



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 292 187**

51 Int. Cl.:
C12N 5/08 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97923569 .4**
86 Fecha de presentación : **07.05.1997**
87 Número de publicación de la solicitud: **0915968**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.05.1999**

54 Título: **Aislamiento, propagación y diferenciación dirigida de células madre del sistema nervioso central de mamíferos.**

30 Prioridad: **23.05.1996 US 18206 P**
25.09.1996 US 719450

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

73 Titular/es: **Neuralstem Biopharmaceuticals**
Building 335, Paint Branch Drive
College Park, Maryland 20742, US

72 Inventor/es: **Johe, Karl, K.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aislamiento, propagación y diferenciación dirigida de células madre del sistema nervioso central de mamíferos.

5 **Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una tecnología en la que se aíslan células madre procedentes de cerebro embrionario y adulto, se propagan y se diferencian eficientemente en cultivo para generar grandes números de células nerviosas. Esta tecnología, por vez primera, permite generar grandes números de muchos tipos diferentes de neuronas que se encuentran en un cerebro normal y proporciona una nueva base para la terapia génica, la terapia de células, un nuevo rastreo de factores de crecimiento y un rastreo de fármacos para trastornos del sistema nervioso.

15 **2. Descripción de la técnica relacionada**

El cerebro está constituido por tipos de células nerviosas muy diversos que realizan interconexiones específicas y que, una vez destruidas, no regeneran a las células nerviosas (neuronas). Además, el cerebro está protegido por una barrera de sangre-cerebro (hematoencefálica) que bloquea eficazmente el flujo de grandes moléculas al cerebro, haciendo ineficaz la inyección periférica de potenciales fármacos para el factor de crecimiento. Así, un reto principal al que se enfrenta actualmente la industria biotecnológica consiste en encontrar un mecanismo eficaz para suministrar potenciales productos de terapia génica directamente al cerebro con el fin de tratar trastornos del sistema nervioso.

Además, para una enfermedad degenerativa tal como el Parkinson, el enfoque más amplio para recuperar una función neuronal perdida puede ser reemplazar las células dañadas por células sanas más que simplemente un producto génico sencillo. Así, el éxito actual y futuro de la terapia génica y la terapia de células depende del desarrollo de células adecuadas que (1) puedan portar una copia sana de un gen enfermizo (es decir, un gen normal), (2) puedan ser trasplantadas al cerebro y (3) puedan ser integradas en la red neuronal del hospedante. Este desarrollo requiere de manera ideal células de origen neuronal que (1) proliferen en cultivo hasta formar un gran número, (2) sean susceptibles a diversos métodos de transferencia de genes y (3) se integren y comporten como las células de un cerebro normal. Sin embargo, no ha habido este tipo de células para fines terapéuticos, ya que las neuronas no se dividen y, por lo tanto, no se pueden propagar en cultivo.

Como alternativas, diversas células transformadas de orígenes neurales y no neurales tales como glias, fibroblastos, e incluso células de la musculatura, que pueden proliferar en cultivo, se han utilizado como posibles vehículos para suministrar un gen de interés a las células del cerebro. Sin embargo, no se espera y no se puede esperar que células de este tipo proporcionen funciones neuronales. Otro enfoque alternativo ha sido obligar a una célula neural de origen desconocido a dividirse en cultivo modificando genéticamente alguna de sus propiedades, al tiempo que conserve algo de su capacidad de convertirse y funcionar como una neurona. A pesar de que algunas células “inmortalizadas” pueden exhibir determinadas características de una neurona, no está claro si estas células alteradas son ciertamente una alternativa viable para fines clínicos.

Un cerebro fetal en desarrollo contiene la totalidad de las células germinales para las células de un cerebro adulto, así como todos los programas necesarios para orquestarlos hacia la red final de neuronas. En las fases tempranas de desarrollo, el sistema nervioso está poblado por células germinales, de las que todas las otras células, principalmente neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, se derivan durante las subsiguientes fases de desarrollo. Claramente, células germinales de este tipo, que son precursores del desarrollo normal del cerebro serían ideales para todas las terapias basadas en genes y basadas en células, si estas células germinales pudieran aislarse, propagarse y diferenciarse en tipos de células maduras.

La utilidad de las células primarias aisladas, tanto para la investigación básica como para la aplicación terapéutica depende del grado al que las células aisladas se asemejen a las del cerebro. Se desconoce cuántos tipos diferentes de células precursoras existen en el cerebro en desarrollo. Sin embargo, pueden existir varios tipos de células distintos:

- 55 un precursor a neuronas únicamente (“progenitor neuronal comprometido” o “neuroblasto”),
- un precursor a oligodendrocitos solamente (“oligodendroblasto”),
- un precursor a astrocitos solamente (“astroblasto”),
- 60 un precursor bipotencial que puede convertirse en neurona u oligodendrocito, neurona o astrocito y oligodendrocito o astrocito, y
- un precursor multipotencial que conserva la capacidad de diferenciarse en uno cualquiera de los tres tipos de células.
- 65

El análisis del mapeo de destino y estudios de trasplante *in vivo* han demostrado que diferentes tipos neuronales y células no neuronales se pueden derivar de las mismas células precursoras¹⁻⁵. Análisis *in vitro* han sugerido tam-

bién que células multipotenciales están presentes en el cerebro en desarrollo^{6,7}. Sin embargo, el análisis del linaje solo no identifica directamente las células multipotenciales; y tampoco define los mecanismos que pueden impulsarlas a diferentes destinos. Células precursoras procedentes del sistema nervioso central (SNC) se han expandido *in vitro* y se ha observado⁸⁻¹² una diferenciación en neuronas y glia y, según se detalla más abajo, se han obtenido tipos de células acusadamente diferentes, incluso cuando las condiciones del cultivo utilizadas eran aparentemente las mismas.

Debido a la actual falta de comprensión de la histogénesis durante el desarrollo del cerebro, muchos investigadores han utilizado diversos términos sueltos para describir las células que han estudiado, por ejemplo progenitor neuronal, precursor neural, precursor neuroepitelial, célula madre multipotencial, etc. Así, la naturaleza de las células descrita hasta la fecha en la bibliografía y las condiciones de cultivo para obtenerlas únicamente se puede comparar una con otra por su capacidad de diferenciación reseñada. El objeto completo del aislamiento, caracterización y uso de células madre procedentes del SNC ha sido recientemente revisado^{33, 34, 38}.

En resumen, hasta la fecha no se han encontrado condiciones, a pesar de muchos informes, de identificar, propagar y diferenciar con éxito células madre multipotenciales. Una recopilación útil de estudios que informan del cultivo de células precursoras del SNC se encuentra en la Tabla 3, pág. 172 de una revisión reciente³⁴ y que se ofrece adicionalmente en lo que sigue.

Vicario-Abejon, C., Johe, K., Hazel, T., Collazo, D. y McKay, R., *Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons*, *Neuron* **15**, 105-114 (1995)¹².

Células expandidas por Vicario-Abejon *et al.* son significativamente diferentes de las descritas en la presente invención, a pesar de que el tejido de partida (hipocampo embrionario), el mitógeno (factor de crecimiento fibroblástico básico, bFGF - siglas en inglés), y el medio basal(N2) son similares en ambos informes. Casi todas las células expandidas por Vicario-Abejon *et al.* fracasaron en diferenciarse en cualesquiera tipos de células, y murieron en ausencia de bFGF (tal como se establece en el documento, pág. 106). Esto también se refleja en la Fig. 3 del documento en el que el número de neuronas MAP2 positivas es excesivamente bajo (50-100 células de un número inicial de células de aproximadamente 80.000 por pocillo; es decir, bastante menos del 1% en todas las condiciones reseñadas). Así, diferencias en las condiciones del cultivo, sutiles como pueden ser, pueden proporcionar células con propiedades significativamente diferentes, y esto, de hecho, es consistente con la observación principal de la presente invención de que el entorno extracelular puede desplazar las propiedades de desarrollo de las células madre del SNC.

Vicario-Abejon *et al.* utilizaron las siguientes condiciones de cultivo que difieren de las descritas en la presente invención:

1. Utilizaron una disociación enzimática, tripsina al 0,1-0,25% + DNAasa I al 0,4% para la disociación inicial del tejido, así como para el subsiguiente pase. La presente invención, la disociación enzimática provoca efectivamente la proteólisis de receptores de FGF y determina que las células no respondan a bFGF y conduce a la diferenciación.

2. Utilizaron suero de bovino fetal al 10% para detener la actividad de tripsina y para cebar a las células desde 4 horas hasta durante una noche antes de cambiar a un medio exento de suero. En la presente invención, el suero, incluso a una concentración menor que 1%, desplaza las células madre a un destino astrocítico.

3. Las células se sembraron a una mucho mayor densidad de 45.000 células por cm² y luego se hicieron crecer hasta confluencia antes del pase por tripsina y suero. En la presente invención, una alta densidad de células inhibe la proliferación y provoca una diferenciación espontánea, incluso en presencia de bFGF.

4. bFGF fue administrado sólo intermitentemente cada 2-3 días, y a 5 ng/ml, menor que la concentración óptima descrita en la presente invención. Esta condición conduce a una diferenciación parcial de las células y una subsiguiente heterogeneidad de los tipos de células en el cultivo.

5. El medio basal, consistente en componentes "N2", consistía en 5 ng/ml de insulina, menor que la concentración óptima descrita en la presente invención.

Ray, J., Peterson, D., Schinstine, M. y Gage, F., *Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3602-36-06 (1993)¹⁰.

Este estudio utilizó condiciones de cultivo que son muy similares a las descritas por Vicario-Abejon *et al.* -bFGF como el mitógeno primario, medio exento de suero e hipocampo E16 (edad embrionaria 16 días). Sin embargo, informa del aislamiento y la expansión de una población precursora (neuroblastos) bastante diferentes de las células de Vicario-Abejon *et al.* (no definido), así como las células madre multipotenciales descritas en la presente invención. Las células reseñadas tenían las siguientes propiedades que contrastaban acusadamente con las de células madre del SNC:

1. Las células expandidas bajo la condición reseñada son neuronas mitóticas con expresiones antigénicas de neurofilamento, nestina, enolasa específica para neuronas, galactocerebrósido y MAP2 (Tabla I, pág. 3604). Las células madre del SNC en expansión reseñadas en la presente invención expresan nestina solamente, son negativas para los antígenos anteriores y, por lo tanto, son una población de células molecularmente distintas de las descritas por Ray *et al.*

2. El análisis ultraestructural de las células expandidas en cultivo “demostró su morfología neuronal histotípica”. Las células madre del SNC en expansión exhibían una morfología no neuronal, completamente diferente.

3. Las “neuronas” mitóticas tenían un tiempo de duplicación de 4 días y podían ser pasadas y desarrolladas en forma de líneas de células continuas. Las células madre del SNC se duplican cada 20-24 horas y exhiben una regresión característica de la capacidad mitótica y de diferenciación a lo largo del tiempo, de modo que no pueden mantenerse indefinidamente como líneas de células estables.

4. El sistema de cultivo desarrollado por Ray *et al.* genera “cultivos de células neuronales casi puros”. El sistema de cultivo en la presente invención genera células madre multipotenciales que pueden diferenciarse en los tres tipos de células principales del cerebro, es decir neuronas, oligodendrocitos y astrocitos.

Ray *et al.* utilizaron las siguientes condiciones de cultivo que difieren de los de la presente invención.

1. Los hipocampos embrionarios se trituraron mecánicamente sin el uso de una enzima; sin embargo, las células se extendieron en placas a aproximadamente 100.000 células por cm², óptimo para la supervivencia neuronal, pero una densidad de células casi 10 veces mayor que la óptima para la expansión de células madre del SNC.

2. bFGF fue administrado a razón de 20 ng/ml, intermitentemente, cada 3-4 días.

3. El medio “N2” basal contenía 5 µg/ml de insulina, menor que el óptimo. El cambio de medio también se prolongó cada 3-4 días.

4. Las células se hicieron pasar utilizando tripsina.

En definitiva, incluso diferencias aparentemente pequeñas en las condiciones del cultivo pueden dar como resultado un aislamiento de tipos de células muy diferentes.

Ray, J. y Gage, F.H., *Spinal cord neuroblasts proliferate in response to basic fibroblast growth factor*, *J. Neurosci.* **14**, 3548-3564 (1994)³⁹.

Ray y Gage informan del aislamiento y la propagación de células “que ya han sido comprometidas a una vía neuronal son y expresan fenotipos neuronales (neuroblastos)” procedentes de la médula espinal utilizando bFGF. De nuevo, a pesar de que el mitógeno primario es bFGF, sus condiciones de cultivo son diferentes y obtenían células acusadamente diferentes de las células madre del SNC.

1. Se utilizó médula espinal E14-E16, una fase mucho más tardía de desarrollo que la óptima para las células madre.

2. El tejido se disoció enzimáticamente mediante papaína y DNasa.

3. La extensión inicial en placas se realizó en suero de bovino fetal al 10%.

4. Hubo un enriquecimiento preliminar de una población de células no adherentes.

5. Hubo un cambio de medio intermitente y un suplemento de bFGF cada 3-4 días.

Gage, F.H., Coates, P.W., Palmer, T.D., Kuhn, H.G., Fisher, L.J., Suhonen, J.O., Peterson, D.A., Suhr, S.T. y Ray, J., *Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **92**, 11879-11883 (1995)³⁵.

Gage *et al.* informaron del aislamiento, la propagación y el trasplante de células procedentes del *hipocampo adulto*. Estas mezclas de células se mantuvieron en cultivo durante un año a través de múltiples pases. El 80% de ellas exhibían propiedades más bien inusuales tal como la co-expresión de antígenos gliales y neuronales, al tiempo que seguían siendo mitóticas. Estas propiedades no son exhibidas por las células madre aisladas de la zona subventricular estriada adulta.

De nuevo, utilizando bFGF como un mitógeno primario, los autores derivaron células acusadamente diferentes de las células madre del SNC reseñadas en la presente invención.

Gritti, A. *et al.*, *Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor*, *J. Neurosci.* **16**, 1091-1100 (1996)⁴⁰.

Estos autores informan del aislamiento y la propagación de células madre multipotenciales procedentes de la zona subventricular del *cerebro adulto* utilizando bFGF. Una diferencia significativa en las condiciones de cultivo utilizadas por Gritti *et al.* es que las células se propagan *en forma de esferas agregadas sin la fijación a la superficie de la placa*. Las condiciones de cultivo desarrolladas por Gritti *et al.* requieren esta agregación de células para formar esferas, utilizando bFGF o factor de crecimiento epidérmico (EGF- siglas en inglés) como una etapa esencial para la propagación de células multipotenciales. Esta etapa de agregación sola distingue esencialmente al sistema de cultivo reseñado del de la presente invención. La agregación fomenta interacciones célula-célula indefinidas y da como resultado desplazamientos incontrolables de diferenciación/destino y, en su conjunto, una mucho menor expansión y diferenciación. Además, este sistema de cultivo y el resultado obtenido por Gritti *et al.* se limitan al cerebro adulto en donde se obtuvo un número extremadamente pequeño de células (10⁵ células por cerebro) y no han sido extendidas a diversas regiones del cerebro embrionario.

El proceso en la presente invención permite la propagación de células madre por todo el SNC en desarrollo así como el cuerpo estriado del cerebro adulto. También utiliza un cultivo adherente y evita activamente el contacto célula-célula y una alta densidad de células. Como resultado, permite una expansión mucho más eficaz de las células en un estado multipotencial no diferenciado y un control mucho más preciso y eficaz sobre la diferenciación de las células expandidas.

Reynolds, B. y Weiss, S., *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system*, *Science* **255**, 1707-1710 (1992)¹⁵.

Reynolds, B., Tetzlaff, W. y Weiss, S., *A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes*, *J. Neurosci.* **12**, 4565-4574 (1992)⁹.

Vescovi, A.L., Reynolds, B.A., Fraser, D.D., y Weiss, S., *bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells*, *Neuron* **11**, 951-966 (1993)⁴¹.

Estos tres estudios describen los *cultivos en esfera* originales de células precursoras neurales procedentes de cerebro adulto y embrionario utilizando EGF (factor de crecimiento epidérmico). Las células expandidas se diferencian en neuronas y astrocitos, pero no en oligodendrocitos y, así, se piensa que son una población bipotencial más que multipotencial. Otra propiedad diferenciadora de las células es que responden solamente a EGF y no a bFGF en particular, mientras que las células madre del SNC responden de modo similar tanto a EGF como bFGF. De nuevo, las condiciones del cultivo en esfera no son equiparables con las empleadas en la presente invención, ya que requieren una agregación de células en las que se espera que se produzcan muchas interacciones adicionales no definidas.

Ahmed, S., Reynolds, B.A., y Weiss, S., *BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors*, *J. Neurosci.* **15**, 5765-5778 (1995)⁴².

Este documento informa de los efectos del factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF- siglas en inglés) sobre cultivos en esfera de células precursoras neurales embrionarias propagadas con EGF. No existe ningún refuerzo adicional del sistema de cultivo *per se*.

Svendsen, c. N., Fawcett, J.W., Bentlage, C. y Dunnett, S.B., *Increased survival of rat EGF-generated CNS precursor cells using B27 supplemented medium*, *Exp. Brain Res.* **102**, 407-414 (1995)³⁶.

Este estudio utiliza el cultivo en esfera con EGF según se describe antes para someter a ensayo un suplemento del medio comercialmente disponible, denominado "B27". El estudio informa simplemente que el uso de B27 refuerza la supervivencia de *células* (no la supervivencia neuronal) en un cultivo mixto que contiene neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

Kilpatrick, T. J. y Bartlett, P. F., *Cloning and growth of multipotential neural precursors: requirements for proliferation and differentiation*, *Neuron* **10**, 255-265 (1993)⁴³.

Los autores informan de la existencia de células precursoras multipotenciales en el telencéfalo de ratón E10 al cultivar células sencillas procedentes del cerebro en bFGF más suero. Los resultados se basaron en 700 células expan-

didadas clonalmente durante 10 días, algunas de las cuales, cuando se diferenciaban en presencia de medio acondicionado con bFGF, suero y astrocitos, podían dar lugar a neuronas. No había una expansión en masa de las células.

- 5 *Kilpatrick, T.J. y Bartlett, P.F., Cloned multipotential precursors from the mouse cerebrum require FGF-2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF-2 or EGF, J. Neurosci.* **15**, 3653-3661 (1995)⁴⁴.

10 Los autores utilizan el sistema de cultivo clonal reseñado en la referencia⁴³ antes descrita para someter a ensayo la eficacia mitogénica de bFGF y EGF sobre las células corticales procedentes de embriones E10 y E17. De nuevo, la condición de cultivo se aplica estrictamente a microcultivo en medio con contenido en suero para demostrar la existencia de diferentes células precursoras en el cerebro en desarrollo. No existe ninguna expansión en masa, cultivo a largo plazo ni protocolo de diferenciación sistémico.

- 15 *Baetge, E.E. Neural stem cells for CNS transplantation, Ann. N. Y. Acad. Sci.* **695**, 285 (1993)⁴⁵.

20 Este es un documento de revisión breve que resume diversos estudios dirigidos para aislar células precursoras y sus derivados en cultivo. Está de alguna manera anticuado y la mayoría de los estudios originales relevantes citados han sido comentados anteriormente.

- 25 *Bartlett, P.F. et al., Regulation of neural precursor differentiation in the embryonic and adult forebrain, Clin. Exp. Pharm. Physiol.* **22**, 559-562 (1995)⁴⁶.

30 Este es también un documento de revisión breve que resume mayoritariamente trabajos previos procedentes del laboratorio de los autores en relación con sus estudios de microcultivo en los que potenciales de diferenciación de determinados clones de precursores se someten a ensayo en presencia de medio acondicionado con FGF de carácter ácido (aFGF), bFGF, suero y/o astrocitos.

35 Además, Sabate *et al.*³² informaron del cultivo de un progenitor neural humano con una capacidad de diferenciación indefinida. Davis y Temple⁶ demostraron la existencia de células madre multipotenciales en la corteza mediante el co-cultivo con células epiteliales durante un breve plazo (menos de 100 células en su totalidad).

Sin embargo, la diferenciación de las células no podía controlarse en ninguno de los informes reseñados que excluían el análisis de sus relaciones de linaje y los mecanismos que regulaban la elección del destino.

40 La presente invención proporciona un método para propagar eficazmente las células germinales no diferenciadas, es decir las células madre del sistema nervioso central (SNC), en cultivo y define condiciones para convertir eficazmente las células no diferenciadas en tipos de células maduras. Estas células no diferenciadas o "células madre del SNC" exhiben la capacidad multipotencial para diferenciarse en los tres tipos de células principales de un cerebro maduro - neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Además de ello, las mismas condiciones de cultivo permiten el aislamiento, la expansión y diferenciación de células multipotenciales equivalentes procedentes del cerebro adulto.

45 Desde la descripción inicial, han aparecido informes adicionales. La investigación más reciente y el uso de células madre del SNC y progenitores neurales han sido revisados⁴⁷⁻⁵² adicionalmente. Además, Reynolds y Weiss⁵³ informaron que progenitores estriados embrionarios, generados en forma de esferas que utilizaban EGF, eran capaces de diferenciarse en los tres tipos de células que incluían oligodendrocitos, astrocitos y neuronas. La frecuencia de las células que responden a EGF quedaba limitada a solamente el 1% del cultivo primario inicial. La subclonación para establecer una autorrenovación era cuestionable, ya que se utilizaron hasta 500 células/pocillo para generar los "clones" secundarios. La diferenciación de las células se indujo incorporando suero al 1% en el medio. Sin embargo, a partir de los clones derivados de células sencillas no se presentaron datos que demostraran los tres tipos de células.

55 Weiss *et al.*⁵⁴ informaron que las células madre del SNC multipotenciales podrían aislarse a partir de la médula espinal adulta y de los tercero y cuarto ventrículos utilizando una combinación de EGF y bFGF, pero no con uno cualquiera solo.

60 Svendsen *et al.*⁵⁵ informaron que células precursoras neurales aisladas del cuerpo estriado del mesencéfalo de embriones de ratas de 16 días de edad (E16), cuando se injertaban en cerebros de rata adultos lesionados, no eran capaces de diferenciarse en neuronas. También informaron que las células del mesencéfalo generadas por EGF, pero no las células estriadas se diferenciaban en neuronas tirosina-hidroxilasa (TH)-positivas, si bien en un número muy bajo (0,002%). No existía ninguna caracterización de células *in vitro* para asegurar que el cultivo primario utilizado no contuviera neuronas post-mitóticas trasladadas desde el tejido, especialmente dado el hecho de que el resultado sólo se podía obtener con tejido E16, cuando la mayoría de las células TH ya habían nacido.

Schinstine e Iacovitti⁵⁶ informaron que algunos de los astrocitos derivados de células precursoras neurales generadas por EGF expresaban antígenos neuronales tales como tau y MAP2. Qian *et al.*⁵⁷ informaron que diferentes

concentraciones de bFGF hacían proliferar células similares a las madre de corteza de ratón E10 con potenciales de diferenciación variables que oscilaban desde sólo neuronales a multipotenciales.

Palmer *et al.*⁶⁵ informaron que células madre del SNC multipotenciales podían aislarse del hipocampo de rata adulta. El 84% de las células que expandían, sin embargo, co-expresaban MAP2c y O4, marcadores neuronales y oligodendrogiales inmaduros. Únicamente el 0,2% eran MAP2ab positivas y menos del 0,01% eran positivas para otros marcadores neuronales tales como tau y neurofilamento 200. Propiedades de este tipo son bastante diferentes de las propiedades descritas en los Ejemplos en la presente solicitud.

Finley *et al.*⁶⁶ informaron que la línea de células de carcinoma embrionario de ratón, P19, puede formar una polaridad neuronal y puede ser electrofisiológicamente activa cuando es inducida por ácido retinoico y suero. Strubing *et al.*⁶⁷ informaron que las células madre embrionarias desarrolladas en medio que contenía suero podían diferenciarse en neuronas electrofisiológicamente activas *in vitro*. Okabe *et al.*⁶⁸ también informaron de la diferenciación de algunas de las células madre embrionarias en neuronas *in vitro*.

Gritti *et al.*⁴⁶ informaron que células madre multipotenciales podían aislarse a partir del subependimo de ratón adulto por parte de EGF y bFGF que, cuando se diferenciaban, podían ser electrofisiológicamente activas y expresar inmunorreactividades a GABA, glutamato y ChAT, pero no otras. Sin embargo, la frecuencia de este tipo de neuronas no se documentó y, así, es difícil determinar lo eficaz que era la maduración neuronal. Además de ello, estos fenotipos neuronales, derivados de células madre en división, no fueron directamente demostrados mediante marcaje con BrdU. Esto es particularmente relevante, ya que los cultivos agregados son extremadamente propensos a ser contaminados por parte de neuronas primarias procedentes del tejido, que los traslada durante varios pases. De hecho, Weiss *et al.*⁴⁹ establecieron que solamente células GABA-positivas podían obtenerse a partir de sus cultivos. La mayoría de las células GABA-positivas pueden ser oligodendrocitos.

Feldman *et al.*⁶⁹ reseñaron estudios electrofisiológicos de precursores neurales de rata generados por EGF. Encontraron que la mayoría, si no todas las células electrofisiológicamente activas son de hecho no neuronales, y que las células gliales contienen canales de Na sensibles a la tensión que evocan conductancias similares a potenciales de acción.

Resultados como estos ilustran que la identificación de células madre del SNC, que definen condiciones que definen establemente las propiedades de las células madre del SNC durante largo plazo y que controlan su diferenciación en tipos de células maduras, no son ni obvios ni predecibles para los expertos en esta técnica.

Sumario de la invención

La presente invención describe un cultivo *in vitro* de células madre del sistema nervioso central de un mamífero, un método para el cultivo *in vitro* de las células madre y un método para la diferenciación de las células madre.

En el cultivo *in vitro* de las células madre del sistema nervioso central de un mamífero, las células madre conservan la capacidad multipotencial de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Las células madre se pueden derivar de tejido del sistema nervioso central de un ser humano, feto o adulto. Además de ello, el tejido del sistema nervioso central puede ser hipocampo, corteza cerebral, cuerpo estriado, septum, diencéfalo, mesencéfalo, cerebelo o médula espinal.

Además de ello, las células madre se pueden diferenciar en neuronas maduras que exhiben una polaridad axon-dendrita, terminales sinápticos y la localización de proteínas implicadas en la sinaptogénesis y la actividad sináptica, que incluyen receptores neurotransmisores, transportadores y enzimas de procesamiento. Además, las células madre conservan su capacidad de generar subtipos de neuronas con diferencias moleculares entre los subtipos.

En un método para el cultivo *in vitro* de las células madre, en el que las células madre conservan la capacidad multipotencial de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, en el que las células procedentes del sistema nervioso central:

a) se disocian mediante trituración mecánica;

b) se extienden en placas a la densidad inicial óptima de 1×10^6 células (procedentes del hipocampo y septum) o de $1,5 \times 10^6$ células (procedentes de otras regiones del SNC) por cada 10 cm de placa revestida con poli-ornitina y fibronectina;

c) se cultivan en la ausencia completa de suero;

d) son diariamente suministradas con un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en

i) un factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) a una concentración de al menos 10 ng/ml,

ii) EGF a una concentración de al menos 10 ng/ml,

ES 2 292 187 T3

iii) TGF-alfa a una concentración de al menos 10 mg/ml, y

iv) FGF de carácter ácido (aFGF) a una concentración de al menos 10 ng/ml más 1 μ g/ml de heparina;

5 e) se reemplaza por medio reciente el 100% del medio de cultivo cada dos días;

f) se hace pasar cada 4 días después de la extensión en placa mediante tratamiento de las células cultivadas con solución salina y raspado de las células de la placa; y

10 g) se vuelven a extender en placas las células pasadas a razón de $0,5 \times 10^6$ células por cada 10 cm de placa prerrevestida con poli-ornitina y fibronectina.

