

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 501**

51 Int. Cl.:
C12N 5/0793 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05735066 .2**
96 Fecha de presentación: **07.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1737950**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.01.2007**

54 Título: **CÉLULAS QUE PRESENTAN CARACTERÍSTICAS DE CÉLULAS NEURONALES PROGENITORAS.**

30 Prioridad:
12.04.2004 US 561613 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.01.2012

73 Titular/es:
SANBIO, INC.
231 S. WHISMAN ROAD, SUITE A
MOUNTAIN VIEW, CA 94041-1522, US

72 Inventor/es:
DEZAWA, Mari

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 372 501 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células que presentan características de células neuronales progenitoras

5 [0001] CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La invención se refiere a procedimientos de preparación de células que presentan características de células neuronales progenitoras procedentes de citoblastos mesenquimales regulando las vías celulares en los citoblastos mesenquimales que están asociados a la transdiferenciación glial de los citoblastos mesenquimales.

10

[0003] ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0004] Una limitación en la investigación y tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central (SNC) o sistema nervioso periférico (SNP) es el reconocimiento convencional de que las neuronas terminalmente diferenciadas están significativamente limitadas en su capacidad de proliferar. Por consiguiente, cualquier tratamiento de enfermedades del SNC o SNP que requiera el trasplante de neuronas terminalmente diferenciadas es difícil de conseguir.

15

[0005] Una aproximación propuesta para superar esta dificultad ha sido el cultivo de un gran número de células mitóticas que presentan características de células neuronales progenitoras ("CPCs"). En teoría dichas células se podrían diferenciar *in vivo* en neuronas que podrían funcionar en el tratamiento de enfermedades del SNC y/o SNP. Alternativamente, las CPCs se podrían diferenciar *in vitro* en neuronas y a continuación ser trasplantadas a pacientes. No obstante, dichas CPCs son raras y difíciles de aislar de los donantes. Por tanto, convencionalmente, los investigadores han intentado obtener CPCs a partir de citoblastos embrionarios y fetales (denominados colectivamente en lo sucesivo como "citoblastos embrionarios").

20

25

[0006] Los citoblastos embrionarios, que son células pluripotentes, se han usado para generar una gran variedad de tipos de tejido, y podrían ser una fuente de CPCs. I. Weissman, Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution (Review). Cell 100, 157-168 (2000). No obstante, el uso de citoblastos embrionarios genera una serie de cuestiones éticas, y así es una fuente no favorecida de citoblastos para la producción de CPCs. Además, los citoblastos embrionarios pueden ser tumorigénicas, que genera problemas de seguridad en cuanto a cualquier procedimiento de trasplante que potencialmente podría dar como resultado la introducción de citoblastos embrionarios a un paciente, como la creación de un injerto de CPC procedente de citoblastos embrionarios.

30

35

[0007] Algunos investigadores han intentado utilizar otros tipos de citoblastos en la producción de CPCs, tales como citoblastos mesenquimales. La Solicitud de patente de Estados Unidos 20030003090 de Prockop, y col., presentada el 2 de enero de 2003, y titulada "Diferenciación *in vitro* dirigida de células de médula ósea estromales en células neurales progenitoras" describe que los niveles de expresión tanto de la NSE como de la vimentina se incrementaron en citoblastos mesenquimales humanos después de su incubación con IBMX 0,5 mM y dbcAMP 1 mM. El incremento en los ARNm de la NSE y la vimentina coincidió con la aparición de células neurales en los cultivos. No obstante, Prockop y col., informaron de que no hubo cambio en el nivel de expresión de MAP1B o de TuJ-1. Puesto que la NSE, MAP1B, y TuJ-1 son marcadores tempranos característicos de neuronas, y la vimentina es un marcador temprano de la glía, Prockop y col., han sugerido que los hMSCs se transdiferenciación *in vitro* en algunos progenitores tempranos de neuronas o de la glía. No obstante, las células progenitoras tempranas de Prockop pueden ser no deseables para su uso debido a que parecen presentar un fenotipo neuronal muy inmaduro cuya eficacia clínica no se comprende bien. El documento WO 03/066856 describe la producción de citoblastos neurales procedentes de citoblastos mesenquimales después de su transfección con el dominio intracelular Notch. Los citoblastos neurales se podrían diferenciar posteriormente en células neurales que expresan MAP-2ab y TuJ-1 después de la inducción del factor trófico.

40

45

50

[0008] Por consiguiente, hay escasez de fuentes de CPC disponibles convencionalmente y adecuadas para su uso, por ejemplo, en la investigación y tratamiento de enfermedades del SNC o SNP. Además, hay escasez de procedimientos que se puedan usar para producir dichas CPCs de una manera adecuada conveniente para su uso. Lo que se necesita son procedimientos y composiciones que superen dichos problemas.

55

[0009] RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de producción de células que presentan características de células neuronales progenitoras procedentes de material que comprende citoblastos mesenquimales, el procedimiento que comprende: la regulación de las vías celulares en los citoblastos mesenquimales que están asociados a la transdiferenciación glial de los citoblastos mesenquimales; donde las vías celulares están suficientemente reguladas para inducir al menos a una parte de los citoblastos mesenquimales para que se transdiferencien en células que presentan características de células neuronales progenitoras; caracterizado por que la regulación comprende la inhibición de la transducción de las señales JAK/STAT.

60

65

[0011] En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de células que presentan características de células neuronales progenitoras que comprende: la incubación de citoblastos mesenquimales con un inhibidor de JAK/STAT en una cantidad suficiente para inducir al menos a una parte de los citoblastos mesenquimales para que se transdiferencien en células que presentan características de células neuronales progenitoras; con la condición de que la interacción no comprende la transfección de los citoblastos mesenquimales con el dominio intracelular Notch.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0012] El inventor ha descubierto de manera inesperada y sorprendente que los problemas y limitaciones indicadas anteriormente se pueden superar poniendo en práctica la invención descrita en el presente documento. La presente invención aborda la producción de CPCs a partir de citoblastos mesenquimales (MSCs) regulando las vías celulares en los hMSCs que están asociadas a la transdiferenciación glial de los hMSCs. En el presente documento se describen formas para realizar y usar la invención.

