuando ciertas reivindicaciones se encontraron inescrutables (Continuación del ítem 2 de la primera hoja)

Este Reporte de Búsqueda Internacional no ha sido establecido con respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Nos. de reivindicaciones:
porque se refieren a materia que no se requirió buscar por esta Autoridad, a saber:
Aunque las reivindicaciones 61-114 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda se ha llevado a cabo y con base en los supuestos efectos del compuesto/composición.

2. ☐ Nos. de reivindicaciones:
porque se refieren a partes de la Solicitud Internacional que no cumplen con los requerimientos prescritos a tal grado de que no se pudo llevar a cabo ninguna Búsqueda Internacional significativa, específicamente:

3. ☐ Nos. de reivindicaciones:
porque son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de acuerdo con la segunda y tercera frases de la Regla 6.4(a).

Bloque III Observaciones cuando carece unidad de invención (Continuación del ítem 3 de la primera hoja)

a Autoridad de Búsqueda Internacional encontró varios inventores en esta solicitud internacional, como sigue

1. ☐ Ya que se pagaron a tiempo por el solicitante todas las cuotas de búsqueda adicionales requeridas, este Reporte de Búsqueda Internacional cubre todas las reivindicaciones escrutables.

2. ☐ Ya que todas las reivindicaciones escrutables pudieron escrutarse sin esfuerzo que justificara una cuota adicional, esta Autoridad no solicitó el pago de ninguna cuota adicional.

3. ☐ Ya que sólo algunas de las cuotas de búsqueda adicionales requeridas se pagaron a tiempo por el solicitante, este Reporte de Búsqueda Internacional cubre sólo las reivindicaciones para las cuales se pagaron cuotas, específicamente las reivindicaciones Nos.:

4. ☐ No se pagaron a tiempo por el solicitante las cuotas de búsqueda adicionales requeridas. En consecuencia, este Reporte de Búsqueda Internacional está restringido a la invención mencionada primero en las reivindicaciones; está cubierta por las Reivindicaciones Nos.:

Aclaración acerca de la Protesta

- ☐ Las tarifas de búsqueda adicionales estaban acompañadas por la protesta del solicitante y, cuando aplica, el pago de una tarifa de protesta
- ☐ Las tarifas de búsqueda adicionales estaban acompañadas por la protesta del solicitante pero el pago de tarifa de protesta aplicable no fue pagado dentro del tiempo límite especificado en la invitación.
- ☐ Ninguna protesta acompañó al pago de las tarifas de Búsqueda adicionales.

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información acerca de los miembros de la familia de patentes

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
WO 0218549 A	07-03-2002	AU	785428 B2	17-05-2007
		AU	6556501 A	07-03-2002
		CN	1350059 A	22-05-2002
		US	2002045259 A1	18-04-2002
WO 2004007696 A	22-01-2004	AU	2003250477 A1	02-02-2004
		CA	2489203 A1	22-01-2004
		EP	1523549 A2	20-04-2005
		GB	2407822 A	11-05-2005
		JP	2005532079 T	27-10-2005
		US	2004009593 A1	15-01-2004
		US	2005101014 A1	12-05-2005
WO 2004081172 A	23-09-2004	AU	2004219851 A1	23-09-2004
		BR	PI0408733 A	07-03-2006
		CA	2518577 A1	23-09-2004
		EP	1613726 A2	11-01-2006
		JP	2006521807 T	28-09-2006
		KR	20060010725 A	02-02-2006
		US	2006211109 A1	21-09-2006
US 2002019046 A1	14-02-2002	NINGUNO		
WO 2005099758 A	27-10-2005	NINGUNO		

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

Recibidas por la Oficina Internacional el 11 de abril 2008 (11.04.08)

factor Steel asociado a membrana y/o factor Steel soluble o medios acondicionados, que se obtienen al atrapar las células hES y/o sus derivados en una estructura o matriz biocompatible y selectivamente permeable.

23. La composición de materia de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque las células hES y/o sus derivados comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas.

24. La composición de materia de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque las células hES y/o sus derivados comprenden progenitores de células madre neuronales.

25. La composición de materia de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque las células hES y/o sus derivados comprenden una combinación de células madre hematopoyéticas y progenitores de células madre neuronales.

26. La composición de materia de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque la estructura o matriz biocompatible y selectivamente permeable se selecciona del grupo que consiste en biopolímeros, polipéptidos, proteínas, polisacáridos, fibronectina, colágeno, laminina, queratina, fibrina, fibrinógeno, ácido hialurónico, sulfato de heparina, sulfato de condroitina, agarosa y gelatina.

27. La composición de materia de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque las células hES y/o sus derivados son atrapados en una mezcla de agarosa y colágeno o en una mezcla de agarosa y gelatina.

28. Un método para aislar células hES, caracterizado porque comprende:

(a) colectar un embrión de 2 a 7 días de edad en un medio que consista en medio esencial mínimo,

(b) aislar células hES del embrión por medios mecánicos.

29. El método de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el embrión es un embrión de 2 días de edad.

30. El método de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque los medios mecánicos son agitación.

31. Un método para expandir células hES libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos,

37. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque las células hES usadas se aíslan de un embrión de 3 días de edad mediante medios mecánicos.

38. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque comprende además la etapa de probar las células madre expandidas para cualquier contaminación.

39. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el proceso de cultivo se lleva a cabo en recipientes biocompatibles.

40. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque la relación de la alícuota de células madre incubadas al medio de células es aproximadamente 1:3.5 a alrededor de 1:35.

41. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo en un ambiente sustancialmente anaeróbico.

42. El método para expandir células hES de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo en un recipiente biocompatible en donde el volumen es casi completamente ocupado por el medio y el recipiente se mantiene en una posición vertical.

43. Un método para diferenciar parcialmente células hES libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, caracterizado porque comprende las etapas de:

(a) introducir células hES en un medio de cultivo de células que consiste en medio esencial mínimo e

(b) incubar las células madre a una temperatura de alrededor de 34°C a aproximadamente 38°C en un ambiente de aproximadamente 3.5% a alrededor de 6% de dióxido de carbono durante alrededor de 12 horas a aproximadamente 48 horas.

44. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el medio de cultivo de células es RPMI o DMEM.

45. El método para diferenciar parcialmente células hES de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo en un incubador de cultivo de células con camisa de agua.

(d) almacenar la preparación a alrededor de -15°C a aproximadamente -72°C y

(e) descongelar la preparación almacenada naturalmente antes de su transplantación,

en donde la viabilidad de las células es de al menos 40% luego de descongelarlas.

55. El proceso para preparar una preparación lista para usarse de células hES y/o sus derivados para transplante a humanos de conformidad con la reivindicación 53 ó 54, caracterizado porque comprende además probar la preparación para cualquier contaminante antes del transplante.

56. El proceso para preparar una preparación lista para usarse de células hES y/o sus derivados para transplante en humanos de conformidad con la reivindicación 53, caracterizado porque las células hES y/o sus derivados obtenidos en (a) se producen mediante los métodos de conformidad con las reivindicaciones 31 ó 45.

57. Un método para almacenar una preparación de células hES y/o sus derivados en una condición viable, caracterizado porque comprende:

(a) tomar una preparación de células hES y/o sus derivados preparada por el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45,

(b) añadir una agente de crioconservación y

(c) congelar las células a alrededor de -15 a aproximadamente -72°C.

58. El método para almacenar una preparación de células hES y/o sus derivados de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque la relación de la cantidad del agente de criopreservación a aquella del medio de cultivo es de aproximadamente 1:500 a alrededor de 16:1000.

59. El método para almacenar una preparación de células hES y/o sus derivados de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el almacenamiento es en un recipiente biocompatible.

60. El método para almacenar una preparación de células hES y/o sus derivados de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque las células se congelan a aproximadamente -18 a alrededor de -20°C.

61. Uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, las células están libres de productos animales, células

alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de fibroblastos o medios acondicionados, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o condición en un sujeto.

62. El uso de conformidad con la reivindicación 61, en donde las células hES y/o sus derivados se producen mediante el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45.

63. El uso de conformidad con la reivindicación 61, en donde la enfermedad, trastorno o condición se selecciona del grupo que consiste en cáncer, apoplejía, trastornos genéticos, trastornos hepáticos, trastornos de desarrollo, trastornos degenerativos, trastornos hereditarios o trastornos traumáticos del sistema nervioso, trastornos vasculares, enfermedades y trastornos de la piel, trastornos autoinmunes, trastornos oculares, trastornos renales, trastornos cardiacos, trastornos musculoesqueléticos, trastornos reproductivos y de fertilidad, artritis y trastornos hemáticos.

64. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos del sistema nervioso son trastornos del sistema nervioso en desarrollo seleccionados del grupo que consiste en Autismo, Parálisis Cerebral, Parálisis de Erb, Retraso Mental y Parálisis Supranuclear Progresiva.

65. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos del sistema nervioso son trastornos del sistema nervioso degenerativos seleccionados del grupo que consiste en Enfermedad de Alzheimer, Degeneración Corticobasal, Sordera (Atrofia del Nervio Auditivo), Demencia, Ataxia de Friedereich, Enfermedad de Neuronas Motoras, Esclerosis Múltiple, Atrofia Olivo Ponto Cerebelar, Mal de Parkinson y Ataxia Espino Cerebelar.

66. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos del sistema nervioso son traumatismos del sistema nervioso seleccionados del grupo que consiste en Daño Cerebral, Coma, Encefalopatía Post Choque Eléctrico, Encefalopatía Después de Vacuna contra la Rabia, Daño o Lesión de Médula Espinal y Estado Vegetativo.

67. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos del sistema nervioso son Accidente Cerebro Vascular o Apoplejía.

68. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos del sistema nervioso son condiciones hereditarias seleccionadas del grupo que consiste en Enfermedad de Neuronas Espino Motoras Hereditaria y Corea de Huntington.

69. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos hepáticos y renales se seleccionan del grupo que consiste en Cirrosis del Hígado, Enfermedad Renal en Etapa Terminal, Síndrome Nefrótico y Enfermedad de Niemann Pick.

70. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos de la piel se seleccionan del grupo que consiste en Artritis, Arterosclerosis, Quemaduras, Ulceras No Sanadoras, Llagas por Presión, Psoriasis, Lupus Eritematoso Sistémico y Sarcoidosis.

71. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos autoinmunes se seleccionan del grupo que consiste en Trombocitopenia, Lupus Eritematoso Sistémico, Sarcoidosis y Colitis Ulcerativa.

72. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos genéticos se seleccionan del grupo que consiste en Síndrome de Down, Espondilitis Anquilosante, Talasemia y Corea de Huntington.

73. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos oculares se seleccionan del grupo que consiste en Atrofia del Nervio Optico, Ptisis Bulbi, Degeneración Macular, Retinitis Pigmentosa, Abrasión Corneal, Rechazo de Injerto Corneal y Ulceras Corneales.

74. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos musculoesqueléticos se seleccionan del grupo que consiste en Distrofia Muscular de Duchenne, Distrofia Muscular Facio Escapular, Distrofia del Cíngulo de las Extremidades, Atrofia Muscular Espinal y Distrofia Muscular de Becker.

75. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los trastornos cardiacos se seleccionan del grupo que consiste en Infarto del Miocardio, Bloqueo de Ramificaciones del Fascículo Derecho, Cardiomiopatía Restrictiva, Insuficiencia Cardiaca, Bradicardia de Seno y Enfermedad de Arteria Coronaria.

76. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde los estados oncológicos se seleccionan del grupo que consiste en Leucemia Mieloide Aguda, Adenocarcinoma de la Glándula Adrenal, Astrocitoma, Carcinoma Hepatocelular y Tumor de Médula Espinal.

77. El uso de conformidad con la reivindicación 63, en donde la enfermedad es Diabetes Mellitus.

78. Uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados cultivados en medios libres de productos animales, células alimentadoras, medios acondicionados, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana o factor Steel soluble, en la preparación de un medicamento para su administración mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa o inyección epidural o catéter epidural o inyección retrobulbar o inyección subcutánea o inyección intracardiaca o inyección intracística o inyección intratecal o mediante aplicación tópica o aplicación intralesional o infusión intravenosa, o por medio de nebulizador, o por aspersión, o mediante rutas intravaginales, o mediante gotas locales para ojos y oídos.

79. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde las células hES y/o sus derivados se producen mediante el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45.

80. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde la cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados es de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células.

81. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde las células hES y/o sus derivados comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, progenitores de células madre neuronales, progenitores de células madre mesenquimáticas, progenitores de células madre epiteliales, progenitores de células madre renales, progenitores de células madre cardiacas o progenitores de células madre hepáticas, o combinaciones de los mismos.

82. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cáncer, apoplejía, trastornos genéticos, trastornos hepáticos, trastornos de desarrollo, trastornos degenerativos, trastornos hereditarios o trastornos traumáticos del sistema nervioso, trastornos vasculares, trastornos de la piel y enfermedades, trastornos autoinmunes, trastornos oculares, trastornos renales, trastornos cardiacos, trastornos musculoesqueléticos, trastornos reproductivos y de fertilidad, artritis y trastornos hemáticos.

83. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde la enfermedad, trastorno o condición se selecciona del grupo que consiste en Leucemia Mieloide Aguda, Adenocarcinoma, Artritis, Astrocitoma, Atrofia del Nervio Auditivo, Autismo, Trastornos Autoinmunes, enfermedad de Alzheimer, Espondilitis Anquilosante, Distrofia Muscular de Becker, Daño Cerebral, Quemaduras, Accidente Cerebrovascular, Parálisis Cerebral, Coma, Ulceras Corneales, Rechazo de Injerto Corneal, Degeneración Cortico-Basal del Sistema Nervioso, Enfermedad de Arterias Coronarias, Diabetes, Demencia, Síndrome de Down, Distrofia Muscular de Duchenne, Enfermedad Renal en Etapa Terminal, Parálisis de Erb, Distrofia Muscular Fascio Escapular, Trastornos de Fertilidad, Ataxia de Friederich, Insuficiencia Cardiaca, Carcinoma Hepatocelular, Enfermedad de Neuronas Espino Motoras Hereditaria, Corea de Huntington, Enfermedad de Krabbe, Distrofia del Cíngulo de las Extremidades, Cirrosis Hepática, Degeneración Macular, Retraso Mental, Esclerosis Múltiple, Enfermedad de Neuronas Motoras, Infarto del Miocardio, Síndrome Nefrótico, Enfermedad de Niemann Pick, Ulceración No Sanadora de la Piel, Atrofia Olivo-Ponto Cerebelar, Atrofia del Nervio Óptico, Mal de Parkinson, Encefalopatía Post Choque Eléctrico, Encefalopatía Post-Vacuna Contra la Rabia, Llagas por Presión, Parálisis Supranuclear Progresiva, Psoriasis, Ptisis Bulbi, Cardiomiopatía Restrictiva, Retinitis Pigmentosa, Bloque de Ramificación del Fascículo Derecho, Sarcoidosis, Bradicardia del Seno, Distrofia Muscular Espinal, Ataxia Espino Cerebelar, Síndrome de Steven Johnson, Lupus Eritematoso Sistémico, Trombocitopenia, Talasemia, Colitis Ulcerativa, Estado Vegetativo, Fibrosis Quística, Enfermedad Pulmonar Intersticial, Azoospermia, Insuficiencia Ovárica Primaria, Ulceras Aftosas, Desequilibrio Hormonal, Osteo-Artritis, Síndrome de Horner y Osteogénica Imperfecta, junto con Canalopatía e Hipogamaglobulinemia.

84. El uso de conformidad con la reivindicación 78, en donde la administración de células hES y/o sus derivados no causa tumores, teratomas o cambios cromosómicos.

85. Uso de células hES y/o sus derivados en la preparación de un medicamento para el tratamiento de Lesión de Médula Espinal (SCI) de un sujeto mediante un método que comprende:

(a) administrar alrededor de 750,000 a aproximadamente 80 millones de células hES y/o sus derivados mediante inyección subcutánea;

(b) repetir la etapa (a) después de un periodo predeterminado y posteriormente administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados mediante inyección intramuscular;

(c) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas, mediante inyección o infusión intravenosa;

(d) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección epidural y repetir la dosis después de un periodo predeterminado dependiendo de la condición del sujeto evaluada por exámenes clínicos y/o neurológicos;

(e) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección caudal;

(f) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección intratecal o catéter de bloque subaracnoide;

(g) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales mediante inyección epidural o catéter epidural;

(h) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados mediante inyección espinal profunda sobre cada lado de la espina y

(i) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados mediante infusión intravenosa;

(j) en donde las etapas (a) e (b) se llevan a cabo primero y las etapas restantes pueden llevarse a cabo en cualquier orden.

