

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 518**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2003** **E 03703224 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013** **EP 1479767**

54 Título: **Método de diferenciación/inducción de células estromales de médula ósea en células nerviosas por transferencia del gen Notch**

30 Prioridad:

**06.02.2002 JP 2002030003**

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

**26.11.2013**

73 Titular/es:

**SANBIO INC. (100.0%)**  
**231 South Whisman Road, Suite A**  
**Mountain View, CA 94041-1522 , US**

72 Inventor/es:

**DEZAWA, MARI;**  
**SAWADA, HAJIME;**  
**KANNO, HIROSHI y**  
**TAKANO, MASAHIKO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 431 518 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

Método de diferenciación/inducción de células estromales de médula ósea en células nerviosas por transferencia del gen Notch

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de inducir diferenciación en células estromales de médula ósea para células precursoras neurales o células neurales, y especialmente neuronas dopaminérgicas, mediante la introducción de un gen Notch, y se refiere además a células precursoras neurales obtenidas mediante el método y al uso terapéutico de las células

**Antecedente de la técnica**

15 La reconstrucción de la función neural en dolencias neurodegenerativas avanzadas tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ELA (esclerosis lateral amiotrófica) y similares requiere la sustitución de las células neurales perdidas por muerte celular. Aunque se ha intentado el trasplante de células neurales en experimentos animales usando embriocitoblastos o neurocitoblastos adultos, células ES y células neurales embrionarias, dichos usos se enfrentan a impedimentos importantes con respecto a su aplicación en seres

20 humanos. Los problemas éticos que rodean el uso de embriocitoblastos o células neurales, y la cuestión de garantizar un suministro estable es también un problema. La demostrada capacidad de las células ES de diferenciarse está atrayendo actualmente mucha atención, pero, además de los numerosos problemas éticos, el coste y la mano de obra necesarios para inducir la diferenciación en tipos de células específicos y el riesgo de formar tumores teratoides tras el trasplante son factores que impiden la aplicación estable de esta tecnología. Para

25 usar neurocitoblastos adultos, deben extraerse mediante craneotomía debido a que se encuentran en una sección nuclear muy limitada del sistema nervioso central, y de esta manera, los pacientes que experimentan un tratamiento regenerativo están también expuestos a un tremendo riesgo y carga.

30 Aunque han pasado aproximadamente 10 años desde el aislamiento *in vitro* de citoblastos del sistema nervioso central, aún no ha sido posible mediante los protocolos actualmente aceptados diferenciar los neurocitoblastos y obtener grandes cantidades de neuronas dopaminérgicas o colinérgicas (Lorenz Studer, Nature Biotechnology Dec. Issue, p. 117 (2001).

35 Un grupo de investigación liderado por los profesores Samuel Weiss de la Calgary University (Canadá) y Tetsuro Shingo ha tenido éxito en inducir eficazmente la diferenciación de las células neurales productoras de dopamina administrando una mezcla de varios factores inductores de la tirosina hidroxilasa (cóctel TH) en cerebros de ratones. Se ha publicado también la diferenciación de células estromales de médula ósea (BMSC) en células precursoras neurales que comprende la adición de agentes potenciadores del AMPc del tipo AMP dibutiril cíclico (AMPdbc) o isobutilmetilxantina (IBMX) al medio (Deng y col., 2001, Biochemical And Biophysical Research Communications

40 282, 148-152).

Las neuronas motoras son acetilcolinérgicas, y se ha considerado su aplicación a enfermedades intratables tales como ELA (esclerosis lateral amiotrófica). En la ELA, la muerte de las neuronas motoras de la médula espinal por motivos que son aún desconocidos conduce a la pérdida de los nervios que controlan los músculos, impidiendo de esta forma el movimiento de los músculos a lo largo del cuerpo incluyendo los músculos respiratorios, y conduciendo a la muerte del paciente en los 2-3 años después del inicio. Actualmente, no existe tratamiento eficaz para esta dolencia, pero se han establecido modelos de ELA en ratas.

45

Las enfermedades musculares más degenerativas tales como la distrofia muscular son progresivas, y por tanto el trasplante de células musculares esqueléticas puede constituir un tratamiento eficaz. En individuos sanos, las células satélite presentes en el tejido muscular suplementan el músculo esquelético que ha perdido su capacidad regenerativa, pero en enfermedades musculares progresivas, el número de dichas células se reduce y la capacidad regenerativa es por lo tanto menor. De esta manera, aunque se puede usar el trasplante de células del músculo esquelético o de sus células precursoras como tratamiento, no existen aún medios curativos eficaces.

50

En el curso del desarrollo del sistema nervioso central, las neuronas y las células gliales son inducidas a diferenciarse a partir de células precursoras neurales o neurocitoblastos relativamente homogéneos. Un mecanismo está activo si algunas de las células incluidas en la población celular precursora se diferencian en determinados subtipos celulares en respuesta a señales de diferenciación, mientras que el resto de células permanecen indiferenciadas. De forma específica, las células anteriormente diferenciadas envían determinadas señales a las células que las rodean para evitar la diferenciación adicional en células de su propio tipo. Este mecanismo se conoce como inhibición lateral. En *Drosophila*, las células ya diferenciadas en neuronas expresan el ligando "Delta" mientras que las células que las rodean expresan el receptor delta "Notch", y la unión del ligando con el receptor asegura que las células que los rodean no se diferencian en células neurales (señalización Notch). El sistema Delta-Notch parece funcionar también en células de la médula espinal (véase, por ejemplo, Chitnis, A., Henrique, D., Lewis, J., Ish-Horowicz, D., Kintner, C.: Nature, 375, 761-766 (1995)).