[0013] Para los propósitos de esta invención, las células que presentan características de células neuronales progenitoras ("CPCs") se definen como células que son mitóticas, expresan nestina y otros marcadores celulares específicos para las células neurales progenitoras/precursores neurales, y proceden de MSCs. Las CPCs se pueden diferenciar en neuronas, glía, y oligodendrocitos, y precursores de cualquiera de los anteriores. Las CPCs pueden proceder de los hMSCs según los procedimientos descritos en el presente documento. En una forma de realización, las CPCs humanas son EfnB2+, CD90-, el receptor beta del PDGF. Estos marcadores se pueden usar para separar las CPCs de los hMSCs usando FACS después de la transdiferenciación glial de los hMSCs según la presente invención. Los procedimientos adecuados de manipulación de CPCs son conocidos de manera convencional, incluyendo aquellos procedimientos descritos, por ejemplo, en la Solicitud de patente de Estados Unidos publicada 20020012903 de Goldman y col.

[0014] En general, según la invención las CPCs se pueden producir regulando las vías celulares en los hMSCs que están asociadas a la transdiferenciación glial de los hMSCs, estando las vías celulares suficientemente reguladas para inducir al menos a una parte de los hMSCs para que se transdiferencien en CPCs.

[0015] Pueden ser útiles una amplia variedad de procedimientos de regulación. Éstos incluyen, pero no están limitados a, la modificación del medio y las condiciones en las que se crecen las células, si se crecen *ex vivo*; la modificación del entorno del tejido en el que están presentes los hMSCs, si se crecen *in vivo*; o la incubación de los hMSCs con agentes de regulación gliales. La forma precisa de regulación no importa, mientras la transdiferenciación glial de los hMSCs esté eficazmente regulada, permitiendo así la diferenciación de los hMSCs en CPCs. En general, la regulación de las vías celulares en MSCs que están asociadas a la transdiferenciación glial de los hMSCs tiene lugar en condiciones que son adecuadas para mantener a los MSCs o CPCs en un estado mitótico y viable. Dichas condiciones son conocidas por alguien experto en la materia, y se pueden encontrar en, por ejemplo, M. Kallos y col., Large-scale expansion of mammalian neural stem cells: a review. Med Biol Eng Comput. Mayo de 2003; 41 (3):271-82. Condiciones y técnicas adecuadas también se pueden encontrar en cualquier otra parte de la biografía tanto para el cultivo celular como para los entornos *in vivo*.

[0016] La regulación de las vías celulares en MSCs que están asociadas a la transdiferenciación glial de los hMSCs se puede conseguir incubando los hMSCs con agentes de regulación gliales. La regulación de las vías celulares en MSCs que están asociados a la transdiferenciación glial de los hMSCs se puede conseguir incubando los hMSCs con agentes de regulación gliales en cantidades suficientes para inducir al menos a una parte de los hMSCs para que se transdiferencien en CPCs. Las incubaciones pueden suponer el cultivo de MSCs en presencia de agentes de regulación gliales con la intención de que los agentes de regulación gliales interactúen con los receptores de la superficie celular de los hMSC o sean transportados al interior de los hMSCs para interactuar con las vías celulares internas. Dicho transporte puede ser pasivo, como transporte por difusión, o activo, tal como a través de los transportadores activos o una mezcla de los dos. Las incubaciones *in vitro* se pueden llevar a cabo de una manera convencional, por ejemplo, incubando cultivos de MSCs en alfa-MEM, o un medio similar, al cual se añaden agente(s) de regulación gliales. Las técnicas de incubación adecuadas se pueden encontrar de manera general en la bibliografía, incluyendo, por ejemplo, M. Kallos y col., Large-scale expansion of mammalian neural stem cells: a review. Med Biol Eng Comput. Mayo de 2003; 41 (3):271-82. Las incubaciones también pueden tener lugar en un entorno *in vivo*, en cuyo caso los agentes de regulación gliales según la invención se pueden administrar sistémica o localmente, y usando procedimientos convencionales. Si el agente de regulación glial es una proteína o un péptido, el procedimiento de incubación puede ser una transfección del ADN que codifica para esa proteína o péptido en los hMSCs. Las transfecciones se pueden llevar a cabo usando protocolos de transfección disponibles comercialmente, tal como el sistema Lipofectamine™ 2000 disponible en Invitrogen, o el sistema de transfección Effectene™ disponible en Qiagen, u otros protocolos de transfección convencionales.

[0017] Si el agente de regulación glial es una proteína o un péptido, el procedimiento de incubación puede ser la administración vírica del agente de regulación glial, usando vectores víricos convencionales, tales como los sistemas vectores Lentiviral (BLOCK-iT™ Lentiviral RNAi Expression System, Invitrogen) para una expresión estable y los sistemas vectores Adenoviral (BLOCK-iT™ Adenoviral RNAi Expression System, Invitrogen) para una expresión

transitoria.

[0018] Las incubaciones pueden tener lugar en diversos momentos: de forma seriada, en paralelo o combinaciones de incubaciones seriadas y en paralelo de los hMSCs con diversos agente(s) de regulación gliales.

5 **[0019]** En formas de realización de la invención, se tiene en cuenta la condición de que las vías celulares de regulación en los hMSCs que están asociadas a la transdiferenciación glial de los hMSCs no comprende la transfección de los hMSCs con el dominio intracelular del gen Notch. En forma de realización de la invención, se tiene en cuenta la condición de que la incubación de los hMSCs con los agentes de regulación gliales no
10 comprenden la transfección de los hMSCs con el dominio intracelular del gen Notch.

[0020] Para los propósitos de esta invención, los citoblastos mesenquimales (MSCs) se definen como citoblastos que de manera convencional se reconoce que se diferencian en varios tipos de células encontradas principalmente en tejidos conectivos, incluyendo pero no limitado a, osteoplastos, adipocitos, condrocitos, y miocitos. Los hMSCs
15 excluyen específicamente citoblastos embrionarios y citoblastos fetales. Los hMSCs se pueden obtener de una amplia variedad de animales, incluyendo pero no limitado a, seres humanos, y otros mamíferos como ratas, ratones, primates, cerdos, vacas, y ovejas. Los hMSCs se pueden obtener a partir de una variedad de tejidos; las fuentes preferidas comprenden médula ósea (citoblastos adherentes de la médula ósea) y sangre del cordón umbilical. Fuentes útiles para los hMSCs, y procedimientos para su obtención se describen en el Ejemplo 1 a continuación, y
20 en otras partes del presente documento. En una forma de realización, los hMSCs humanas útiles en la práctica de esta invención expresan CD29, y CD90, pero son negativas para CD15, CD34, CD11b/c, CD31, CD45 y el factor de von Willebrand.