86. El uso de conformidad con la reivindicación 85, el cual comprende además repetir la etapa (f) seguida por la etapa (g), hasta que el sujeto exhiba señales clínicas de recuperación de la SCI.

87. El uso de conformidad con la reivindicación 85, en donde las células hES y/o sus derivados se producen mediante el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45.

88. El uso de conformidad con la reivindicación 85, en donde alrededor de 750,000 a aproximadamente 80 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas y progenitores de células madre neuronales, se suspenden en 0.25 a 1.0 ml de una solución biocompatible en la etapa (a) y etapa (b).

89. El uso de conformidad con la reivindicación 85, en donde aproximadamente 750,000 a alrededor de 11 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas y progenitores de células madre neuronales, se suspenden en 2.0 a 4.0 ml de una solución biocompatible en la etapa (f).

90. El uso de conformidad con la reivindicación 85, en donde alrededor de 750,000 a aproximadamente 80 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas y progenitores de células madre neuronales, se suspenden en 15 a 40 ml de una solución biocompatible en la etapa (g).

91. El uso de conformidad con la reivindicación 85, en donde el tratamiento de sujetos con SCI da como resultado la reducción de úlceras por decúbito.

92. Uso de alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticos, en la preparación de un medicamento para administración mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea,

inyección intramuscular, inyección intratecal, infusión por catéter epidural o infusión por catéter de bloque subaracnoide, en el tratamiento de trastornos de desarrollo, degenerativos, hereditarios y traumáticos del sistema nervioso y ataque cerebrovascular.

93. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos de la piel mediante inyección subcutánea o intravenosa.

94. El uso de conformidad con la reivindicación 93, en donde las células hES y/o progenitores se mezclan en un vehículo biocompatible que se aplicará a la piel dañada.

95. El uso de conformidad con la reivindicación 94, en donde el vehículo biocompatible es un gel, ungüento, pasta o aspersión por aerosol.

96. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 80 millones de células hES y/o sus derivados en la preparación de un medicamento para el tratamiento de úlceras por decúbito mediante aplicación local o tópica y por medio de inyección intramuscular.

97. Uso de alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos autoinmunes mediante inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intra-articular o infusión intravenosa o combinaciones de los mismos.

98. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprende progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos genéticos mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intratecal, infusión por catéter epidural o infusión por catéter de bloque subaracnoide, o combinaciones de los mismos.

99. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de gangrena mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular o aplicación local en la unión de tejido viable y muerto o combinaciones de los mismos.

100. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados en la preparación de un medicamento para el tratamiento de condiciones asociadas con envejecimiento mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, aplicación local en suspensión o mezclado con un vehículo biocompatible.

101. El uso de conformidad con la reivindicación 100, en donde el vehículo biocompatible es un gel, ungüento, pasta o rocío de aerosol.

102. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células progenitoras productoras de insulina embrionarias humanas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de diabetes mellitus mediante inyección intravenosa o intramuscular o ambas.

103. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para tratar trastornos cardiovasculares mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intracardiaca, angiografía o inyección directa, o combinaciones de los mismos.

104. Uso de conformidad con la reivindicación 102, en donde la administración es durante angiografía.

105. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, progenitores de células madre productoras de albúmina y progenitores de células madre productoras de bilirrubina, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos hepáticos y renales mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, infusión intravenosa o inyección local, o combinaciones de las mismas.

106. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de Fertilidad y Trastornos Reproductivos mediante inyección intramuscular local, inyección intratesticular o a través de inyección en piel subcutánea cerca del epidídimo, o combinaciones de los mismos.

107. Uso de alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de Trastornos Musculoesqueléticos mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular o infusión por catéter intravenoso, o combinaciones de las mismas.

108. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, progenitores de células madre hematopoyéticas y/o progenitores de células madre mesenquimáticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos oculares mediante inyección intravenosa local, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección retrobulbar, inyección intravítrea o aplicación tópica, o combinaciones de los mismos.

109. El uso de conformidad con la reivindicación 108, en donde aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, se administran mediante inyección retrobulbar.

110. El uso de conformidad con la reivindicación 108, en donde aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales se administran mediante inyección intravítrea.

111. El uso de conformidad con la reivindicación 108, en donde alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre mesenquimáticas, se aplican a lentes de contacto para el tratamiento de abrasión corneal.

112. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos pulmonares mediante inyección intramuscular, inyección intravenosa, aspersión o nebulizador, o combinaciones de los mismos.

113. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos hormonales mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa, o combinaciones de los mismos.

114. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de Ulceras Aftosas mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa, o combinaciones de las mismas.

115. Uso de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y/o progenitores de células madre hematopoyéticas, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de osteoartritis de la rodilla y unión de la cadera mediante inyección intramuscular, inyección intravenosa o inyección intra-articular, o combinaciones de las mismas.

116. Un método para probar el efecto de un compuesto en células hES y/o sus derivados, caracterizado porque comprende cultivar células hES y/o sus derivados obtenidas mediante el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45 en presencia del compuesto, y determinar el efecto del compuesto en las células.

117. Uso de las células hES y/o sus derivados obtenidas mediante el método de conformidad con la reivindicación 31 ó 45, en la preparación de un medicamento para el suministro de un fármaco a un sujeto, en donde las células absorben el fármaco en presencia del fármaco, y en donde las células se administran a un sitio en el sujeto, el fármaco es suministrado.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial De La Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(Código de barras)

(43) Fecha de publicación internacional:
13 Diciembre 2007 (13.12.2007)

(10) Número de Publicación Internacional:
PCT WO 2007/141657 A3

(51) Clasificación[7] de patente internacional:
A61K 35/48 (2006.01) *C12N 5/06* (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)

(21) Número de solicitud internacional: PCT/IB2007/002292

(22) Fecha de presentación internacional: 6 marzo 2007 (06.03.2007)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos de prioridad:

582/DEL/2006	7 Marzo 2006 (07.03.2006) IN
1500/DEL/2006	26 Junio 2006 (26.06.2006) IN
60/844,350	14 Septiembre 2006 (14.09.2006) US

(71) Solicitante e
(72) Inventor: **SHROFF, Geeta** [IN/IN]; 487 Hardevpuri, Gautam Nagar, New Delhi 115049 (IN).

(81) Estados designados: *(a menos que se indique lo contrario, para cada tipo de protección nacional disponible):* AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados: *(a menos que se indique lo contrario, para cada tipo de protección regional disponible):* Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:
- *con reporte internacional de búsqueda*
- *antes del vencimiento de la fecha para modificar las reivindicaciones y para ser republicada en caso de que se reciba reporte de modificaciones*

(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda internacional: 24 abril 2008

(54) Título: COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CELULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS Y SUS DERIVADOS, METODOS DE USO Y METODOS DE PREPARACION

(57) Resumen: La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende preparaciones de células madre embrionarias humanas (hES) y sus derivados, y a métodos para su transplante en el cuerpo humano, en donde el transplante da como resultado la inversión clínica de síntomas, cura, estabilización o detención de degeneración de una amplia variedad de condiciones, enfermedades y trastornos médicos actualmente incurables y terminales. La invención se refiere además a procesos nuevos para preparar líneas de células madre nuevas que están libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados. Esta invención se refiere además al aislamiento, cultivo, mantenimiento, expansión, diferenciación, almacenamiento y conservación de estas células madre.

WO 2007/141657 A3 (Código de barras)

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

A. CLASIFICACION DEL TEMA

De acuerdo a la Clasificación de Patentes Internacional (IPC) o a la clasificación nacional y a la IPC.

INV. A61K35/48 A61K35/12 C12N5/06 A61P25/00

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido por los símbolos de clasificación):

A61K

Documentación buscada diferente a la documentación mínima, a la extensión que tales documentos están incluidos en los campos buscados:

Base de datos electrónicos consultados durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, en donde sea práctico, términos de búsqueda utilizados):

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERA QUE SON RELEVANTES

Categoría*	Cita del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para la Reiv. No.
X	WANG W-H ET AL: "Human embryonic stem cell renglones are contaminated: What should we do?" HUMAN REPRODUCTION 2005 UNITED KINGDOM, vol. 20, no. 11, 2005, páginas 2987-2989, XP002466325 ISSN: 0268-1161 1460-2350 todo el documento página 2988, columna izquierda, último párrafo ----- -/--	28,29 21-27, 30, 61-84, 92-116

[X] Documentos adicionales se enlistan en la continuación del bloque C [X] Véase familia de patentes anexa.