El método es aplicable a células madre derivadas del tejido del sistema nervioso central procedente de un ser humano, feto o adulto. De nuevo, el tejido del sistema nervioso central puede ser el hipocampo, la corteza cerebral, el cuerpo estriado, septum, diencefalo, mesencefalo, cerebelo o médula espinal.

20 El método de la invención para la expansión y el cultivo *in vitro* de células madre del sistema nervioso central de un mamífero, en el que las células madre conservan la capacidad multipotencial de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, comprende las etapas de

a) disociar células procedentes del tejido del sistema nervioso central mediante trituración mecánica en ausencia de cationes divalentes;

25 b) cultivar las células disociadas adheridas a una placa en un medio de cultivo exento de suero y químicamente definido;

c) extender en placas células disociadas a una densidad que no exceda de 20.000 células/cm² y, en pases subsiguientes, volver a extender en placas las células cultivadas a una densidad que no exceda de 10.000 células/cm²;

30 d) añadir diariamente a las células de cultivo un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en

i) bFGF a una concentración de al menos 10 ng/ml,

35 ii) EGF a una concentración de al menos 10 ng/ml,

iii) TGF-alfa a una concentración de al menos 10 mg/ml, y

iv) aFGF a una concentración de al menos 10 ng/ml más 1 μ g/ml de heparina;

40 e) reemplazar por medio reciente el medio de cultivo cada dos días;

f) hacer pasar las células cultivadas en el espacio de cuatro días después de la extensión en placa de modo que no excedan de una confluencia del 50%; y

45 g) hacer pasar las células cultivadas mediante tratamiento de las células cultivadas con solución salina exenta de cationes divalentes y raspar las células de la placa.

La solicitud describe también un método para la diferenciación de un cultivo *in vitro* de células madre del sistema nervioso central de un mamífero, en el que las células madre conservan la capacidad multipotencial de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, en donde las células procedentes del sistema nervioso central

a) se disocian mediante trituración mecánica;

55 b) se extienden en placas a la densidad inicial óptima de 1×10^6 células (procedentes del hipocampo y septum) o de $1,5 \times 10^6$ células (procedentes de otras regiones del SNC) por cada 10 cm de placa pre-revestida con poli-ornitina y fibronectina;

c) se cultivan en la ausencia completa de suero;

60 d) son diariamente suministradas con un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en

i) un factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) a una concentración de al menos 10 ng/ml,

ii) EGF a una concentración de al menos 10 ng/ml,

65 iii) TGF-alfa a una concentración de al menos 10 mg/ml, y

iv) FGF de carácter ácido (aFGF) a una concentración de al menos 10 ng/ml más 1 μ g/ml de heparina;

e) se reemplaza por medio reciente el 100% del medio de cultivo cada dos días;

f) se hace pasar cada 4 días después de la extensión en placa mediante tratamiento de las células cultivadas con solución salina y raspado de las células de la placa;

g) se vuelven a extender en placa las células pasadas a $0,5 \times 10^6$ células por cada 10 cm de placa prerrevestida con poli-ornitina y fibronectina; y

h) se retira el factor de crecimiento aclarando las células con solución salina o tratándolas con tripsina y, subsiguientemente, con un inhibidor de tripsina y luego se continúa cultivando las células en el medio exento de suero sin el factor de crecimiento.

Además, la diferenciación se puede dirigir específicamente añadiendo un segundo factor de crecimiento a las células cultivadas, ya sea antes o después de retirar el primer factor de crecimiento de las células cultivadas. El segundo o añadido factor de crecimiento puede ser factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF - siglas en inglés), factor neurotrópico ciliar (CNTF - siglas en inglés), factor inhibidor de leucemia (LIF - siglas en inglés) u hormona tiroidea, yodotironina (T3).

El método de la invención para la diferenciación de un cultivo *in vitro* de células madre del sistema nervioso central de un mamífero, en el que las células madre conservan la capacidad multipotencial de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, comprende las etapas de:

a) disociar células procedentes de tejido del sistema nervioso central mediante trituración mecánica en ausencia de cationes divalentes;

b) cultivar las células disociadas adheridas a una placa en un medio de cultivo exento de suero y químicamente definido;

c) extender en placas células disociadas a una densidad que no exceda de 20.000 células/cm² y, en pases subsiguientes, volver a extender en placas las células cultivadas a una densidad que no exceda de 10.000 células/cm²;

d) añadir diariamente a las células cultivadas un primer factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en

i) bFGF a una concentración de al menos 10 ng/ml,

ii) EGF a una concentración de al menos 10 ng/ml,

iii) TGF-alfa a una concentración de al menos 10 mg/ml, y

iv) aFGF a una concentración de al menos 10 ng/ml más 1 µg/ml de heparina;

e) reemplazar por medio reciente el medio de cultivo cada dos días;

f) hacer pasar las células cultivadas en el espacio de cuatro días después de la extensión en placa de modo que no exceda de una confluencia del 50%; y

g) hacer pasar las células cultivadas mediante tratamiento de las células cultivadas con solución salina exenta de cationes divalentes y raspar las células de la placa; y

h) separar el primer factor de crecimiento de las células cultivadas, en donde dicha separación da como resultado la diferenciación de las células cultivadas en neuronas, astrocitos y/u oligodendrocitos.

La presente solicitud describe también un cultivo *in vitro* de neuronas maduras específicas para la región y terminalmente diferenciadas, derivadas de cultivos de células madres del SNC multipotenciales de mamífero y un método de cultivo *in vitro* para la generación de las neuronas diferenciadas.

En el método para la generación *in vitro* de neuronas maduras específicas para la región y terminalmente diferenciadas, procedentes de cultivos de células madre del SNC multipotenciales de mamífero, las células madre del SNC multipotenciales procedentes de una región específica se cultivan en un medio de cultivo exento de suero y químicamente definido que contiene un factor de crecimiento; el medio es reemplazado por medio exento de factor de crecimiento; las células madre se recolectan mediante tripsinización; se extienden en placas a una densidad de entre 100.000 y 250.000 células por centímetro cuadrado; y se cultivan en un medio de cultivo exento de suero, exento de ácido glutámico y químicamente definido. La región específica del SNC de la que se derivan las células madre multipotenciales se selecciona del grupo que consiste en corteza, tubérculo olfatorio, retina, septum, eminencia gangliónica lateral, eminencia gangliónica media, amígdala, hipocampo, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo ventral y dorsal, tronco cerebral, cerebelo y médula espinal.

Además, el medio de cultivo exento de suero y químicamente definido se puede seleccionar de N2 (DMEM/F12, glucosa, glutamina, bicarbonato de sodio, 25 $\mu\text{g/ml}$ de insulina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de apotransferrina humana, 25 nM de progesterona, 100 μM de putrescina, 30 nM de selenito de sodio, pH 7,2⁸) o medio modificado con N2. El factor de crecimiento se puede seleccionar del grupo que consiste en bFGF, EGF, TGF-alfa y aFGF.

Además, el medio de cultivo exento de suero, exento de ácido glutámico y químicamente definido se puede suplementar con entre 10-100 ng/ml de factor neurotrópico derivado del cerebro. El método es aplicable a células madre del SNC multipotenciales derivadas del tejido del sistema nervioso central procedente de cualquier mamífero, incluida la rata y el ser humano.

La presente solicitud también describe cultivos *in vitro* de neuronas maduras específicas para la región y terminalmente diferenciadas, derivadas de cultivos de células madre del SNC multipotenciales de mamíferos procedentes de una región específica del SNC. La región específica de la que se derivan las células madre multipotenciales se selecciona del grupo consistente en corteza, tubérculo olfatorio, retina, septum, eminencia gangliónica lateral, eminencia gangliónica media, amígdala, hipocampo, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo ventral y dorsal, tronco cerebral, cerebelo y médula espinal. De igual manera, el cultivo *in vitro* de neuronas diferenciadas específicas para la región se puede derivar de cualquier célula madre del SNC multipotencial de mamífero, incluida la rata y el ser humano.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A muestra la diferenciación controlada de células madre del SNC a alta densidad. Células precursoras, nestina-positivas, de rápida división fueron marcadas con BrdU durante las últimas 24 horas de la proliferación. Después, se inició la diferenciación mediante retirada de bFGF (día 0) y se continuó durante hasta 6 días. A los tiempos indicados las células se fijaron y tiñeron para BrdU y antígenos neuronales. Se muestran las relaciones de células doblemente teñidas para BrdU y cada antígeno neuronal con respecto a las células BrdU positivas totales (BrdU+). Hasta el 50% de células BrdU+ expresaba antígenos neuronales y su expresión era dependiente del tiempo. MAP2 positivo (MAP2+), círculo en negro; TuJ1 positivo (TuJ1+), rombo gris; neurofilamento L positivo (neurofilamento L+), cuadrado en blanco; neurofilamento M positivo (neurofilamento M+), triángulo en negro.

La figura 1B muestra las proporciones de neuronas MAP2+ (●), oligodendrocitos GalC+ (+) y astrocitos GFAP+ (o) en clones diferenciados. Clones de diversos tamaños que oscilaban entre 39 células y 2800 células se diferenciaron durante 6 días y se analizaron para dos tipos de células por cada clon mediante inmunohistoquímica doble. En la Tabla I se da una lista parcial y la inmunotinción se muestra en la fig. 3. El número de neuronas aumentaba con el tamaño creciente del clon, constituyendo el 50% del clon.

La figura 1C muestra una comparación de las eficacias mitogénicas de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). Células (densidad inicial de 1×10^4 por placa) sutilmente dissociadas del hipocampo (HI) E16, corteza (CTX) E14 y cuerpo estriado (ST), y capa subependimal de adulto (Adulto) se expandieron con EGF (20 ng/ml) o bFGF (10 ng/ml). Colonias que surgían después de 10 días de expansión se tiñeron para nestina, una proteína filamentosamente intermedia característica de células precursoras del SNC^{13,14}. Se muestra el número relativo de colonias promediado de al menos 2 experimentos para cada región (bFGF = 1). Estaban presentes colonias veinticinco veces más nestina+ por placa cuando las células embrionarias se desarrollaban en bFGF (recuadro con puntos) que en EGF (recuadro con barras). A altas densidades (1×10^6 y $2,5 \times 10^6$), la condición de bFGF dio células BrdU+/nestina+ 10 veces mayores que EGF. Los dos factores de crecimiento eran igualmente mitogénicos para las células adultas. Cuando se diferenciaban clones expandidos en EGF y bFGF, neuronas y oligodendrocitos se encontraron en cantidades similares; sin embargo, los clones expandidos en EGF dieron lugar a un número significativamente mayor de astrocitos GFAP+.

Las figuras 2A-D muestran un clon típico de células madre del SNC. Las células se marcaron mediante un círculo en la placa en el espacio de 24 horas de la extensión en placa antes de la primera mitosis y luego se expandieron durante hasta 10 días (fig. 2A). En la figura 2B se muestra una vista más ampliada de otro clon antes de la diferenciación, inmunoteñido con anticuerpo anti-nestina. Obsérvese la morfología radial homogénea de las células nestina-positivas, consistente con la morfología nestina-positiva en el neuroepitelio *in vivo*. La figura 2C muestra un clon hermano a un pequeño aumento, que ha sido diferenciado durante 6 días e inmunoteñido con un anticuerpo específico para neuronas, TuJ1. Obsérvese la presencia diseminada y no localizada de neuronas TuJ1-positivas por todo el clon. En la figura 2D se muestra una vista más ampliada de las mismas células. Las células TuJ1-positivas asumen una morfología neuronal típica. Son evidentes morfologías heterogéneas en las células TuJ1-negativas no neuronales.

Las figuras 3A-J muestran ejemplos de clones representativos de células del hipocampo embrionarias (3A, 3C, 3E, 3G, 3I) y células subependimales adultas (3B, 3D, 3F, 3H, 3J) doblemente teñidas con combinaciones de anticuerpos para revelar diferentes tipos de células dentro de clones individuales; anti-MAP2, neuronal; anti-GalC, oligodendrítico; anti-GFAP, astrocítico. Las dos inmunorreacciones se desarrollaron secuencialmente y se distinguieron utilizando dos cromógenos distintos a través de la reacción con fosfatasa alcalina (azul, indicada por flechas) frente a la reacción de peroxidasa de rábano picante (rojo, indicadas por cabezas de flecha).

Las células en las figuras 3A y 3B se tiñeron doblemente con anti-MAP2 (neuronal, flechas) y anti-GFAP (astrocítico, cabezas de flecha) y muestran que los clones expandidos con bFGF derivados de cerebro embrionario o adulto se diferencian tanto en neuronas como en astrocitos. (Los oligodendrocitos están sin teñir en esta tinción).

Las células en las figuras 3C y 3D se tiñeron doblemente con anti-GalC (oligodendrocítico, flechas) y anti-GFAP (astrocítico, cabezas de flecha) y muestran que clones expandidos con bFGF derivados de cerebro embrionario o adulto se diferencian tanto en oligodendrocitos como en astrocitos. (Las neuronas están sin teñir en esta tinción).

5 Las figuras 3E y 3F muestran clones diferenciados en presencia de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Las células se tiñeron doblemente con anti-MAP2 (neuronal, flechas) y anti-GFAP (astrocítico). La mayoría de las células eran MAP2+ y solamente unas pocas eran GFAP+.

10 Las figuras 3G y 3H muestran clones diferenciados en presencia de factor neurotrófico ciliar (CNTF). Las células se tiñeron doblemente con anti-MAP2 (neuronal) y anti-GFAP (astrocítico, cabezas de flecha). Todas las células eran intensamente GFAP+.

15 Las figuras 3I y 3J muestran clones diferenciados en presencia de la hormona tiroidea, triyodotironina (T3). Las células se tiñeron doblemente con anti-GalC (oligodendrocítico, flechas) y anti-GFAP (astrocítico, cabezas de flecha). Aumentaron células GFAP+ y, en particular, GalC+. Disminuyeron células MAP2+ (Tabla IV).

20 La figura 4 muestra la diferenciación de células madre del SNC humano en neuronas en un cultivo de alta densidad. Células del SNC expandidas con bFGF a una elevada densidad se diferenciaron mediante la retirada de bFGF ("WD"). El número de neuronas que expresan proteína tau se determinó mediante inmunocitoquímica en cultivo durante la fase de expansión ("antes de WD") frente a después de la diferenciación ("después de WD"). El drástico aumento en las neuronas post-mitóticas solamente después de la retirada de bFGF indica que éstas fueron generadas a partir de las células madre en división.

25 Las figuras 5A-F muestran células madre humanas teñidas con antisero anti-tau específico de seres humanos (Chemicon) que identifican neuronas. Células madre del SNC humano en proliferación en un cultivo de alta densidad no expresan la proteína tau, un marcador neuronal (figura 5A). Después de 6 días de diferenciación, sin embargo, muchas células con una morfología neuronal típica expresan un alto nivel de proteína tau (figura 5B). Con el fin de demostrar adicionalmente que estas neuronas se derivan de hecho de células madre en división, las células madre se marcaron con 10 μ M de bromodesoxiuridina (BrdU), un indicador de la mitosis, durante 24 horas justo antes de la retirada de bFGF. Estas células se diferenciaron luego durante 6 días, se tiñeron doblemente con antisero anti-tau específico de seres humanos (FITC, verde) y anticuerpo anti-BrdU (rodamina, rojo). La figura 5C muestra una vista muy aumentada de las subsiguientes neuronas tau-positivas según se observa a través de fluorescencia FITC. La figura 5D muestra el mismo campo de visión que la figura 5D, pero observada a través de fluorescencia con rodamina para revelar núcleos BrdU-positivos. La mayoría de las neuronas tau-positivas son también positivas para BrdU, demostrando que se derivaron de células madre mitóticas antes de la retirada de bFGF.

30 Con el fin de demostrar adicionalmente la multipotencialidad de células madre del SNC humano, éstas se cultivaron a una densidad clonal según se describe para las células de roedores. La figura 5E muestra un clon típico a un bajo aumento, que ha sido expandido a partir de una sola célula durante 20 días, ha sido subsiguientemente diferenciado durante 12 días y ha sido inmunoteñido con el anticuerpo anti-MAP2, específico para neuronas. Las neuronas son abundantes en el clon. La figura 5F muestra una vista a mayor aumento del clon en la figura 5E para indicar que las células MAP2-positivas tienen una morfología neuronal típica.

35 Las figuras 6A-D demuestran una diferenciación dirigida de células madre del SNC humano. Células madre del SNC humano, después de 16 días de expansión, se hicieron desarrollar clonalmente durante 20 días adicionales y luego se diferenciaron en presencia o ausencia de factores simples, PDGF (10 ng/ml), CNTF (10 ng/ml) o T3 (3 ng/ml). La figura 6A muestra un clon control no tratado, con aproximadamente 50% de neuronas MAP2-positivas (flechas) y 2-10% de astrocitos GFAP-positivos (cabezas de flecha). La figura 6B muestra un clon tratado con PDGF, en el que el 75% de las células son neuronas MAP2-positivas (flechas) y 2-10% son astrocitos GFAP-positivos (cabezas de flecha). La figura 6C muestra un clon tratado con CNTF, en el que el 85% son astrocitos GFAP-positivos (cabezas de flecha) y solamente el 9% son neuronas MAP2-positivas (flechas). La figura 6D muestra un clon tratado con T3 con un número incrementado de oligodendrocitos O4- y/o GalC-positivos (flechas) y de astrocitos GFAP-positivos (cabezas de flecha).

40 Las figuras 7A-7I muestran que un gran número de neuronas maduras con una polaridad axón-dendrítica y una actividad sináptica correctas pueden ser obtenidas de forma rutinaria a partir de células madre del SNC expandidas durante largo tiempo. Las células madre del hipocampo procedentes de embriones de rata E16 se expandieron en cultivos durante 16 días y a través de 4 pases. Justo antes del último pase, las células de rápida división se marcaron con 10 μ M de BrdU durante una noche, se les hizo el pasaje utilizando tripsina y se extendieron en placas sobre portaobjetos de cámara. Las células se mantuvieron durante 21 días para permitir una diferenciación constitutiva y una maduración de neuronas. Subsiguientemente, se analizaron mediante inmunocitoquímica el grado de maduración y los subtipos neuronales generados.

45 Fig. 7A: Neuronas teñidas con anticuerpo TuJ1 vistas a un bajo aumento (100x) para ilustrar que la producción de neuronas es eficaz.

Fig. 7B: Morfología típica de neuronas revelada por anticuerpos TuJ1 (400x).

Fig. 7C: Morfología típica de neuronas revelada por anticuerpos MAP2 (400x).

Fig. 7D: Neuronas teñidas con anticuerpo sinapsina. Solamente se tiñen neuronas maduras que contienen vesículas sinápticas.

Fig. 7E: Tinción con BrdU. Todas las células en el cultivo, neuronas y glía, están marcadas con BrdU.

Fig. 7F: Tinción doble con sinapsina y BrdU. Las células maduras sinapsina-positivas son también BrdU-positivas, demostrando que se derivan de células madre mitóticas en cultivo.

Fig. 7G: La tinción del anticuerpo anti-sinapsina en puntos marca los terminales de axón presinápticos específicamente en grandes neuronas maduras.

Fig. 7H: Las estructuras sinapsina-positivas están estrechamente aplicadas a procesos dendríticos revelados por la tinción con anticuerpo MAP2.

Fig. 7I: Las proteínas MAP2 y sinapsina están estrechamente asociadas pero no co-localizadas, sugiriendo una interacción presináptica-postsináptica.

La figura 8 muestra que neuronas derivadas de células madre expresan diversos receptores neurotransmisores y transportadores de los que se espera están implicados en la transmisión sináptica, según se detecta por RT-PCR. Células madre expandidas durante largo tiempo derivadas de la corteza de roedores E16 se diferenciaron durante 14 días y se recolectaron para preparar ARN. Las células madre no diferenciadas también se prepararon con el fin de comparar una inducción específica para la diferenciación. El ARN procedente de un cerebro entero de rata adulta se utilizó como control positivo. Se utilizaron cebadores específicos para familias de NMDA (D-aspartato de N-metilo) y AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico) de subtipos de receptor glutamato, así como para diversos transportadores GABA. Obsérvese especialmente la inducción específica de los receptores NMDA R1, AMPA R1 y AMPA R2 en células diferenciadas.

Las figuras 9A-F muestran ejemplos de neuronas típicas derivadas de células madre del hipocampo de embriones de rata que habían sido expandidas *in vitro* durante 16 días (aproximadamente 16 divisiones celulares a lo largo de 4 pases) y se habían diferenciado durante un total de 21 días. Las células madre del SNC mitótico se marcaron por impulsos con bromodesoxiuridina (BrdU) durante las últimas 24 horas antes de la diferenciación. Las neuronas resultantes se inmunotifieron por tres veces con anticuerpos contra BrdU (fig. 9A), MAP2ab (fig. 9B) y sinapsina (fig. 9C). La vista compuesta de la célula teñida por tres veces se muestra en la fig. 9D. El marcaje con BrdU demuestra que la neurona diferenciada se derivaba de un precursor mitótico en el cultivo y que es una neurona terminalmente diferenciada, ya que conserva el nivel mitótico durante la fase de diferenciación prolongada. MAP2ab es una proteína específica de neuronas bien establecida, presente solamente en neuronas maduras y localizada la mayoría de las veces en dendritas. La sinapsina es una proteína de la vesícula sináptica bien establecida y, así, localiza terminales sinápticos en axones. Las neuronas marcadas por tres veces, tal como se muestra en la fig. 9D, establecieron que células madre del SNC mitóticas expandidas durante largo tiempo se diferenciaban terminalmente en neuronas maduras con una polarización subcelular adecuada que contenía estructuras dendríticas (post-sinápticas) y axonales (pre-sinápticas) distintas de las esperadas de neuronas totalmente funcionales. Otras proteínas de la vesícula sináptica también se localizan en el mismo modelo de terminales de axón en puntos aplicadas al soma y dendritas. Las fig. 9E y fig. 9F muestran otra célula madre del SNC del hipocampo derivada de una neurona madura doblemente teñida para la sinaptofisina y MAP2ab, respectivamente.

La figura 10 muestra un campo de neuronas procedentes de células madre del SNC del hipocampo vistas por microscopía de electrones de transmisión. Son evidentes la abundante presencia de sinapsis que contienen vesículas sinápticas y densidades post-sinápticas.

Las figuras 11A-D muestran registros electrofisiológicos intracelulares procedentes de neuronas sencillas obtenidas de células madre del SNC del septum E15.5 de rata. Consistentes con esta morfología, estos registros demuestran que las redes neuronales derivadas de células madre del SNC son también electrofisiológicamente activas. Así, cuando se estimularon células individuales con un electrodo, estas células condujeron potenciales de acción (Fig. 11A), demostraron la presencia de diversos canales de iones sensibles a la tensión (fig. 11B) y provocaron potenciales excitatorios e inhibitorios post-sinápticos en respuesta a la aplicación al baño del neurotransmisor excitatorio, glutamato (figs. 11C y D). Estos ejemplos establecen sin duda alguna que las células madre del SNC dan lugar a tramas neuronales terminalmente diferenciadas y electrofisiológicamente funcionales.

Diversos fenotipos neuronales observados *in vivo* se obtienen a partir de los cultivos de células madre del SNC. Ejemplos de algunos de estos fenotipos neuronales se muestran en las figuras 12-18 y en la Tabla VII.

La figura 12 muestra la expresión de receptores de dopamina D1 y D2 procedentes de células madre del SNC aisladas de la eminencia gangliónica lateral y media de E15.5. ARNs totales se aislaron a partir de cultivos de células madre del SNC respectivos, diferenciados durante períodos variables (0-20 días). Se muestra el modelo de electroforesis del ADN, amplificado por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa). Se muestran los resultados procedentes de cinco preparaciones de cultivo independientes, realizadas en paralelo en un solo gel. Los

números por encima de las pistas indican los días de diferenciación. D1 = receptor de dopamina, D1; D2 = receptor de dopamina, D2.

Las figuras 13A-D muestran neuronas colinérgicas procedentes de células madre del SNC del septum. Células madre del SNC derivadas del septum E16 se diferenciaron durante 18-21 días. Las neuronas colinérgicas fueron confirmadas mediante histoquímica de acetilcolina esterasa (no mostrada), mediante inmunotinción para acetilcolina transferasa (fig. 13A) y para el transportador de acetilcolina (fig. 13C). En cada caso, células madre del SNC se incubaron con el marcador mitótico, BrdU (10 μ M), durante 24 horas justo antes de conmutar a la condición de diferenciación (figs. 13B y D).

Las figuras 14A-F muestran neuronas que contienen neuropéptidos obtenidas de células madre del SNC de la eminencia gangliónica lateral (cuerpo estriado) 15.5 de rata. Estas son unas neuronas neuropéptido Y-positiva (Fig. 14A), BrdU-positiva (fig. 14B), una neurona met-enkefalina-positiva (fig. 14C), BrdU-positiva (fig. 14D) y una neurona leu-enkefalina-positiva (fig. 14E), BrdU-positiva (fig. 14F).

Las figuras 15A-F muestran morfologías típicas de varios subtipos de neuronas derivados de células madre del SNC del mesencéfalo ventral E12.5 de rata. Las figuras 15A y B muestran una neurona TH-positiva y BrdU-positiva (fig. 15A - tinción con TH; fig. 15B - tinción con BrdU). Las figuras 15C y D muestran otra neurona TH-positiva y MAP2ab-positiva (fig. 15C - tinción con TH; fig. 15D - tinción con MAP2ab). La figura 15E muestra neuronas teñidas con anticuerpo anti-GABA. La figura 15F muestra neuronas teñidas mediante histoquímica con acetilcolina-esterasa.

Las figuras 16A-D muestran ejemplos de neuronas procedentes de células madre de la médula espinal. La figura 16A muestra una neurona acetilcolina esterasa-positiva derivada de las células madre del SNC de la médula espinal E13.5 de rata, que también es BrdU-positiva (fig. 16B). Se muestran neuronas colinérgicas mediante la tinción con acetilcolina-transferasa (fig. 16C) que son también BrdU-positivas (fig. 16D).

Las figuras 17A y B muestran neuronas GABAérgicas derivadas de células madre del SNC del hipocampo E15.5 de rata, que han sido teñidas doblemente para ácido glutámico descarboxilasa (fig. 17A) y GABA (fig. 17B). Las figuras 17C y D muestran una neurona calretinina-positiva (fig. 17C), MAP2ab-positiva (fig. 17D) del hipocampo.

Las figuras 18A-F muestran neuronas derivadas de células madre del SNC del tálamo e hipotálamo E13.5 de rata. La figura 18A muestra neuronas talámicas teñidas para tau; la figura 18B muestra el mismo campo de visión teñido para BrdU. La figura 18C muestra una neurona hipotalámica teñida para tau; la figura 18D muestra el mismo campo de visión teñido para BrdU. Las figuras 18E y F muestran neuronas sinapsina-positivas de células madre del SNC del tálamo e hipotálamo, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

En esta solicitud, se definen condiciones que permiten una expansión en masa de hasta 10^9 veces en cultivo y la diferenciación controlada de células madre del SNC multipotenciales procedentes del cerebro embrionario y adulto de mamíferos. En ambos casos, clones derivados de células sencillas se diferencian en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. La adición de factores sencillos puede desplazar drásticamente la proporción de tipos de células dentro de un clon.

El proceso para aislar, propagar y diferenciar las células madre del SNC se da a continuación en detalle. El proceso contiene cuatro etapas esenciales que deben seguirse en concierto para un aislamiento y diferenciación con éxito de las células madre del SNC. Las cuatro etapas esenciales son como sigue:

(1) La disociación inicial de células procedentes de tejido se realiza mediante trituración mecánica y no mediante digestión enzimática. Con el tejido adulto, es necesario digerir primero enzimáticamente el tejido y luego disociar las células del tejido mediante trituración mecánica.