[0021] En una forma de realización, los hMSCs se pueden aislar a partir de la sangre del cordón umbilical usando técnicas descritas en la bibliografía. Por ejemplo, C. Campagnoli y col., Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. 1: Blood. 15 de Octubre de 2001; 98(8):2396-402., describe procedimientos útiles en general para la obtención de MSCs de sangre fetal. En A. Erices y col., Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. 1: Br J Haematol. Abril de 2000; 109(1):235-42., se describen procedimientos útiles en general para la obtención de MSCs procedente de la sangre del cordón
25 umbilical. L. Hou y col., Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells *in vitro*. Int J Hematol. Octubre de 2003; 78(3):256-61, describe procedimientos útiles en general para la obtención, purificación, y expansión de MSCs de sangre del cordón umbilical humano.

[0022] Los agentes de regulación gliales se definen como sustancias que, entre otras características, poseen la característica de inhibir la transdiferenciación de MSCs en células gliales y promover su transdiferenciación en CPCs. Los agentes de regulación gliales pueden actuar a través de una variedad de mecanismos diferentes para alejar a los hMSCs del destino glial. Por ejemplo, se cree que los factores proneurales básicos de transcripción de hélice-bucle-hélice Mash 1, Math 1 y neurogenina 1 son activadores de la expresión génica neuronal.

[0023] Se cree que los genes proneurales dirigen la transdiferenciación neuronal de los hMSCs mientras inhiben la transdiferenciación glial. Un mecanismo mediante el cual se puede inhibir la transdiferenciación glial es a través de la regulación de la transducción de señales mediada por STAT. Se cree que la transducción de señales por STAT se desencadena mediante fosforilación, que se cree que está catalizada por la familia Janus de tirosina quinasas (JAK). La inhibición de la transducción de la señal JAK-STAT puede regular, por tanto, las vías de transdiferenciación glial y
40 promover el destino neuronal de los hMSCs.

[0024] Los agentes de regulación gliales usados en el presente documento pueden comprender inhibidores o antagonistas o agentes que interfieren con las vías de señalización para factores gliogénicos. Los agentes de regulación gliales también pueden comprender agonistas para la neurogénesis, incluyendo factores neurogénicos. El uso de estos agonistas o factores puede controlar negativamente la gliogénesis de los hMSCs en la práctica de esta invención. Los agentes de regulación gliales pueden comprender formas convencionales de moléculas terapéuticas, incluyendo pero no limitado a, moléculas pequeñas, péptidos, y productos génicos completos o fragmentos de los mismos.

[0025] Los agentes de regulación gliales usados en la invención incluyen, inhibidores de JAK/STAT, incluyendo inhibidores de STAT1 y STAT3. En ciertas formas de realización, dichos inhibidores de JAK/STAT pueden comprender ARNi para el silenciamiento de genes de la vía JAK/STAT, oligonucleótidos de sentido contrario para la regulación por disminución de la vía JAK/STAT, o la molécula pequeña inhibidora de la JAK, 4-(4'-hidroxifenil)amino-6,7-dimetoxiquinazolina. Inhibidores de JAK/STAT adicionales se pueden encontrar en la Solicitud de patente de Estados Unidos 20040209799 de George Vasios, publicada el 21 de octubre de 2004; y la Solicitud de patente de Estados Unidos 20040052762 de Hua Yu y col., publicada el 18 de marzo de 2004.

[0026] Agentes de regulación gliales alternativos incluyen, pero no están limitados a, antagonistas de BMP2 ó 7 (proteína morfogénica ósea). Dichos antagonistas pueden comprender productos génicos completos o fragmentos de los mismos, de genes que expresan Noggina, Cordina, Folistatina, *Sonic hedgehog* (SHH), o agonistas de estos genes.