* Categorías especiales de los documentos citados
"A" documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera ser de particular relevancia.
"E" documento anterior publicado en o después de la fecha de presentación internacional.
"L" documento el cual puede arrojar dudas sobre la(s) eivindicación(es) de prioridad o el cual se cita para establecer la fecha de publicación de otra cita u otra razón especial (como se especifica)
"O" documento que se refiere a una descripción oral, uso, exhibición u otro medio
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada.
"T" documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y no en conflicto con la solicitud, pero citado para entender el principio o teoría fundamental de la invención.
"X" documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede ser considerada nueva o no se puede considerar que involucre una etapa inventiva cuando el documento es considerado de manera aislada.
"Y" documento de particular relevancia; no se puede considerar que la invención involucre una etapa inventiva cuando el documento es combinado con uno o más de tales documentos, tal combinación sería obvia para una persona experimentada en la técnica.
"y" documento miembro de la misma familia de patentes.

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional	Fecha de envío del reporte de búsqueda internacional
4 febrero 2008	18/02/2008

Nombre y dirección de correspondencia de la ISA/US	Funcionario Autorizado
Oficina Europea de Patentes, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016	MATEO ROSELL, A

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

C. (Continuación) DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERA QUE SON RELEVANTES

Categoría	Cita del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para la Reiv. No.
X	WO 02/18549 A (MARIA BIOTECH CO LTD [KR]) 7 marzo 2002 (2002-03-07)	28,29
Y	Abstract página 10, renglón 23 - página 12, renglón 5 página 14, renglón 28 - página 15, renglón 1 página 17, renglón 21 - página 19, renglón 31; ejemplo 7 ----	21-27, 30, 61-84, 92-116
Y	AMIT M ET AL: "Feeder Layer- and Serum-Free Culture of Human Embryonic Stem Cells" BIOLOGY OF REPRODUCTION 2004 UNITED STATES, vol. 70, no. 3, 2004, páginas 837-845, XP002466324 ISSN: 0006-3363 resumen página 837, columna izquierda, párrafo 1 - página 838, columna izquierda, párrafo 1 página 842, columna izquierda, párrafo 2 - página 844, columna derecha, último párrafo ----	21-27 61-84, 92-116
Y	KLIMANSKAYA I ET AL: "Human embryonic stem cells derived without feeder cells" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, vol. 365, no. 9471, 7 Mayo 2005 (2005-05-07), páginas 1636-1641, XP004882308 ISSN: 0140-6736 resumen página 1636, columna izquierda, párrafo 1 - página 1638, columna derecha, último párrafo página 1640, columna derecha, párrafo 2 - página 1641, columna izquierda, párrafo 2 ----	21-27, 61-84, 92-116
Y	STOJKOVIC P ET AL: "HUMAN-SERUM MATRIX SUPPORTS UNDIFFERENTIATED GROWTH OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS" STEM CELLS, ALPHAMED PRESS, DAYTON, OH, US, vol. 23, no. 7, agosto 2005 (2005-08), páginas 895-902, XP009065121 ISSN: 1066-5099 resumen página 895, columna izquierda, párrafo 1 - página 896, columna derecha, párrafo 1 página 900, columna izquierda, párrafo 1 - página 901, columna derecha, párrafo 1 ---- -/--	21-27, 61-84, 92-116

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

C. (Continuación) DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERA QUE SON RELEVANTES

Categoría	Cita del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para la Reiv. No.
Y	EZASHI T ET AL: "Low 02 tensions and the prevention of differentiation of hES cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 29 MAR 2005 UNITED STATES, vol. 102, no. 13, 29 marzo 2005 (2005-03-29), páginas 4783-4788, XP002466326 ISSN: 0027-8424 resumen página 4783, columna izquierda, párrafo 2 - columna derecha, párrafo 2; figure 1 página 4787, columna derecha, párrafo 3 página 4788, columna derecha, párrafo 2	21-27, 61-84, 92-116
Y	WO 2004/007696 A (NISTOR GABRIEL I [US]; KEIRSTEAD HANS S [US]; UNIV CALIFORNIA [US]) 22 enero 2004 (2004-01-22) resumen página 3, renglones 15-25 página 10, renglón 34 - página 20, renglón 2; ejemplos 1-5	21-27, 61-84, 92-116
Y	WO 2004/081172 A (RELIANCE LIFE SCIENCES PVT LTD [IN]; TOTEY SATISH MAHADEORAO [IN]; RAV) 23 septiembre 2004 (2004-09-23) resumen página 7, párrafo 18 página 8, párrafo 20 - página 11, párrafo 29 página 35, párrafo 94 - página 46, párrafo 129	21-27, 61-84, 92-116
Y	ZHANG S-C ET AL: "In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 19, no. 12, diciembre 2001 (2001-12), páginas 1129-1133, XP002268706 ISSN: 1087-0156 resumen página 1130, columna derecha, párrafo 2 página 1131, columna izquierda, párrafo 2 página 1132, columna derecha, párrafo 2 página 1133, columna derecha, párrafo 2	21-27, 61-84, 92-116

-/--

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

C. (Continuación) DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERA QUE SON RELEVANTES

Categoría	Cita del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para la Reiv. No.
Y	REUBINOFF B E ET AL: "Neural progenitors from human embryonic stem cells" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 19, no. 12, diciembre 2001 (2001-12), páginas 1134-1140, XP002971362 ISSN: 1087-0156 resumen página 1138, columna derecha, párrafo 1 - página 1139, columna izquierda, párrafo 2	21-27, 61-84, 92-116

	MCDONALD J W ET AL: "TRANSPLANTED EMBRYONIC STEM CELLS SURVIVE, DIFFERENTIATE AND PROMOTE RECOVERY IN INJURED RAT SPINAL CORD" NATURE MEDICINE, NATURE AMERICA, NEW YORK, US, vol. 5, no. 12, diciembre 1999 (1999-12), páginas 1410-1412, XP002933176 ISSN: 1078-8956 citado en la solicitud resumen página 1411, columna izquierda, párrafo 4 - página 1412, columna derecha, párrafo 4	21-27, 61-84, 92-116

	HARPER J M ET AL: "Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 04 MAY 2004 UNITED STATES, vol. 101, no. 18, 4 Mayo 2004 (2004-05-04), páginas 7123-7128, XP002466977 ISSN: 0027-8424	21-27, 61-84, 92-116
	citado en la solicitud resumen página 7123, columna izquierda, párrafo 1 - columna derecha, párrafo 2; figures 1-3 página 7127, columna derecha, párrafo 2 - página 7128, columna derecha, párrafo 2	21-27, 61-84, 92-116

	-/--	

Forma PCT/ISA/210 (continuación de la segunda hoja) (Julio de 1992)

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

C. (Continuación) DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERA QUE SON RELEVANTES

Categoría	Cita del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para la Reiv. No.
Y	KERR D A ET AL: "Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury" JOURNAL OF NEUROSCIENCE 15 JUN 2003 UNITED STATES, vol. 23, no. 12, 15 Junio 2003 (2003-06-15), páginas 5131-5140, XP002466978 ISSN: 0270-6474 citado en la solicitud resumen página 5138, columna derecha, párrafo 3 - página 5139, columna derecha, párrafo 1	21-27, 61-84, 92-116
Y	US 2002/019046 A1 (CARPENTER MELISSA K [US] ET AL) 14 Febrero 2002 (2002-02-14) página 2, párrafo 23 - página 3, párrafo 30 página 6, párrafo 73 - página 11, párrafo 119; ejemplos 1-5	21-27, 61-84, 92-116
Y	WO 2005/099758 A (STANDARD OIL CO [US]; KOFIDIS THEODOROS [DE] TRUSTEES THE LELAND STAND) 27 octubre 2005 (2005-10-27). resumen página 1, renglones 5-10 página 7, renglón 6 - página 10, renglón 20; ejemplos I-V	21-27, 61-84, 92-116
Y	GERECHT-NIR S ET AL: "The promise of human embryonic stem cells" BAILLIERE'S BEST PRACTICE AND RESEARCH. CLINICAL OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY, BAILLIERE TINDALL, LONDON, GB, vol. 18, no. 6, diciembre 2004 (2004-12), páginas 843-852, XP004664903 ISSN: 1521-6934 todo el documento	21-27, 61-84, 92-116
Y	SCHULDINER MAYA ET AL: "Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 97, no. 21, 10 octubre 2000 (2000-10-10), páginas 11307-11312, XP002184277 ISSN: 0027-8424 todo el documento	21-27, 61-84, 92-116