55

60

65

Se piensa que la interacción celular mediante la proteína de membrana Notch juega un papel principal en el proceso de desarrollo por medio de la cual un grupo celular homogéneo produce muchos tipos diversos, y, de forma específica, que tras la estimulación del ligando por células adyacentes, Notch induce la expresión de HES1 o HES5 que inhiben los factores de neurodiferenciación bHLH (hélice básica-bucle-hélice) tales como Mash1, Math1 y neurogenina, para suprimir la diferenciación en el mismo tipo celular que la célula adyacente (véase, por ejemplo, Kageyama y col., Saibo Kogaku [Cell Engineering] Vol.18, No.9, 1301-1306 (1999)).

La ruta intracelular de Notch se entiende actualmente como sigue. Cuando Notch se activa por primera vez mediante ligandos situados en la superficie de las células adyacentes (Delta, Serradas, Dentadas), su dominio intracelular se escinde (Artavanis-Tsakonas S. y col.: Science (1999) 284:770-776 y Kageyama y col., Saibo Kogaku [Cell Engineering] Vol. 18, Nº.9, 1301-1306 (1999)). Tras la escisión del dominio intracelular de Notch, este migra desde la membrana celular al núcleo con la ayuda de una señal de localización nuclear (SLN) y en el núcleo forma un complejo con la proteína de unión a ADN RBP-Jκ (Honjo T.: Genes Cells (1996) 1:1-9 y Kageyama y col., Saibo Kogaku [Cell Engineering] Vol.18, Nº 9, 1301-1306 (1999)). La propia RBP-Jκ es un represor de la transcripción por unión a ADN y, en ausencia de Notch activado, se une al promotor del gen HES1 que es un factor de inhibición de la diferenciación, bloqueando de este modo su expresión; sin embargo, una vez que se forma el complejo entre RBP-Jκ y el dominio intracelular de Notch, el complejo actúa en vez de activar la transcripción del gen HES-1 (véase Jarriault S. y col.: Nature (1995) 377: 355-358, Kageyama R. y col.: Curr. Opin. Genet. Dev. (1997) 7: 659-665 y Kageyama y col., Saibo Kogaku [Cell Engineering] Vol. 18, Nº 9, 1301-1306 (1999)). Esto da como resultado la expresión de HES1 y la supresión inducida por HES1 de la diferenciación. En otras palabras, se cree que Notch suprime la diferenciación mediante HES1 (véase Kageyama y col., Saibo Kogaku [Cell Engineering] Vol. 18, Nº 9, 1301-1306 (1999)).

También en mamíferos, ha llegado a ser evidente que la regulación mediada por Notch de la expresión génica es importante en el mantenimiento de las células precursoras neurales o los neurocitoblastos y en el muy diverso proceso de la diferenciación neural, y que la ruta de Notch es también esencial para la diferenciación de células diferentes de las del sistema nervioso (véase Tomita K. y col.: Genes Dev. (1999) 13: 1203-1210 y Kageyama y col., Saibo Kogaku [Cell Engineering] Vol. 18, No.9, 1301-1306 (1999)). Además, se han anticipado también la existencia de una ruta de Notch independiente de HES, la regulación negativa de la señalización de Notch sobre el nivel de transcripción y la interacción negativa en el nivel de la proteína (véase Goh, M., Saibo Kogaku [Cell Engineering] Vol.18, Nº 9, 1291-1300 (1999)). Adicionalmente, todas las publicaciones anteriormente mencionadas tanto enseñan como sugieren que la señalización de Notch actúa en una dirección que suprime la diferenciación.

Los trastornos nerviosos centrales en los cuales la reconstrucción no es una opción actualmente incluyen una variedad de diferentes dolencias con una elevada tasa de incidencia en la población debidas a lesión en la médula espinal inducida por lesión o al deterioro cerebrovascular o al glaucoma que conduce a la ceguera, a dolencias neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson. La investigación de métodos neurodegenerativos para tratar dichas enfermedades es por tanto una necesidad social urgente y los resultados de esta investigación de los presentes inventores se consideran una innovación para la aplicación a seres humanos. Las células estromales de la médula ósea se extraen fácilmente mediante aspiración de la médula ósea de un paciente ambulatorio, y debido a su naturaleza muy proliferativa pueden cultivarse en grandes cantidades en un lapso de tiempo relativamente corto. Además, puede esperarse una tremenda ventaja debido a que se puede llevar a cabo el trasplante autólogo si los nervios se forman a partir de citoblastos de la propia médula ósea. La ausencia de rechazo inmunológico podría dispensar de la necesidad de administrar inmunosupresores, haciendo de esta manera posible un tratamiento más seguro. Además, debido a que los citoblastos de médula ósea se pueden obtener de un banco de médula ósea, este método es realmente posible desde un punto de vista del suministro. Si se pueden usar dichas células para derivar células neurales, para las cuales no existían anteriormente medios eficaces, entonces se puede esperar un efecto mayor en el campo de la medicina regenerativa.