- 5 **[0027]** Otros agentes de regulación gliales alternativos incluyen, pero no están limitados a, inhibidores de Hes, incluyendo pero no limitado a inhibidores de Hes 1 y/o Hes 5. Dichos inhibidores de Hes pueden comprender ARNi para el silenciamiento de genes de Hes, u oligonucleótidos de sentido contrario para la regulación por disminución de Hes.
- 10 **[0028]** Agentes de regulación gliales alternativos adicionales incluyen, pero no están limitados a, inhibidores de Id-1. Véase S. Tzeng y col., Id1, Id2, and Id3 gene expression in neural cells during development. *Glia*. Diciembre de 1998; 24(4):372-81. Dichos inhibidores de Id-1 pueden comprender ARNi para el silenciamiento de genes de Id-1, u oligonucleótidos de sentido contrario para la regulación por disminución de Id-1.
- 15 **[0029]** Otros agentes de regulación gliales incluyen, pero no están limitados a, inhibidores de los homólogos de mamífero de glide/gcm (*glial cells missing*) de *Drosophila*, incluyendo pero no limitado a Gcm1 (murino) o GCMB (humano). Véase Y. Iwasaki y col., The potential to induce glial differentiation is conserved between *Drosophila* and mammalian glial cells missing genes. *Development*. Diciembre de 2003; 130(24):6027-35. Epub 22 de Octubre de 2003; y M. Kammerer y col., GCMB, a second human homolog of the fly glide/gcm gene. *Cytogenet Cell Genet*. 1999; 84(1-2):43-7.). Dichos inhibidores de los homólogos glide/gcm pueden comprender ARNi para el silenciamiento de genes de los homólogos glide/gcm (tal como Gcm1 (murino) o GCMB (humano)), u oligonucleótidos de sentido contrario para la regulación por disminución de los homólogos glide/gcm (tal como Gcm1 20 (murino) o GCMB (humano)).
- 25 **[0030]** Agentes de regulación gliales adicionales incluyen, pero no están limitados a, inhibidores de Sox9, que puede ser un factor de transcripción para el linaje de oligodendrocitos. Véase C. Stolt y col., The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev*. 1 de Julio de 2003; 17(13):1677-89.). Dichos inhibidores de Sox9 pueden comprender ARNi para el silenciamiento de genes de Sox9, u oligonucleótidos de sentido contrario para la regulación por disminución de Sox9.
- 30 **[0031]** Aún agentes de regulación gliales adicionales incluyen, pero no están limitados a, inhibidores de la neurogenina 3, que puede ser un factor de transcripción para la gliogénesis. Dichos inhibidores de la neurogenina 3 pueden comprender ARNi para el silenciamiento de genes de la neurogenina 3, u oligonucleótidos de sentido contrario para la regulación por disminución de la neurogenina 3.
- 35 **[0032]** Otros agentes de regulación gliales incluyen, pero no están limitados a, inhibidores del factor neurotrófico ciliar (CNTF). En ciertas formas de realización, dichos inhibidores del CNTF pueden comprender ARNi para el silenciamiento de genes del CNTF, u oligonucleótidos de sentido contrario para la regulación por disminución del CNTF.
- 40 **[0033]** Los agentes de regulación gliales también pueden comprender productos génicos completos o fragmentos de los mismos procedentes de genes que expresan Wnt1, que inhibe enormemente la gliogénesis. Véase K. Tang y col., Wnt-1 promotes neuronal differentiation and inhibits gliogenesis in P19 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 26 de Abril 2002; 293 (1):167-73. Productos génicos completos o fragmentos de los mismos procedentes de genes que expresan Wnt1 se pueden administrar por transfección u otros procedimientos convencionales, tales como procedimientos de terapia génica, incluyendo vectores víricos.
- 45 **[0034]** Alternativamente, los agentes de regulación gliales pueden comprender productos génicos completos o fragmentos de los mismos procedentes de genes que expresan un subgrupo de factores básicos neurales de hélice-bucle-hélice (bHLH) que desempeñan papeles instructivos durante la neurogénesis o se expresan en CPCs en proliferación. Dichos agentes de regulación gliales pueden comprender productos génicos completos o fragmentos de los mismos procedentes de genes que expresan neurogenina 1, Mash1, Math1, Math6, o NeuroD. Los productos 50 génicos completos o fragmentos de los mismos procedentes de genes que expresan el subgrupo de factores básicos neurales de hélice-bucle-hélice (bHLH), incluyen pero no están limitados a, neurogenina 1, Mash1, Math1, Math6, o NeuroD, y se pueden administrar mediante transfección u otros procedimientos convencionales, tal como procedimientos de terapia génica, incluyendo vectores víricos.
- 55 **[0035]** Adicionalmente, los agentes de regulación gliales se pueden administrar solos o en combinación. En una forma de realización preferida, si se usa una combinación de agentes de regulación gliales en la práctica de la invención, entonces se pueden seleccionar agentes de regulación gliales que actúen sobre diferentes vías de regulación gliales. Esto puede servir para potenciar el efecto de regulación glial global de los agentes de regulación gliales.
- 60 **[0036]** Para los propósitos de esta invención, el aislamiento de CPCs comprende el aislamiento de CPCs a partir de células no CPC en una muestra, tales como MSCs que no se han transdiferenciado en CPCs. Dicho aislamiento puede comprender un solo aislamiento o múltiples aislamientos. Si se deben llevar a cabo múltiples aislamientos, preferentemente se pueden usar diferentes tipos o técnicas de aislamiento, puesto que dichos tipos o técnicas de aislamiento diferentes pueden mejorar los resultados del aislamiento. En la práctica de esta invención son útiles una 65 amplia variedad de procedimientos de aislamiento. Ejemplos de dichos procedimientos de aislamiento incluyen, pero

no están limitados a citometría de flujo (conocido como separación FACS), técnicas de separación magnética, y clasificación visual. También se puede usar la inmunocitoquímica en casos en los que la viabilidad celular no es crítica.

5 **[0037]** La separación FACS se puede llevar a cabo usando equipos y protocolos FACS convencionales con anticuerpos que sean específicos para epítomos asociados a una o más características de las CPCs. N. Ivanova y col., A stem cell molecular signature. Science 298(5593):601-4 (18 de Octubre de 2002). Anticuerpos adicionalmente
 10 útiles en la práctica de la invención, aunque no necesariamente útiles para la separación FACS, comprenden anticuerpos dirigidos contra CD15, dirigidos contra CD29, dirigidos contra CD34, dirigidos contra CD90, dirigidos
 15 contra CD31, dirigidos contra CD45, dirigidos contra CD11 b/c, y dirigidos contra factor de von Willebrand. El equipo FACS para poblaciones celulares útil en la práctica de esta invención incluye, pero no está limitado a, un analizador FACSscalibur™ con el software CeliQuest™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), o el equipo FACS disponible en Guava Technologies (Hayward, California).

15 **[0038]** Alternativamente, el aislamiento se puede llevar a cabo usando técnicas de separación magnética, tales como los protocolos y reactivos BioMag™, disponibles en forma de kit en Qiagen. La inmunocitoquímica puede ser otra técnica de separación útil en la práctica de esta invención; procedimientos inmunocitoquímicos útiles se describen en M. Dezawa y col., Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of *in vitro* differentiated bone-marrow stromal cells. Eur. J. Neurosci. 14, 1771-1776 (2001). Las inspecciones inmunocitoquímicas se pueden
 20 llevar a cabo en un microscopio confocal de barrido láser, tal como el Radians 2000 (Bio-Rad, Hertfordshire, RU). En la práctica de esta invención se pueden utilizar técnicas visuales de clasificación celular convencionales.

[0039] Para los propósitos de esta invención, las neuronas se definen como cualquiera de las células conductoras de impulsos que constituyen el cerebro, la médula espinal, y los nervios, que constan de una estructura celular
 25 nucleada con una o más dendritas y un solo axón. Bioquímicamente, las neuronas se caracterizan por su reacción con anticuerpos para el neurofilamento M, la beta-3-tubulina y TuJ-1. Estas reacciones se pueden usar para aislar neuronas o células que presenten una o más características de las neuronas usando técnicas tales como la separación FACS. Las células neurales también se caracterizan por secretar neurotransmisores, sintetasas de neurotransmisores o proteínas relacionadas con los neurotransmisores, por ejemplo, el neuropéptido Y y la
 30 sustancia P.

[0040] Para los propósitos de esta invención, los agentes neurotróficos se definen como sustancias que, entre otras características, posee la característica de provocar o promover la diferenciación de las CPCs en neuronas o células que presentan una o más características de las neuronas. Los agentes neurotróficos útiles en la práctica de
 35 esta invención comprenden, pero no están limitados a, el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), y la forskolina (FSK). Los agentes neurotróficos se pueden combinar con las CPCs de la presente invención usando técnicas de manipulación celular conocidas en la materia. Los procedimientos preferidos se pueden encontrar, en general, en el documento PCT/JP03/01260 de Dezawa y col. En una forma de realización preferida, se combinan el bFGF, el CNTF y la FSK con CPCs en un cultivo celular en cantidades eficaces
 40 para provocar o promover la diferenciación de las CPCs en neuronas o células que presenten una o más características de las neuronas.