-/-

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

C. (Continuación) DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERA QUE SON RELEVANTES

Categoría	Cita del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para la Reiv. No.
Y	RICHARDS M ET AL: "An efficient and safe Xeno-Free Cryopreservation method for the storage of human embryonic stem cells" STEM CELLS, ALPHAMED PRESS, DAYTON, OH, US, vol. 22, no. 5, 2004, páginas 779-789, XP002376917 ISSN: 1066-5099 todo el documento	21-27, 61-84, 92-116
A	---- HONG S H ET AL: "Expression of estrogen receptor-[alpha] and -[beta], glucocorticoid receptor, and progesterone receptor genes in human embryonic stem cells and embryoid bodies" MOLECULES AND CELLS 31 DEC 2004 GERMANY, vol. 18, no. 3, 31 diciembre 2004 (2004-12-31), páginas 320-325, XP002466327 ISSN: 1016-8478 todo el documento	31-52
A	---- SHI Q J ET AL: "Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts" ENDOCRINOLOGY 1993 UNITED STATES, vol. 132, no. 3, 1993, páginas 1387-1395, XP002466328 ISSN: 0013-7227 todo el documento	31-52
A	---- GERAMI-NAINI BEHZAD ET AL: "Trophoblast differentiation in embryoid bodies derived from human embryonic stem cells." ENDOCRINOLOGY APR 2004, vol. 145, no. 4, April 2004 (2004-04), páginas 1517-1524, XP002466329 ISSN: 0013-7227 todo el documento	31-52
Y	---- G.S. MUDUR: "BIG WONDER CELLS MESS - Medical research guiderenglones in India leave doctors free to do what they wish" INTERNET CITATION, [Online] 20 noviembre 2005 (2005-11-20), XP002466330 Retrieved from the Internet: URL:http://www.telegraphindia.com/1051120/asp/opinion/story_5496960.asp> todo el documento	
	---- -/--	

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

C. (Continuación) DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERA QUE SON RELEVANTES

Categoría	Cita del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para la Reiv. No.
T	"The Stem Cell 'Miracles'" INTERNET CITATION, [Online] 23 Mayo 2006 (2006-05-23), páginas 1-5, XP002466331 Retrieved from the Internet: URL:http://sci.rutgers.edu/forum/showthread.php?t=57401> todo el documento	
T	MANNELLO F ET AL: "Concise review: No breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: Conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not go" STEM CELLS 2007 UNITED STATES, vol. 25, no. 7, 2007, páginas 1603-1609, XP002466979 ISSN: 1066-5099 todo el documento	
T	SKOTTMAN HELI ET AL: "Culture conditions for human embryonic stem cells" REPRODUCTION (CAMBRIDGE), vol. 132, no. 5, noviembre 2006 (2006-11), páginas 691-698, XP002466980 ISSN: 1470-1626 todo el documento	
T	DE SOUSA PAUL A ET AL: "The road to providing human embryo stem cells for therapeutic use: the UK experience" REPRODUCTION (CAMBRIDGE), vol. 132, no. 5, noviembre 2006 (2006-11), páginas 681-689, XP002466981 ISSN: 1470-1626 todo el documento	
T	GRUEN LORI ET AL: "Concise review: Scientific and ethical roadblocks to human embryonic stem cell therapy" STEM CELLS (MIAMISBURG), vol. 24, no. 10, octubre 2006 (2006-10), páginas 2162-2169, XP002466982 ISSN: 1066-5099 todo el documento	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

Bloque II Observaciones cuando ciertas reivindicaciones se encontraron inescrutables (Continuación del ítem 2 de la primera hoja)

Este Reporte de Búsqueda Internacional no ha sido establecido con respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Nos. de reivindicaciones:
porque se refieren a materia que no se requirió buscar por esta Autoridad, a saber:
Aunque las reivindicaciones 61-114 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda se ha llevado a cabo y con base en los supuestos efectos del compuesto/composición.

2. ☐ Nos. de reivindicaciones:
porque se refieren a partes de la Solicitud Internacional que no cumplen con los requerimientos prescritos a tal grado de que no se pudo llevar a cabo ninguna Búsqueda Internacional significativa, específicamente:

3. ☐ Nos. de reivindicaciones:
porque son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de acuerdo con la segunda y tercera frases de la Regla 6.4(a).

Bloque III Observaciones cuando carece unidad de invención (Continuación del ítem 3 de la primera hoja)

a Autoridad de Búsqueda Internacional encontró varios inventores en esta solicitud internacional, como sigue

1. ☐ Ya que se pagaron a tiempo por el solicitante todas las cuotas de búsqueda adicionales requeridas, este Reporte de Búsqueda Internacional cubre todas las reivindicaciones escrutables.

2. ☐ Ya que todas las reivindicaciones escrutables pudieron escrutarse sin esfuerzo que justificara una cuota adicional, esta Autoridad no solicitó el pago de ninguna cuota adicional.

3. ☐ Ya que sólo algunas de las cuotas de búsqueda adicionales requeridas se pagaron a tiempo por el solicitante, este Reporte de Búsqueda Internacional cubre sólo las reivindicaciones para las cuales se pagaron cuotas, específicamente las reivindicaciones Nos.:

4. ☐ No se pagaron a tiempo por el solicitante las cuotas de búsqueda adicionales requeridas. En consecuencia, este Reporte de Búsqueda Internacional está restringido a la invención mencionada primero en las reivindicaciones; está cubierta por las Reivindicaciones Nos.:

Aclaración acerca de la Protesta

- ☐ Las tarifas de búsqueda adicionales estaban acompañadas por la protesta del solicitante y, cuando aplica, el pago de una tarifa de protesta
- ☐ Las tarifas de búsqueda adicionales estaban acompañadas por la protesta del solicitante pero el pago de tarifa de protesta aplicable no fue pagado dentro del tiempo límite especificado en la invitación.
- ☐ Ninguna protesta acompañó al pago de las tarifas de Búsqueda adicionales.

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información acerca de los miembros de la familia de patentes

No. de solicitud internacional
PCT/IB2007/002292

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 0218549	A 07-03-2002	AU 785428 B2	17-05-2007
		AU 6556501 A	07-03-2002
		CN 1350059 A	22-05-2002
		US 2002045259 A1	18-04-2002
WO 2004007696	A 22-01-2004	AU 2003250477 A1	02-02-2004
		CA 2489203 A1	22-01-2004
		EP 1523549 A2	20-04-2005
		GB 2407822 A	11-05-2005
		JP 2005532079 T	27-10-2005
		US 2004009593 A1	15-01-2004
		US 2005101014 A1	12-05-2005
WO 2004081172	A 23-09-2004	AU 2004219851 A1	23-09-2004
		BR PI0408733 A	07-03-2006
		CA 2518577 A1	23-09-2004
		EP 1613726 A2	11-01-2006
		JP 2006521807 T	28-09-2006
		KR 20060010725 A	02-02-2006
		US 2006211109 A1	21-09-2006
US 2002019046	A1 14-02-2002	NINGUNO	
WO 2005099758	A 27-10-2005	NINGUNO	

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial De La Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(Código de barras)

(43) Fecha de publicación internacional:
13 Diciembre 2007 (13.12.2007)

(10) Número de Publicación Internacional:
PCT WO 2007/141657 A2

(51) Clasificación[7] de patente internacional:
A61K 35/48 (2006.01) *C12N 5/06* (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)

(21) Número de solicitud internacional: PCT/IB2007/002292

(22) Fecha de presentación internacional: 6 marzo 2007 (06.03.2007)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos de prioridad:

582/DEL/2006	7 Marzo 2006 (07.03.2006) IN
1500/DEL/2006	26 Junio 2006 (26.06.2006) IN
60/844,350	14 Septiembre 2006 (14.09.2006) US

(71) Solicitante e
(72) Inventor: **SHROFF, Geeta** [IN/IN]; 487 Hardevpuri, Gautam Nagar, New Delhi 115049 (IN).