ELA (esclerosis lateral amiotrófica) es una dolencia en la cual la muerte celular de las neuronas motoras de la médula espinal por motivos aún desconocidos conduce a la pérdida de los nervios que controlan los músculos, impidiendo de esta forma el movimiento de los músculos a lo largo del cuerpo incluyendo los músculos respiratorios y conduciendo a la muerte del paciente en los 2-3 años tras el inicio, dado que actualmente no existe tratamiento eficaz. La formación de neuronas acetilcolinérgicas procedentes de los citoblastos de la propia médula ósea podría permitir el trasplante autólogo, y este ofrecería un mayor beneficio que puede incluso servir como cura para la ELA:

No existen actualmente también métodos de tratamiento eficaces para las enfermedades musculares tales como la distrofia muscular, una enfermedad degenerativa del músculo esquelético. Podría darse como resultado también un mayor beneficio para dichas dolencias debido a que la formación de células del músculo esquelético procedentes de citoblastos de la propia médula ósea podría permitir el trasplante autólogo. Utilizando dichas células para derivar células del músculo esquelético, para las cuales no han existido anteriormente medios eficaces, podría también esperarse proporcionar un mayor efecto en el campo de la medicina regenerativa.

Las posibles aplicaciones de esta tecnología no pertenecen solamente al campo del tratamiento clínico sino también al área del diseño de órganos artificiales y similares, que se espera sea un campo importante de desarrollo en el futuro. Si las células neurales o las células musculares pudieran producirse fácilmente en un nivel de cultivo celular,

entonces pueden imaginarse las aplicaciones para la creación de órganos artificiales híbridos y similares.

### Breve descripción de la invención

5 La presente invención proporciona un método para inducir a las células estromales de médula ósea (BMSC) a diferenciarse en células precursoras neurales *in vitro* que comprende las etapas de:

- (1) aislar BMSC de médula ósea, y cultivar dichas células en un medio de cultivo esencial normalizado suplementado con un suero, e
- 10 (2) introducir, en dichas células, un ácido nucleico que comprende secuencias que codifican un dominio intracelular de Notch, y cultivar adicionalmente dichas células para producir células precursoras neurales.

La invención proporciona además una población de células precursoras neurales producida mediante el método anterior, donde los miembros de la población de células precursoras neurales comprenden un dominio intracelular de Notch, donde además las células no expresan el dominio extracelular de Notch.

### Breve descripción de los dibujos

20 La Fig. 1 es una micrografía (microscopio de contraste de fases) en lugar de un dibujo, que muestra células neurales inducidas a diferenciarse de acuerdo con la invención.

La Fig. 2 es una combinación de fotografías inmunofluorescentes en lugar de un dibujo, que muestra reacciones positivas de células neurales inducidas a diferenciarse de acuerdo con la invención, frente a anticuerpos dirigidos contra MAP-2, anticuerpos dirigidos contra neurofilamentos y anticuerpos dirigidos contra nestina.

25 La Fig. 3 es una combinación de fotografías inmunofluorescentes en lugar de un dibujo, que muestra reacciones de células neurales inducidas a diferenciarse de acuerdo con la invención, frente a anticuerpos para el neurotransmisor de la sintetasa tirosina hidroxilasa (TH) y los neurotransmisores o péptidos del transportador de la acetilcolina vesicular relacionados con neurotransmisores (VaChT), neuropéptido Y (NPY), sustancia P (SP), glutamina (Glu), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y péptido intestinal vasoactivo (VIP).

30 La Fig. 4 es un par de fotografías inmunofluorescentes en lugar de un dibujo, que muestran cambios en la positividad de la tirosina hidroxilasa (tasa de diferenciación de neuronas dopaminérgicas) de células neurales inducidas a diferenciarse de acuerdo con la invención, antes y después del tratamiento con GDNF.

35 La Fig. 5 es una gráfica que muestra cambios en la positividad de la tirosina hidroxilasa (tasa de diferenciación de neuronas dopaminérgicas) de células neurales inducidas a diferenciarse de acuerdo con la invención, antes y después del tratamiento con GDNF.

La Fig. 6 es un par de fotografías inmunofluorescentes en lugar de un dibujo, que muestran cambios en la positividad de la acetilcolina vesicular (tase de diferenciación de las neuronas acetilcolinérgicas) de células neurales inducidas a diferenciarse de acuerdo con la invención, antes y después del tratamiento con neurotrofinas (NT; 2.5 S NGF).

40 La Fig. 7 es una gráfica que muestra cambios en la positividad del transportador de la acetilcolina vesicular (tasa de diferenciación de las neuronas acetilcolinérgicas) de células neurales inducidas a diferenciarse de acuerdo con la invención, antes y después del tratamiento con neurotrofinas (NT; 2.5 S NGF).

45 La Fig. 8 es un par de gráficas que muestran el efecto terapéutico de trasplantar neuronas dopaminérgicas obtenidas mediante el método de inducir la diferenciación de la invención en el cuerpo estriado de modelos de enfermedad de Parkinson en ratas.

La Fig. 9 es una combinación de fotografías inmunofluorescentes en lugar de un dibujo, que muestra que las células trasplantadas en el cuerpo estriado no eran células gliales sino células neurales y neuronas dopaminérgicas.

50 La Fig. 10 es una combinación de fotografías inmunofluorescentes ampliadas en lugar de un dibujo que muestran que las células trasplantadas en el cuerpo estriado eran células neurales y neuronas dopaminérgicas. Las Figs. 11a a 11f muestran las características de células estromales aisladas de médula ósea (MSC). La Fig. 11a muestra los resultados del análisis FACS de ratas (MSC). Se expresaron las células CD29 (integrina beta 1), CD90 (Thy-1) y CD54 (ICAM), pero no CD34 (marcador de hemocitoblasto) o CD11b/c (marcador relacionado con macrófagos). Las Figs. 11b y 11c son micrografías de contraste de fases de MSC no tratadas de ratas (b) y de MSC no tratadas de seres humanos (c). Las Figs. 11d a 11f son fotografías inmunohistoquímicas de CD29 (d), CD90 (e) y CD34 (f) en MSC de seres humanos. Las MSC fueron positivas para CD29 y CD90, pero negativas para CD34, la barra representa 50  $\mu$  m.