Trituración significa agitación suave de conjuntos de células provocados por el movimiento fluido que se produce durante la acción de pipeteado repetitiva mediante la cual células individuales se vuelven sueltas y se disocian de células vecinas. La trituración se realiza en una solución salina exenta de cationes divalentes, cuya ausencia ayuda a romper las interacciones entre proteínas de adhesión a la célula sobre la superficie de la célula. Células madre de en rápida división en la zona ventricular son sólo débilmente adherentes, y la simple retirada de los cationes divalentes del medio y una suave agitación mediante pipeteado son suficientes para disociar el tejido en células la mayoría de ellas sencillas. A continuación, las células se cultivan en ausencia completa de suero. Incluso una breve exposición al suero afecta de manera perjudicial a la capacidad de diferenciación de las células madre, de modo que ya no son capaces de diferenciarse en neuronas y oligodendrocitos. El pre-revestimiento de las placas con poli-L-orinitina y fibronectina facilita la adhesión de las células a las placas.

(2) Las células madre del SNC exhiben una propiedad innata de diferenciarse espontáneamente, lo que refleja un mecanismo regulador que controla el ciclo celular en función de la concentración libre de factor de crecimiento, el mitógeno. Con el fin de suprimir la diferenciación de las células madre en otros tipos de células y de conservar una homogeneidad, el factor de crecimiento debe ser suministrado diariamente a una concentración de 10 ng/ml o superior. El factor de crecimiento se puede seleccionar de (1) factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), (2) EGF, (3)

ES 2 292 187 T3

TGF-alfa o (4) FGF de carácter ácido (aFGF). Si se selecciona el factor de crecimiento de fibroblastos de carácter ácido, también se debe suministrar heparina a una concentración de 1 µg/ml.

(3) Incluso un suministro continuo de bFGF u otro factor de crecimiento seleccionado es insuficiente para inhibir la diferenciación, si se deja que el cultivo alcance una densidad crítica mayor que aproximadamente 50%. Lo más probablemente, esto se debe a factor o factores endógenos todavía no definidos secretados por las propias células en división que antagonizan la acción de bFGF. Así, con el fin de separar del cultivo factores de este tipo y de reducir la interacción célula-célula lo más posible, las células deben ser pasadas con frecuencia cada 4 días después de la extensión en placas, y debería realizarse una nueva extensión en placas a una baja densidad de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ por cada 10 cm de placa, es decir en el intervalo de 1×10^2 a 1×10^6 células por 10 cm de placa, pre-revestidas con poli-ornitina y fibronectina.

(4) El pase de las células por parte de tripsina da como resultado una separación proteolítica de un componente receptor de bFGF e inhabilita el efecto mitogénico de bFGF. La velocidad de renovación del receptor es lo suficientemente lenta durante el período en el que las células no son capaces de reconocer el mitógeno y activan la vía de diferenciación.

Con el fin de evitar este proceso, las células se tratan con solución salina tamponada de Hank (HBSS- siglas en inglés) para separar cationes divalentes en el cultivo que interrumpe las interacciones iónicas entre las cadherinas y las integrinas sobre la superficie de la célula y las proteínas de la matriz extracelular sobre la placa de cultivo, determinando que las células se redondeen. En este punto las células madre pueden ser raspadas de la placa con un raspador sin dañar las células.

Otras células en el cultivo se mantienen estrechamente ligadas a la placa y el raspado las elimina, permitiendo así una selección eficaz de células madre no diferenciadas que se dividen rápidamente.

La diferenciación de las células madre del SNC se consigue separando simplemente el mitógeno, bFGF u otro factor de crecimiento seleccionado, del medio. La especificación de los tipos de célula, es decir neuronas, oligodendrocitos y astrocitos, se produce constitutivamente. Con el fin de una diferenciación controlada eficaz, las células deben estar en un estado homogéneo que se puede conseguir siguiendo las etapas 1-4 anteriores.

Estos procesos proporcionan un sistema de cultivo para obtener con control y eficacia una población homogénea de las células madre del SNC que se pueden diferenciar en neuronas, oligodendrocitos y astrocitos. Lo destacado de las características de este sistema es:

(1) producción de un gran número de las células madre del SNC con el potencial de formar muchos subtipos neuronales diferentes, oligodendrocitos y astrocitos que se pueden trasplantar a un cerebro;

(2) diferenciación controlada *in vitro* bajo condiciones exentas de suero, que permite la investigación de nuevos factores de crecimiento y citoquinas;

(3) células que se dividen rápidamente accesibles a la manipulación genética para la introducción de genes extraños;

(4) generación de neuronas maduras *in vitro*, adecuadas para el rastreo genético y farmacológico; y

(5) derivación directa de células precursoras intermedias procedentes de las células madre para el enriquecimiento de una población sencilla de células.

El aislamiento de las células madre del SNC de la manera anteriormente descrita permite, además, una diferenciación dirigida de las células tratándolas con factores de crecimiento específicos. Una importancia práctica de esta diferenciación dirigida a la biotecnología es que un tipo de células sencillo se puede enriquecer *in vitro*. Así, una nueva aplicación de factores de crecimiento previamente descritos PDGF³⁷ (factor de crecimiento derivado de plaquetas), CNTF (factor neurotrófico ciliar) y T3 (hormona tiroidea, tri-yodotironina) sería dirigir las células madre del SNC para generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, respectivamente.

Otra importancia práctica, especialmente para PDGF, es que las neuronas inducidas por PDGF parecen ser realmente progenitores neuronales que pueden proliferar adicionalmente y expandirse en cultivo por parte de PDGF. Estas células se diferencian solamente en neuronas o en neuronas y oligodendrocitos, y difieren de las células madre. El aislamiento de progenitores neuronales a partir del SNC de mamíferos por parte de PDGF no se ha descrito previamente.

Ejemplos

1. Aislamiento de células madre del SNC procedentes de cerebro de rata embrionario

El hipocampo embrionario de rata (día de gestación 16; el día de concepción es el día 1, Taconic Farm) se disecó en solución salina tamponada de Hank (HBSS) y se disoció mediante breve trituración mecánica en HBSS. Las células se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en un medio exento de suero que contenía

DMEM/F12, glucosa, glutamina, bicarbonato de sodio, 25 $\mu\text{g/ml}$ de insulina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de apotransferrina humana, 25 nM de progesterona, 100 μM de putrescina, 30 nM de selenito de sodio, pH 7,2⁸, más 10 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico humano recombinante¹² (bFGF; R&D Inc.).

5 1 x 10⁶ células se extendieron en placas por cada 10 cm de placa de cultivo de tejido de plástico pre-revestida con 15 $\mu\text{g/ml}$ de poli-L-ornitina y 1 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectina de plasma bovino (Gibco). bFGF se añadió diariamente y el medio se cambió cada 2 días. Las células se hicieron pasar a una confluencia del 50% (4 días después de la extensión inicial en placa) al incubarlas brevemente en HBSS y rasparlas con un raspador de células.

10 Se encontraron células con una capacidad multipotencial por todo el neuroepitelio en desarrollo. Bajo condiciones de cultivo idénticas, se podían preparar células similares procedentes de otras regiones del SNC en desarrollo incluida la corteza cerebral, cuerpo estriado, septum, diencéfalo, mesencéfalo, cerebelo y médula espinal. De la corteza y del cuerpo estriado E14 y del hipocampo E16, aproximadamente el 70% de células sutilmente disociadas respondían a bFGF en el espacio de 2 días de la extensión en placa al sufrir una mitosis.

15 2. Propagación de células madre del SNC procedentes del cerebro de rata embrionario

a) Expansión en masa

20 Células del hipocampo aisladas de cerebros de rata embrionarios se expandieron mediante la adición diaria de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) en medio exento de suero. El suministro continuo de bFGF era importante para reprimir la diferenciación y para mantener una población homogénea de células que se dividían rápidamente y que expresaban nestina, una proteína filamentosa intermedia característica de células precursoras del SNC^{13,14}. Menos del 1% de las células expresaba el marcador astroglial GFAP o los marcadores oligodendrogiales, O4 y GalC.

30 Las células se hicieron pasar durante 4 días después de la extensión en placa, tiempo durante el cual el número de células aumentó rápidamente con un tiempo de duplicación de células medio de aproximadamente 24 horas. Las células pasadas se volvieron a extender en placa a razón de 0,5 x 10⁶ células por cada 10 cm de placa y se dejó que se propagaran adicionalmente. Las células se podían subcultivar hasta cinco veces de esta manera hasta un total de 20 días *in vitro*, tiempo durante el cual se podía esperar de manera ideal un rendimiento de 2²⁰ células. Después de este período de tiempo, la tasa mitótica de las células disminuyó rápidamente y las células perdieron gradualmente su capacidad multipotencial, exhibiendo características gliales y siendo incapaces de diferenciarse en neuronas.

35 Grandes números de células procedentes de la corteza, el cuerpo estriado y el septum, aisladas de embriones de 12-18 días de gestación, podían también expandirse en cultivo en masa de la misma manera. El transcurso en el tiempo de la expansión era similar al de las células del hipocampo. La expansión continua estaba de nuevo limitada por la pérdida constitutiva de la multipotencialidad después de aproximadamente 20 días de la división de la célula. Así, esta regresión parece ser una propiedad característica de las células madre del SNC.

40 b) Expansión clonal

45 No está disponible ningún marcador antigénico sencillo que identifique de forma única células madre multipotenciales procedentes de otros precursores *in vitro*. La identidad de una población precursora solamente se puede confirmar mediante la capacidad de diferenciación de las células. Las condiciones definidas para el cultivo en masa en esta solicitud también permitían una expansión clonal en donde las células fueron extendidas en placas a una densidad extremadamente baja de células, de modo que las células sencillas estaban bien aisladas.

50 La capacidad de diferenciación de las células expandidas en el cultivo en masa se confirmó en cada pase extendiendo 200 células por cada 10 cm de placa y sometiénolas a cultivo bajo condiciones como las descritas anteriormente. En el espacio de 24 horas de la extensión en placas, células sencillas bien aisladas fueron marcadas con un anillo de 3 mm (Nikon) en el fondo de la placa. La viabilidad inicial de las células sencillas marcadas era 5-10%, y cada placa proporcionaba típicamente 10-20 clones marcados. Solamente una sola célula residía en cada círculo. La subsiguiente población de células dentro de cada círculo son la progenie de esa célula sencilla. Clones se expandieron hasta durante 55 10 días (500-2000 células). El tiempo de duplicación medio era de aproximadamente 24 horas.

3. Diferenciación y análisis de células madre del SNC procedentes del cerebro de rata embrionario

60 El potencial de desarrollo de células expandidas se sometió a ensayo diferenciando directamente las células. La retirada de bFGF inició la diferenciación en el espacio de 24 horas. Para iniciar la diferenciación de células de alta densidad, células que se dividían rápidamente, que habían estado en cultivo durante 12 días y se hicieron pasar tres veces se incubaron durante al menos 24 horas con 10 μM de BrdU (bromodesoxiuridina) antes del pase. 80-85% de las células incorporaban BrdU. Las células se recolectaron mediante raspado utilizando tripsina, seguido de inhibidor de tripsina de haba de soja en el medio exento de suero. Fueron extendidas en placas por duplicado a razón de 40.000 65 células/cm² en portaobjetos de cámara de múltiples pocillos (LabTek) pre-revestidos con poli-L-ornitina y fibronectina, y se cultivaron en el medio exento de suero sin bFGF. A los tiempos indicados, las células se fijaron y tiñeron con diversos anticuerpos de acuerdo con un proceso estándar.

Las células inmunopositivas se recontaron bajo un aumento de 400x. Se hizo un recuento de al menos cinco campos con un número total de células mayor que 1000 por muestra. Los resultados mostrados (fig. 1A) son recuentos de células de la media de dos experimentos. Los reactivos de anticuerpos utilizados eran: antisuero anti-nestina; anti-MAP2 (clon HM-2, Sigma) y antisuero anti-tau (Sigma) monoclonales, anti-neurofilamentos L y M monoclonales (clones NR4 y NN18, Boehringer-Mannheim), anti-beta tubulina tipo III (TuJ1), anti-GFAP monoclonal (ICN), A2B5 (ATCC), O4 y anti-galactocerebrósido (GalC).

A lo largo de un período de 6 días se produjo un aumento progresivo en el número de células que expresaban varios antígenos específicos para neuronas bien establecidos, incluidos MAP2a, b y c, beta-tubulina tipo 3 (TuJ1), tau y neurofilamentos L, M y H (Fig. 1A). Hasta el 50% de las células expresaba los antígenos neuronales y exhibía una morfología neuronal compleja. Las células restantes expresaban GFAP, GalC/O4 o nestina. Mientras que neuronas y glia han sido observadas previamente en cultivo expandido, estos ejemplos son los primeros en establecer que la diferenciación de células precursoras proliferantes se puede iniciar en un instante preciso y que surgen rápidamente múltiples tipos de células. Estas condiciones permiten un análisis del linaje a gran escala *in vitro*.

Para determinar si la población precursora contiene progenitores comprometidos separados que dan lugar independientemente a neuronas y glia, células que se dividían rápidamente se extendieron en placas a una densidad clonal (200 células por cada 10 cm de placa) y células sencillas bien aisladas se marcaron con círculos de 3 mm de diámetro. El 5-10% de las células sencillas marcadas sobrevivió y proliferó con un tiempo de duplicación de 24 horas para generar clones. Después de diversos períodos de expansión (los tamaños de los clones oscilan entre 2^4 y 2^{10} células), se inició la diferenciación de clones lavando las placas una vez con HBSS y cultivándolas en el mismo medio, pero en ausencia de bFGF (fig. 2).

Para la subclonación (datos no mostrados en la Tabla II), las placas clonales se lavaron y se dejaron brevemente en HBSS hasta que las células se redondeaban. Se recogieron clones de 500-2000 células en un volumen de 50 μ l con un pipeteador ajustable, al tiempo que se observaba a través de un microscopio. Cada clon se volvió a extender en placas en una placa de 10 cm y células sencillas se marcaron y cultivaron como antes.

Tipos de células dentro de los clones se analizaron durante los primeros seis días de diferenciación mediante doble tinción con combinaciones de anticuerpos específicos para el tipo de célula que reaccionan con células mutuamente exclusivas:

neuronas = MAP2+, tau+, TuJ1+, neurofilamento L+, o neurofilamento M+;

astrocitos = GFAP+; y

oligodendrocitos = O4+ o GalC+.

La doble tinción se realizó secuencialmente utilizando un kit comercial (Zymed) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la tinción de oligodendrocitos, las células fijadas con paraformaldehído al 4% se tiñeron primeramente para los antígenos O4 o GalC de la superficie de la célula sin permeabilización. El primer anticuerpo se desarrolló con una reacción de fosfatasa alcalina (azul) y el segundo con una reacción de peroxidasa (roja) (Zymed).

Como en el cultivo de alta densidad, hacia los seis días, el 50% de las células en un clon expresaban antígenos neuronales incluidos MAP2, tau y beta-tubulina tipo III (Tabla I, figs. 3A y C). En la Tabla I, clones de células precursoras del hipocampo se expandieron, diferenciaron y analizaron como se describe arriba. Arriba se presenta una lista parcial de clones típicos. Se muestran el número total de células (tamaño del clon) y las células teñidas positivas para los antígenos específicos para el tipo de célula. Su proporción relativa se da en porcentaje entre paréntesis. Se cuantificó un total de 48 clones procedentes de 4 pases diferentes en 6 experimentos separados. La media total indica la composición media de cada uno de los tipos de células en los 48 clones.

La expresión del neurofilamento se demoró bajo estas condiciones. En promedio, el 8% de las células en un clon era GalC+ y tenía una morfología de oligodendrocito típica. Un 8% adicional expresaba GFAP y exhibía una morfología de astrocyto característica. Las restantes células no estaban teñidas por ninguno de los anticuerpos específicos para los tipos de células diferenciadas, sino que reaccionaban con anticuerpos A2B5 y/o anti-nestina. Un máximo del 20% de las células murió durante la diferenciación. Se obtuvieron resultados idénticos independientemente de que los clones se obtuvieran a partir de células sutilmente disociadas sin ningún pase previo o partir de células después de 4 pases (26 días).

Células con una capacidad multipotencial se encontraban a lo largo de todo el neuroepitelio en desarrollo. Bajo condiciones de cultivo idénticas, células similares se podían preparar a partir de otras regiones del SNC en desarrollo, incluida la corteza cerebral, el cuerpo estriado, septum, diencefalo, mesencefalo, cerebelo y médula espinal. Cuando se expandían clonalmente, casi todos los clones contenían múltiples tipos de células definidos tanto por la morfología como por la expresión del antígeno con neuronas que constituían el 50% del clon.

Clones proliferantes de las células multipotenciales contenían una morfología uniforme y modelos de expresión de antígeno. A pesar de ello, la separación de morfologías neuronales y no neuronales se producía rápidamente en el espacio de 24 horas y solamente después de la retirada del mitógeno. Las neuronas tempranas estaban uniformemente

distribuidas por todo el clon sin una polaridad o localización obvia sugiriendo la ausencia de progenitores neuronales comprometidos durante la expansión clonal. Además de ello, el número de neuronas aumentaba linealmente con el tamaño creciente del clon y constituía de forma reproducible el 50% del clon (fig. 1B).

Con el fin de determinar adicionalmente si los clones en expansión consistían en progenitores comprometidos proliferantes, se recogieron clones y se volvieron a extender de nuevo en placas. 10-15% de las células dieron lugar a clones de segunda generación. De nuevo, la totalidad de los subclones contenían neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células sin teñir (Tabla II). Más específicamente, en la Tabla II se muestran la composición del tipo de célula de subclones obtenidos de tres clones independientes, HI6, HI8, HI9. Se cuantificó un total de 84 subclones a partir de 13 clones parentales independientes en dos experimentos separados. Solamente se presenta una lista parcial. La media total indica la composición media de cada tipo de célula procedente de los 84 subclones. Ningún subclón consistía solamente en un tipo de célula. Estos datos indican que los precursores multipotenciales sufren divisiones simétricas para regenerar células hijas con una capacidad multipotencial.

4. Aislamiento, propagación, diferenciación y análisis de células madre del SNC procedentes del cerebro de rata adulta

La capa subependimal del cerebro de rata adulta contiene células mitóticas nestina-positivas que podían expandirse en cultivo agregado en presencia de factor de crecimiento epidermal (EGF), pero no bFGF¹⁵. Algunas de las células en los agregados mostraban propiedades neuronales y astrocíticas. Para definir con mayor precisión su capacidad de desarrollo, la población mitótica (1% de 1×10^5 células/cerebro) que revestía el ventrículo lateral del cuerpo estriado de rata adulta se expandió en presencia de bFGF y se comparó con los precursores embrionarios. Rodajas del cerebelo procedentes de 250 g de cerebros de rata adulta (10-20 por experimento) se prepararon y la región subependimal del cuerpo estriado que revestía los ventrículos laterales se cortaron bajo el microscopio en HBSS oxigenada. Las células se disociaron incubando tejidos desmenuzados a la temperatura ambiente durante 10 minutos con tripsina (1 mg/ml), hialuronidasa (0,7 mg/ml) y ácido quinurénico (0,2 mg/ml) en HBSS oxigenada. Estas células se lavaron una vez en HBSS con 0,7 mg/ml de ovomucoide y 0,2 mg/ml de ácido quinurénico, se resuspendieron y se trituraron mecánicamente en la misma solución. Las células disociadas se recuperaron por centrifugación y se cultivaron en el medio exento de suero más bFGF (10 ng/ml) según se describe para las células embrionarias.

La morfología y características de desarrollo de las células adultas nestina-positivas eran similares a las de las células embrionarias. Después de la retirada de bFGF, los clones marcados se diferenciaban en múltiples tipos de células que expresaban MAP2, TuJ1, GFAP y GalC (Fig. 3B y D). De manera notable, la misma alta proporción de neuronas se encontró en clones diferenciados de células adultas como en los clones embrionarios (Tabla III). Más específicamente, la Tabla III muestra la composición del tipo de células de clones diferenciados, derivados de células subependimales adultas. Se cuantificaron 23 clones de tres experimentos independientes.

5. Aislamiento, propagación, diferenciación y análisis de células madre del SNC de cerebros de rata embrionarios y adultos

Células sutilmente disociadas de diversas regiones de cerebro embrionario se cultivaron en presencia de EGF (20 ng/ml) o bFGF (10 ng/ml) bajo condiciones idénticas según se describe arriba. Células adultas sutilmente disociadas se prepararon como se describe arriba y se cultivaron bajo condiciones idénticas a las de las células embrionarias. El posible efecto de la densidad inicial de células sobre la respuesta mitogénica se sometió a ensayo variando la densidad inicial de células desde 1×10^4 a $2,5 \times 10^6$ por placa. A baja densidad, se midió la eficacia de la formación de la colonia; a alta densidad, se hizo un recuento de células mitóticas BrdU+/nestina+. Colonias expandidas con EGF y bFGF se diferenciaron también retirando los mitógenos y los tipos de células se analizaron como se describe arriba.

Bajo las condiciones de cultivo de estos ejemplos, EGF era un mitógeno con la misma eficacia que bFGF para células adultas (fig. 1C) y, cuando se diferenciaban los clones, éstos dieron lugar a los tres tipos de células. Clones embrionarios expandidos con EGF, con y sin pase, también se diferenciaban en los tres tipos de células. A diferencia de las células adultas, sin embargo, EGF era al menos 10 veces menos eficaz que bFGF como mitógeno para las células embrionarias de varias regiones diferentes, independientemente de la densidad inicial de células (fig. 1C). Así, con la excepción de los efectos proliferantes de EGF, estos datos revelan que las células multipotenciales procedentes de los SNCs embrionario y adulto son acusadamente similares. TGF α (10 ng/ml) también era un mitógeno para las células multipotenciales y no se podía distinguir de EGF, mientras que aFGF (10 ng/ml) en presencia de heparina (1 μ g/ml) mimetizaba los efectos de bFGF.

6. Diferenciación dirigida de células madre del SNC procedentes del cerebro embrionario y adulto de ratas

El análisis clonal sugiere que los precursores multipotenciales no están comprometidos antes de la retirada del mitógeno y, así, señales extracelulares pueden regular la determinación del tipo de célula. Los autores de la invención sometieron a ensayo si la proporción de los tipos de células generados dentro de un clon podía ser influenciada por factores de crecimiento y citoquinas, ya sea durante la proliferación o la diferenciación.

La influencia de factores de crecimiento sobre la especificación del tipo de células se sometió a ensayo añadiendo éstas al cultivo dos días antes de la retirada de bFGF y durante 6 días de diferenciación. Diariamente se añadieron factores y el medio se cambió cada 2 días. Al término de los 6 días se analizaron los clones en cuanto a la composición

del tipo de célula mediante doble tinción como se describe arriba. Las concentraciones finales de los factores eran 10 ng/ml de PDGF-AA, -AB o -BB, 10 ng/ml de CNTF y 3 ng/ml de T3.

En clones embrionarios, la proporción de neuronas aumentaba significativamente en presencia de PDGF (10 ng/ml, -AA, -AB o -BB) durante la diferenciación. Hasta el 80% de las células eran neuronales con la expresión de MAP2, tau, TuJ1 o NF-M, y un número menor de células se expresaba O4, GalC y GFAP (figs. 3E y F, Tabla IV). Más específicamente, la Tabla IV muestra la composición clonal media de cada tipo de célula obtenida cuando los clones se diferenciaban durante 6 días en ausencia (no tratado) o en presencia de diferentes factores. Se prepararon placas clonales de células después de 0-3 pases. El tamaño del clon oscilaba entre 17 y 5336 células. Los tipos de células diferenciados se analizaron como se describe arriba.

Las células que expresan los antígenos neuronales mostraban una morfología menos madura bajo estas condiciones. Cuando se trataban con factor neurotrófico ciliar (CNTF), los clones dieron lugar casi exclusivamente a astrocitos (figs. 3G y H, Tabla IV). De manera notable, menos del 1% de las células era MAP2-positivas en este estado. Las células tratadas con CNTF eran intensamente GFAP-positivas y todas mostraban una morfología plana astrocítica. LIF mostró efectos idénticos que CNTF.

La hormona tiroidea, tri-yodotironina (T3), influía sobre la diferenciación de los precursores multipotenciales hacia un destino glial mixto (figs. 3I y J, Tabla IV). Astrocitos y oligodendrocitos aumentaron ambos 3 veces y había una acusada disminución en la proporción de neuronas. Como en el caso de los clones no tratados, células GalC- y O4-positivas mostraban morfologías de oligodendrocitos características. Los clones eran de un tamaño similar en todos los experimentos y el análisis numérico de células muertas mostró que la muerte selectiva de células no puede ser la responsable de los cambios en la proporción de tipos de células. Se obtuvieron resultados similares con células madre multipotenciales procedentes de la corteza y del cuerpo estriado embrionarios. Además, las células multipotenciales derivadas de la capa subependimial del cerebro adulto mostraron respuestas de diferenciación cuantitativamente similares a PDGF, CNTF y T3 (fig. 3, Tabla IV). Esto enfatiza la naturaleza general de estas vías.

Otros factores que fueron sometidos a ensayo durante este estudio y que no mostraron ningún efecto instructivo significativo en la determinación del tipo de célula eran: NGF, NT-3, BDNF, TGF β 1, IL1 β , IL2-11, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, oncoestatina M, factor de células madre, eritropoyetina, interferón gamma, ácidos 9-cis y todos los -trans retinoicos, acetato de retinilo, dexametasona y corticosterona.

7. Aislamiento, expansión, diferenciación y análisis de células madre del SNC procedentes del cerebro fetal humano

Tejidos de diversas regiones de cerebros fetales humanos se obtuvieron de fetos de 45 a 114 días en períodos de gestación. Los tejidos se disociaron en HBSS mediante trituración mecánica según se describe arriba. Las células se recogieron por centrifugación, se resuspendieron, se extendieron en placas a razón de 1×10^6 células por cada 10 cm de placa y se expandieron en un medio exento de suero más 10 ng/ml de bFGF bajo condiciones idénticas a las descritas para las células madre del SNC fetales de roedores de arriba.

Aproximadamente 25-50% de las células humanas, dependiendo de la edad y de la región, tenía una morfología de la célula madre del SNC y respondían a bFGF mediante una rápida división de la célula. Células madre del SNC humanas se expandieron en cultivo hasta durante 36 días. El tiempo de duplicación medio era de aproximadamente 48 horas, lo que contrasta con la contraparte de roedores con un tiempo de duplicación de 24 horas. Tras la retirada de bFGF, la diferenciación de células madre del SNC fetales humanas se produjo rápidamente y surgieron múltiples tipos de células. En cultivo de alta densidad, las células se diferenciaron durante hasta 13 días y los subsiguientes tipos de células presentes se analizaron mediante inmunocitoquímica según se describe para el cultivo de células de roedores. Antes de la diferenciación por la retirada de bFGF, en el cultivo están presentes pocas neuronas tau-positivas (fig. 4). En contraposición, después de la retirada del bFGF, hasta el 40% de las células del cerebro fetal humanas expandidas con bFGF en cultivo en masa eran neuronas inmunorreactivas con antisuero anti-tau específico para seres humanos. Una mayoría de las neuronas tau-positivas en cultivo podía marcarse con BrdU (bromodesoxiuridina), el indicador de la mitosis, en un espacio de 24 horas antes de la retirada de bFGF (figs. 5C y D). Este resultado demuestra que las condiciones de cultivo definidas para las células madre del SNC de roedores se aplica igualmente bien para la expansión y diferenciación eficaces de células madre del SNC humanas para generar grandes números de neuronas en cultivo.