[0041] Para los propósitos de esta invención, las células gliales se definen como cualquiera de las células que conforman la red de células ramificadas y fibras que soportan el tejido del sistema nervioso central. Las células
 45 gliales incluyen, pero no están limitadas a, astrocitos, células de Schwann, oligodendrocitos, y microglía.

[0042] Para los propósitos de esta invención, los genes se definen como un grupo de transcritos conectados, donde un transcrito es un grupo de exones producidos mediante transcripción seguida (opcionalmente) por el procesamiento alternativo del pre-ARNm. Para los propósitos de esta invención, los productos génicos se definen
 50 como proteínas traducidas a partir de genes. Para los propósitos de esta invención, los fragmentos de genes se definen como un subgrupo de un gen. Para los propósitos de esta invención, los fragmentos de productos génicos se definen como un subgrupo de un producto génico.

[0043] Un paciente significa un animal, normalmente un mamífero, y más habitualmente, un ser humano, que es el
 55 objeto de observación o estudio médico.

[0044] Las CPCs producidas según la invención se pueden administrar a pacientes mediante una variedad de procedimientos, incluyendo pero no limitado a, infusión mediante inyección con una cánula, aguja o derivación, o mediante la implantación dentro de un vehículo, por ejemplo, una cápsula biodegradable, pero también están dentro
 60 del alcance de la invención otras vías de administración. Las vías de administración de la invención comprenden vías locales y sistémicas. La administración local puede incluir preferentemente la administración a partes determinadas del SNC o SNP, y preferentemente incluye vías intraparenquimales. Las vías de administración sistémica comprenden vías parenterales, prefiriéndose las vías de administración sistémica intravenosa (i.v.), o intraarterial (tal como a través de las arterias carótidas interna o externa). Las técnicas de administración sistémica
 65 se pueden adaptar de técnicas usadas para administrar precursores celulares, en general como los descritos en D. Lu y col., Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury. J Neurotrauma.

Agosto de 2001; 18(8):813-9.

[0045] Las cantidades de CPCs administradas a un paciente se pueden determinar clínicamente, usando técnicas convencionales de determinación de las dosis, y valoraciones clínicas de la enfermedad particular de un paciente.

5

EJEMPLOS

Materiales y procedimientos:

10 **[0046]** MSCs: Se aislaron y cultivaron MSCs de rata (cepa Wistar) como se describe en M. Dezawa y col., Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of *in vitro* differentiated bone-marrow stromal cells. Dur. J. Neurosci. 14, 1771-1776 (2001). En cuanto a los hMSCs humanas, se utilizan MSCs adquiridas comercialmente (PT-2501, BioWhittaker, Walkersville, MD) y MSCs de donantes sanos. Las células se pueden mantener en alfa-MEM (Sigma, M-4526) con suero fetal bovino al 10% (FBS).

15

[0047] En caso de obtener los hMSCs de donantes sanos, un paso inicial es la obtención de aspirado de médula ósea de donantes sanos mediante técnicas de aspiración convencionales. El aspirado de células se transfiere a un tubo de 50 ml. A continuación se introducen cuidadosamente 13 ml de Histopaque, usando una pipeta de 10 ml. El tubo se centrifuga a 2000 rpm durante 20 minutos. Se recogen las células de la interfase. Se añade PBS (al menos 3 veces el volumen de la interfase) y la mezcla se centrifuga a 1200 rpm. Las células se lavan dos veces más con PBS. El sedimento de células se resuspende en DMEM +10% de FCS, y las células se someten a recuento. Se vuelven a cultivar en placa 5x10⁶ células por matraz de cultivo de tejidos T-75, y se incuban durante 3 días. El día 4, las células no adherentes se extraen y el matraz se lava tres veces con el medio. Las células adherentes se dejan crecer en el matraz. Cuando las células alcanzan el 20-30% de confluencia, el contenido de 2-3 matraces se agrupan y se vuelve a cultivar en un frasco T-75. Cuando las células de este último matraz alcanzan confluencia, las células se someten a tripsinización con tripsina al 0,05% y EDTA al 0,02%. Las células se lavan y se cuentan. A continuación las células se resuspenden en Sigma Alpha MEM +10% de FBS (M-4526). En los experimentos en los que se va usar lipofección, es importante asegurarse de que el medio no contiene l-glu. No se añade glutamina. Las células se expanden durante 2-4 semanas y se congelan en los primeros pasajes.

20

[0048] Los marcadores de la superficie celular en MSCs de rata y seres humanos se analizan con análisis celular activado por fluorescencia (FACS). En una forma de realización, los hMSCs expresan CD29, y CD90, pero son negativas para CD34, CD31, CD45, CD11 b/c, y el factor de von Willebrand, que es consistente con M. Pittenger y col., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284, 143-147 (1999); y J. Kohyama y col., Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. Differentiation 68, 235-244 (2001) (Fig. 1A). Se obtiene el mismo resultado por inmunocitoquímica. La diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica tanto de MSCs de rata como de seres humanos se confirma según el procedimiento descrito por M. Pittenger y col., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284, 143-147.

25

[0049] Análisis FACS. Células a una concentración final de 1×10^7 /ml se incubaron con 1 mg de un anticuerpo monoclonal en tampón fosfato salino (PBS). Las incubaciones se pueden llevar a cabo en presencia de 10 mg de inmunoglobulina de ratón para evitar la unión inespecífica del anticuerpo. En MSCs de rata, los anticuerpos dirigidos contra CD-34 de ratón (Santa Cruz Antibodies) y los anticuerpos dirigidos contra CD-29 de hámster (PharMingen, San Diego, CA) se pueden marcar con FITC, y los controles se pueden incuban con anticuerpo dirigido contra IgG de ratón o hámster marcada con FITC. Los anticuerpos dirigidos contra CD54 y CD11b/c de ratón se pueden comprar en PharMingen. El anticuerpo dirigido contra el factor de von Willebrand de ratón y otros anticuerpos necesarios para la práctica de esta invención se pueden obtener comercialmente. Los controles pueden incluir células teñidas con suero de ratón no inmunitario. Si estos anticuerpos están conjugados a FITC, las células se pueden incuban posteriormente con 1 mg de anticuerpo dirigido contra IgG de ratón conjugada con FITC. En MSCs de seres humanos, se pueden usar anticuerpos dirigidos contra CD34, CD29, CD54, CD11b/c y el factor de von Willebrand de ratón marcados con ficoeritrina, y los controles pueden incluir células teñidas con anticuerpo dirigido contra IgG de ratón conjugada con ficoeritrina. Los datos se pueden obtener y analizar en un FACScalibur con el software CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