60 Las Figs. 12a a 12h muestran fenotipos después de la transfección de NICD (Dominio intracelular de Notch). La Fig. 12a muestra los resultados de la RT-PCR para el dominio extracelular de Notch (ECD) y el dominio intracelular (ICD) en MSC de rata, antes de la transfección de NICD (banda 1) y tras la transfección de NICD (banda 2). Debido a que se detectó ECD en la MSC no tratada, se expresó de forma natural una pequeña cantidad de Notch endógeno. Tras la transfección de NICD, sin embargo, ECD se reguló por defecto y NICD se reguló ligeramente por exceso. Las Figs. 12b a 12g son fotografías inmunohistoquímicas de GLAST (b, c), 3-PGDH (d, e) y nestina (f, g) en MSC no tratadas de rata (b, d, f) y MSC de rata transfectadas con NICD (c, e, g). La barra representa 50  $\mu$  m en b, c, d y g y 80  $\mu$  m en e y f. La Fig. 12h es una gráfica que muestra la

actividad del promotor de PGHD para MSC no tratadas de rata (MSC) y MSC de rata transfectadas con NICD (NICD). La forma de longitud completa de 3-PGDH y la forma truncada (M1965) mostraron aumentos de 9 a 10 veces en la actividad del promotor después de la transfección con NICD ( $p < 0,01$ ).

La Fig. 13 muestra las tasas de conversión de células MAP-2ab $\leftrightarrow$  tras el tratamiento con diversos factores tróficos. No se detectaron células MAP-2ab $\leftrightarrow$  cuando se introdujeron los factores tróficos en MSC de rata tanto no tratadas como transfectadas con un vector control. La introducción de tres de los factores tróficos (FSK + 6FGF + CNTF) mostró una tasa más elevada de producción de células neurales (96,5%), mientras que la eliminación de cualquiera de estos tres factores dio como resultado una tasa de conversión más baja.

Las Figs. 14a a 14q muestran los resultados del análisis de células neurales inducidas. Las Figs. 14a a 14c son micrografías de contraste de fases de células neurales inducidas a partir de MSC de rata (a, b) y MSC de seres humanos (c). La barra representa 200  $\mu$ m en la Fig. 14a y 50  $\mu$ m en las Figs. 14b y 14c. Las Figs. 14d a 14g y 14i a 14k son fotografías inmunohistoquímicas de marcadores de neuronas y marcadores de glía en MSC de rata (f, g, i, j, k) y MSC de seres humanos (d, e) (5 días) tras la introducción de factores tróficos. Los marcadores de MAP-2ab (d) y del neurofilamento-M (e) se detectaron en MSC humanas mientras que la tubulina beta 3 (f) y TuJ-1 (g) se expresaron en MSC de rata. Ninguna de las células de rata o de ser humano reaccionaron con los marcadores de glía GFAP (i), GalC (j) y O4 (k). La barra representa 100  $\mu$ m en d, e y f, 60  $\mu$ m en g y 100  $\mu$ m en i a k. La Fig. 14h muestra el marcado de Brd-U de las células neurales. Las células positivas para MAP-2ab (Código verde marcado, con Alexa Fluor 488) no incorporan Brd-U (código rojo, marcado con Alexa Fluor 546). La Fig. 14l muestra los resultados del análisis de la transferencia Western para la muestra de MAP-2ab de rata (1) y la muestra de GFAP de rata (2). La Banda 1 es la transferencia Western y la banda 2 la tinción S de Ponceau. Las MSC no tratadas (M) no expresaron ni MAP-2ab ni GFAP. En el 5º día (N) tras la introducción de los factores tróficos, las MSC fueron positivas para MAP-2ab pero fueron todavía negativas para GFAO. Se usó cerebro (B) como control positivo para MAP-2ab y GFAP. Las Figs. 14m a 14q muestran los resultados de un test de fijación de membranas con células neurales inducidas a partir de MSC de rata (m) y células neurales inducidas a partir de MSC humanas (n, p). La inducción dio como resultado un drástico aumento en la corriente de K $\leftrightarrow$  rectificadas hasta aproximadamente 1600 pA y 4000 pA en las MSC de rata (m) y las MSC humanas (n), respectivamente, en comparación con las MSC no tratadas (o, p). La Fig. 14q muestra una micrografía de contraste de fases de las MSC humanas registradas en la Fig. 14n.

La Fig. 15 es un par de gráficas que muestran las actividades relativas del promotor de Neuro D y GFAP para MSC no tratadas de rata (MSC) MSC de rata transfectadas con NICD (NICD) y MSC de rata inducidas con células neurales (inducidas).