(81) Estados designados: *(a menos que se indique lo contrario, para cada tipo de protección nacional disponible):* AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados: *(a menos que se indique lo contrario, para cada tipo de protección regional disponible):* Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:
- sin reporte internacional de búsqueda y para ser republicada en cuanto se reciba dicho reporte

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas refiérase a las "Notas de Guía en Códigos y Abreviaturas" que aparece a comienzo de cada publicación regular de la Gaceta del PCT

(54) Título: COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CELULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS Y SUS DERIVADOS, METODOS DE USO Y METODOS DE PREPARACION

(57) **Resumen:** La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende preparaciones de células madre embrionarias humanas (hES) y sus derivados, y a métodos para su transplante en el cuerpo humano, en donde el transplante da como resultado la inversión clínica de síntomas, cura, estabilización o detención de degeneración de una amplia variedad de condiciones, enfermedades y trastornos médicos actualmente incurables y terminales. La invención se refiere además a procesos nuevos para preparar líneas de células madre nuevas que están libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados. Esta invención se refiere además al aislamiento, cultivo, mantenimiento, expansión, diferenciación, almacenamiento y conservación de estas células madre.

WO 2007/141657 A2 (Código de barras)

COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CELULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS Y SUS DERIVADOS, METODOS DE USO Y METODOS DE PREPARACION

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden células madre embrionarias humanas (hES) o sus derivados, las células madre están libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibrolastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, para usarse en el tratamiento de enfermedades, condiciones o trastornos médicos actualmente incurables o terminales. Más particularmente, la invención se refiere a métodos de tratamiento de trastornos clínicos y condiciones terminales o actualmente incurables usando células hES por medio de un protocolo de transplante. La invención se refiere además a procesos nuevos para preparar líneas de células madre nuevas las cuales están libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos,

suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados. Esta invención se refiere además al aislamiento, cultivo, mantenimiento, expansión, diferenciación, almacenamiento y conservación de las células madre.

Técnica anterior

Un gran número de trastornos, condiciones y enfermedades médicas humanas son ya sea actualmente incurables a través de las terapias de fármaco, cirugía o métodos de transplante existentes, o son terminales.

Las células madre tienen la capacidad de dividirse para generar células "hijas" que conservan las propiedades de la célula madre, o de producir hijas que empiezan a diferenciarse en un tipo de célula más especializado, o de producir una célula hija de cada tipo. Las células madre son entonces cruciales para el crecimiento y desarrollo humano normal, y debido a sus características intrínsecas también son fuentes potenciales de células nuevas para la regeneración de tejido dañado o enfermo. Las células madre están presentes en todas las etapas de desarrollo y en muchos (posiblemente la mayoría) tejidos del adulto. Células madre de diferentes tejidos, y de diferentes etapas de desarrollo, varían en términos del número y tipo de células a las cuales

dan origen normalmente. Las principales clases de células madre de acuerdo con esta clasificación son las células madre embrionarias, células madre somáticas y células germinales embrionarias.

En las primeras etapas después de la fertilización (hasta la octava etapa celular), todas las células del embrión son totipotentes (es decir, tienen la capacidad de desarrollarse en cada tipo de célula requerida para el desarrollo completo, incluyendo tejidos extra-embrionarios tales como la placenta y el cordón umbilical). Después de aproximadamente dos a cinco días se alcanza la etapa de blastocisto. Dentro de esta bola de 50-100 células descansa la masa celular interna, la cual se desarrollará en el embrión adecuado. La masa celular interna comprende aproximadamente un cuarto de todas las células en esta etapa de desarrollo y una clase única de células madre; las células madre embrionarias. Las células madre embrionarias tienen la capacidad innata o potencial de diferenciarse en cada uno de los 200 y tantos tipos de células del cuerpo y se describen como pluripotentes. La capacidad de las células hES para contribuir a todos los tipos de tejidos en desarrollo aún no ha sido completamente establecida, pero pueden hacerse crecer durante largos periodos de tiempo en cultivo y expandirse en número sin cambiar sus genotipos o fenotipos celulares, y conservando su estado pluripotente bajo estas condiciones.

Después de la etapa de blastocisto, las células madre comprenden una proporción descendente de células en el embrión, feto y cuerpo adulto. Muchos si no es que la mayoría de los tejidos en el feto y adulto contienen células madre, las cuales, en su ubicación normal, tienen el potencial de diferenciarse en un número limitado de tipos de células específicos para de esta manera regenerar el tejido en el cual residen normalmente. Estas células madre (células madre somáticas) son multipotentes y pueden tener un potencial más restringido que las células madre embrionarias toda vez que normalmente dan origen a algunos pero no todos los tipos de células del cuerpo humano. Las principales fuentes de células madre somáticas son la médula ósea y sangre de cordón del feto y adulto.

Las células madre embrionarias sirven como un excelente sistema *in vitro* para estudiar eventos de diferenciación celular, tamizado de fármacos y como una fuente primaria de células diferenciadas especializadas para aplicaciones terapéuticas regeneradoras futuras.

Las células madre embrionarias, al ser pluripotentes, tienen el potencial de desarrollo de dar origen a cualquier tipo de célula diferenciada. Así, una enfermedad que resulte de la falla o desregulación, ya sea genética o adquirida, de tipos de células específicas es potencialmente tratable por el transplante de células hES o

sus derivados mediante reemplazo de las células defectuosas y regeneración del órgano o tejido afectado y también al estimular el tejido latente y que muere.

Se ha sugerido que el transplante de células hES o sus derivados en el cuerpo humano tiene el potencial como un medio para resolver necesidades médicas no satisfechas.

Se ha considerado ampliamente que el transplante de células hES revolucionará el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, condiciones y trastornos pero, hasta la fecha, los estudios han sido restringidos a estudios preclínicos en ratones y primates. Es cuestionable si los resultados observados en modelos con animales son verdaderamente representativos de los eventos que pudieran ocurrir después del transplante de estas células en el humano. Además, sin el uso clínico del concepto, las composiciones farmacéuticas, protocolos, rutas de administración y dosis de administración de las células madre siguen sin definir y sin probarse. Más aún, aunque las células madre humanas derivadas de fuentes que no son un embrión o xenotransplante de células, tejidos y órganos de otras especies han sido usadas en el escenario clínico, estos intentos han sido ampliamente inexitosos o presentan una variedad de efectos secundarios debilitadores.

La presente invención proporciona el transplante de una composición farmacéutica que comprende células hES y/o

sus derivados en humanos que sufren de una variedad de condiciones, enfermedades o trastornos actualmente incurables o terminales.

La patente de E.U.A. No. 5,453,457 describe una composición que comprende células pluripotentes de mamífero no murino derivadas de una célula germinal primordial y que incluyen factor de crecimiento de fibroblasto básico, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y factor inhibidor de leucemia.

La patente de E.U.A. No. 6,800,480 reclama una composición que comprende células hES no diferenciadas que proliferan en una matriz extracelular.

La solicitud de patente de E.U.A. No. 2003/0017587 describe la expansión *in vitro* de células madre embrionarias no diferenciadas obtenidas de un feto abortado o de blastocistos en etapa de corte frescos o congelados usando un medio de cultivo que no requiere células alimentadoras. Una vez aisladas, las células madre embrionarias son introducidas en un medio de cultivo de células complementado con factores de crecimiento, suero bovino fetal, factor de crecimiento neuronal, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble o medios acondicionados que no son deseables en vista de potenciales efectos secundarios después de su transplante en un paciente. Igualmente, la mencionada

solicitud de patente no dice nada acerca del protocolo que se usará para el tratamiento de trastornos genéticos o clínicos excepto que el paciente requiere de una dosis de cada tipo de célula.

La solicitud de patente de E.U.A. 2004/0071665 proporciona un método terapéutico que emplea células madre de mamífero para el tratamiento de cardiopatologías. Este ejemplo proporciona células madre embrionarias diferenciadas para formar un racimo cardiomiogénico, cultivada sobre células alimentadoras y luego inyectado en tres sitios del corazón de un ratón que tiene infarto del miocardio.

La solicitud de patente de E.U.A. No. 2004/0107453 describe un método para obtener, mantener y diferenciar células madre adultas y su uso en tratamiento terapéutico.

La solicitud de patente de E.U.A. No. 2005/0124003 describe un método para obtener, mantener y diferenciar células madre fetales y su uso en tratamiento terapéutico.