Con el fin de analizar adicionalmente la multipotencialidad de las células madre del SNC fetales humanas en el cultivo en masa, células en división se extendieron en placas a una densidad clonal (100-200 células por cada 10 cm de placa) y se expandieron adicionalmente durante 20 días (tamaño del clon = 2^{10}). Subsiguientemente, se diferenciaron clones retirando bFGF y analizando los tipos de células inmunorreactivos para anticuerpos específicos para neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. La mayoría de las células fetales humanas clonalmente expandidas se diferenciaban para dar origen a los tres tipos de células - neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (figs. 5E y F). Al igual que con las células madre de roedores, neuronas MAP2-positivas constituían aproximadamente el 50% del clon (Tabla V). Las células restantes tenían una morfología glial grande alargada. Aproximadamente el 10% de las células expresaba antígeno astrocítico maduro, GFAP, y aproximadamente el 2% expresaba antígenos oligodendrocíticos O4 o galactocerebrósido (GalC) (Tabla V). Este análisis clonal demuestra, así, que el sistema de cultivo descrito en esta memoria permite un aislamiento, expansión en masa y diferenciación eficaces de células madre multipotenciales procedentes del SNC fetal humano.

8. *Diferenciación dirigida de células madre del SNC procedentes del cerebro fetal humano*

Además de la multipotencialidad y de las propiedades de auto-renovación de células madre del SNC, la capacidad de diferenciarse en un tipo de célula en respuesta a una señal extracelular es la propiedad definitoria clave de células madre del SNC de roedores según se demuestra arriba. Los tres factores extracelulares, PDGF, CNTF y T3, también dirigían la diferenciación de los clones de células del SNC humanas de una manera idéntica (Tabla V, figs. 6A-D). Así, en presencia de PDGF, células neuronales MAP2-positivas aumentaban hasta un 71% de un clon, significativamente mayor que el 46% en el cultivo control no tratado. En contraposición, en presencia de CNTF, disminuían las células MAP2-positivas y aumentaban drásticamente los astrocitos GFAP-positivos hasta un 85% de los clones. T3 aumentaba las células oligodendrogiales O4 o GalC-positivas, así como las células astrogiales GFAP-positivas, mientras que disminuían neuronas MAP2-positivas (Tabla V). Estos resultados demuestran las similitudes cuantitativamente entre las células madre del SNC de seres humanos y de roedores y la capacidad de aplicación universal del presente sistema de cultivo para una expansión y diferenciación eficaces de células madre del SNC de mamíferos.

9. *Maduración, sinaptogénesis y diversidad de neuronas derivadas de células madre in vitro*

La multipotencialidad de células madre del SNC y su diferenciación dirigida por parte de señales extracelulares definidas establece inequívocamente que las neuronas se derivan directamente de células madre. Así, el origen de la diversidad neuronal observada en el cerebro maduro parte de células madre del SNC. ¿Pueden las células madre del SNC expandidas en cultivo durante un largo plazo conservar la capacidad de madurar para formar una polaridad axonal-dendrítica, con el fin de interactuar con otras células y formar sinapsis? Con el fin de investigar el grado al que las neuronas derivadas de células madre del SNC pueden madurar *in vitro* bajo condiciones exentas de suero, se dejó que células madre derivadas del hipocampo de rata embrionario se diferenciaron durante hasta 21 días a alta densidad.

Subsiguientemente, las neuronas se tiñeron con diversos anticuerpos que reconocían proteínas específicas para axones o dendritas. Sinapsina, sinaptofisina, sinaptobrevina y syntaxina son proteínas que se encuentran en las vesículas sinápticas de neuronas maduras en los terminales del axón y están implicada en la exocitosis de neurotransmisores. Las cuatro proteínas están muy co-localizadas en las neuronas derivadas de células madre, en un modelo en puntos, lo más probablemente delineando los terminales del axón. Los procesos que portan las proteínas de la vesícula sináptica eran delgados, muy elaborados, viajaban durante una larga distancia y decoraban el perímetro de neuronas vecinas (fig. 7G). Estas contenían proteínas específicas para axones tales como tau y neurofilamento y estaban desprovistas de proteínas específicas para dendritas tales como MAP2a y MAP2b (fig. 7H y 7I).

Estos resultados indican que, de manera similar a las neuronas generadas *in vivo*, neuronas derivadas de células madre exhiben una adecuada polaridad axón-dendrita y exhiben una actividad sináptica. Neuronas derivadas de células madre también expresaban receptores neurotransmisores principales, transportadores y enzimas de tratamiento importantes para las funciones del neurotransmisor. Estos incluían miembros de receptores glutamato, receptores GABA y receptores dopamina (fig. 8). Además, las células madre conservan su capacidad de generar subtipos de neuronas con diferencias moleculares entre los subtipos.

10. *Generación in vitro de todos los subtipos neuronales encontrados en el cerebro maduro por diferenciación de las células madre del SNC*

Entendiendo los programas moleculares que gobiernan la organización de la diversidad neuronal complejas en el cerebro adulto de mamíferos es un objetivo principal de la neurobiología del desarrollo. La mayoría de los dominios estructurales en el cerebro adulto y subpoblaciones de neuronas post-mitóticas que los comprenden se generan durante el desarrollo embrionario. Las propiedades del desarrollo de las células precursoras inmediatas que dan lugar a neuronas específicas, sin embargo, son ampliamente desconocidas. Tampoco son claras la fase precisa de diferenciación y el principio molecular general mediante el cual las neuronas adquieren sus fenotipos neurotransmisores.

Una línea emergente de evidencias es que desde las fases tempranas del desarrollo, el tubo neural y las vesículas del cerebro son diseñados por una expresión espacial y temporal de un cierto número de proteínas nucleares y segregadas^{58,59}. Esta evidencia es consistente con la hipótesis de que el neuroepitelio temprano está constituido por células precursoras predeterminadas y que la organización cortical madura, por ejemplo, deriva de una "proto-corteza"⁶⁰, temprana predeterminada.

La idea del neuroepitelio prederminado, sin embargo, está en contra con otras observaciones de estudios en representación en mapa de destino *in vivo* y de estudios de trasplante^{5,61-63}. Una conclusión principal de estos experimentos es que determinadas poblaciones de precursores son multipotenciales y/o ampliamente plásticas con respecto a los linajes neuronales frente a los gliales, así como los fenotipos neuronales tales como fenotipos neurotransmisores y el destino laminar o regional. Con el fin de reconciliar estos dos conjuntos de observaciones aparentemente contradictorias, deben abordarse varios asuntos principales. ¿Qué es la capacidad de diferenciación de la célula precursora que da directamente origen a neuronas terminalmente diferenciadas? ¿Qué información, si es que hay alguna, contiene la célula precursora con respecto al fenotipo específico de las neuronas?

Para contestar a estas cuestiones, los autores de la invención han aislado con éxito del neuroepitelio temprano de rata células precursoras multipotenciales, células madre del SNC, y han examinado cuantitativamente su capacidad de diferenciación *in vitro*⁶⁴ (véanse también los Ejemplos 1-3, 5 y 6). Bajo condiciones constitutivas sin influencia exó-

gena, clones de células madre del SNC se diferenciaban en los tres tipos principales de células - neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. En presencia de factores extracelulares sencillos, sin embargo, su elección de destino podía dirigirse hacia tipos de células sencillos. Además, células madre multipotenciales de este tipo eran con mucho la mayoría de poblaciones expandibles en cultivo, lo que sugiere que eran abundantes en el neuroepitelio. Estas propiedades se han compartido también por células madre del SNC procedentes del cerebro fetal humano. Así, estas son las propiedades definitorias de células madre del SNC de mamíferos que constituyen la mayor parte del SNC embrionario y son los precursores directos a las neuronas del cerebro adulto.

Entonces, ¿qué es la capacidad de desarrollo de células madre del SNC multipotenciales con respecto a fenotipos neuronales? En este Ejemplo, los autores de la invención examinaron el grado de información incorporada en las células madre del SNC aisladas para guiar una diferenciación terminal y una maduración de neuronas y para la generación de subpoblaciones específicas de neuronas. Los autores de la invención encontraron que a pesar de que las células madre del SNC están ampliamente distribuidas en grandes números por todo el neuroepitelio y son igualmente multipotenciales con respecto a los tres tipos principales de células, las células madre del SNC derivadas de una región distinta dan origen a fenotipos neuronales apropiados solamente para esa región. Concluyeron que la información que especifica los fenotipos neuronales específicos para la región está presente en el estado de célula madre multipotencial, que esta información es establemente heredada a través de muchas divisiones celulares *in vitro* y que, cuando se diferencia bajo condiciones constitutivas en ausencia de influencia externa, las células madre del SNC no son equivalentes y cada una da origen a conjuntos sólo restringidos de neuronas apropiados para la región de la que se originaban las células madre del SNC.

En los Ejemplos 1-3, 5 y 6, los autores de la invención limitaron la diferenciación de clones de células madre del SNC solamente al instante más temprano de la maduración en el que los tres fenotipos celulares, es decir neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, podían ser tomados como muestras sin topar con la muerte significativa de la célula. Por lo tanto, la diferenciación neuronal estaba limitada solamente a las fases tempranas de diferenciación. Los autores de la invención decidieron examinar en que medida neuronas derivadas de células madre del SNC podían diferenciarse *in vitro* bajo condiciones constitutivas, es decir en medio exento de suero, mínimo definido en ausencia de factores exógenos.

La diferenciación neuronal abarca muchas fases distintas de la maduración celular. Una de las características iniciales que se esperan de una neurona funcional es la polarización de una neurona en distintos compartimientos, es decir soma, dendrita y axón. Los autores de la invención examinaron diversas condiciones de cultivo definidas para fomentar la diferenciación de clones de células madre del SNC multipotenciales en neuronas polarizadas. Bajo condiciones clonales encontraron que la supervivencia neuronal está también limitada para permitir la caracterización sistemática de fenotipos tardíos de diferenciación neuronal. De manera interesante, la adición de diversos factores neurotróficos comercialmente disponibles, que incluyen familias de NGF y FGF no podía superar esta barrera.

Sin embargo, al aumentar simplemente la densidad celular de células madre del SNC en diferenciación era suficiente para una supervivencia eficaz neuronal, y neuronas polarizadas con una morfología madura podían obtenerse de forma reproducible al cabo de 14-21 días en medio N2 en ausencia de glutamato y de cualesquiera otros factores exógenos. Aunque no es esencial, la suplementación ocasional del cultivo con factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) facilitaba generalmente de manera adicional la supervivencia neuronal a largo plazo y, por lo tanto, se utilizaba en este Ejemplo.

Específicamente, células madre del SNC se aislaron y expandieron en condiciones definidas tal como se describe previamente antes en los Ejemplos 1-3, 5 y 6. Diferentes neuronas se derivaron aislando células madre del SNC de diferentes regiones del sistema nervioso central y de diferentes fases del desarrollo del SNC. Las condiciones de diferenciación para obtener todos los fenotipos neuronales eran idénticas y las diferentes neuronas se derivaban solamente de permitir la expresión de información inherente ya incorporada en las células madre del SNC expandidas.

Más específicamente, en el último ciclo mitótico, la diferenciación fue manifiestamente desencadenada por la retirada del mitógeno, por ejemplo bFGF, reemplazando el medio exento de mitógeno por medio de crecimiento. Al mismo tiempo, o algunos días más tarde sin ninguna consecuencia diferencial, las células se recolectaron mediante tripsinización y centrifugación de acuerdo con procesos convencionales. La tripsina fue inactivada añadiendo inhibidor de tripsina. El sedimento de células resultante se resuspendió en el mismo medio de crecimiento N2 sin bFGF ni ningún otro factor y se extendió en placas a una alta densidad de células, óptimamente a 125.000 células por centímetro cuadrado, sobre placas de cultivo de tejido pre-revestidas con poli-L-ornitina (15 $\mu\text{g/ml}$) y fibronectina (1 $\mu\text{g/ml}$) o laminina (1 $\mu\text{g/ml}$). Dos a cuatro días más tarde, el medio N2 fue reemplazado por medio N2 sin ácido glutámico. La alta densidad de células era necesaria para una diferenciación neuronal eficaz, y la ausencia de ácido glutámico era necesaria para permitir una supervivencia a largo plazo de neuronas maduras.

Las neuronas se mantuvieron durante largos períodos (hasta 30 días) bajo estas condiciones, cambiando el medio cada 3-4 días. La suplementación del medio con 20 ng/ml de BDNF humano recombinante facilitó adicionalmente la supervivencia y maduración neuronales. Al cabo de 12-30 días de diferenciación, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y los fenotipos neuronales se identificaron mediante inmunocitoquímica frente a proteínas marcadoras.

Con el fin de demostrar directamente que las neuronas maduras y diversos subtipos de neuronas en cultivo se producían directamente a partir de las células madre del SNC mitóticas, las células madre del SNC procedentes de

diversas regiones del cerebro embrionario (véase más abajo para los ejemplos), que habían sido expandidas *in vitro* durante largo tiempo (aproximadamente 16 días y 16 divisiones celulares a lo largo de 4 pases) fueron manifiestamente diferenciadas durante un total de 21 días tal como se describe arriba. Las células madre del SNC mitóticas se marcaron por impulsos con bromodesoxiuridina (BrdU) durante las últimas 24 a 48 horas antes de la diferenciación. Desde todas las regiones, hasta el 86% de neuronas MAP2ab-positivas también eran positivas para BrdU. Hacia las 24 horas del marcaje con BrdU, aproximadamente el 50%-75% de las neuronas, inmunopositivas para los antígenos específicos para diferentes subtipos neuronales, también eran positivas para BrdU. Antes de la etapa de diferenciación manifiesta, no se observaron neuronas que expresaran MAP2ab ni ningún otro antígeno específico para el subtipo en ninguno de los cultivos de células madre del SNC. Así, consistente con los ejemplos previos (Ejemplos 1-8) todas las neuronas y subtipos neuronales que se reseñan más abajo se produjeron exclusivamente a partir de células madre del SNC mitóticas y expandidas durante largo tiempo.

Las neuronas, así obtenidas, contenían una localización distinta de proteínas dendríticas tales como MAP2ab procedentes de proteínas axonales tales como tau, neurofilamentos y varias proteínas de la vesícula sináptica. En la fig. 9 se muestran neuronas típicas derivadas de células madre del hipocampo embrionario de rata. Las neuronas maduras fueron inmunoteñidas tres veces con anticuerpos contra BrdU (fig. 9A), MAP2ab (fig. 9B) y sinapsina (fig. 9C). En la fig. 9D se muestra la tinción combinada.

Las figuras 9E y F muestran otro ejemplo típico de neuronas derivadas de células madre del hipocampo teñidas dos veces para la sinaptofisina (fig. 9E), una proteína de la vesícula sináptica que marca terminales del axón, y MAP2ab (Fig. 9C) que marca el proceso dendrítico. Estos resultados de inmunotinción demuestran la polarización de neuronas en axones y dendritas y sugiere significativamente numerosas uniones sinápticas. Un examen adicional de estas morfologías mediante microscopía electrónica confirmó la abundante presencia de sinapsis que contenían vesículas sinápticas y densidades sinápticas (fig. 10).

Estas redes neuronales también eran electrofisiológicamente funcionales. Conducían potenciales de acción (fig. 11A), contenían diversos canales de iones sensibles a la tensión (fig. 11B) y transmitían potenciales excitatorios e inhibitorios post-sinápticos cuando eran provocados por aplicación en baño del neurotransmisor excitatorio, glutamato (figs. 11C y D). Así, estos resultados demuestran inequívocamente que la totalidad de la información necesaria y suficiente para formar neuronas maduras y sinaptogénesis a partir del estado mitótico está autocontenida y es estable dentro de las células madre del SNC expandidas durante largo tiempo.

Células madre del SNC expandidas durante largo tiempo, derivadas de varias regiones diferentes del neuroepitelio, dieron origen a distintas subpoblaciones de neuronas. Así, células madre del SNC se aislaron a partir de varias regiones diferentes del SNC embrionario de rata en los instantes en los que se sabía que se encontraban en el comienzo o a la mitad de la neurogénesis - corteza (CTX), septum (SEP), eminencia gangliónica lateral (LG - siglas en inglés), eminencia gangliónica media (MGE - siglas en inglés), hipocampo en el día de gestación embrionaria 15,5 (E 15,5), tálamo, hipotálamo E13.5, mesencéfalo ventral y dorsal E12.5 y médulas espinales E11.5-E13.5. A partir de cada una de estas regiones, cultivos casi homogéneos de células madre del SNC se podían expandir durante largo tiempo (típicamente durante 16 días con un tiempo de duplicación medio de 24 horas) de acuerdo con las condiciones de cultivo descritas previamente⁶⁴.

Las propiedades generales de las células madre del SNC en expansión tales como morfología, velocidad mitótica y características de diferenciación, no se podían distinguir entre diferentes regiones, incluido el hipocampo que ha sido descrito antes en detalle⁶⁴. En el análisis clonal, cada una de estas regiones contiene muchos clones de células madre del SNC con una capacidad multipotencial de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos en proporciones relativas idénticas a los clones de células madre del hipocampo previamente detallados⁶⁴.

La cuestión precisa es entonces si sólo hay un tipo de célula madre que constituye todo el neuroepitelio y que la especificación regional y la diversidad neuronal se producen en etapas subsiguientes de desarrollo, o si las células madre del SNC en la etapa multipotencial contienen la información para fenotipos neuronales regionalmente distintos.

Las eminencias gangliónicas lateral y media son dos estructuras estrechamente adyacentes que se desarrollan en paralelo formando el cuerpo estriado y el globo pálido en el cerebro adulto. Receptores de dopamina, D1 y D2 se expresan en el cuerpo estriado, pero D2 solamente está presente en el pálido. La expresión de receptores D1 y D2 procedentes de células madre del SNC aisladas a partir de las eminencias gangliónicas lateral y media E16 fue examinada por RT-PCR (fig. 12). Antes de la diferenciación, las células madre del SNC procedentes de cualquier región no expresaban receptores de dopamina. Después de 9 días de diferenciación, los receptores D1 y D2 fueron expresados en células madre derivadas de la LGE, pero solamente el receptor D2 se expresaba en células procedentes de la MGE. Este modelo de diferenciación era estable a lo largo del transcurso de la diferenciación durante 21 días del examen (fig. 12).

Neuronas colinérgicas del septum han sido críticamente atribuidas al brote de la enfermedad de Alzheimer. Estas neuronas aparecen durante E15-E18 en ratas. Células madre del SNC derivadas del septum E16 se diferenciaron durante 18-21 días bajo las condiciones definidas según se describen anteriormente, y la presencia de neuronas colinérgicas fue confirmada mediante histoquímica de acetilcolina transferasa y mediante inmunotinción para la acetilcolina transferasa y para el transportador de acetilcolina vesicular. La figura 13 A muestra una neurona colinérgica derivada de células madre del SNC septal, inmunoteñida para la acetilcolina transferasa. La figura 13B muestra el mismo campo

de visión que la fig. 13A, teñido para el marcador mitótico BrdU. Las figuras 13C y D muestran otro ejemplo de una neurona colinérgica teñida dos veces para el transportador vesicular de acetilcolina y BrdU, respectivamente.

La Tabla VII resume el número de neuronas MAP2ab-positivas por centímetro cuadrado y las proporciones de diferentes fenotipos neuronales con relación a las neuronas MAP2ab positivas totales derivadas de células madre del SNC de varias regiones y edades diferentes. Aproximadamente 4-5% de las neuronas MAP2-positivas eran colinérgicas. En contraposición, las células madre del SNC del hipocampo y cortical no dieron origen a neuronas colinérgicas.

Aproximadamente 0,4% de neuronas derivadas de células madre del SNC de las LGE y MGE también expresaban el transportador vesicular de acetilcolina, un marcador específico de neuronas colinérgicas (Tabla VII). Aproximadamente 2,8% a 10,7% de neuronas derivadas de las LGE y MGE contenían varios neuropéptidos diferentes, tales como neuropéptido Y, met-enkefalina y leu-enkefalina (fig. 14; Tabla VII). Las figuras 14A, C y D muestran neuronas derivadas de células madre del SNC de la LGE típicas teñidas para el neuropéptido Y, met-enkefalina y leu-enkefalina, respectivamente. Las figuras 14B, D y F muestran la inmunotinción para BrdU de los mismos campos que en las figs. 14A, C y E, respectivamente.

Cuando se diferenciaban células madre del SNC expandidas del mesencéfalo ventral E12.5, aproximadamente $2,6 \pm 0,3\%$ de neuronas MAP2-positivas expresaban tirosina hidroxilasa, la enzima clave para la síntesis de dopamina y un marcador bien establecido de neuronas dopaminérgicas (Tabla VII). La figura 15A muestra una neurona TH-positiva derivada de células madre del SNC típica y la figura 15B muestra la correspondiente tinción con BrdU del mismo campo. Todas las células TH-positivas son neuronas como se muestra por la doble tinción para TH y MAP2ab (figs. 15C y D, respectivamente). La mayoría de las neuronas restantes eran positivas para el marcador de neurogás GABAérgicas, ácido glutámico descarboxilasa (GAD) así como para la propia GABA (fig. 15E) y/o para acetilcolina esterasa (fig. 15F; Tabla VII) que se sabe es expresada en neuronas monoaminérgicas en este área.

En contraposición, células madre del SNC derivadas del mesencéfalo dorsal no generaban neuronas TH-positivas (Tabla VII). Casi todas las neuronas de este área ($100,9 \pm 9,1\%$) expresaban acetilcolina esterasa (Tabla VII). Lo más probable es que sean neuronas monoaminérgicas, consistentes con el modelo *in vivo*. De manera significativa, no surgían neuronas TH-positivas procedentes de células madre del SNC derivadas de la corteza, septum, hipocampo, cuerpo estriado y médula espinal (Tabla VII). Así, en paralelo con el modelo de expresión *in vivo* conocido, la generación de neuronas TH-positivas era única para las células madre del SNC del mesencéfalo ventral *in vitro*.

Células madre del SNC procedentes de la zona cervical y médulas espinales torácicas E13.5 se expandieron y diferenciaron. $1,2 \pm 0,1\%$ de neuronas MAP2-positivas eran colinérgicas que contenían transportador vesicular de acetilcolina (Tabla VII). Las neuronas colinérgicas que también expresan acetilcolina transferasa y son BrdU-positivas se muestran en las figuras 16C y D, respectivamente. $39,3 \pm 2,5\%$ de las neuronas expresaba acetilcolina esterasa (Tabla VII), la mayoría de las cuales se espera que sean monoaminérgicas. Una neurona acetilcolinaesterasa-positiva y BrdU-positiva típica se muestra en las figuras 16A y B, respectivamente.

Neuronas derivadas de células madre del SNC del hipocampo y de la corteza E15.5 no expresaban tirosina hidroxilasa, acetilcolina esterasa, acetilcolina transferasa ni transportador vesicular de acetilcolina (Tabla VII). Esto es apropiado para la conocida ausencia de estos marcadores en el hipocampo *in vivo*. Aproximadamente el 30% de neuronas MAP2ab-positivas eran GABAérgicas, indicado por la expresión de GAD y GABA. Las figuras 17A y B muestran ejemplos típicos de la tinción GAD- y GABA-positiva, respectivamente, que se solapan por completo. En las figuras 17C y D, respectivamente, se muestra una neurona calretinina- y MAP2ab-positiva del hipocampo típica.

Neuronas maduras también se pueden derivar con una eficacia igual a partir del tálamo e hipotálamo E13.5. Estas neuronas contienen excepcionalmente largos procesos axonales. Una neurona talámica típica, teñida para la proteína axonal, tau, y BrdU se muestra en las figuras 18A y B, respectivamente. Una neurona hipotalámica típica teñida para tau y BrdU se muestra en las figuras 18C y D, respectivamente. La tinción con sinapsina de neuronas talámicas e hipotalámicas se muestra en las figuras 18E y F, respectivamente.

Los ejemplos dados anteriormente, se han seleccionado en base a poblaciones solamente bien establecidas *in vivo* en la bibliografía y también en base a marcadores bien definidos, comercialmente disponibles. En la Tabla VII se muestra un resumen de las proporciones de diferentes fenotipos neuronales procedentes de diversas células de madre del SNC regionales. Estos ejemplos son sólo una parte de la diversidad neuronal presente en cultivos derivados de células madre del SNC.

En resumen, estos resultados demuestran de forma concluyente que distintas subpoblaciones de neuronas se generan en cultivo a partir de células madre del SNC expandidas, y que los tipos de neuronas generadas quedan restringidos de una manera específica para la región que corresponde a aproximadamente a los modelos de expresión *in vivo*. La información que especifica el fenotipo neuronal está, por lo tanto, embutida en el estado de célula madre multipotencial. Además de ello, esta información especificativa es congénitamente estable a lo largo de muchas divisiones celulares y queda establecida durante el subsiguiente proceso de diferenciación. Estos resultados demuestran directamente que el neuroepitelio de mamíferos está, de hecho, dividido en un modelo en mosaico de diferentes tipos de células madre del SNC multipotenciales con información hereditaria restringida que especifica fenotipos neuronales en ausencia de cualesquiera otras interacciones. Así, todos los subtipos neuronales encontrados en el cerebro maduro de mamíferos pueden ser generados *in vitro* mediante una diferenciación apropiada de células madre del SNC.

Estas neuronas y las células madre del SNC capaces de diferenciarse en neuronas de este tipo proporciona el elemento clave para la terapia génica, la terapia celular y la identificación de nuevas moléculas terapéuticas (proteínas, péptidos, ADN, oligonucleótidos, compuestos orgánicos sintéticos y naturales) dirigidos a trastornos del sistema nervioso.

Importancia de la tecnología de células madre del SNC

El comportamiento de las células madre *in vitro* proporciona importantes conocimientos sobre el desarrollo del SNC. Una proliferación eficaz y una diferenciación controlada de las células precursoras permitía un análisis cuantitativo de su capacidad de desarrollo. Estas células exhiben propiedades que son esperadas de células madre: rápida proliferación, multipotencialidad y auto-regeneración. Además de ello, las células procedentes del cerebro adulto eran cuantitativamente equivalentes a las células embrionarias, indicando que las células madre persisten en el adulto.

Las células multipotenciales podían aislarse eficazmente a partir de muchas regiones del SNC en desarrollo, indicando que son abundantes por todo el neuroepitelio. Esto contrasta con la noción ampliamente mantenida de que las células madre son raras. La diferenciación de las células madre se puede dirigir eficazmente mediante factores extracelulares que se sabe están presentes durante el desarrollo del SNC¹⁶⁻²³. Esto sugiere que diferentes factores extracelulares pueden actuar sobre una sola clase de células madre para generar diferentes tipos de células. Un mecanismo instructivo similar también ha sido observado *in vitro* con células madre aisladas del sistema nervioso periférico²⁴.

Múltiples tipos de células aparecen rápidamente cuando las células madre se diferencian *in vitro*. En contraposición, neuronas, astrocitos y oligodendrocitos aparecen en distintos instantes *in vivo*. Claramente, mecanismos adicionales deben regular la elección del destino *in vivo*. La expresión temporal y espacial de factores extracelulares y sus receptores puede ser una parte del mecanismo.

Otro mecanismo de regulación de la elección del destino *in vivo* puede implicar etapas intermedias de diferenciación. La identificación de la célula precursora de oligodendrocitos bipotencial, O-2A, a partir del nervio óptico postnatal demostró directamente que durante el desarrollo se producen progenitores restringidos^{25,26}. Las células madre son distintas de las células O-2A. Sus orígenes, propiedades y capacidades de desarrollo difieren. Dando por hecho que las células madre se diferencian en oligodendrocitos, la vía de diferenciación puede implicar una fase intermedia obligatorio, un estado progenitor comprometido tal como la célula O-2A. Las respuestas similares de las dos células a T3 y CNTF^{27,28}, puede reflejar esta etapa común.