30

[0050] Inmunocitoquímica. El procedimiento general está descrito en M. Dezawa y col., Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of *in vitro* differentiated bone-marrow stromal cells. Eur. J. Neurosci. 14, 1771-1776 (2001). Después de la fijación de las células con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS), se incuban con anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos para la nestina se pueden adquirir comercialmente en PharMingen. A continuación las células se pueden incuban con anticuerpos secundarios dirigidos contra IgG, IgM de ratón o IgG de conejo conjugadas a Alexa Fluor 488 ó 546 (Molecular Probes, Eugene, OR) durante 1 hora a temperatura ambiente, y se puede llevar a cabo la tinción de recuento con yoduro de TOTO-3 (Molecular Probes). Las inspecciones se pueden realizar en un microscopio confocal de barrido láser (Radiant 2000, Bio-Rad, Hertfordshire, RU).

35

40

45

50

55

60

Ejemplo 1:

[0051] Se dejaron crecer MSCs humanas (PT-2501, BloWhiftaker, Walkersville, MD) en cultivo en alfa-MEM que contiene FBS al 10%, en general según E. Sudbeck y col., Structure-based design of specific inhibitors of Janus kinase 3 as apoptosis-inducing antileukemic agents. Clin. Cancer Res. 5, 1569-1582 (1999). Los hMSCs se incubaron con 40 µg/ml de 4-(4'-hidroxifenil)amino-6,7-dimetoxiquinazolina (WHI-P131, Calbiochem, San Diego, CA) durante dos días. El WHI-P131 se lavó después de 2 días.

Ejemplo 2:

10

[0052] MSCs humanas, preparadas según la sección de Materiales y procedimientos, se dejaron crecer en cultivo de alfa-MEM que contiene FBS al 10%, en general según E. Sudbeck y col., Structure-based design of specific inhibitors of Janus kinase 3 as apoptosis-inducing antileukemic agents. Clin. Cancer Res. 5, 1569-1582 (1999). Una vez que el cultivo hubo alcanzado un 90% de confluencia, se incubaron varios ARN, diseñados usando el BLOCK-iT™ RNAi Designer (Invitrogen), con el cultivo durante un periodo de tiempo suficiente para silenciar la expresión de Sox9, usando los protocolos de BLOCK-iT™ disponibles en Invitrogen. Las CPCs resultantes se aislaron a partir de MSCs sin transdiferenciar mediante selección secuencial usando perlas magnéticas recubiertas con los anticuerpos adecuados tal como anticuerpo dirigido contra EfnB2 (selección positiva para CPCs), contra CD90 (selección negativa para CPCs), y contra el receptor beta del PDGF (selección negativa para CPCs). Los anticuerpos y las perlas recubiertas se pueden obtener de proveedores comerciales. Las células en PBS se incubaron con las perlas recubiertas durante 1 hora a temperatura ambiente. Las perlas unidas a las células se extrajeron usando un imán. Las CPCs se lavaron eliminando el anticuerpo y se resuspendieron en alfa-MEM que contiene FBS al 10% y se dejaron proliferar.

Ejemplo 3:

[0053] MSCs humanas, preparadas según la sección de Materiales y procedimientos, se dejaron crecer en cultivo de alfa-MEM que contiene FBS al 10%, en general según E. Sudbeck y col., Structure-based design of specific inhibitors of Janus kinase 3 as apoptosis-inducing antileukemic agents. Clin. Cancer Res. 5, 1569-1582 (1999). Se generaron oligómeros de sentido contrario a Hes 1 según las técnicas descritas en cualquiera de H. Moulton y col., Peptide-assisted delivery of steric-blocking antisense oligomers. Curr Opin Mol Ther. Abril de 2003; 5(2):123-32; C. Stein y col., Antisense oligonucleotides as therapeutic agents-is the bullet really magical? Science. 20 de Agosto de 1993; 261(5124):1004-12; o C. Helena, The anti-gene strategy: control of gene expression by triplex-forming-oligonucleotides. Anticancer Drug Des. Diciembre de 1991; 6(6):569-84. Una vez que el cultivo de MSC alcanza una confluencia del 90%, los oligómeros de sentido contrario de Hes-1 se incuban con los hMSCs durante un periodo de tiempo suficiente para la regulación por disminución de la expresión de Hes-1, según las técnicas descritas en cualquiera de las tres referencias citadas en este ejemplo. Las CPCs se aíslan a partir de MSCs sin transdiferenciar mediante selección secuencial usando perlas magnéticas recubiertas con los anticuerpos adecuados tal como anticuerpo dirigido contra EfnB2 (selección positiva para CPCs), contra CD90 (selección negativa para CPCs), y contra el receptor beta del PDGF (selección negativa para CPCs). Los anticuerpos y las perlas recubiertas se pueden obtener de proveedores comerciales. Las células en PBS se incubaron con las perlas recubiertas durante 1 hora a temperatura ambiente. Las perlas unidas a las células se extrajeron usando un imán. Las CPCs se lavaron eliminando el anticuerpo y se resuspendieron en alfa-MEM que contiene FBS al 10% y se dejaron proliferar.