En particular, y de relevancia particular para la presente invención, el transplante de células madre embrionarias en modelos de Lesión de Médula Espinal (SCI) en ratón han mostrado claramente su futuro potencial como un tratamiento de primera línea de SCI aguda (McDonald et al., (1999) Nature Med. 5:1410; Kerr et al., (2003) J. Neurosci. 23:5131; Roy et al., (2004) Nature Biotechnology, 22:297; Hori et al., (2003) Stem Cells, 21:405; Harper, (2004) Proc.

Natl. Acad. Sci. 101:7123). A pesar de la eficacia demostrada en modelos con animales, el escepticismo con respecto a problemas de rechazo de injerto contra huésped, la necesidad potencial de administración de por vida de inmunosupresores y la formación de tumores y teratomas han retrasado las autorizaciones para reproducir la seguridad y eficacia preclínica en pruebas con humanos experimentales. Un problema adicional que enfrenta el diseño de estudios clínicos y de particular relevancia para la presente invención es que, hasta el momento, no hay protocolos o programas de administración establecidos, no hay estudios de lo que pudiera ser una dosis terapéuticamente efectiva o una composición farmacéutica activa, o qué tipos de células o combinaciones de células deben usarse.

Por lo tanto un objetivo de la presente invención es desarrollar composiciones farmacéuticas que comprendan células hES y sus derivados las cuales estén libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados suspendidos en una solución biocompatible, portadora o matriz, entonces adecuada para uso humano.

Otro objetivo más de la presente invención es desarrollar un protocolo para el tratamiento de trastornos actualmente incurables o terminales.

Un objetivo más de la presente invención es desarrollar un protocolo para el tratamiento de SCI (Lesión de Médula Espinal).

Las composiciones de la presente invención son simples de preparar, seguras, económicas, eficientes, fácilmente transportables, escalables, tienen una vida útil adecuada y están libres de efectos secundarios tales como reacciones antígeno-anticuerpo, enervaciones aberrantes, tumorigenicidad, formación de teratomas o rechazo de injerto contra huésped. Asimismo, la presente invención requiere de sólo un embrión y por consiguiente el suministro continuo de embriones humanos no se requiere. Igualmente, el protocolo para tratamiento de acuerdo con la presente invención no requiere el uso de inmunosupresores, y no depende de tipificación de HLA, no depende de raza, género o edad del sujeto tratado para el tratamiento efectivo de las enfermedades, condiciones o trastornos, no tiene regresión y no tiene la necesidad de un entrenamiento anterior en la técnica de administración. El tratamiento de sujetos con las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la práctica de la presente invención es por lo tanto posible en cualquier instalación clínica adecuadamente equipada a nivel mundial.

Para transplantar células madre embrionarias humanas en humanos para propósitos terapéuticos es importante que estas células estén libres de contaminación tal como bacterias, virus, priones o tiroides. La adopción de prácticas de laboratorio operacionales estándares tales como adecuadas prácticas de fabricación y clínicas reducen el riesgo de estas contaminaciones a un nivel aceptable.

Los riesgos para el paciente existen, no obstante, a través de metodologías de cultivo de células existentes.

Un gran riesgo es que los componentes del medio de cultivo de células, mantenidos en el producto farmacéutico para su administración a sujetos humanos, se administren y por lo tanto representen un riesgo para el paciente a través de efectos secundarios hasta el momento no anticipados que no hubieran podido ser anticipados a través de estudios de "seguridad" en pruebas con animales.

La eliminación de este riesgo es por lo tanto deseable.

Las características de una fuente de cultivo de células madre embrionarias para su administración a sujetos humanos ha sido identificada como teniendo el siguiente diseño: son capaces de proliferación durante un periodo de tiempo extendido sin diferenciación, mantienen un cariotipo en el cual todas las características del donador se conservan fielmente durante el cultivo, mantienen el potencial de

diferenciarse en derivados del endodermo, mesodermo y ectodermo a través del cultivo, no se diferenciarán cuando sean cultivadas en ausencia de factores exógenos, no darán origen a teratomas, no serán inmunogénicas, no formarán conexiones aberrantes y tejido ectópico, actuarán en el tejido dañado y no se dividirán continuamente *in vivo* sino que están programadas para hacerlo en un ciclo de vida natural. No debe haber contaminantes presentes en la metodología de cultivo y la línea de células descrita en la invención.

El principal impulso de investigación hasta ahora ha sido desarrollar condiciones de cultivo que satisfagan estos requerimientos, pero hasta la fecha ninguna de estas condiciones han sido esperanzadoras o validadas a través de pruebas clínicas. En particular, la investigación hasta la fecha se ha enfocado en la eliminación del requerimientos de células alimentadoras de ratón como una matriz para el crecimiento y des-diferenciación de un cultivo de células madre embrionarias humanas. El remedio parcial de proporcionar factores de crecimiento desconocidos a través de la remoción de células alimentadoras y la suplementación de "medios acondicionados" también ha revelado un riesgo inaceptable en el medio de cultivo ideal. Las células madre embrionarias humanas cultivadas en presencia de medios acondicionados alimentadores conservan aún un riesgo

inherente de contaminación y por lo tanto un riesgo inaceptable durante su transplante a humanos.

Un factor adicional en el diseño de condiciones de cultivo de células madre embrionarias humanas destinadas para su administración a humanos es la cuestión de complementos exógenos residuales en los medios que pudieran estar presentes en la composición farmacéutica administrada pero que son esenciales durante la fase de expansión celular.

Estos incluyen factor de crecimiento de fibroblastos, factor inhibidor de leucemia, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble, suero, albúminas u suplementos de albúmina, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, transferrinas o suplementos de transferrina, antioxidantes, insulina o sustitutos de insulina, precursores de colágeno o sustitutos de precursor de colágeno, elementos residuales, residuos de "medios acondicionados", productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos y suplementos vitamínicos.

Los residuos de estos suplementos adicionales se ven como riesgos innecesarios para la seguridad de los pacientes durante el transplante de células madre embrionarias humanas en estos sujetos. Además, la suplementación de estos factores en el medio de cultivo se

añade al riesgo de contaminación del ambiente y se añade al costo futuro de una terapia con células madre y por lo tanto limita su capacidad de aplicación en una amplia gama de enfermedades, condiciones o trastornos médicos.

Un número de enfoques han sido adoptados para reducir estos riesgos incluyendo: las patentes de E.U.A. y solicitudes Nos. 5,843,780; 5,690,926; 6,642,048; 6,800,480; 5,166,065; 6,200,806; 5,453,357; 6,090,622; 6,562,619; 6,921,632, 2006/0073587 y 2002/076747.

Sin embargo, ninguno de estos enfoques ofrecen un sistema para la producción de un producto farmacéutico que contenga células madre embrionarias humanas y sus derivados el cual esté libre de factores potencialmente contaminantes que pudieran afectar la eficacia y seguridad de células madre embrionarias humanas y sus derivados después de administración a humanos.

Es por lo tanto otro objetivo de la invención desarrollar un sistema de cultivo de células simplificado para la expansión de las células hES y sus derivados en un estado sustancialmente no diferenciado para producir así un producto farmacéutico que esté listo para usarse en una amplia variedad de trastornos médicos.

Más particularmente, un objetivo de la presente invención es proporcionar una técnica de cultivo que produzca una línea de células madre libre de productos animales,

células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden células hES y/o sus derivados, y el uso de las células hES y sus derivados para tratar una amplia variedad de condiciones, enfermedades y trastornos en las que las células madre se introducen en el cuerpo humano mediante una variedad de rutas de administración, aplicaciones tópicas o inserción intralesional.

La presente invención proporciona además un método para tratar un sujeto que sufra de una enfermedad, trastorno o condición terminal o actualmente incurable, que comprende un programa de administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES o sus derivados mediante inyección intramuscular, intravenosa, caudal, intravítrea, intraestriatial, intraparenquimal, intratecal, epidural, retrobulbar, subcutánea, intracardiaca, intracística, intra-articular o intratecal, infusión por catéter epidural, infusión por catéter de bloque

subaracnoide, infusión intravenosa, por medio de nebulizador, por medio de aspersor, por medio de rutas intravaginales, por medio de gotas oculares y óticas locales, y un programa de administración de las células hES y sus derivados tópicamente o intralesionalmente.