Existe también evidencia del análisis del linaje *in vivo* e *in vitro* en cuanto a la presencia de otras restricciones del linaje, incluidos precursores neuronales y de oligodendrocitos bipotenciales y progenitores neuronales comprometidos^{6,7,29,30}. Estos también pueden surgir de la diferenciación de células madre. El ensayo clonal descrito en esta memoria permitirá definir cuantitativamente las contribuciones relativas de compromiso de linaje frente a factores instructivos y selectivos en estas células intermedias.

En resumen, la presente solicitud revela que:

(1) se puede hacer que la mayoría de las regiones del cerebro y de la médula espinal fetales puedan multiplicarse en cultivo bajo condiciones de cultivo completamente definidas para proporcionar hasta un incremento de 1.000.000.000 de veces en el número de células;

(2) el cultivo de células madre homogéneo puede ser excitado para diferenciarse bajo condiciones controladas con precisión, en las que hasta el 50% de las células se diferencian en neuronas, mientras que las células restantes se convierten en astrocitos y oligodendrocitos;

(3) muchos tipos diferentes de neuronas se generan en cultivo;

(4) se han identificado factores de crecimiento que dirigen eficazmente las células madre a diferenciarse en un sólo tipo de célula, es decir neurona, astrocito u oligodendrocito; y

(5) se han aislado y expandido células madre equivalentes a partir de la capa subependimal de adultos utilizando un proceso similar.

Estos resultados enumerados proporcionan las siguientes ventajas frente al estado actual de la técnica. En primer lugar, esta tecnología de células madre del SNC permite un cultivo a gran escala de células madre homogéneas en un estado no diferenciado. Cuanto más tiempo se puedan mantener las células en el estado de célula madre, tanto mayor será el rendimiento de neuronas que se pueden derivar del cultivo, permitiendo con ello una transferencia más eficaz de genes y una selección a gran escala de esas células que portan el gen de interés.

En segundo lugar, este sistema de cultivo permite una diferenciación controlada de las células madre, en donde el 50% de las células expandidas se convierte ahora en neuronas. Esta eficaz diferenciación, combinada con una eficaz proliferación, proporciona rutinariamente más de 100 millones de neuronas a partir de la neocorteza de un cerebro fetal de rata en un período de dos semanas.

En tercer lugar, la diferenciación de las células madre en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos se produce constitutivamente, en donde los tres tipos de células continúan madurando en cultivo, lo más probablemente debido a interacciones de nutrición unos con otros, tal como durante el desarrollo normal del cerebro. Surgen muchos tipos diferentes de neuronas, que responden a muchos factores de crecimiento y que contienen neurotransmisores y sus receptores. Así, una parte importante del desarrollo del cerebro puede ser recapitulada en un entorno manipulable, destacando con ello el potencial de extraer y someter a ensayo nuevos factores neurotrópicos normalmente secretados por estas células.

Finalmente, estos resultados permiten el establecimiento de condiciones mediante las cuales neuronas inmaduras en división se pueden derivar directamente de las células madre y se pueden expandir adicionalmente para permitir un aislamiento a gran escala de tipos específicos de neuronas en cultivo.

Aplicaciones comerciales potenciales

La tecnología de células madre de la presente invención se puede desarrollar para la aplicación directa a muchos aspectos diferentes del descubrimiento de terapia y de fármacos para trastornos del sistema nervioso. En lo que sigue se esbozan cuatro ejemplos para aplicaciones comerciales potenciales, es decir la terapia génica para la enfermedad de Parkinson, la terapia celular, la investigación de nuevos factores de crecimiento y ensayos para el rastreo de fármacos.

Las células madre del SNC cumplen de sobra los criterios técnicos como vehículos para las terapias génicas y las terapias celulares en general. Las células madre se pueden expandir rápidamente bajo condiciones controladas con precisión y reproducibles. Además, estas células son fácilmente accesibles a todos los protocolos de transferencia de genes estándares tales como a través de tratamiento con retrovirus, adenovirus, liposomas y fosfato de calcio, así como subsiguientes protocolos de selección y expansión. Las células madre expandidas se diferencian eficazmente en neuronas en masa.

Además, debe enfatizarse que dos propiedades adicionales de las células madre las hacen únicas como la base fundamental del desarrollo terapéutico dirigido al sistema nervioso en seres humanos. En primer lugar, una vez que las células madre son obligadas a diferenciarse en tipos de células maduras, la totalidad de las interacciones moleculares se encuentran dispuestas en el sistema de cultivo para generar, madurar y sobrevivir una diversidad de diferentes tipos de células y subtipos neuronales. Estas interacciones recapitulan una parte importante del proceso natural de desarrollo del cerebro. Por lo tanto, las células madre, en calidad de vehículos de la terapia génica y de la terapia celular, no sólo reestablecen un gen o factor potencial sencillo a suministrar, sino también toda la infraestructura para la regeneración del nervio.

En segundo lugar, las células madre en cultivo se expanden a partir de los precursores germinales multipotenciales del desarrollo normal del cerebro. Por lo tanto, estas células madre conservan la capacidad de convertirse no solamente en tres tipos de células diferentes, sino también en muchos diferentes tipos de neuronas en función de los entornos medioambientales a los que están expuestos. Esta amplia plasticidad, que es la propiedad inherente de las células madre, sugiere de manera precisa que, una vez trasplantadas, las células pueden conservar la capacidad de conformarse en muchas regiones diferentes del cerebro del hospedante y de diferenciarse en neuronas específicas para esa región particular del hospedante. Estas propiedades intrínsecas de las células madre primarias son bastante diferentes de las líneas celulares tumorigénicas existentes, en las que una cierta diferenciación neuronal puede ser inducida bajo condiciones artificiales. Por lo tanto, con estas propiedades únicas, células madre del SNC humano expandible contienen un importante potencial comercial por sí mismas, con un pequeño desarrollo adicional.

1. Terapia génica para la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson resulta principalmente de la degeneración de neuronas liberadoras de dopamina en la sustancia negra del cerebro y el agotamiento resultante del neurotransmisor de dopamina en el cuerpo estriado. La causa de esta degeneración es desconocida, pero los síntomas de degeneración motrices de la enfermedad pueden aliviarse administrando periféricamente el precursor de dopamina, L-dopa, en el brote temprano de la enfermedad. A medida que la enfermedad continúa empeorando, L-dopa ya no es eficaz y, actualmente, no hay disponible ningún tratamiento adicional. Un tratamiento prometedor que se está desarrollando consiste en trasplantar neuronas de la sustancia negra ricas en dopamina procedentes del cerebro del feto en el cuerpo estriado del cerebro del paciente. Resultados obtenidos de diversos centros clínicos se muestran extremadamente optimistas. Sin embargo, se estima que se necesitan hasta 10 cerebros fetales con el fin de obtener células suficientes para una operación de trasplante. Este requisito hace inviable la amplia aplicación del trasplante de neuronas primarias como realidad terapéutica. Este es exactamente el tipo de problema resuelto por la tecnología de células madre del SNC de la presente solicitud, en la que un pequeño número de células puede ser expandido en cultivo hasta 1.000.000.000 de veces.

Se reconoce ahora ampliamente que el trasplante de células productoras de dopamina es la terapia más prometedora de la enfermedad de Parkinson grave y que para una terapia eficaz es esencial una población estable de células o una línea de células tratada genéticamente para producir dopamina. Tirosina hidroxilasa (TH) es la enzima clave para la síntesis de dopamina. Se pueden producir células madre del SNC humanas derivadas de ganglios basales fetales que expresen el gen tirosina hidroxilasa (TH). Estas células se pueden expandir, diferenciar y trasplantar en el cuerpo estriado del paciente. Dado que las células se derivan originalmente del cuerpo estriado primordial, tendrán la mejor

opción de integrarse en esta región del cerebro. La producción de células de este tipo y su trasplante con éxito en modelos de animales dará como resultado la aplicación más prometedora de la terapia génica hasta la fecha.

2. *Terapia celular*

En la mayoría de las enfermedades neurológicas, a diferencia de la enfermedad de Parkinson, la causa de los síntomas no puede ser atribuida a un sólo factor. Esta condición hace ineficaz el enfoque terapéutico de introducir un único gen mediante terapia génica. Más bien, se requerirá la sustitución del complejo neuronal del hospedante por células sanas. Dado que las células madre del SNC son las células germinales naturales del cerebro en desarrollo, la capacidad de convertirse en células del cerebro maduro, las células madre procedentes de la médula espinal y diferentes regiones del cerebro se pueden utilizar directamente para repoblar nervios degenerados en diversas neuropatías.

Se están desarrollando varias líneas de células madre específicas que sobreexpresan diversos factores de crecimiento, que están actualmente en ensayos clínicos. Esta aplicación combina la plasticidad única de las células madre y la terapia génica mediada por el factor de crecimiento para proporcionar no solamente el beneficio del suministro dirigido de la proteína, sino también una regeneración neuronal amplia en zonas específicas.

Ejemplos primarios de factores de crecimiento actualmente en ensayos clínicos o bajo desarrollo completo por diversas compañías se listan más abajo en la Tabla VI³¹. Hasta la fecha, ensayos de factores de crecimiento han quedado limitados a dirigir la inyección periférica de grandes dosis, lo que conlleva riesgos importantes de efectos secundarios, ya que la mayoría de los factores de crecimiento afectan a muchas poblaciones diferentes de neuronas y de tejidos no neurales y con una semivida corta. Estos problemas se pueden superar generando a partir de células madre del SNC varias poblaciones de células o líneas de células que expresen establemente estos factores de crecimiento y que demuestren su capacidad de diferenciarse en neuronas y de segregar los factores de crecimiento en regiones periféricas y centrales específicas.

3. *Investigación de nuevos factores de crecimiento*

Uno de los principios centrales de la neurobiología moderna es que cada una de las neuronas de mayor proyección, si no todas las neuronas, requieren señales específicas (factores tróficos) para alcanzar sus células diana y sobrevivir. Las neuropatías en muchas enfermedades pueden ser provocadas por o pueden implicar una carencia de factores de crecimiento de este tipo. Estos factores de crecimiento representan la siguiente generación de fármacos preventivos y terapéuticos para trastornos del sistema nervioso y, por lo tanto, el enorme capital invertido en la investigación de nuevos factores de crecimiento por parte de la industria biotecnológica.

Implícito en la observación de que una diversidad de neuronas maduras pueden ser producidas a partir del cultivo de células madre del SNC es que diversos factores de crecimiento son segregados por las células en fase de diferenciación para la determinación de tipos de célula, maduración y el soporte continuado de su supervivencia y que las células contienen la maquinaria receptora necesaria para responder a esos factores de crecimiento y, probablemente, a otros. La mayoría de los factores de crecimiento actualmente conocidos en el sistema nervioso se descubrieron por sus efectos sobre los nervios periféricos y, lo más probablemente, representan una fracción muy pequeña de factores de crecimiento existentes en el cerebro.

La investigación de factores de crecimiento del cerebro ha sido difícil, principalmente debido a que tipos de células neuronales particulares son difíciles de aislar del cerebro y de mantenerlos en condiciones de cultivo definidas. La diferenciación de las células madre en neuronas supera este problema y abre nuevos ensayos para rastrear factores de crecimiento potenciales.

4. *Ensayos del rastreo de fármacos*

Dado que se están identificando cada vez más receptores neurotransmisores y proteínas transductoras de señales a partir del cerebro, está resultando claro que el dogma de un neurotransmisor que activa un receptor es una suprasimplificación. La mayoría de los complejos receptores de neuronas están constituidos por subunidades de proteínas codificadas por varios genes, y cada gen sintetiza muchas variaciones diferentes de la proteína. Estas variaciones resultan en una amplia gama de posibles combinaciones de receptores y no un solo receptor, que pueden interactuar con un neurotransmisor. Por consiguiente, se puede producir una gama de salida de señales por parte de una sola acción de neurotransmisor. La señal específica efectuada por un neurotransmisor en una neurona depende entonces de qué complejo receptor es producido por la célula. Así, la diversidad celular debe ir paralela con la diversidad molecular y constituir un elemento estructural principal en el que se basa la complejidad de la función del cerebro.

El descubrimiento de fármacos por parte de la farmacología tradicional ha sido realizado sin el conocimiento de una complejidad de este tipo utilizando un homogeneizado de cerebro completo y animales, y la mayoría de los análogos producidos de neurotransmisores con amplias acciones y efectos secundarios. La siguiente generación de fármacos farmacéuticos, con el propósito de modificar funciones específicas del cerebro, se puede obtener rastreando potenciales químicos contra neuronas que exhiben un perfil específico de neurotransmisores, complejos receptores y canales de iones.

ES 2 292 187 T3

Células madre del SNC, expandidas y diferenciadas en neuronas en cultivo expresan varios neurotransmisores y complejos de receptores. Se pueden desarrollar muchas líneas de células derivadas de células madre y progenitores neuronales de diferentes regiones del cerebro que, cuando se diferencian en neuronas maduras, exhibirían un perfil único de complejos de neurotransmisor y receptor. Líneas de células neuronales de este tipo serían herramientas
5 valiosas para diseñar y rastrear fármacos potenciales.

En resumen, la tecnología de células madre del SNC de esta solicitud ofrece amplios e importantes potenciales para tratar trastornos del sistema nervioso.

10 A lo largo de esta solicitud se han citado los siguientes artículos científicos.

1. **Turner, D.L. y Cepko, C.L.**, *Nature* **328**, 131-136 (1987).

2. **Gray, G., Glover, J., Majors, J. y Sanes, J.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7356-7360 (1988).

3. **Wetts, R. y Fraser, S.**, *Science* **239** 1142-1145 (1988).

4. **McConnell, S.**, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2**, 23-27 (1992).

5. **Walsh, C. y Cepko, C.L.** *Nature* **362**, 632-635 (1993).

6. **Davis, A.A. y Temple, S.**, *Nature* **372**, 263-266 (1994).

7. **Williams, B. y Price, J.**, *Neuron* **14**, 1181-1188 (1995).

8. **Cattaneo, E. y McKay, R.D.G.**, *Nature* **347**, 762-765 (1990).

9. **Reynolds, B., Tetzlaff, W. y Weiss, S.**, *J. Neurosci.* **12**, 4565-4574 (1992).

10. **Ray, J., Peterson, D., Schinstine, M. y Gage, F.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3602-3606 (1993).

11. **Ghosh, A. y Greenberg, M.**, *Neuron* **15**, 89-103 (1995).

12. **Vicario-Abejon, C., Johe, K., Hazel, T., Collazo, D. y McKay, R.**, *Neuron* **15**, 105-114 (1995).

13. **Frederiksen, K. y McKay, R.D.G.**, *J. Neurosci.* **8**, 1144-1151 (1988).

14. **Lendahl, U., Zimmermann, L.B. y McKay, R.D.G.**, *Cell* **60**, 585-595 (1990).

15. **Reynolds, B. y Weiss, S.**, *Science* **255**, 1707-1710 (1992).

16. **Ip, N. et al.**, *Neuron* **10**, 89-102 (1993).

17. **Davis, S. et al.**, *Science* **260**, 1805-1808 (1993).

18. **Ware, C. et al.**, *Development* **121**, 1283-1299 (1995).

19. **Yeh, H.-J., Ruit, K. G., Wang, Y.-X., Parks, W.C., Snider, W. D. y Deuel, T.F.**, *Cell* **64**, 209-216 (1991).

20. **Yeh, H.-J., Silos-Santiago, I., Wang, Y.-X., George, R.J., Snider, W.D. y Deuel, T.F.**, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **90**, 1952-1956 (1993).

21. **Orr-Urtregger, A., Bedford, M.T., Do, M.S., Eisenbach, L. y Lonai, P.**, *Development* **115**, 289-303 (1992).

22. **Reddy, U.R. y Pleasure, D.**, *J. Neurosci. Res.* **31**, 670-677 (1992).

23. **Barres, B. y Raff, M.**, *Neuron* **12**, 935-942 (1994).

24. **Shah, N.M., Marchionni, M.A., Isaacs, I., Stroobant, P. y Anderson, D.J.**, *Cell* **77**, 349-360 (1994).

25. **Raff, M., Miller, R. y Noble, M.**, *Nature* **303**, 390-396 (1983).

26. **Raff, M.**, *Science* **243**, 1450-1455 (1989).

27. **Barres, B., Lazar, M. y Raff, M.**, *Development* **120**, 1097-1108 (1994).

28. **Hughes, S., Lillien, L., Raff, M., Rohrer, H. y Sendtner, M.**, *Nature* **335**, 70-73 (1988).

29. Luskin, M., Parnavelas, J. y Barfield, J., *J. Neurosci.* **13**, 1730-1750 (1993).
30. Luskin, M., *FASEB J.* **8**, 722-730 (1994).
- 5 31. Schatzle, H.M., *Trends in Neuroscience* **18**, 463-464 (1995).
32. Sabate, O., Horellou, P., Vigne, E., Colin, P., Perricaudet, M., Buc-Caron, M.-H y Mallet, J., *Nature Genetics* **9**, 256-260 (1995).
- 10 33. Svendsen, C.N. y Rosser, A.E., *Trends in Neuroscience* **18**, 465-466 (1995).
34. Gage, F.H., Ray, J. y Fisher, L.J., *Annu. Rev. Neurosci.* **18**, 159-192 (1995).
- 15 35. Gage, F.H., Coates, P.W., Palmer, T.D., Kuhn, H.G., Fisher, L.J., Shonen, J.O., Peterson, D.A., Suhr, S.T. y Ray, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11879-11883 (1995).
36. Svendsen, C. N., Fawcett, J.W., Bentlage, C. y Dunnett, S.B., *Exp. Brain. Res.* **102**, 407-414 (1995).
37. Hermanson, M., Olsson, T., Westermark, B. y Funa K., *Exp. Brain Res.* **102**, 415-422 (1995).
- 20 38. Kilpatrick, T.J., Richards, L.J. y Bartlett, P.F., *Mol. Cell. Neurosci.* **6**, 2-15 (1995).
39. Ray, J. y Gage, F.H., *J. Neurosci.* **14**, 3548-3564 (1994).
- 25 40. Gritti, A. *et al.*, *J. Neurosci.* **16**, 1091-1100 (1996).
41. Vescovi, A.L., Reynolds, B.A., Fraser, D.D. y Weiss, S., *Neuron* **11**, 951-966 (1993).
42. Ahmed, S., Reynolds, B.A. y Weiss, S., *J. Neurosci.* **15**, 5765-5778 (1995).10.11.
- 30 43. Kilpatrick, T.J. y Bartlett, P.F., *Neuron* **10**, 255-265 (1993).
44. Kilpatrick, T.J. y Bartlett, P.F., *J. Neurosci.* **15**, 3653-3661 (1995).
- 35 45. Baetge, E.E. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **695**, 285 (1993).
46. Bartlett, P.F. *et al.*, *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* **22**, 559-562 (1995).
47. Temple, S. y Qian, X., *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 11-17 (1996).
- 40 48. Brustle, O. y McKay, R.D.G., *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 688-695 (1996).
49. Weiss, S., Reynolds, B.A., Vescovi, A.L. Morshead, C., Craig, C.G., van der Kooy, D., *Trends Neurosci.* **19**, 387-393 (1996).
- 45 50. Stemple, D.L. y Mahanthappa, N.K., *Neuron* **18**, 1-4 (1997).
51. Morrison, S.J., Shah, N.M. y Anderson, D.J., *Cell* **88**, 287-298 (1997).
- 50 52. McKay, R., *Science* **276**, 66-71 (1997).
53. Reynolds, B.A. y Weiss, S., *Dev. Biol.* **175**, 1-13 (1996).
54. Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C. y Reynolds, B.A., *J. Neurosci.* **16**, 7599-7609 (1996).
- 55 55. Svendsen, C.N., Clarke, D.J., Rosser, A.E. y Dunnett, S.B., *Exp. Neurol.* **137**, 376-388 (1996).
56. Schinstine, M. e Iacovitti, L., *Exp. Neurol.* **141**, 67-78 (1996).
- 60 57. Qian, X., Davis, A.A., Goderie, S.K. y Temple, S., *Neuron* **18**, 81-93 (1997).
58. Lumsden, A. y Krumlauf, R., *Science* **274**, 1109-1115 (1996).
- 65 59. McConnell, S.K., *Neuron* **15**, 761-768 (1995).
60. Rakic, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11323-11327 (1995).

61. **Schlaggar**, B.L. y **O'Leary**, D.D.M., *Science* **252**, 1556-1560 (1991).

62. **Brustle**, O., **Maskos**, U. y **McKay**, R.D.G., *Neuron* **15**, 1275-1285 (1995).

63. **Vicario-Abejon**, C., **Cunningham**, M.G. y **McKay**, R.D., *J. Neurosci.* **15**, 6351-6353 (1995).

64. **Johe**, K.K., **Hazel**, T.G., **Muller**, T., **Dugich-Djordjevic**, M.M. y **McKay**, R.D.G., *Genes Dev.* **10**, 31129-31140 (1996).

65. **Palmer**, T.D., **Takahashi**, J. y **Gage**, F.H., *Mol. Cell. Neurosci.* **8**, 389-404 (1997).

66. **Finley**, M.F.A., **Kulkarni**, N. y **Huettner**, J.E., *J. Neurosci.* **16**, 1056-1065 (1996).

67. **Strubing**, C., **Ahnert-Hilger**, G., **Shan**, J., **Wiedenmann**, B., **Hescheler**, J. y **Wobus**, A.M., *Mech. Dev.* **53**, 275-287 (1995).

68. **Okabe**, S., **Forsberg-Nilsson**, K., **Spiro**, A.C., **Segal**, M. y **McKay**, R.D., *Mech. Dev.* **59**, 89 (1996).

69. **Feldman**, D.H., **Thinschmidt**, J.S., **Peel**, A.L., **Papke**, R.L. y **Reier**, P.J., *Exp. Neurology* **140**, 206-217 (1996).

Mientras que la invención ha sido descrita en relación con lo que actualmente se considera son las realizaciones más prácticas y preferidas, ha de entenderse que la invención no está limitada a las realizaciones descritas.

TABLA I

Composición del tipo de célula de clones diferenciados

Clones de células precursoras del hipocampo embrionario

Pase	Tamaño del Clon	MAP2+ (%)	GalC+ (%)	GFAP+ (%)
1	319	145 (45)		41 (13)
1	451	245 (54)		0 (0)
1	1237	634 (51)		9 (1)
1	2197	956 (44)		42 (2)
1	2779	1617 (58)		336 (12)
4	71		10 (14)	5 (7)
4	139		14 (10)	4 (3)
4	296		21 (7)	139 (47)
4	341		54 (16)	38 (11)
4	420		39 (9)	25 (6)
4	600		35 (6)	60 (10)
4	662		66 (10)	62 (9)
4	141	42 (30)	4 (3)	
4	427	220 (52)	15 (4)	
4	610	306 (50)	29 (5)	
Media total:		48,6±1,6%	8,4±1,0%	7,8±2,3%

ES 2 292 187 T3

TABLA II

Composición del tipo de célula de clones diferenciados

Subclones procedentes de clones de células precursoras del hipocampo embrionario

Subclon	Tamaño del Clon	MAP2+ (%)	GalC+ (%)	GFAP+ (%)
HI6.1	337	22 (7)	99 (29)	
HI6.2	338	13 (4)	157 (46)	
HI6.3	537	132 (25)	48 (9)	
HI6.4	565	98 (17)	28 (5)	
HI6.5	831	96 (12)	107 (13)	
HI6.6	886	158 (18)	134 (15)	
HI6.7	893	135 (15)	66 (7)	
HI6.8	950	154 (16)	53 (6)	
HI6.9	951	112 (12)	120 (13)	
HI6.10	970	105 (11)	95 (10)	
HI19.1	84	11 (13)		0 (0)
HI19.2	211	45 (21)		0 (0)
HI19.3	363	61 (17)		18 (5)
HI19.4	697	172 (25)		5 (1)
HI19.5	861	135 (16)		57 (7)
HI19.6	1469	401 (27)		123 (8)
HI19.7	1841	486 (26)		179 (10)
HI8.1	88		4 (5)	0 (0)
HI8.2	104		3 (3)	0 (0)
HI8.3	193		16 (8)	28 (15)
HI8.4	237		14 (6)	39 (16)
HI8.5	384		65 (17)	119 (31)
HI8.6	402		26 (6)	75 (19)
HI8.7	554		49 (9)	45 (8)
HI8.8	571		23 (4)	49 (9)
HI8.9	662		41 (6)	118 (18)
HI8.10	669		46 (7)	46 (7)
HI8.11	827		57 (7)	18 (2)
HI8.12	836		92 (11)	97 (12)
HI8.13	1084		104 (10)	53 (5)
HI8.14	1268		124 (10)	163 (13)
HI8.15	1284		75 (6)	193 (15)

Media total: 20,1±1,4% 8,9±1,1% 10,0±0,7%

ES 2 292 187 T3

TABLA III

Composición del tipo de célula de clones diferenciados

Clones de células subependimales de adulto

	Pase	Tamaño del Clon	MAP2+ (%)	GalC+ (%)	GFAP+ (%)
10	1	73	6 (8)		37 (51)
	1	159	56 (35)		42 (26)
	1	173	57 (33)		26 (15)
15	1	185	71 (38)		32 (17)
	1	230	97 (42)		39 (17)
	1	273	139 (51)		56 (21)
20	1	387	117 (30)		45 (12)
	1	554	237 (43)		84 (15)
	1	675	280 (41)		74 (11)
25	1	847	399 (47)		155 (18)
	1	496		23 (5)	92 (19)
30	1	526		7 (1)	115 (22)
	1	644		19 (3)	26 (4)
	1	713		22 (3)	179 (25)
35	1	1112		56 (5)	235 (21)
	0	278	153 (55)	6 (2)	
	0	305	145 (48)	19 (6)	
40	1	411	156 (38)	68 (17)	
	0	513	242 (47)	3 (1)	
	0	532	246 (46)	26 (5)	
45	0	538	283 (53)	10 (2)	
	0	584	277 (47)	32 (5)	
	0	1012	498 (49)	5 (0)	
50	Media total:		41,7±2,6%	4,2±1,2%	19,6±2,7%

ES 2 292 187 T3

TABLA IV

Efecto de factores extracelulares sobre la determinación del tipo de célula

	(Anticuerpo)	No tratado (%)	+PDGF (%)	+CNTF (%)	+T3 (%)
5					
10	A. Embrionario				
	Neurona (MAP2)	45,9	81,0	0,9	11,5
15	Neurona (TuJ1)	9,9	72,4	N.D.	N.D.
	Neurona (NF-M)	1,0	53,0	N.D.	N.D.
20	Oligodendrocito (GalC)	7,4	2,8	4,5	21,2
	Astrocito (GFAP)	6,3	2,0	97,3	20,7
25	B. Adulto				
	Neurona (MAP2)	36,8	73,9	11,8	35,2
30	Neurona (TuJ1)	47,9	72,4	N.D.	N.D.
	Oligodendrocito (NF-M)	4,8	N.D.	N.D.	N.D.
35	Astrocito (GFAP)	20,3	2,2	72,9	32,4

TABLA V

Diferenciación dirigida de células madre del SNC humano expandidas con bFGF

	(Anticuerpo)	No tratado (%)	+PDGF (%)	+CNTF (%)	+T3 (%)
45					
50	Neurona (MAP2+)	45,9±2,3	71,4±1,9	9,4±1,6	16,9±2,4
55	Oligodendrocitos (O4+/GalC+)	2,6±0,8	0,8±0,3	0,9±0,1	25,3±2,8
60	Astrocitos (GFAP+)	10,5±1,8	7,1±1,2	85,2±1,9	37,1±3,4
65	Muertas	5,9±0,7	3,5±0,4	2,0±0,5	8,2±0,6

TABLA VI

Factores neurotróficos y enfermedades

Factor neurotrópico:	Enfermedad
Factor de crecimiento de los nervios:	Enfermedad de Alzheimer Neuropatía diabética Neuropatía con taxol Neuropatía compresiva Neuropatía relacionada con el SIDA
Factor de crecimiento derivado del cerebro:	Esclerosis amiotrófica lateral
Neurotrofina 3:	Neuropatía de fibras grandes
Factor de crecimiento similar a insulina:	Esclerosis amiotrófica lateral Neuropatía con vincristina Neuropatía con taxol
Factor neurotrófico ciliar:	Esclerosis amiotrófica lateral
Factor neurotrófico derivado de glia:	Enfermedad de Parkinson

TABLA VII: Proporciones de fenotipos neuronales de células madre del SNC derivadas regionalmente¹

Regiones ²	MAP2+ ³	% TH+	% AChE+	% VAT+	% ChAT+	% GAD+	% NPY+	% L-Enk+	% L-Enk+
SEPT	976±153	0,0	11,5±1,3	4,3±0,7	5,4±2,0	N.D.	0,0	0,0	0,0
LGE	2324±571	0,0	4,7±1,4	0,4±0,1	N.D.	N.D.	5,6±0,3	3,8±0,7	10,7±3,8
MGE	2414±518	0,0	6,0±1,8	0,4±0,1	N.D.	N.D.	2,8±0,1	5,1±2,5	5,0±0,6
HI	4286±1695	0,0	0,0	0,0	0,0	53,1±2,3	0,0	0,0	0,0
VM	2072±264	2,6±0,3	76,1±6,8	0,0	N.D.	84,4±6,5	N.D.	N.D.	N.D.
DM	1385±95	0,0	100,9±9,1	0,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
SPC	1529±18	0,0	39,3±2,5	1,2±0,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Leyendas de la Tabla VII

¹ Los números para los diferentes fenotipos neuronales se dan como el porcentaje de neuronas MAP2ab-positivas por centímetro cuadrado para cada región. MAP2ab, proteína a y b asociada a microtúbulos; TH, tirosina hidroxilasa; AchE, acetilcolina esterasa; VAT, transportador de acetilcolina vesicular; ChAT, colina acetil transferasa; GAD, ácido glutámico descarboxilasa; NPY, neuropéptido Y; L-Enk, leu- encefalina; M-Enk, met-encefalina.