Ejemplo 4:

[0054] Se generaron plásmidos de expresión Wnt-1 según M. Sen y col., Regulation of fibronectin and metalloproteinase expression by Wnt signaling in rheumatoid arthritis synoviocytes. Arthritis Rheum. Noviembre de 2002; 46(11):2867-77. MSCs humanas, preparadas según la sección de Materiales y procedimientos, se dejaron crecer en cultivo de alfa-MEM que contiene FBS al 10%, en general según E. Sudbeck y col., Structure-based design of specific inhibitors of Janus kinase 3 as apoptosis-inducing antileukemic agents. Clin. Cancer Res. 5, 1569-1582 (1999). Una vez que el cultivo alcanza una confluencia del 90%, los hMSC se incuban con los plásmidos de expresión Wnt-1 durante dos días a 37°C y el 5% de CO₂ utilizando el reactivo Lipofectamine™ 2000 y los protocolos disponibles en Invitrogen. Después de los dos días de incubación, el cultivo se selecciona para células transfectadas usando técnicas de selección convencionales durante un período de 10 días. Las CPCs resultantes se aíslan a partir de MSCs sin transdiferenciar mediante selección secuencial usando perlas magnéticas recubiertas con los anticuerpos adecuados tal como anticuerpo dirigido contra EfnB2 (selección positiva para CPCs), contra CD90 (selección negativa para CPCs), y contra el receptor beta del PDGF (selección negativa para CPCs). Los anticuerpos y las perlas recubiertas se pueden obtener de proveedores comerciales. Las células en PBS se incubaron con las perlas recubiertas durante 1 hora a temperatura ambiente. Las perlas unidas a las células se extrajeron usando un imán. Las CPCs se lavaron eliminando el anticuerpo y se resuspendieron en alfa-MEM que contiene FBS al 10% y se dejaron proliferar.

Ejemplo 5:

[0055] Las células producidas según el Ejemplo 1 se pusieron en medio esencial mínimo Minimum Essential Medium Alpha Eagle Modification (M4526, Sigma Co.) que contiene el 20% de suero fetal bovino (14-501 F, Lote #61-1012, BioWhittaker Co.). Se añadieron 5 µM de forskolina (344273, Calbiochem, La Jolla, CA), 10 ng/ml de factor de crecimiento básico de fibroblastos recombinante humano (100-18B, Peptotech EC, Ltd., Londres, RU) y 10 ng/ml de factor neurotrófico ciliar (557-NT, R&D Systems, Minneapolis, MN). El cultivo se creció durante 3 días, momento en el que eran reconocibles las células que presentaban características neuronales, con el resultado de 29,46 +/- 3,0% de células MAP-2ab positivas. La MAP-2ab se analizó usando la transferencia de Western, con lisados de células preparados a partir de células incubadas, y 50 µg de lisado de proteínas sometidas a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 5% y al 10%. Los antígenos para la MAP-2 (1:500, Chemicon) se detectaron usando fosfatasa alcalina.

Ejemplo 6:

[0056] Se recogieron las células que presentan características neuronales del Ejemplo 5, y se crecieron hasta una confluencia del 90% en cultivo de alfa-MEM con FBS al 10% en general, según E. Sudbeck y col., Structure-based design of specific inhibitors of Janus kinase 3 as apoptosis-inducing antileukemic agents. Clin. Cancer Res. 5, 1569-1582 (1999). A continuación, se añadieron al cultivo celular 5 mM de forskolina (344273, Calbiochem), 10 ng/ml de factor de crecimiento básico de fibroblastos (100-18B, Peptotech CE, Ltd.) y 50 ng/ml de factor neurotrófico ciliar (557-NT, R & D Systems).

[0057] Las células se cultivan durante diez días en presencia de los agentes neurotróficos, y a continuación se analizan las características morfológicas de las células neurales y para la reacción positiva de anticuerpos dirigidos contra la MAP-2 (MAB364, Chemicon), neurofilamentos (814342, Boehringer Mannheim) y nestina (BMS4353, Bioproducts).

PUBLICACIONES

- [0058] Bishop, A.E., Buttery, L.D. & Polak, J.M. Embryonic stem cells (Review). J. Pathol. 197, 424-429 (2002).
- [0059] Weissman, I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution (Review). Cell 100, 157-168 (2000).
- [0060] Pittenger, M.F. y col., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284, 143-147 (1999).
- [0061] Dezawa, M. y col., Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of *in vitro* differentiated bone-marrow stromal cells. Eur. J. Neurosci. 14, 1771-1776 (2001).
- [0062] Jiang, Y. y col., Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 418, 41-49 (2002).
- [0063] Eglitis, M.A., Dawson, D., Park, K.W. & Mouradian, M.M. Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. Neuroreport 10, 1289-1292 (1999).
- [0064] Kopen, G.C., Prockop, D.J. & Phinney, D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 96, 10711-10716 (1999).
- [0065] Terada, N. y col., Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. Nature 416, 542-545 (2002).
- [0066] Wagers, A.J., Sherwood, R.I., Christensen, J.L. & Weissman, I.L. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. Science 297, 2256-2259 (2002).
- [0067] Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J. & Black, I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J. Neurosci. Res. 61, 364-370 (2000).
- [0068] Kohyama, J. y col., Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. Differentiation 68, 235-244 (2001).
- [0069] Sanchez-Ramos, JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. J. Neurosci. Res. 69, 880-893 (2002).

- [0070]** Lundkvist, J. & Lendahl, U. Notch and the birth of glial cells (Review). *Trends Neurosci.* 24, 492-494 (2001).
- [0071]** Morrison, S.J. y col., Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* 101, 499-510 (2000).
- [0072]** Gaiano, N., Nye, J.S. & Fishell, G. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26, 395-404 (2000).
- [0073]** Nye, J.S., Kopan, R. & Axel, R. An activated Notch regulates neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development* 120, 2421-2430 (1994).
- [0074]** Yamamoto, N. y col., Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 45031-45040 (2001).
- [0075]** Shibata, T. y col., Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J. Neurosci.* 17, 9212-9219 (1997).
- [0076]** Yamasaki, M. y col., 3-Phosphoglycerate dehydrogenase, a key enzyme for l-serine biosynthesis, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage and olfactory ensheathing glia in the mouse brain. *J. Neurosci.* 21, 7691-7704 (2001).
- [0077]** Gregg, C.T., Chojnacki, A.K. & Weiss, S. Radial glial cells as neuronal precursors: the next generation? *J. Neurosci. Res.* 69, 708-713 (2002).
- [0078]** Roy, N.S. y col., *In vitro* neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 6, 271-277 (2000).
- [0079]** Ip, N.Y. The neurotrophins and neuropoietic cytokines: two families of growth factors acting on neural and hematopoietic cells (Review). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840, 97-106 (1998).
- [0080]** Grosse, G. y col., Expression of Kv1 potassium channels in mouse hippocampal primary cultures: development and activity-dependent regulation. *J. Neurosci.* 20, 1869-1882 (2000).
- [0081]** Morrison, S.J. Neuronal differentiation: proneural genes inhibit gliogenesis (Review). *Curr. Biol.* 11, R349-351 (2001).
- [0082]** Sun, Y. y col., Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104, 365-376 (2001).
- [0083]** Ishibashi, M. y col., Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *EMBO J.* 13, 1799-1805 (1994).
- [0084]** Furukawa, T. y col., *rax*, *Hes1*, and *notch1* promote the formation of Muller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron* 26, 383-394 (2000).
- [0085]** Kahn, M.A. y col., Ciliary neurotrophic factor activates JAK/Stat signal transduction cascade and induces transcriptional expression of glial fibrillary acidic protein in glial cells. *J. Neurochem.* 68, 1413-1423 (1997).
- [0086]** Seidel, H.M., Lamb, P. & Rosen, J. Pharmaceutical intervention in the JAK/STAT signaling pathway (Review). *Oncogene* 19, 2645-2656 (2000).
- [0087]** Burdon, T., Smith, A. & Savatier, P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* 12, 432-438 (2002).
- [0088]** Nakashima, K. y col., BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98, 5868-5873 (2001).
- [0089]** Stork, P.J. & Schmitt, J.M. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* 12, 258-266 (2002).
- [0090]** Neufeld, B. y col., Serine/Threonine kinases 3pK and MAPK-activated protein kinase 2 interact with the basic helix-loop-helix transcription factor E47 and repress its transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 275, 20239-20242 (2000).