Es preferible usar células hES o sus derivados que estén libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos vitamínicos, suplementos aminoácidos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, para evitar cualquier probabilidad de contaminación y posibilidades de efectos secundarios negativos. Las células hES y sus derivados pueden obtenerse a través de cualquier metodología de cultivo de células conocida y aprobada, la cual está libre de células alimentadoras, y libre de contaminación de cualquier fuente y segura para transplante a humanos. Los derivados de hES incluyen células diferenciadas más del cuerpo humano.

La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades, trastornos o condiciones terminales o actualmente incurables que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células hES o sus derivados están libres de

productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, suspendidos en una solución farmacéuticamente aceptable y biocompatible o cualquier otro vehículo portador.

La presente invención incluye también células hEs y/o sus derivados libres de productos animales, células alimentadoras, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, combinaciones de minerales complementarios, suplementos de aminoácidos, suplementos vitamínicos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana, factor Steel soluble y medios acondicionados, atrapados en un material o matriz biocompatible. El material biocompatible o matriz puede seleccionarse de biopolímeros, incluyendo polipéptidos o proteínas, polisacáridos, incluyendo fibronectina, varios tipos de colágeno, laminita, queratina, fibrina, fibrinógeno, ácido hialurónico, sulfato de heparina, sulfato de condroitina, agarosa o gelatina.

Las composiciones de la presente invención pueden estar en una forma de fármaco listo para usar en las cuales las células madre tienen viabilidad adecuada, es decir, tienen una viabilidad lo suficientemente alta como para ser

útiles en uno o más métodos de la presente invención. En una modalidad, las células madre tienen una viabilidad de más de aproximadamente 40%, por ejemplo más de alrededor de 50%, 60%, 70% u 80%. Las composiciones pueden incluir además un agente antimicrobiano, agente antibacteriano, producto hormonal u otro agente farmacéutico.

Para preparar las composiciones, alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o uno o más de sus derivados tales como progenitores de células madre hematopoyéticas, progenitores de células madre neuronales, progenitores de células madre mesenquimáticas, progenitores de células madre productoras de insulina, progenitores de células madre de hepatocitos, progenitores de células madre cardiacas, progenitores de células madre epiteliales o mezclas de los mismos se suspenden en aproximadamente 0.25 mL a alrededor de 100 ml de un vehículo portador. En una modalidad, aproximadamente 750,000 a alrededor de 80 millones de células hES se suspenden en alrededor de 0.25 ml a aproximadamente 10 ml del vehículo portador. En enriquecimiento para tipos progenitores de células madre diferenciados específicos en una población es una prioridad, aunque una proporción de células madre no diferenciadas permanecerá en la composición. En una modalidad, la porción de células madre no diferenciadas será de no más de aproximadamente 80% de la población total de

células. En otra modalidad, la porción de células madre no diferenciadas será de no más de alrededor de 40% de la población total de células.

Las enfermedades terminales y otros trastornos o condiciones que pueden ser tratados o reducidos de acuerdo con la presente invención incluyen, sin limitación, cáncer, trastornos hepáticos y renales, trastornos del sistema nervioso, trastornos de la piel, trastornos autoinmunes, trastornos genéticos, trastornos oculares, trastornos musculoesqueléticos, trastornos de fertilidad y reproductivos y trastornos cardiovasculares y sin limitación incluyen Leucemia Mieloide Aguda, Adenocarcinoma, Artritis, Astrocitoma, Atrofia del Nervio Auditivo, Autismo, Trastornos Autoinmunes, enfermedad de Alzheimer, Espondilitis Anquilosante, Distrofia Muscular de Becker, Daño Cerebral, Quemaduras, Accidente Cerebrovascular, Parálisis Cerebral, Coma, Ulceras Corneales, Rechazo de Injerto Corneal, Degeneración Cortico-Basal del Sistema Nervioso, Enfermedad de Arterias Coronarias, Diabetes, Demencia, Síndrome de Down, Distrofia Muscular de Duchenne, Enfermedad Renal en Etapa Terminal, Parálisis de Erb, Distrofia Muscular Fascio Escapular, Trastornos de Fertilidad, Ataxia de Friederich, Insuficiencia Cardiaca, Carcinoma Hepatocelular, Enfermedad de Neuronas Espino Motoras Hereditaria, Corea de Huntington, Enfermedad de Krabbe, Distrofia del Cíngulo de las

Extremidades, Cirrosis Hepática, Degeneración Macular, Retraso Mental, Esclerosis Múltiple, Enfermedad de Neuronas Motoras, Infarto del Miocardio, Síndrome Nefrótico, Enfermedad de Niemann Pick, Ulceración No Sanadora de la Piel, Atrofia Olivo-Ponto Cerebelar, Atrofia del Nervio Óptico, Mal de Parkinson, Encefalopatía Post Choque Eléctrico, Encefalopatía Post-Vacuna Contra la Rabia, Llagas por Presión, Parálisis Supranuclear Progresiva, Psoriasis, Ptisis Bulbi, Cardiomiopatía Restrictiva, Retinitis Pigmentosa, Bloque de Ramificación del Fascículo Derecho, Sarcoidosis, Bradicardia del Seno, Distrofia Muscular Espinal, Ataxia Espino Cerebelar, Síndrome de Steven Johnson, Lupus Eritematoso Sistémico, Trombocitopenia, Talasemia, Colitis Ulcerativa, Estado Vegetativo, Fibrosis Quística, Enfermedad Pulmonar Intersticial, Azoospermia, Insuficiencia Ovárica Primaria, Ulceras Aftosas, Desequilibrio Hormonal, Osteo-Artritis, Síndrome de Horner y Osteogénica Imperfecta, junto con Canalopatía e Hipogamaglobulinemia.

Más específicamente, la presente invención proporciona un método de tratamiento de SCI en un sujeto, que comprende:

a) administrar aproximadamente 750,000 a alrededor de 80 millones de células hES y/o sus derivados mediante inyección subcutánea;

b) repetir la etapa (a) después de un periodo

predeterminado y posteriormente administrar células hES y/o sus derivados mediante inyección intramuscular;

c) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas, mediante inyección o infusión intravenosa;

d) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección epidural y repetir la dosis después de un periodo predeterminado dependiendo de la condición del sujeto evaluada por examen clínico y/o neurológico;

e) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección caudal;

f) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales, mediante inyección intratecal o catéter de bloque subaracnoide;

g) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales,

mediante inyección epidural o catéter epidural;

h) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados mediante inyección espinal profunda sobre cada lado de la espina y

i) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados mediante infusión intravenosa;

en donde las etapas (a) e (b) se llevan a cabo primero y las etapas restantes pueden llevarse a cabo en cualquier orden. En una modalidad, la etapa (f) se repite seguida por la etapa (g), al menos una vez, hasta que el sujeto exhiba señales clínicas de recuperación de la SCI.

La invención proporciona también un método para tratar un sujeto con una enfermedad, trastorno y condición que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células hES y/o sus derivados cultivados en medio libre de productos animales, células alimentadoras, medios acondicionados, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de fibroblastos, factor Steel asociado a membrana o factor Steel soluble, mediante inyección intramuscular e inyección intravenosa o inyección intraepidural o catéter epidural o inyección retrobulbar inyección subcutánea o inyección intracardiaca o inyección intracística o inyección intratecal o mediante aplicación tópica o aplicación intralesional. En una modalidad, la

enfermedad, trastorno o condición es una enfermedad, trastorno o condición terminal o actualmente incurable.

La invención proporciona también un método para tratamiento de trastornos del sistema nervioso en desarrollo, degenerativos, hereditarios y traumáticos y ataque cerebrovascular que comprende la administración de alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre neuronales y progenitores de células madre hematopoyéticas solos o en combinación, mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intratecal, infusión por catéter epidural e infusión por catéter de bloque subaracnoide.

La invención proporciona también un método para el tratamiento de trastornos de la piel que comprende la administración de aproximadamente 750,000 a alrededor de 160 millones de células hES y/o sus derivados, en donde las células comprenden progenitores de células madre hematopoyéticas, mediante inyección subcutánea o intravenosa.

La invención proporciona también un método de tratamiento de úlceras por decúbito que comprende la administración de alrededor de 750,000 a aproximadamente 160 millones de células hES y/o sus derivados mediante aplicación local o tópica y mediante inyección intramuscular.

La invención proporciona también un método de