² Regiones de las que se derivaron células madre del SNC. SEPT, septum 15.5; LGE, eminencia gangliónica lateral E15.5; MGE, eminencia gangliónica media 15.5; HI, hipocampo E15.5; VM, mesencéfalo ventral E12.5; DM, mesencéfalo dorsal E12.5; SPC, médula espinal E13.5.

³ Se muestra el número medio de células MAP2ab-positivas por centímetro cuadrado. Los números iniciales de células extendidas en placa para todas las regiones era de 125.000 células por centímetro cuadrado $\pm$ error medio estándar.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la expansión y cultivo *in vitro* de células madre del sistema nervioso central de un mamífero, en el que las células madre conservan la capacidad multipotencial de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, que comprende las etapas de:

a) disociar células procedentes de tejido del sistema nervioso central mediante trituración mecánica en ausencia de cationes divalentes;

b) cultivar las células disociadas adheridas a una placa en un medio de cultivo exento de suero;

c) extender en placas células disociadas a una densidad que no exceda de 20.000 células/cm² y, en pasos subsiguientes, volver a extender en placas las células cultivadas a una densidad que no exceda de 10.000 células/cm²;

d) añadir diariamente a las células de cultivo un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en

i) bFGF a una concentración de al menos 10 ng/ml,

ii) EGF a una concentración de al menos 10 ng/ml,

iii) TGF-alfa a una concentración de al menos 10 mg/ml, y

iv) aFGF a una concentración de al menos 10 ng/ml más 1 µg/ml de heparina;

e) hacer pasar las células cultivadas en el espacio de cuatro días después de la extensión en placa, de modo que no exceda de una confluencia del 50%; y

f) hacer pasar las células cultivadas tratando las células cultivadas con solución salina.

2. Un cultivo de adhesión *in vitro* de células madre del sistema nervioso central de un mamífero, en donde el cultivo se puede obtener por el método de la reivindicación 1, y en donde las células madre

a) expresan nestina;

b) conservan la capacidad multipotencial de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos; y

c) se diferencian tras la retirada de mitógeno.

3. Un método para la diferenciación de un cultivo *in vitro* de células madre del sistema nervioso central de un mamífero, en el que las células madre conservan la capacidad multipotencial de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, que comprende las etapas de:

a) disociar células procedentes de tejido del sistema nervioso central mediante trituración mecánica en ausencia de cationes divalentes;

b) cultivar las células disociadas adheridas a una placa en un medio de cultivo exento de suero;

c) extender en placas células disociadas a una densidad que no exceda de 20.000 células/cm² y, en pasos subsiguientes, volver a extender en placas las células cultivadas a una densidad que no exceda de 10.000 células/cm²;

d) añadir diariamente a las células cultivadas un primer factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en

i) bFGF a una concentración de al menos 10 ng/ml,

ii) EGF a una concentración de al menos 10 ng/ml,

iii) TGF-alfa a una concentración de al menos 10 mg/ml, y

iv) aFGF a una concentración de al menos 10 ng/ml más 1 µg/ml de heparina;

e) se hacen pasar las células cultivadas en el espacio de cuatro días después de la extensión en placa, de modo que no exceda de una confluencia del 50%;

f) se hacen pasar las células cultivadas tratando las células cultivadas con solución salina; y

g) separar el primer factor de crecimiento de las células cultivadas, en donde dicha separación da como resultado la diferenciación de las células cultivadas en neuronas, astrocitos y/u oligodendrocitos.

4. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que en la etapa (b), el medio de cultivo se define químicamente, el medio de cultivo se reemplaza por medio reciente cada dos días y en el que en la etapa (f) la solución salina está exenta de cationes divalentes y las células se raspan de la placa.

5. El método o cultivo *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células madre se derivan de tejido del sistema nervioso central de un ser humano.

6. El método o cultivo *in vitro* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células madre se derivan del tejido del sistema nervioso central de un feto no humano.

7. El método o cultivo *in vitro* de la reivindicación 5, en el que las células madre se derivan de tejido del sistema nervioso central de un adulto.

8. El método o cultivo *in vitro* de las reivindicaciones 5, 6 ó 7, en el que las células madre se derivan de tejido del sistema nervioso central seleccionado del grupo que consiste en hipocampo, corteza cerebral, cuerpo estriado, septum, diencéfalo, mesencéfalo, cerebelo y médula espinal.

9. El cultivo *in vitro* de la reivindicación 2, en el que las células madre se diferencian en neuronas maduras que exhiben:

a) una polaridad axón-dendrita,

b) terminales sinápticos, y

c) localización de proteínas implicadas en la sinaptogénesis y la actividad sináptica, que incluyen

i) receptores de neurotransmisores,

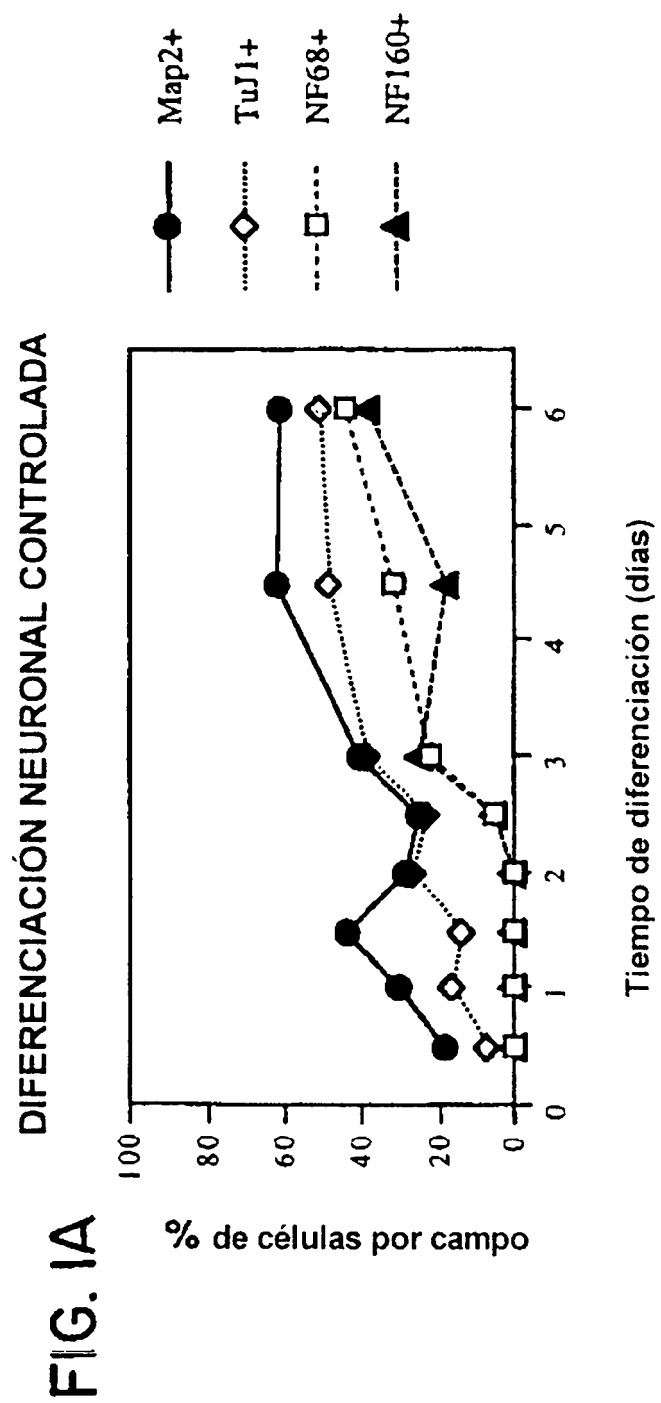
ii) transportadores, y

iii) enzimas de procesamiento.

10. El cultivo *in vitro* de la reivindicación 2, en el que las células madre conservan su capacidad de generar subtipos de neuronas con diferencias moleculares entre los subtipos.

11. El método de la reivindicación 3, que comprende, además, añadir un segundo factor de crecimiento a las células cultivadas después de separar el primer factor de crecimiento de las células cultivadas, en el que el segundo factor de crecimiento es diferente del primer factor de crecimiento.

12. El método de la reivindicación 11, en el que el segundo factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor neurotrópico ciliar (CNTF), factor inhibidor de leucemia (LIF) y hormona tiroidea, yodotironina (T3).



ESPECIFICACIÓN DEL TIPO DE CÉLULA EN CLONES

FIG. 1B

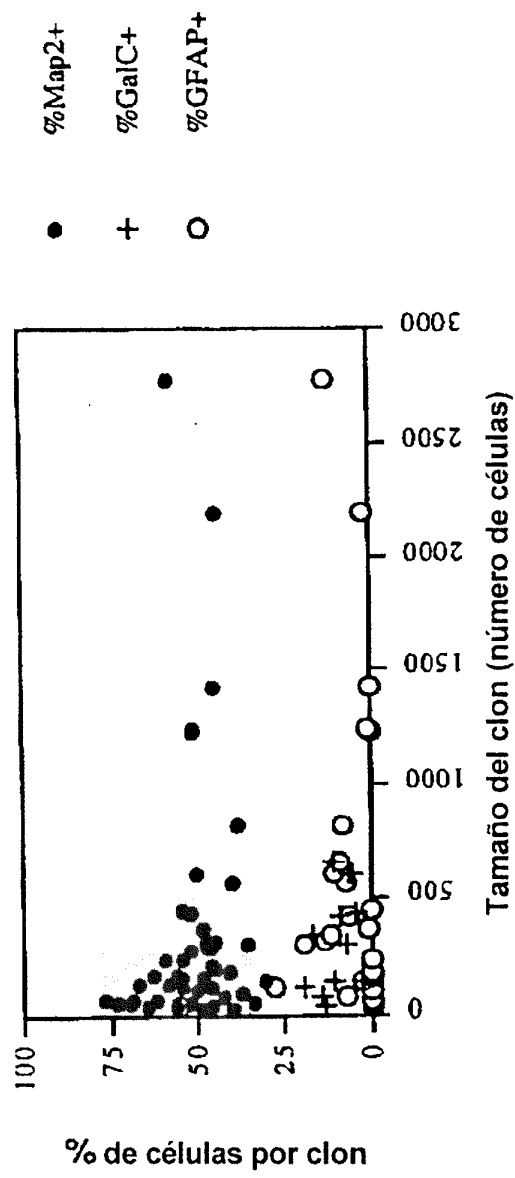
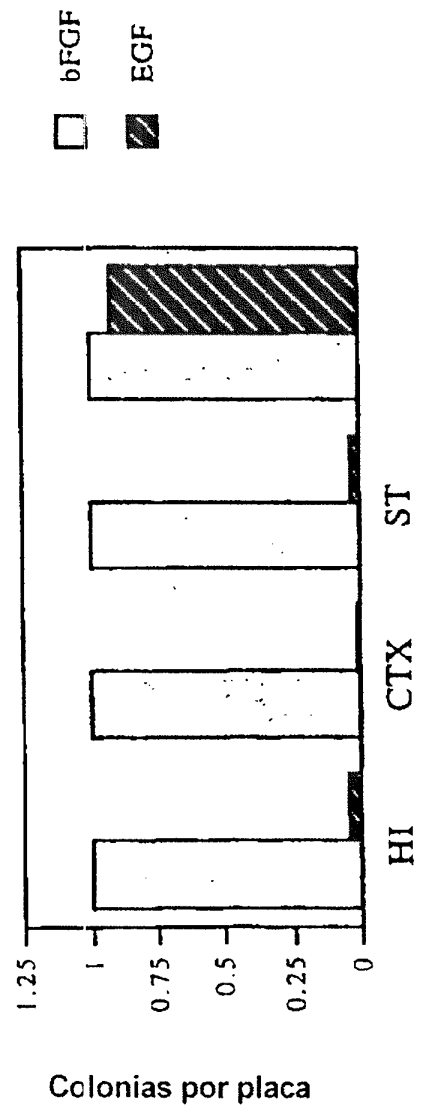


FIG. 1C

EGF frente a bFGF



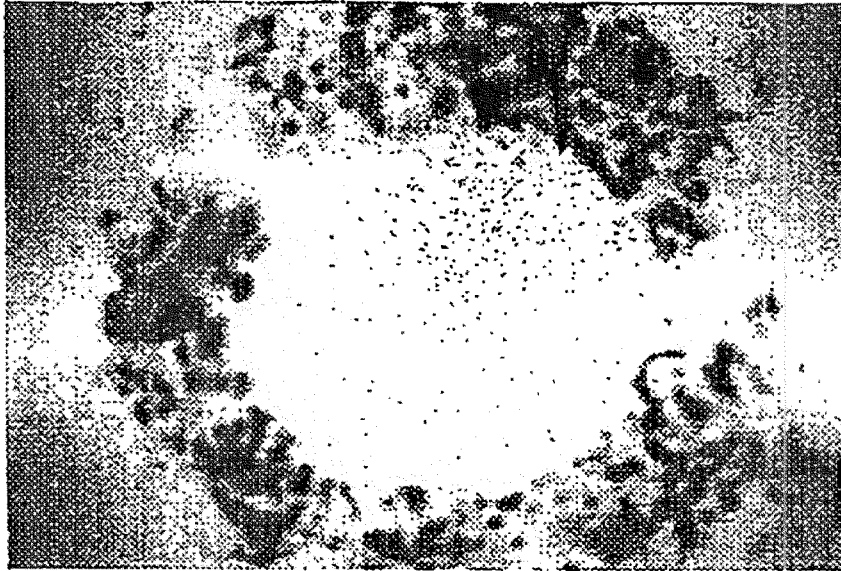


FIG. 2A



FIG. 2B

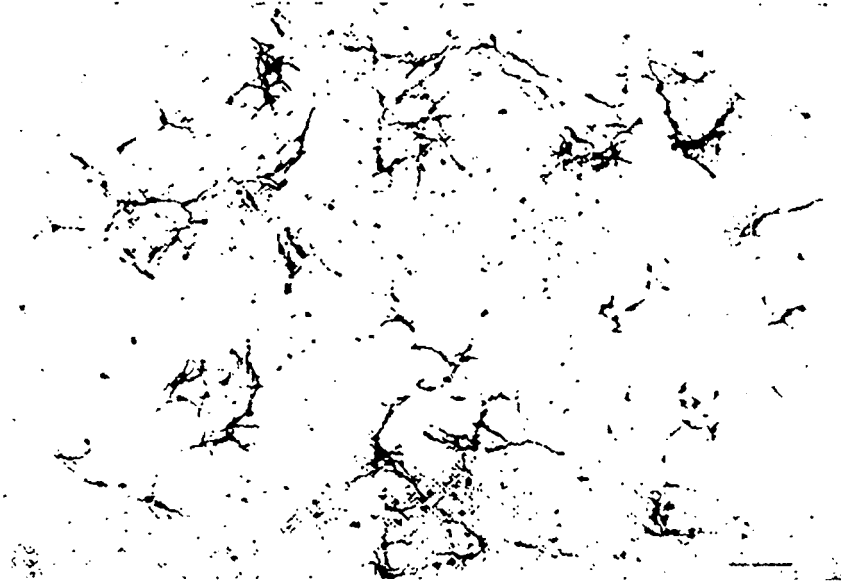
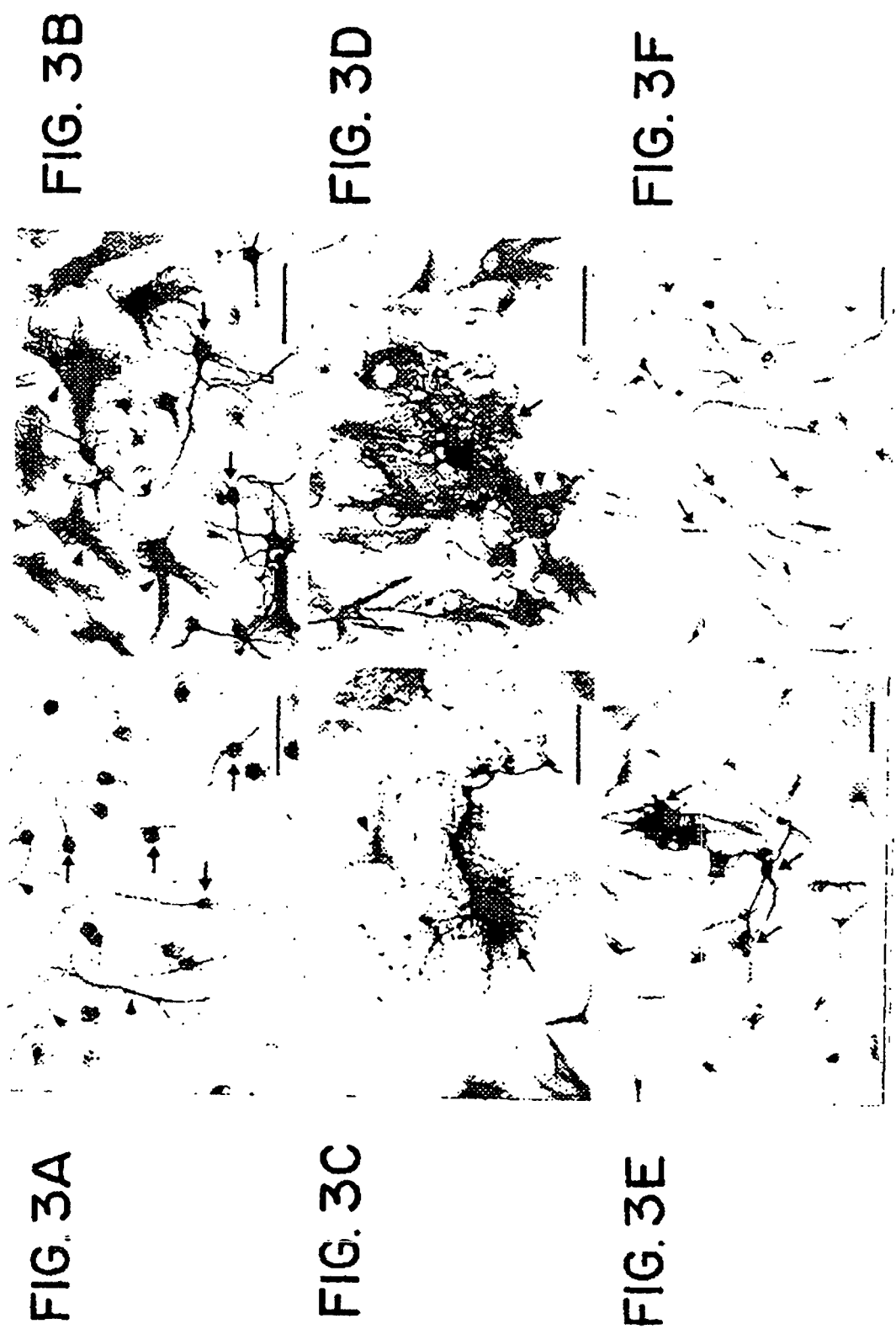


FIG. 2C



FIG. 2D



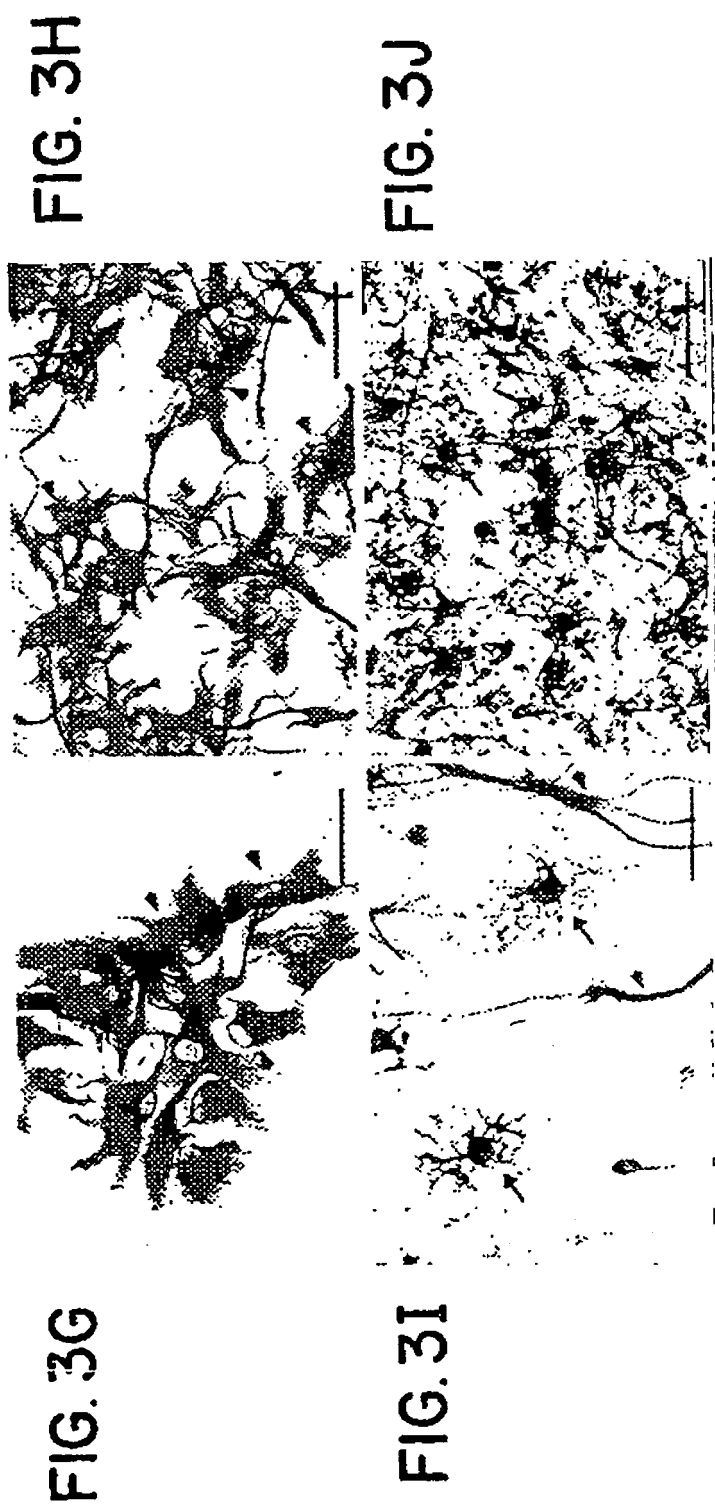
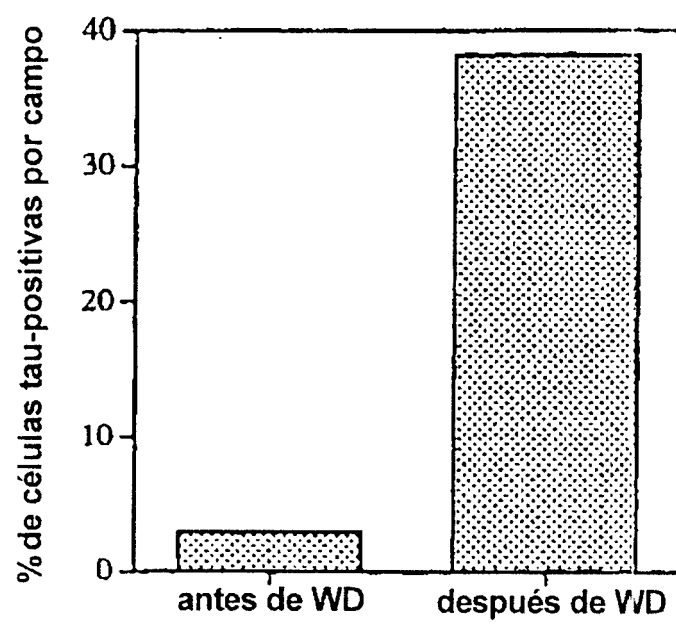