Las Figs. 16a a 16m muestran los resultados del trasplante en modelos de enfermedad de Parkinson en ratas. La Fig. 16a es una gráfica que muestra los porcentajes de los siguientes neurotransmisores en MSC de ratas tras la inducción con factores tróficos: ácido gamma -aminobutírico (GABA); 0,3  $\pm$  0,1, péptido intestinal vasoactivo (VIP); 0,5  $\pm$  0,1, serotonina (Ser); 2,0  $\pm$  0,4, glutamato (Glu); 2,3  $\pm$  0,7, sustancia P (SP); 2,4  $\pm$  0,9, TH; 3,9  $\pm$  0,6, transportador de la acetilcolina vesicular (VACht); 5,2  $\pm$  2,4, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP); 5,3  $\pm$  0,8, neuropéptido Y (NPY) 6,1  $\pm$  1,6. Con la posterior administración de GDNF, el porcentaje de células positivas para TH aumentó drásticamente hasta 41,0  $\pm$  11,1 (GTH). Las Figs. 16b y 16c muestran la expresión de TH en MSC humanas tras la inducción del factor trófico y a continuación, posterior tratamiento con GDNF. Las MSC humanas presentaron la misma respuesta que las MSC de rata, con células positivas para TH-que aumentaron claramente tras el tratamiento con GDNF. La barra representa 100  $\mu$ m en b y 30  $\mu$ m en c. La Fig. 16d muestra los resultados o la RT-PCR de Nurr-1 en MSC de rata. Nurr-1 Se observó un aumento de la regulación en exceso-tras la administración de GDNF (Ng) en comparación con las células tras la introducción solo del factor trófico (N). La Fig. 16e muestra una transferencia Western para TH en MSC de rata. La expresión de TH fue débil en MSC tras la inducción del factor trófico (N), pero aumentó tras la inducción de GDNF (Ng). La médula adrenal (A) sirvió como un control positivo. La banda 1 es la transferencia Western y la banda 2 es una tinción S de Ponceau. La Fig. 16f es una gráfica que muestra los efectos del comportamiento tras el injerto de MSC de rata en el cuerpo estriado. La gráfica muestra la rotación inducida por apomorfina en un grupo MSC ( $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$ ), un grupo N-MSC ( $\bullet$ - $\bullet$ ) y un grupo G-MSC ( $\blacksquare$ - $\blacksquare$ ) (\*: 0,01 < p < 0,05; \*\*: p<0,01).

Las Figs. 16g a 16k son fotografías inmunoteñidas del neurofilamento-M (g), TH (h), DAT (i), GFAP (j) y O4 (i) en el cuerpo estriado en la 10ª semana después del trasplante en el grupo G-MSC. Las señales de estos marcadores fueron todas marcadas con Alexa 546 (codificación de color rojo). Las MSC de ratas injertadas se marcaron en primer lugar con GFP. Se observe una duplicación de GFP-neurofilamento, GFP-TH y GFP-DAT en g, h e i, pero no con la tinción de GFAP o la tinción de O4. La barra representa 50  $\mu$ m. La Fig. 16l es un conjunto de ilustraciones de secciones que muestran la integración de MSC de rata marcadas con GFP (grupo G-MSC) en el cuerpo estriado. Están indicadas las imágenes confocales tras la inmunohistoquímica para TH (rojo) procedentes de regiones marcadas por puntos en el diagrama. La barra representa 50  $\mu$ m. La Fig. 16m es una gráfica que muestra la rotación inducida por apomorfina en ratas tras el trasplante de MSC neurales humanas tratadas con GDNF. Se muestran los resultados de 5 ratas (rotación promedio: 0.44  $\pm$  0.2) hasta más de cuatro semanas después del injerto (representándose una rata por cada color).

### Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han investigado la estimulación de las células estromales de médula ósea mediante la introducción de genes que juegan un papel central en las etapas iniciales de la morfogénesis de las células

estromales de médula ósea, y han examinado los efectos de dicha estimulación sobre la inducción de la diferenciación de las células estromales de médula ósea. De forma específica, se esperaba que fuera potencialmente posible “reinicializar” las células estromales de médula ósea mediante la introducción de genes Notch y genes de señalización de Notch, que juegan importantes papeles en la diferenciación del desarrollo del sistema nervioso y llevan a cabo funciones para determinar el destino de las células cuando las células precursoras se diversifican en células neurales o células gliales.

Es importante señalar que a pesar de la implicación de los genes Notch y de los genes relacionados con la señalización de Notch en el mecanismo de supresión de la inducción de la diferenciación celular, ha sido un hallazgo completamente inesperado que la combinación de la introducción de genes Notch y genes relacionados con la señalización de Notch con otra estimulación para inducir la diferenciación, puede inducir también la diferenciación de las muchas células en las cuales se han introducido los genes Notch y los genes relacionados con la señalización de Notch (no en las células que se ponen en contacto con las células en las cuales se han introducido los genes Notch y los genes relacionados con la señalización de Notch). No se puede afirmar que la introducción de los genes Notch y de los genes relacionados con la señalización de Notch en el método de inducción de la diferenciación de la presente invención de como resultado la reinicialización de la diferenciación del desarrollo de las células estromales de médula ósea. Sin embargo, mediante la combinación de la introducción de este gen con otras etapas de inducción de la diferenciación de acuerdo con la invención, ha sido posible proporcionar como resultado un método para inducir eficazmente la diferenciación de las células estromales de médula ósea en células neurales.

Como resultado de la experimentación repetida en la combinación de etapas que comprenden la introducción de los genes Notch y de genes relacionados con la señalización de Notch, los presente inventores han sido los primeros en tener éxito en inducir de manera eficaz la diferenciación de las células estromales de médula ósea en células neurales in vitro. Además, se ha confirmado que tras el injerto de las células neurales obtenidas mediante el método de inducción de la diferenciación en modelos de enfermedad de Parkinson en ratas o el método retinal asociado a daño en el nervio óptico o en modelos de degeneración del nervio óptico, los nervios injertados prendieron y funcionaron realmente.