- [0091]** Shimazaki, T., Shingo, T. & Weiss, S. The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells. *J. Neurosci.* 21, 7642-7653 (2001).
- 5 **[0092]** Kurooka, H., Kuroda, K. & Honjo, T. Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse notch1 intracellular region. *Nucleic Acids Res.* 26, 5448-5455 (1998).
- [0093]** Franklin, J.L. y col., Autonomous and non-autonomous regulation of mammalian neurite development by Notch1 and Delta1. *Curr. Biol.* 9, 1448-1457 (1999).
- 10 **[0094]** Akerud, P. y col., Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin on developing and adult substantia nigra dopaminergic neurons. *J. Neurochem.* 73, 70-78 (1999)
- [0095]** Sakurada, K., Ohshima-Sakurada, M., Palmer, T.D. & Gage, F.H. Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development* 126, 4017-4026 (1999).
- 15 **[0096]** Kim, J.H. y col., Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418, 50-56 (2002).
- 20 **[0097]** Song, H.J., Stevens, C.F. & Gage, F.H. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat. Neurosci.* 5, 438-445 (2002).
- [0098]** Weinmaster, G., Roberts, V.J. & Lemke, G. A homolog of *Drosophila* Notch expressed during mammalian development. *Development* 113, 199-205 (1991).
- 25 **[0099]** Peyton, M. y col., BETA3, a novel helix-loop-helix protein, can act as a negative regulator of BETA2 and MyoD-responsive genes. *Mol. Cell Biol.* 16, 626-33 (1996).
- 30 **[0100]** Rozovsky, I. y col., Estradiol (E2) enhances neurite outgrowth by repressing glial fibrillary acidic protein expression and reorganizing laminin. *Endocrinology* 143, 636-646 (2002).
- [0101]** Sudbeck, E.A. y col., Structure-based design of specific inhibitors of Janus kinase 3 as apoptosis-inducing antileukemic agents. *Clin. Cancer Res.* 5, 1569-1582 (1999).
- 35 **[0102]** Seta, Y., Toyono, T., Takeda, S. & Toyoshima, K. Expression of Mash1 in basal cells of rat circumvallate taste buds is dependent upon gustatory innervation. *FEBS Lett.* 444, 43-46 (1999).
- [0103]** Schwaiger, F.W. y col., Peripheral but not central axotomy induces changes in Janus kinases (JAK) and signal transducers and activators of transcription (STAT). *Eur. J. Neurosci.* 12, 1165-1176 (2000).
- 40 **[0104]** Kawasaki, H. y col., Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28, 31-40 (2000).
- 45 **[0105]** Tanaka, H. y col., Role of serotonergic neurons in L-DOPA-derived extracellular dopamine in the striatum of 6-OHDA-lesioned rats. *Neuroreport* 10, 631-634 (1999).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de células que presentan características de células neuronales progenitoras a partir de material que comprende citoblastos mesenquimales, el procedimiento que comprende:
- 5 la regulación de las vías celulares en los citoblastos mesenquimales que están asociados a la transdiferenciación glial de los citoblastos mesenquimales; donde las vías celulares están suficientemente reguladas para inducir al menos a una parte de los citoblastos mesenquimales para que se transdiferencien en células que presentan características de células neuronales progenitoras;
- 10 caracterizado porque la regulación comprende la inhibición de la transducción de la señal JAK/STAT y no comprende la transfección de citoblastos mesenquimales con el dominio intracelular Notch.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde la regulación comprende la incubación de un
- 15 inhibidor de JAK/STAT con citoblastos mesenquimales.
3. Un procedimiento para la producción de células que presentan características de células progenitoras neuronales que comprende:
- 20 la incubación de citoblastos mesenquimales con un inhibidor de JAK/STAT en una cantidad suficiente para inducir al menos a una parte de los citoblastos mesenquimales para que se transdiferencien en células que presentan características de células neuronales progenitoras;
- caracterizado porque el procedimiento no comprende la transfección de los citoblastos mesenquimales con el
- 25 dominio intracelular Notch.
4. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde los citoblastos mesenquimales se seleccionan del grupo constituido por citoblastos mesenquimales humanos, citoblastos mesenquimales de rata, citoblastos mesenquimales de ratón, citoblastos mesenquimales de primate, citoblastos
- 30 mesenquimales de cerdo, citoblastos mesenquimales de vaca, y citoblastos mesenquimales de oveja.
5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde la incubación comprende la transfección del inhibidor de JAK/STAT en los citoblastos mesenquimales.
- 35 6. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los citoblastos mesenquimales proceden de sangre del cordón umbilical.
7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los citoblastos mesenquimales proceden de médula ósea.
- 40 8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, donde el inhibidor de JAK/STAT se selecciona entre:
- ARNi para el silenciamiento de genes de la vía de JAK/STAT;
- 45 oligonucleótidos de sentido contrario para la regulación por disminución de la vía de JAK/STAT;
- inhibidores de STAT1 y STAT3;
- 50 la molécula pequeña inhibidora de la JAK, 4-(4'-hidroxifenil)amino-6,7-dimetoxiquinazolina.