FIG. 4



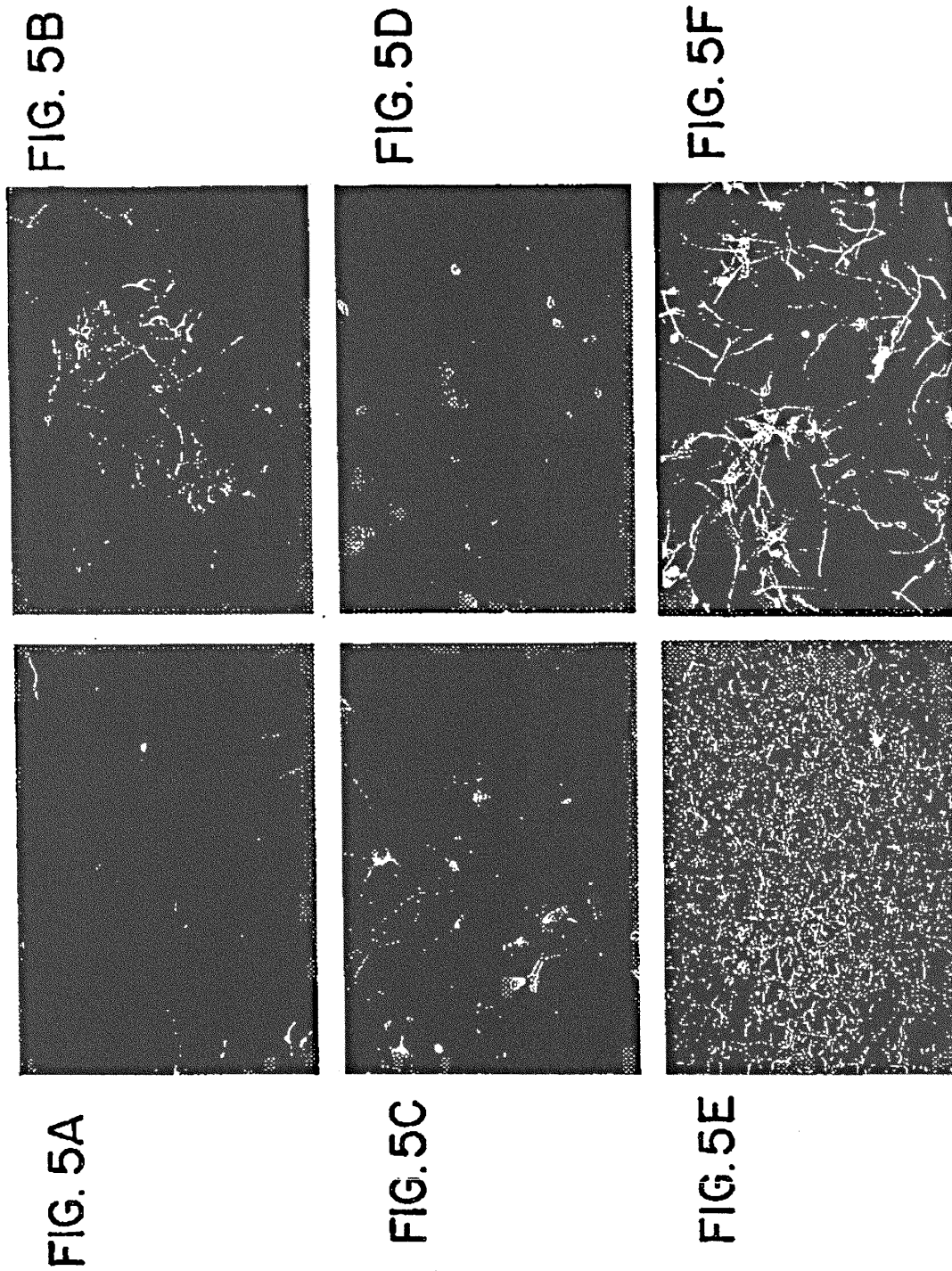


FIG. 6A

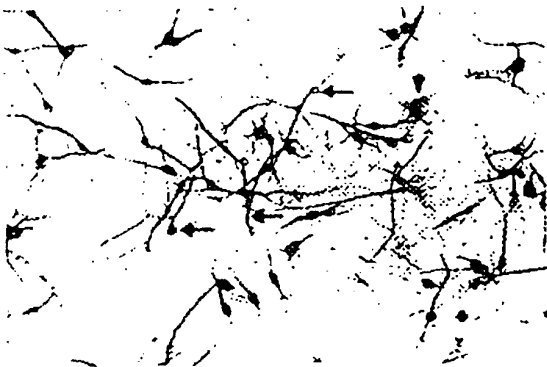


FIG. 6B

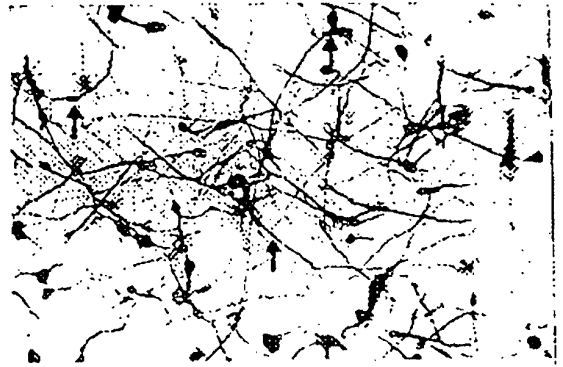
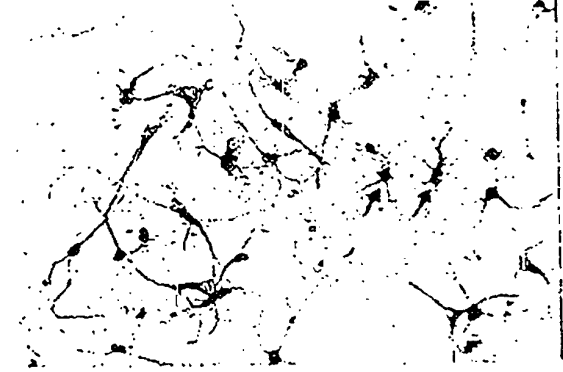