De forma sorprendente, mediante la introducción de genes Notch y de genes relacionados con la señalización de Notch en células estromales de médula ósea, mediante la administración de diversos factores y citoquinas consideradas como implicadas en la promoción de la diferenciación neural, y aumentando el AMPC intracelular que se considera que es un estimulador general del inicio de la diferenciación, ha sido posible inducir de forma satisfactoria la diferenciación de las células estromales de médula ósea en células neurales en condiciones de cultivo in vitro. Los inventores han confirmado no solo la expresión de MAP-2 y del neurofilamento que son específicos de células neurales, sino también la expresión del neurotransmisor sintetasa tirosina hidroxilasa y la producción de neurotransmisores tales como acetilcolina, neuropéptido Y y sustancia P

Por otra parte, se ha sugerido que la desmetilación y la activación de uno o de unos pocos genes por la 5-azacitidina (5-AZC) conduce a la conversión en mioblastos (véase Taylor SM, Jones PA: Cell 17: 771-779, 1979 y Nabeshima Y., Seitai no Kagaku 47(3):184-189, 1996). Los inventores han combinado la introducción anteriormente mencionada de genes Notch y genes relacionados con la señalización de Notch en células neurales con la desmetilación anteriormente mencionada con 5-azacitidina (5-AZC). De forma específica, al eliminar la expresión suprimida por la metilación de los genes que utilizan el agente desmetilante anteriormente mencionado para reinicializar células estromales de médula ósea, introducir posteriormente los genes Notch y los genes relacionados con la señalización de Notch y cultivar simultáneamente las células donde se han introducido los genes junto con las células estromales de médula ósea sin los genes, y finalmente, tratar las células con un agente de aumento para el AMPC intracelular que se considera que es un estimulador general para iniciar la diferenciación, los inventores han tenido éxito al inducir la diferenciación de los genes Notch y de los genes relacionados con la señalización de Notch introducidos en células en células esqueléticas cultivando in vitro. Se ha encontrado la formación y estriación de miotubos polinucleados característicos en las células resultantes, y se ha confirmado también la expresión de las proteínas específicas del músculo miogenina y Myf5 en el nivel del ARNm.

De acuerdo con la invención, se proporciona un método de inducción de células estromales de médula ósea (BMSC) para que se diferencien en células precursoras neurales in vitro que comprende las etapas de:

- (1) aislar BMSC procedentes de médula ósea, y cultivar dichas células en un medio de cultivo esencial normalizado suplementado con un suero; e
- (2) introducir, en dichas células secuencias que comprenden un ácido nucleico que codifican un dominio intracelular de Notch, y cultivar adicionalmente dichas células para producir células precursoras neurales.

Las células estromales de médula ósea aisladas pueden derivarse de un ser humano. De acuerdo con otro modo adicional de la invención, se proporcionan células precursoras neurales mediante el método anteriormente mencionado, donde miembros de la población de células precursoras neurales comprenden un dominio intracelular de Notch, donde además las células no expresan el dominio extracelular de Notch. Miembros de la población de células precursoras neurales expresan marcadores para las células precursoras neurales, GLAST, 3PGDH, y nestina.

De acuerdo con la presente invención, en un aspecto adicional se proporciona un método para inducir las BMSC a diferenciarse en células neurales in vitro que comprende las etapas de:

- 5 (1) aislar BMSC de médula ósea, y cultivar dichas células en un medio de cultivo esencial normalizado suplementado con un suero.  
 (2) introducir, en dichas células, secuencias que comprenden un ácido nucleico que codifican un dominio intracelular de Notch, y cultivar además dichas células; y  
 10 (3) añadir un agente que aumenta el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) o un análogo de AMPc y/o un factor estimulador de la diferenciación celular a dicho medio de cultivo, y cultivar adicionalmente dichas células para producir dichas células neurales, donde las células diferenciadas resultantes son progenie de las BSMC donde se han introducido las secuencias que comprenden dicho ácido nucleico y que codifican un dominio intracelular de Notch.

15 La introducción del gen Notch y del gen relacionado con la señalización de Notch puede llevarse a cabo mediante lipofección con un vector de expresión de mamífero.

El método puede comprender también, entre las etapas (2) y (3), una etapa de selección de células donde los genes se han introducido, durante un periodo predeterminado de tiempo.

20 El agente que aumenta el AMP cíclico o el análogo de AMP cíclico puede ser forskolina, y su concentración puede ser de 0,001 nM a 100 μM

25 El factor estimulador de la diferenciación celular puede seleccionarse entre el grupo que consiste en un factor básico de crecimiento de los fibroblastos (BFGF), factor neurotrófico ciliar (CNTF) y sus mezclas.

La concentración del factor estimulador de la diferenciación celular puede estar entre 0,001 ng/ml y 100 μg/ml

Las células estromales de médula ósea aisladas son preferentemente células humanas.