FIG. 6C



FIG. 6D



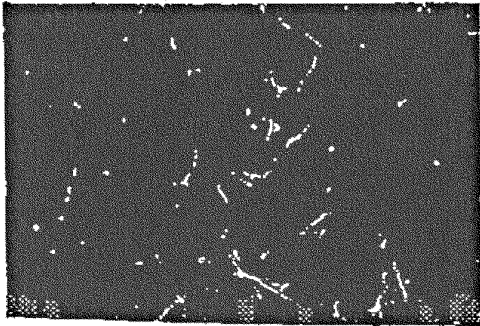


FIG. 7A

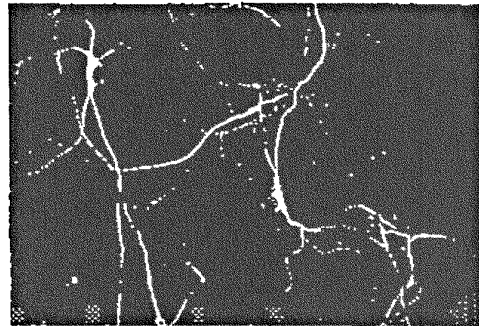


FIG. 7B

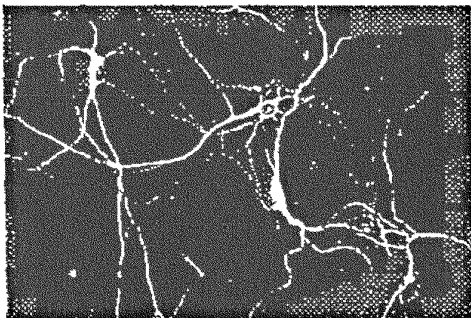


FIG. 7C

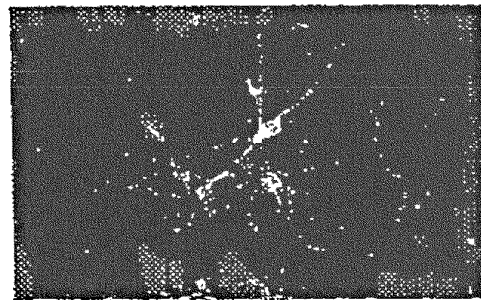


FIG. 7D

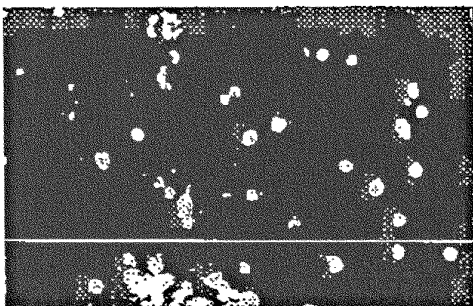


FIG. 7E

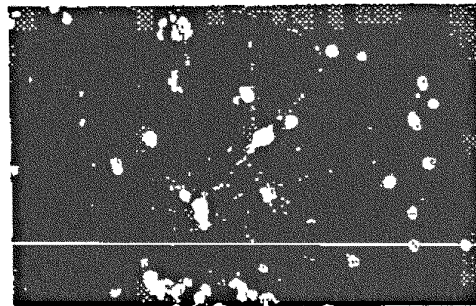


FIG. 7F

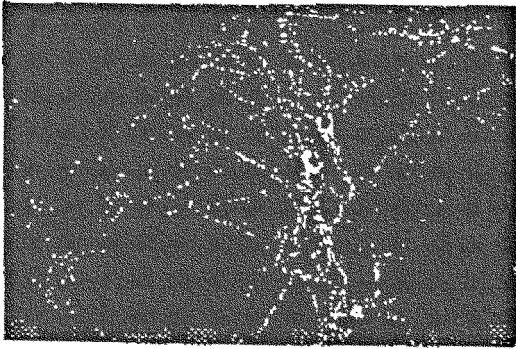


FIG. 7G

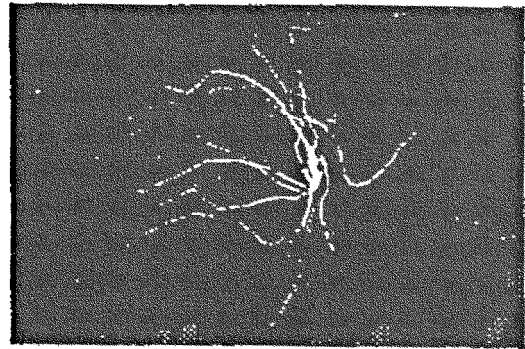


FIG. 7H

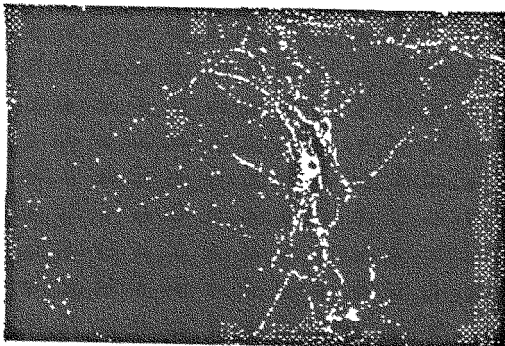


FIG. 7I

GABA T4
GABA T1
GABA T
GABA T3

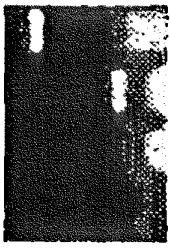


FIG. 8C

AMPA R4
AMPA R3
AMPA R2
AMPA R1

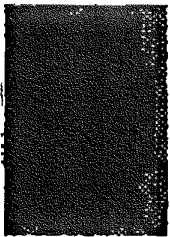


FIG. 8B

NMDA R2D
NMDA R2C
NMDA R2B
NMDA R2A
NMDA R1

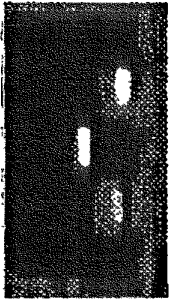


FIG. 8A

Células madre CTX
no diferenciadas



FIG. 8F

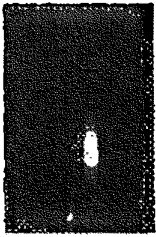


FIG. 8E

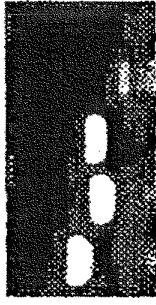


FIG. 8D

Neuronas diferenciadas
derivadas de células madre

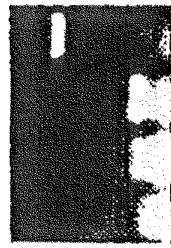


FIG. 8I

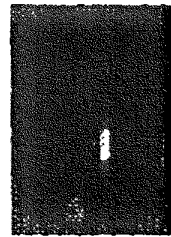


FIG. 8H

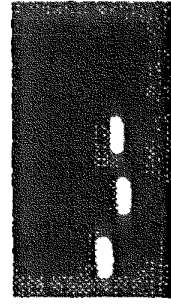


FIG. 8G

Cerebro adulto completo

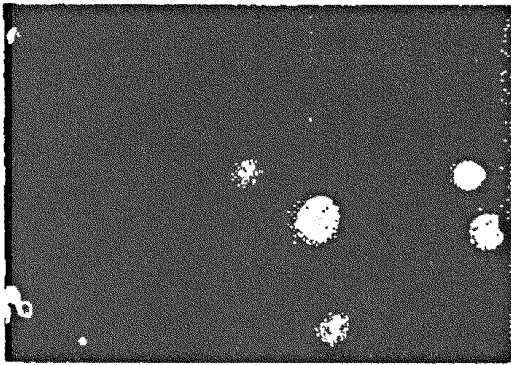


FIG. 9A

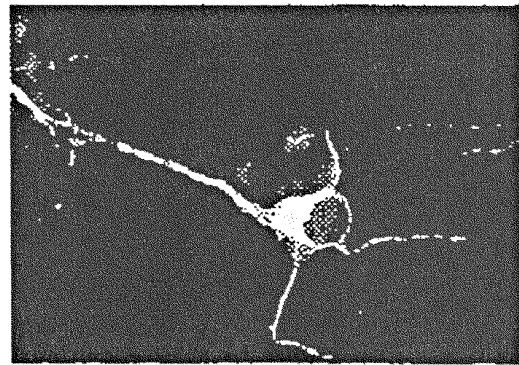


FIG. 9B

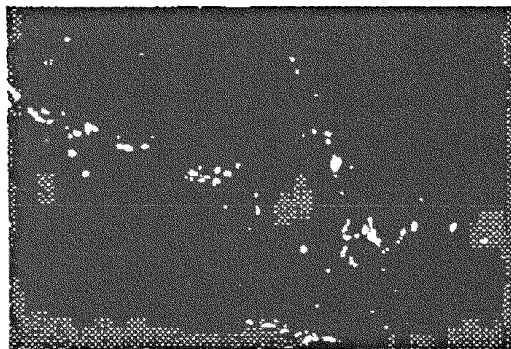


FIG. 9C

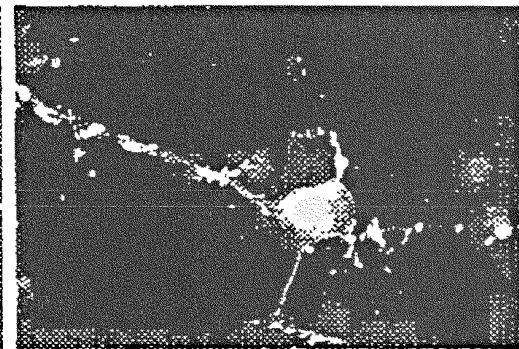


FIG. 9D

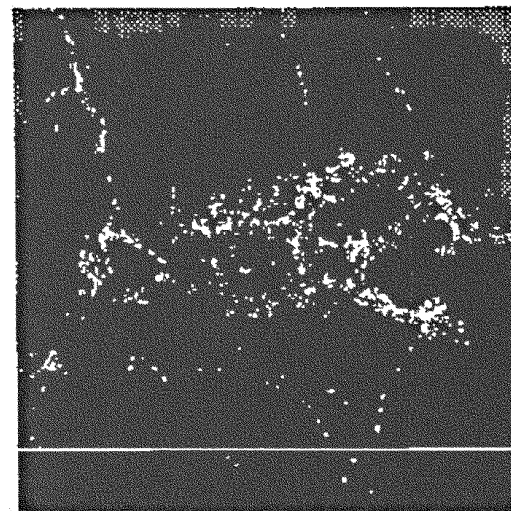


FIG. 9E

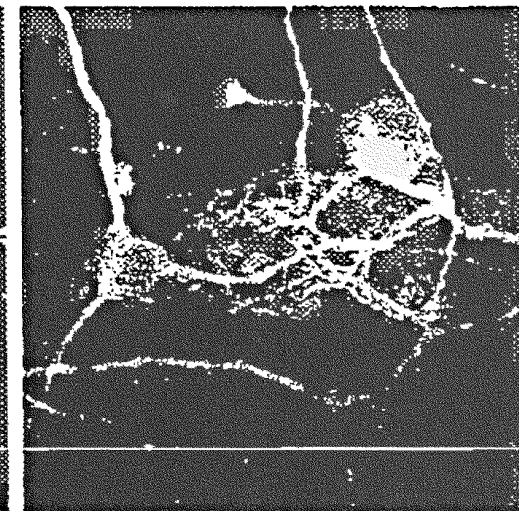


FIG. 9F

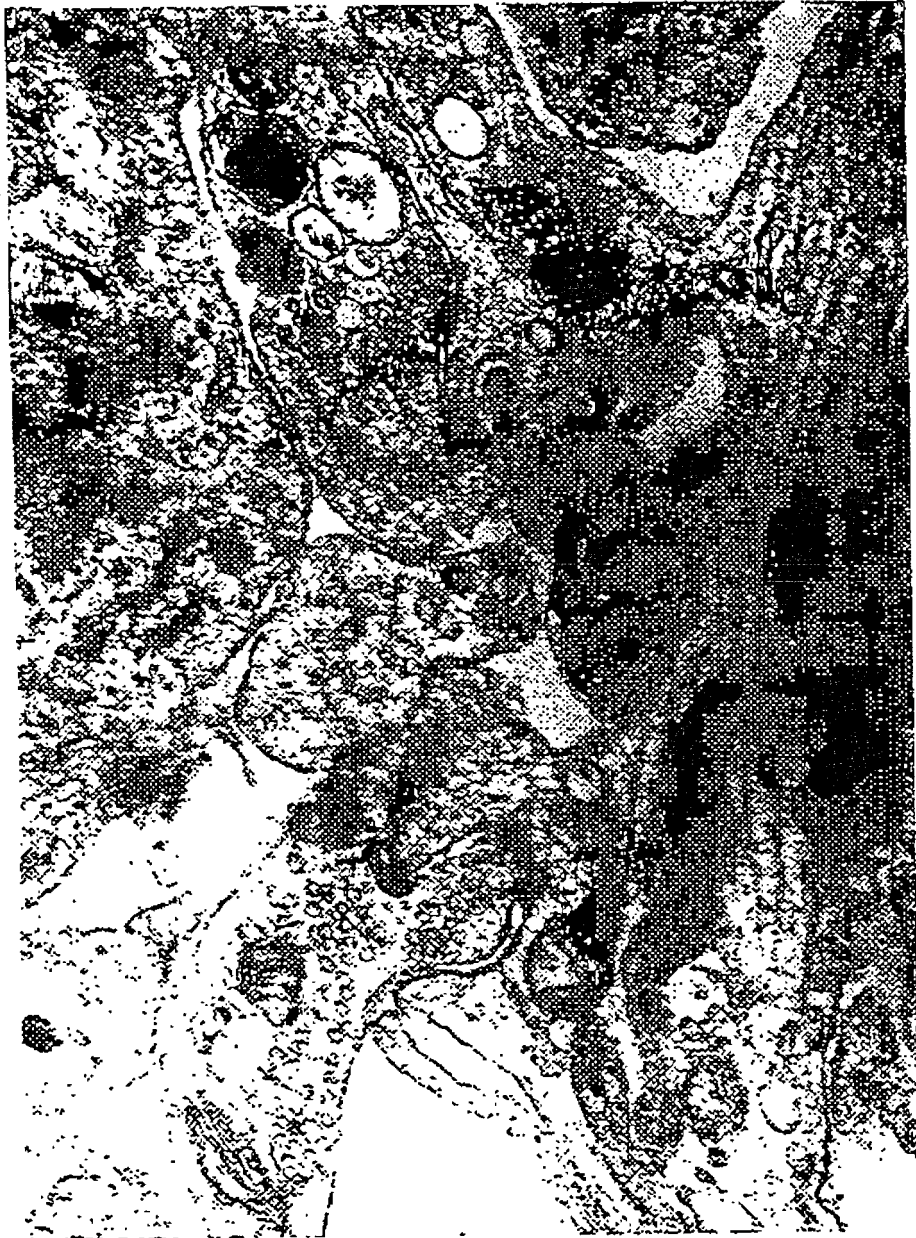


FIG. 10

FIG. 11A

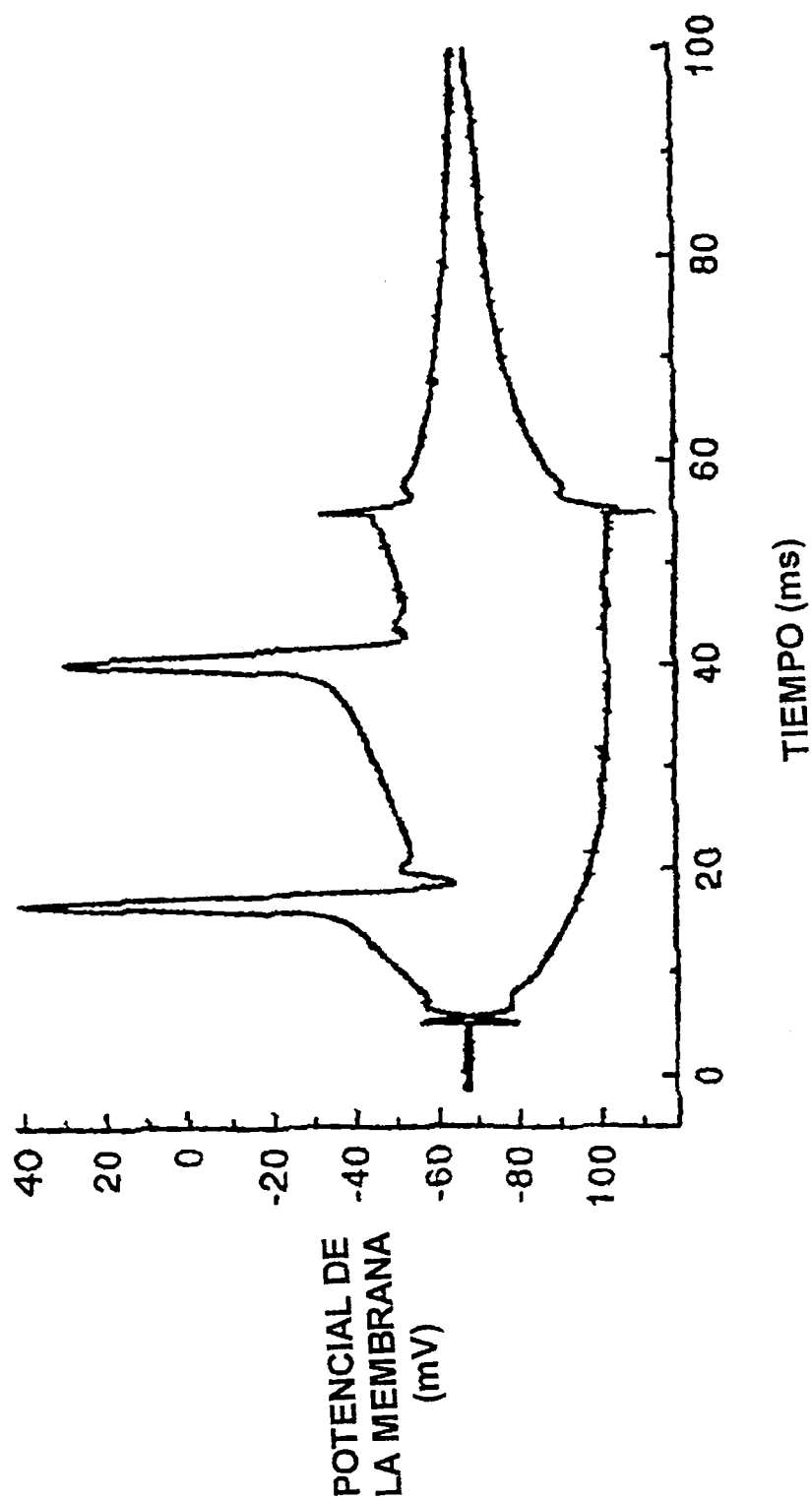


FIG. IIB

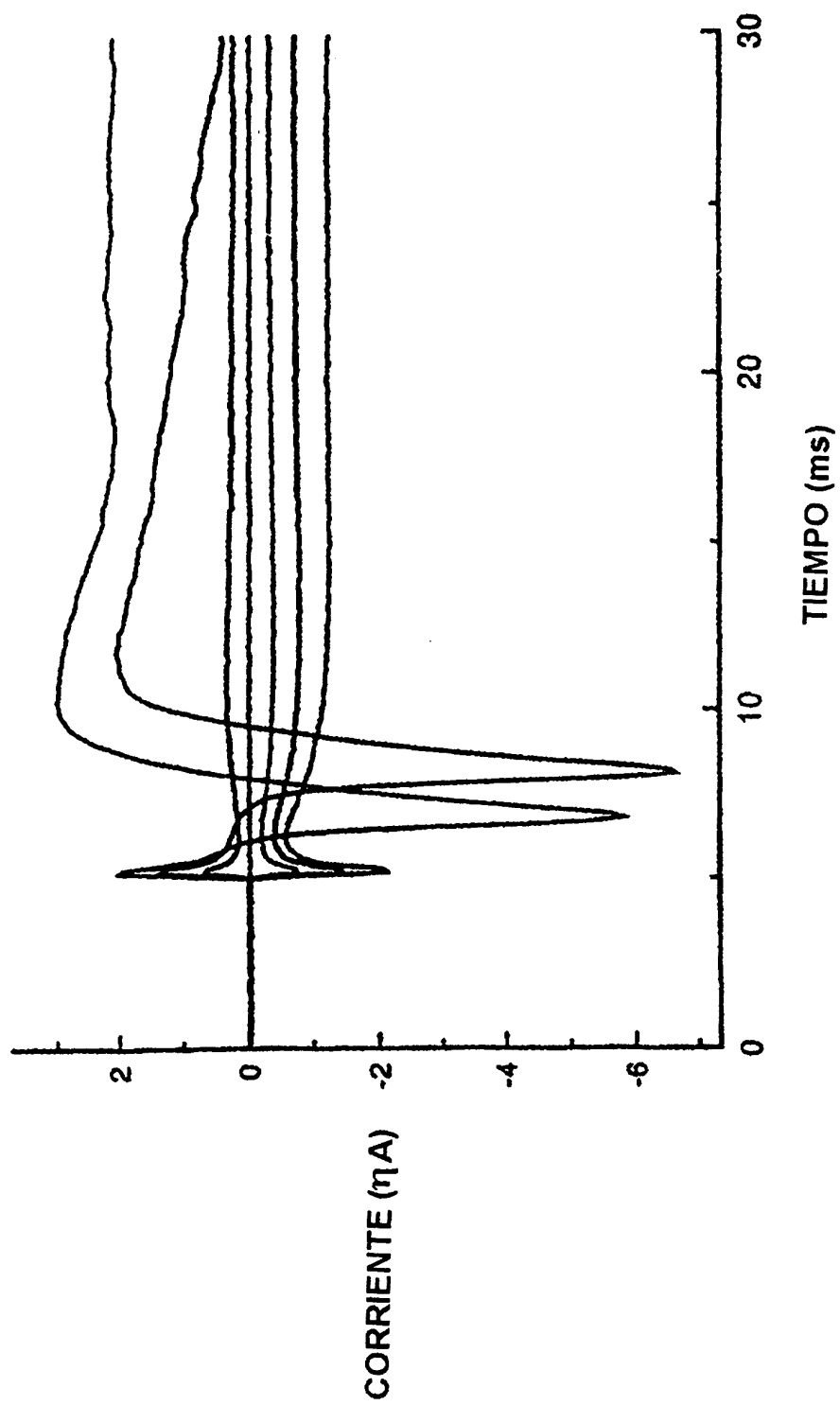


FIG. IIC

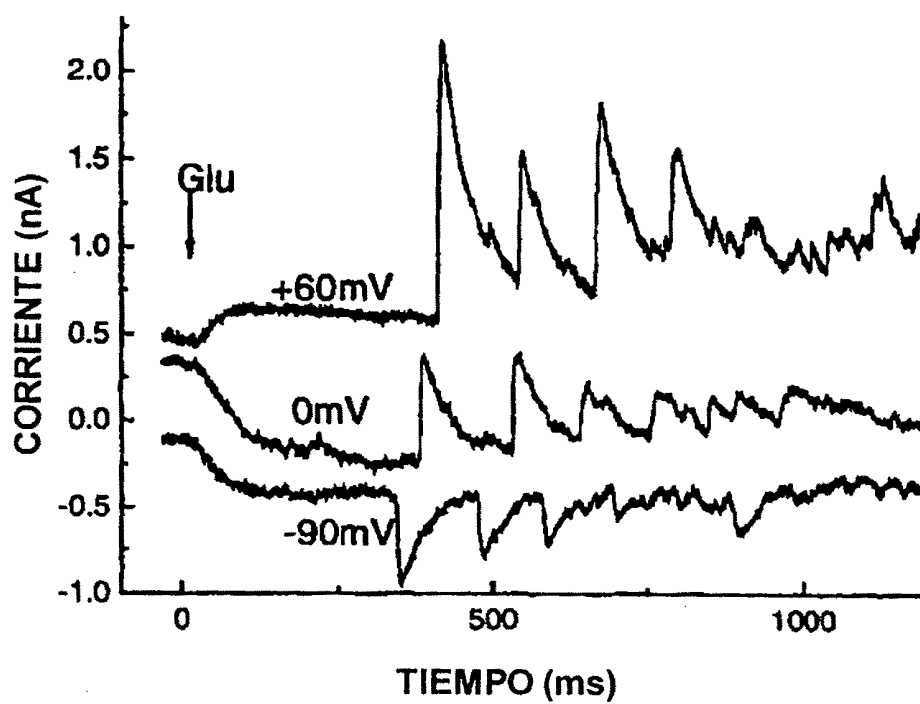
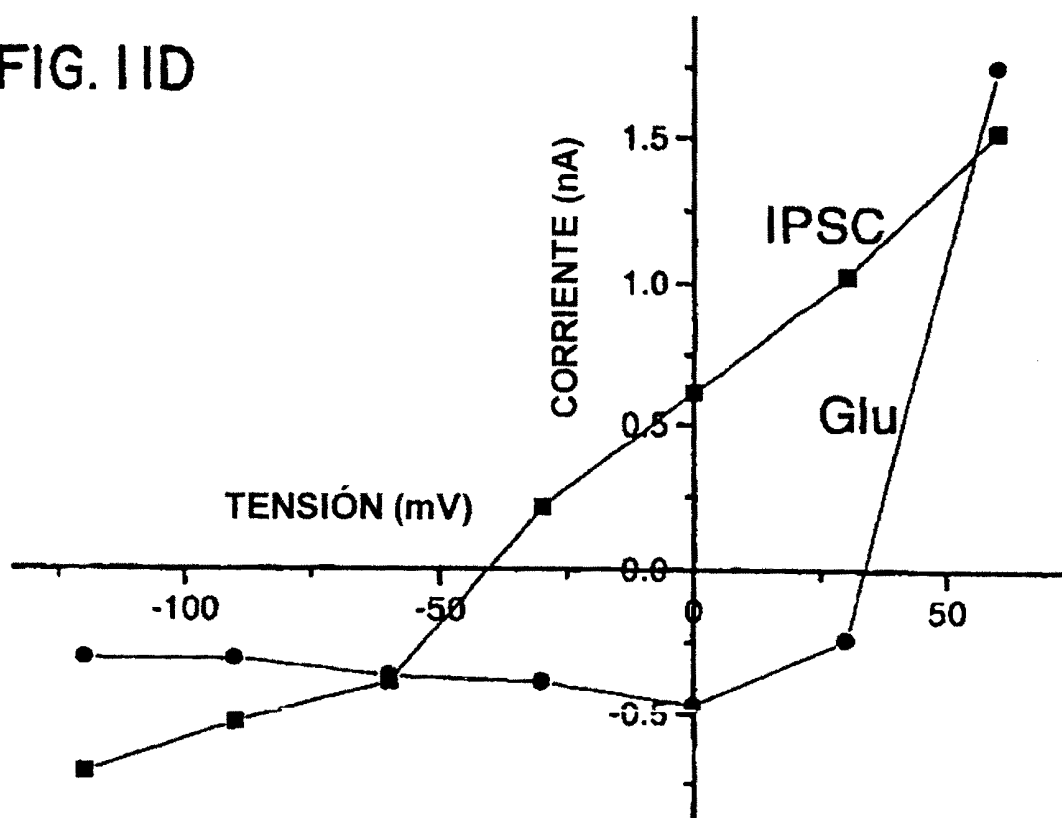
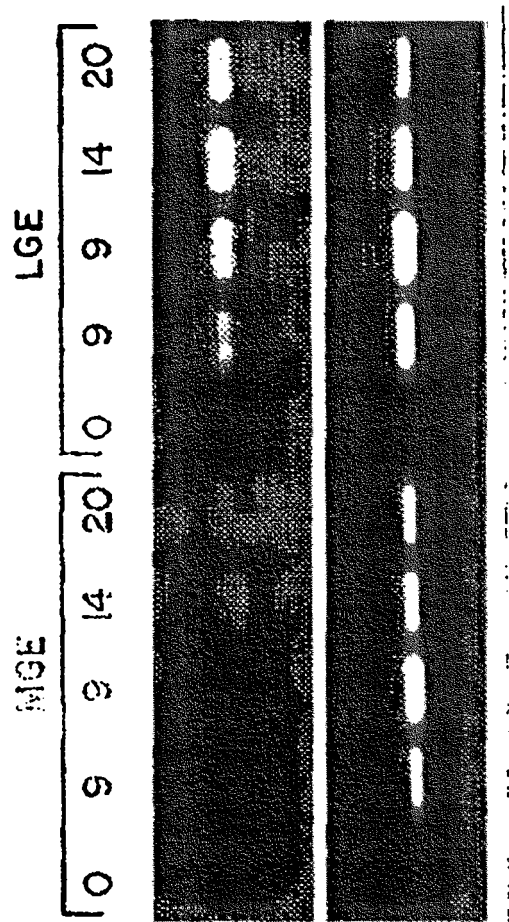


FIG. IID





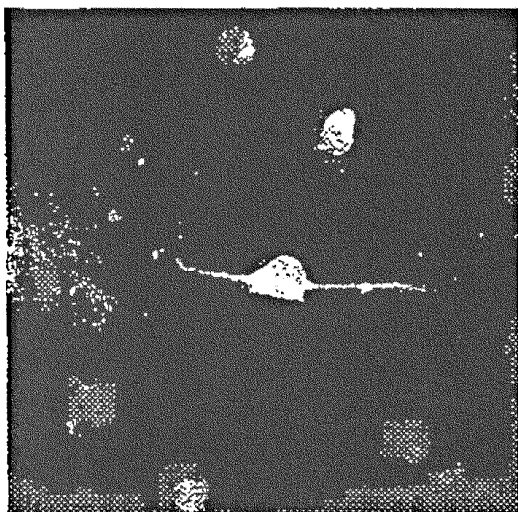


FIG. 13A

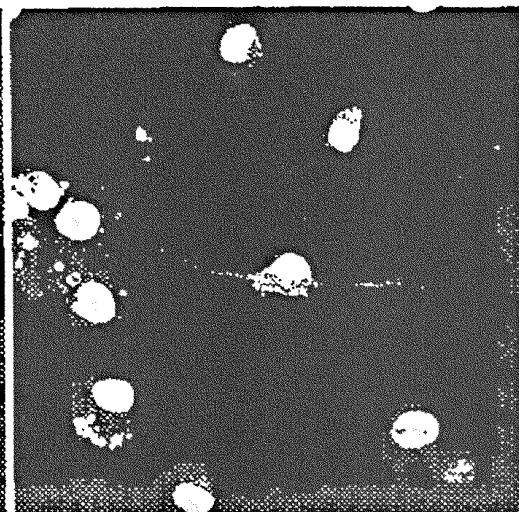


FIG. 13B

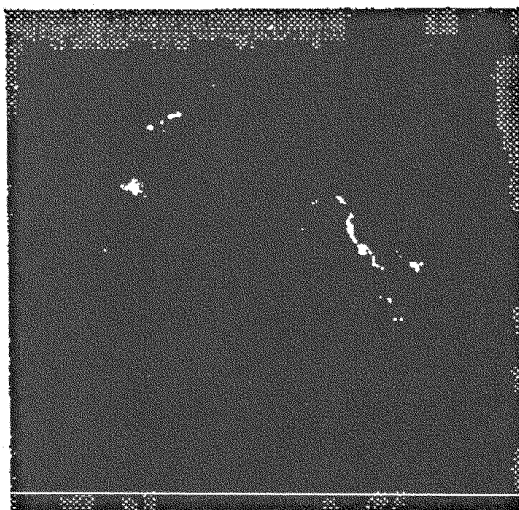


FIG. 13C

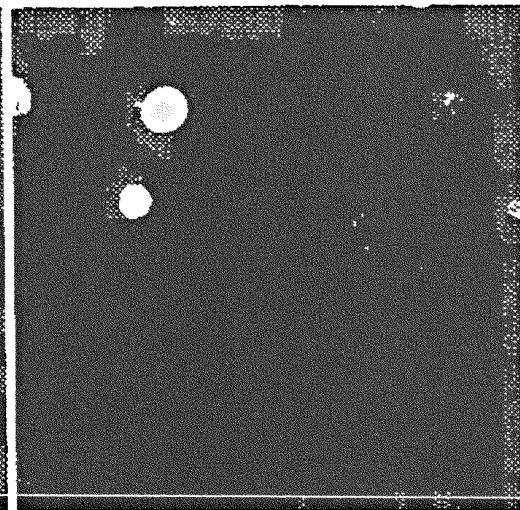


FIG. 13D

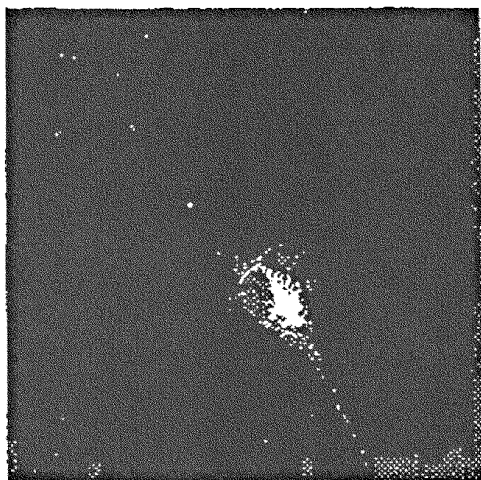


FIG. 14A

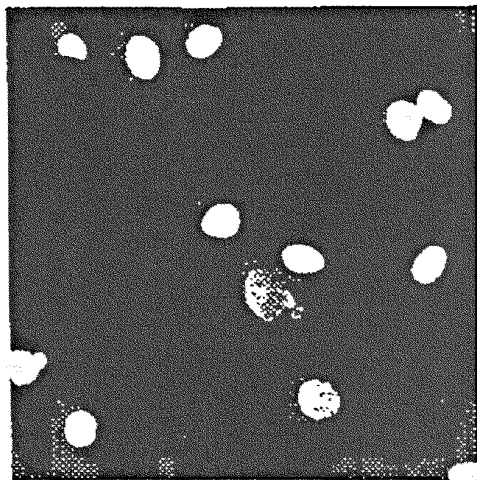


FIG. 14B



FIG. 14C

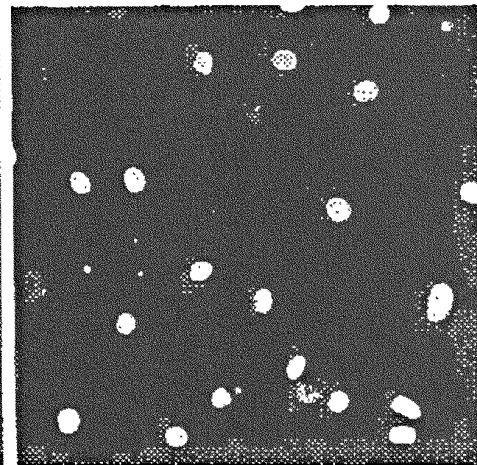


FIG. 14D

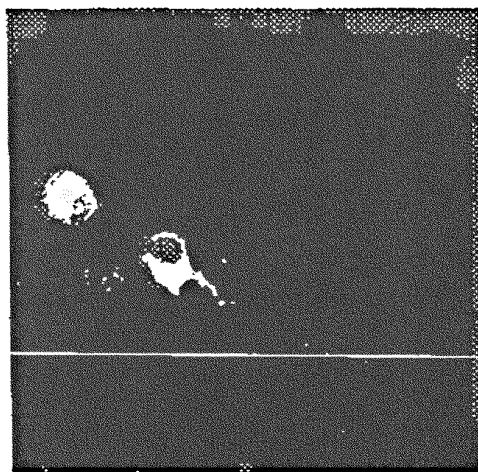


FIG. 14E

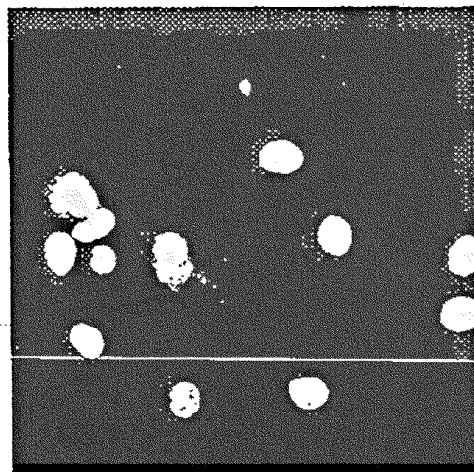


FIG. 14F

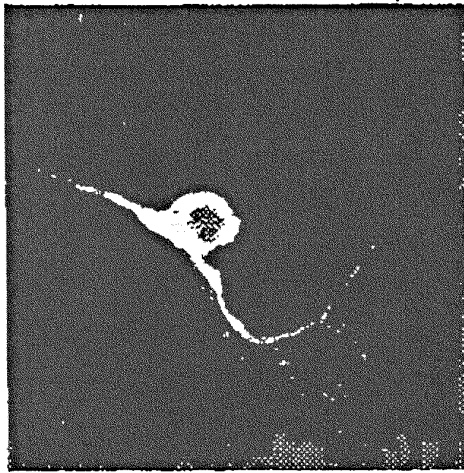


FIG. 15A

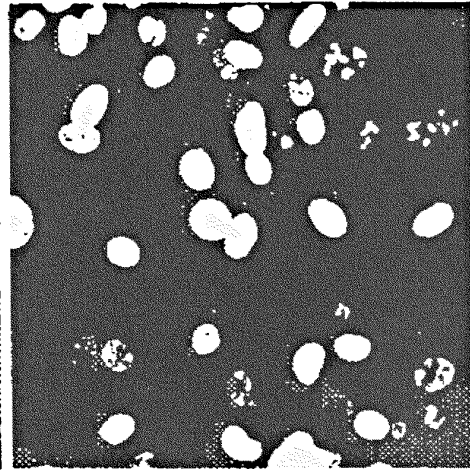


FIG. 15B

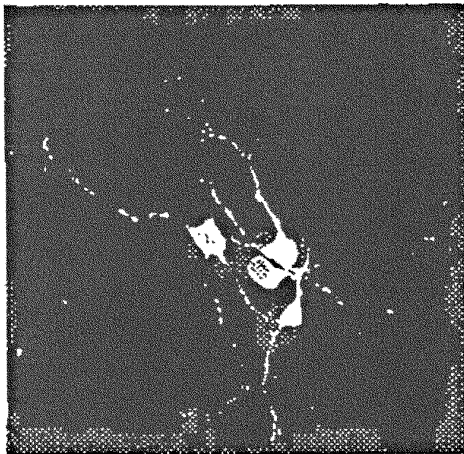


FIG. 15C

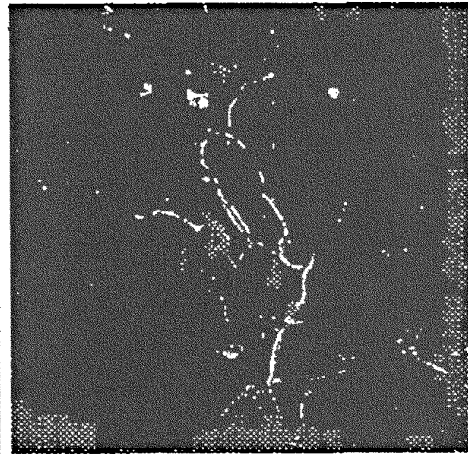


FIG. 15D

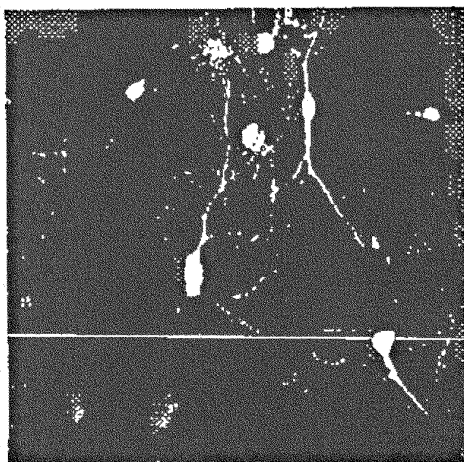


FIG. 15E

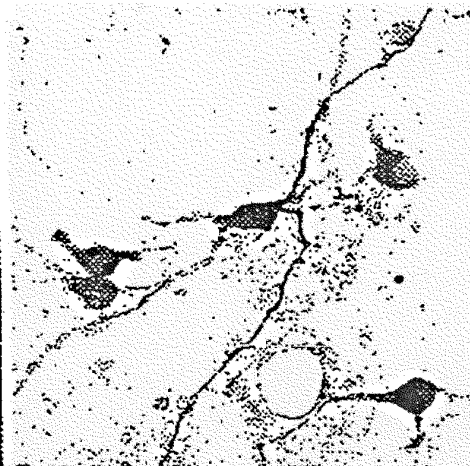


FIG. 15F

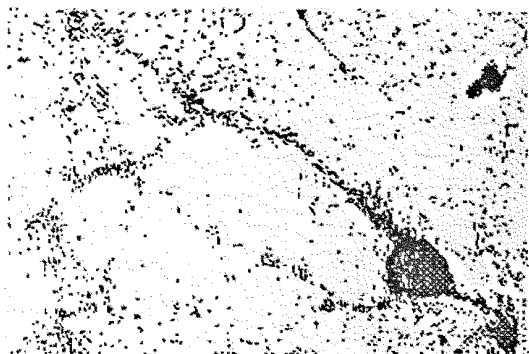


FIG. 16A

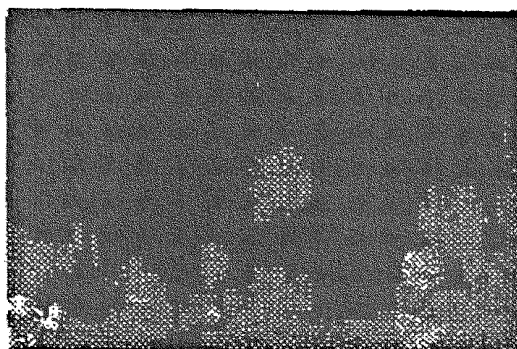


FIG. 16B

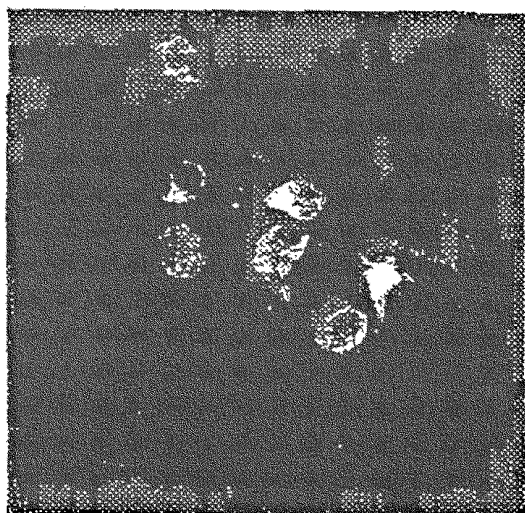


FIG. 16C

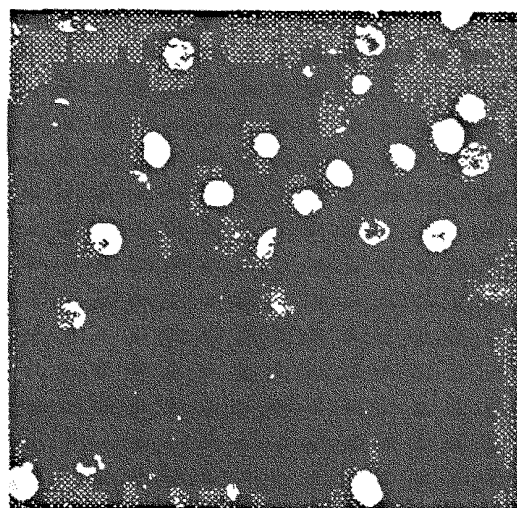


FIG. 16D

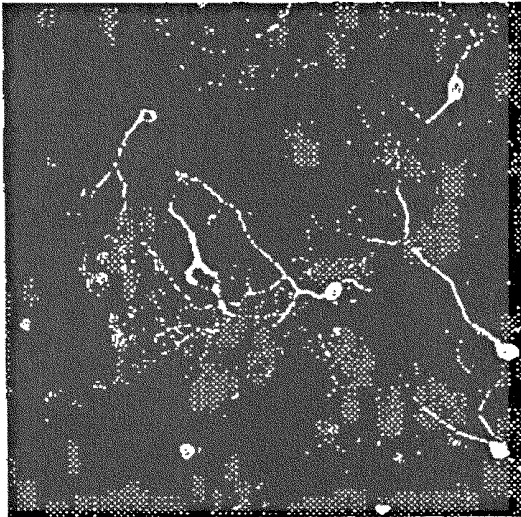


FIG. 17A

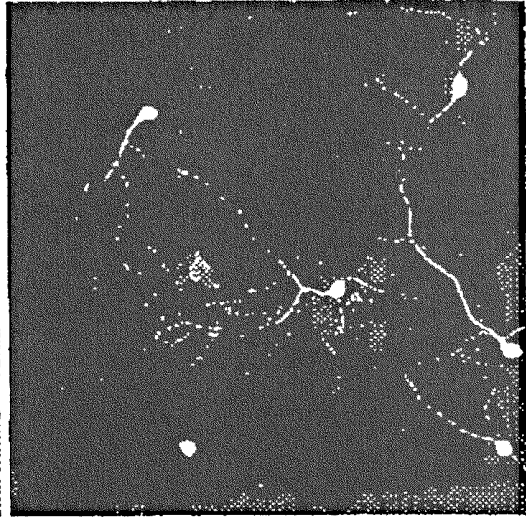


FIG. 17B

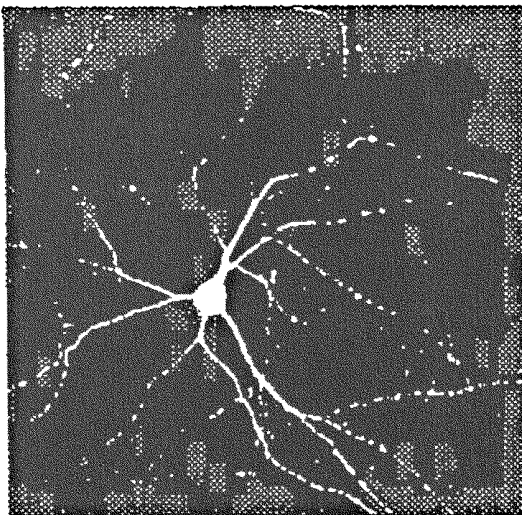


FIG. 17C

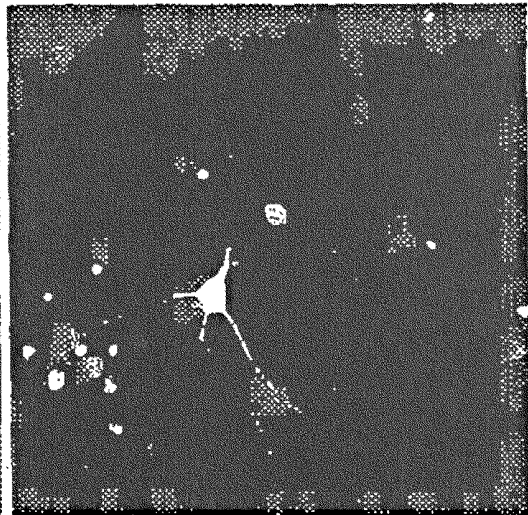


FIG. 17D

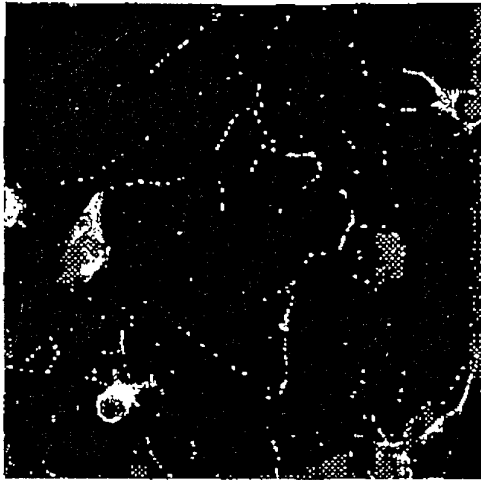


FIG. 18A

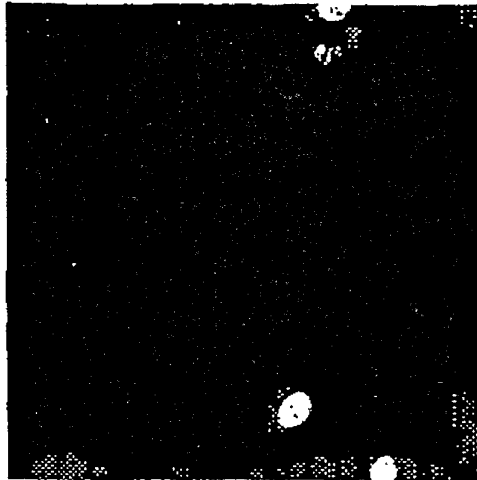


FIG. 18B



FIG. 18C

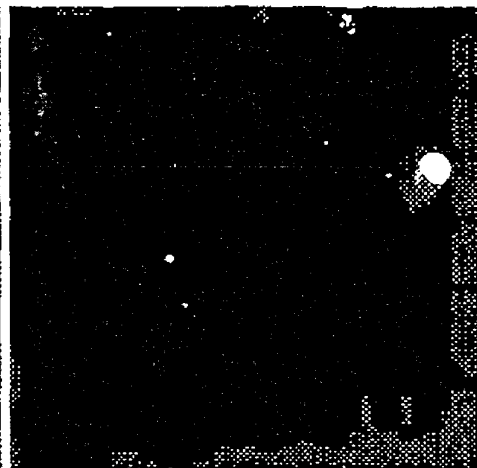


FIG. 18D

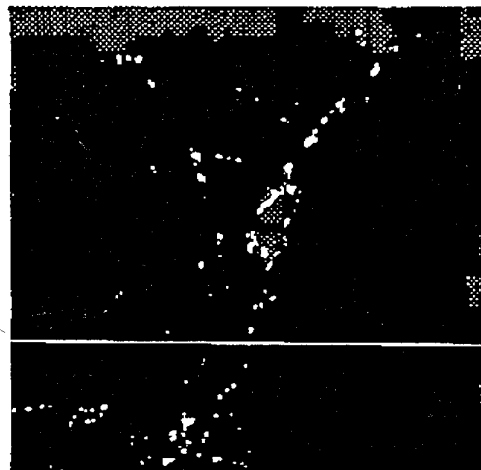


FIG. 18E

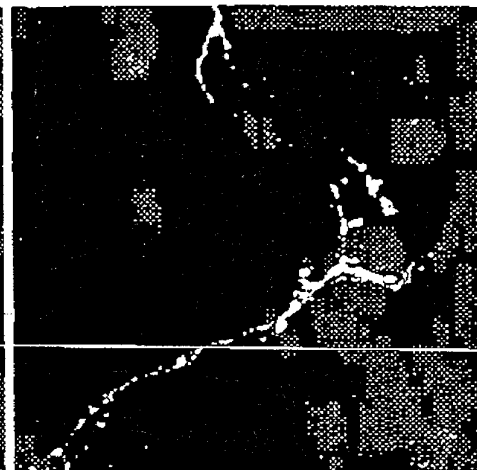


FIG. 18F