30 De acuerdo con otro modo adicional de la invención, se proporciona un método para inducir que las células estromales de médula ósea se diferencien en neuronas dopaminérgicas in vitro que comprende las etapas de:

- 35 (1) aislar células estromales de médula ósea, y cultivar las células en un medio de cultivo esencial normalizado suplementado con un suero;  
 (2) introducir un gen Notch y/o un gen relacionado con la señalización de Notch en las células, y cultivar además las células;  
 (3) añadir un agente que aumenta el AMP cíclico o un análogo de AMP cíclico, y/o un factor estimulador de la diferenciación celular al medio de cultivo, y cultivar adicionalmente las células para producir las células neurales;  
 40 (4) cultivar las células neurales obtenidas en la Etapa (3) en un medio de cultivo esencial normalizado suplementado con un suero; e  
 (5) añadir factor neurotrófico derivado de glía (GDNF), y agente que aumenta el AMP cíclico o un análogo de AMP cíclico, y/o un factor estimulador de la diferenciación celular diferente del factor neurotrófico derivado de glía al medio de cultivo, y cultivar adicionalmente las células para obtener neuronas dopaminérgicas,

45 donde las neuronas dopaminérgicas resultantes son progenie de las células estromales de médula ósea donde se han introducido el gen Notch y/o el gen relacionado con la señalización de Notch.

50 El medio de cultivo esencial normalizado en la Etapa (4) puede ser un medio alfa esencial mínimo modificado por Eagle.

El suero en la Etapa (4) puede ser suero de feto de bovino.

55 El agente que aumenta el AMP cíclico o el análogo de AMP cíclico en la Etapa (5) puede ser forskolina. La concentración del agente que aumenta el AMP cíclico o el análogo de AMP cíclico en la Etapa (5) puede estar entre 0,001 nM y 100 μM.

60 El factor estimulador de la diferenciación celular diferente del factor neurotrófico derivado de glía en la Etapa (5) puede seleccionarse del grupo que consiste en factor básico de crecimiento de los fibroblastos (bFGF) factor de crecimiento derivado de plaquetas-AA (PDGF-AA) y sus mezclas.

La concentración del factor neurotrófico derivado de glía en la (Etapa 5) puede estar entre 0,001 ng/ml y 100 μg/ml, y está preferentemente entre 1 ng/ml y 100 ng/ml

65 La concentración del factor estimulador de la diferenciación celular diferente del factor neurotrófico derivado de glía puede estar entre 0,001 ng/ml y 100 μg/ml.

Las células estromales aisladas de médula ósea son preferentemente células humanas.

De acuerdo con otro modo adicional de la invención, se proporciona un método para inducir a las células estromales de médula ósea a diferenciarse en neuronas acetilcolinérgicas in vitro, que comprende las etapas de:

- 5 (1) aislar células estromales de médula ósea, y cultivar las células en un medio de cultivo esencial normalizado suplementado con un suero;
- (2) introducir un gen Notch y/o un gen relacionado con la señalización de Notch en las células, y cultivar adicionalmente las células;
- 10 (3) añadir un agente que aumenta el AMP cíclico o un análogo de AMP cíclico, y/o un factor estimulador de la diferenciación celular al medio de cultivo, y cultivar adicionalmente las células para producir las células neurales;
- (4) cultivar las células neurales obtenidas en la Etapa (3) en un medio de cultivo esencial normalizado suplementado con un suero; e
- 15 (5) añadir factor de crecimiento del nervio (NGF), y un agente que aumenta el AMP cíclico o un análogo de AMP cíclico, y/o un factor estimulador de la diferenciación celular diferente del factor de crecimiento del nervio al medio de cultivo, y cultivar adicionalmente las células para obtener neuronas acetilcolinérgicas.

20 donde las neuronas acetilcolinérgicas resultantes son progenie de las células estromales de médula ósea donde se han introducido el gen Notch y/o genes relacionados con la señalización de Notch.

El medio de cultivo esencial normalizado en la Etapa (4) puede ser el medio alfa esencial mínimo modificado por Eagle. El suero en la Etapa (4) puede ser suero de feto de bovino.

25 El agente que aumenta el AMP cíclico o el análogo de AMP cíclico en la etapa (5) puede ser forskolina. La concentración del agente que aumenta el AMP cíclico o el análogo de AMP cíclico en la Etapa (5) puede estar entre 0,001 nM y 100  $\mu$ M.

30 El factor estimulador de la diferenciación celular diferente del factor de crecimiento del nervio en la Etapa (5) puede seleccionarse entre el grupo que consiste en factor básico de crecimiento de los fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas-AA (PDGF-AA) y sus mezclas.

35 La concentración del factor de crecimiento del nervio en la (Etapa 5) puede estar entre 0,001 ng/ml y 100  $\mu$ g/ml, y está preferentemente entre 1 ng/ml y 100 ng/ml.

La concentración del factor estimulador de la diferenciación celular diferente del factor de crecimiento del nervio en la Etapa (5) puede estar entre 0,001 ng/ml y 100  $\mu$ g/ml.

40 Las células estromales aisladas de médula ósea son preferentemente células humanas.

De acuerdo con otro modo adicional de la invención, se proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de la población de células precursoras neurales anteriormente mencionadas en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un paciente que padece de una enfermedad, trastorno o dolencia del sistema nervioso central.

45 A lo largo de la presente memoria descriptiva, el término "células estromales de médula ósea" se refiere a células en la médula ósea que no son del sistema hemopoyético y son potencialmente capaces de diferenciarse en osteocitos, condriocitos, adipocitos y similares. Las células estromales de médula ósea se identifican por ser positivas para CD29 ( $\beta$ 1-integrina), CD90 (Thy-1) y CD54 (ICAM-1) y ser negativas para CD34 (marcador de hemocitoblastos) y CD11b/c (marcador de macrófagos).

50 El término "eficazmente" tal como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva con respecto a la inducción de diferenciación significa que las células de médula ósea seleccionadas se han convertido finalmente en células neurales a una tasa elevada mediante el método de inducción de la diferenciación de la invención. La eficacia del método de inducción de la diferenciación es del 50% o mayor, preferentemente del 75% o mayor, de forma más preferible del 80% o mayor, incluso de forma más preferible del 85% o mayor, de forma aún más preferible, del 90% o mayor, y lo más preferible, del 95% o mayor.

60 El término "células precursoras neurales" tal como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva se refiere a células estromales de médula ósea inmediatamente después de la introducción de un gen Notch y/o de un gen relacionado con la señalización de Notch, y, de forma específica son las células antes de la introducción de factores tróficos.

65 El término "células neurales" tal como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva se refiere a neuronas, que se caracterizan morfológicamente por un cuerpo celular y dos tipos de procesos (dendritas y axones), y bioquímicamente por la reacción con anticuerpos para el isótopo 3 de la  $\beta$ -tubulina y TuJ1.



Las células neurales se caracterizan por secretar neurotransmisores, sintetizar neurotransmisores o proteínas relacionadas con neurotransmisores, por ejemplo, tirosina hidroxilasa (TH), transportador de la acetilcolina vesicular, neuropéptido Y y sustancia p (SP).

- 5 La tiroxina hidroxilasa es un marcador de neuronas dopaminérgicas, mientras que el transportador de la acetilcolina vesicular es un marcador de las neuronas acetilcolinérgicas que son normalmente neuronas motoras.

10 El término “células gliales” tal como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva se refiere a astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células epiteliales que se encuentran entre las neuronas y sus procesos en los nervios centrales.

Proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es un marcador de astrocitos, y O4 es un marcador de oligodendrocitos.

15 El término “células musculoesqueléticas” tal como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva se refiere a miofibras o fibras musculares, y son los miocitos individuales del músculo esquelético. Morfológicamente se caracterizan por ser células largas gigantes, células delgadas multinucleadas con formación de miofibras y estriadas, mientras que bioquímicamente se caracterizan por expresar los factores reguladores de la transcripción tales como miogenina y Myf5.

20 El método de inducir la diferenciación de células estromales de médula ósea en células neurales de acuerdo con la invención es novedoso en el aspecto de comprender una etapa de introducir un gen Notch y/o un gen relacionado con la señalización de Notch en las células anteriormente mencionadas. Otro novedoso aspecto es que esta etapa puede combinarse con otras etapas de inducción de la diferenciación de la técnica anterior en un orden prescrito. La selección y la óptima combinación de dichas etapas de acuerdo con la invención constituyen un novedoso descubrimiento muy significativo de los presentes inventores. Las células estromales de médula ósea ya eran conocidas como citoblastos mesenquimales o células precursoras capaces de ser inducidas a diferenciarse en osteoblastos, células endoteliales vasculares, células del músculo esquelético, adipocitos y células del músculo liso, pero no se sabía si las células estromales de médula ósea podrían realmente diferenciarse en células neurales, y esta meta no se había conseguido de forma satisfactoria a pesar de los diversos intentos. Aunque no se pretende quedar constreñido por ninguna teoría concreta, los presentes inventores suponen que la introducción de un gen Notch y un gen relacionado con la señalización de Notch en las células anteriormente mencionadas da como resultado una reinicialización de las células en términos de diferenciación del desarrollo, y ayudan en la función de otros tratamientos inductores de la diferenciación.

35 La presente invención se explicará en mayor detalle ahora mediante los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Inducción neural

40 Se extrajeron células estromales a partir de la médula ósea de ratas adultas (ratas Wistar) y se cultivaron. El medio usado fue medio alfa esencial mínimo con la modificación de Eagle (M4526, Sigma Co.) que contenía suero de feto de bovino al 20% (14-501F, Lote n° 61-1012, BioWhittaker Co.).

45 Tras subcultivar para cuatro generaciones, se introdujo el gen del dominio intracelular de Notch cuando las células alcanzaron un 80-90% de confluencia. Un fragmento EcoRI-XbaI de 3,1 kb del dominio intracelular de Notch se insertó en el sitio de multiclonación de EcoRI-XbaI del vector de expresión de mamífero pCI-neo (n° E1841) de Promega para la recombinación. Se usó un sistema LipofectAMINE 2000 (11668-027, GIBCO BRL para la introducción).

50 En el día siguiente a la introducción, se añadió sulfato G418 (83-5027, Gibco BRL) a una concentración de 200 ng/ml y las células introducidas se seleccionaron durante 10 días.

55 Tras la restauración de la población de células hasta una confluencia del 90%, se añadieron 5 µM de forskolina (344273, Calbiochem), 10 ng/ml de factor básico de crecimiento de los fibroblastos (100-18B, Peprotech EC, Ltd.) y 50 ng/ml de factor neurotrófico ciliar (557-NT, R&D Systems)

60 Como resultado de analizar las células después de aproximadamente 10 días, se observó la morfología característica de las células neurales tal como se muestra en la Fig. 1. Las células inducidas presentaron reacción positiva para los anticuerpos dirigidos contra MAP-2 (MAB364, Chemicon), neurofilamento (814342, Boehringer Mannheim) y nestina (BMS4353, Bioproducts), tal como se muestra en la Fig. 2. Debido a que MAP-2 y el neurofilamento son marcadores de las células neurales y nestina es un marcador de las células precursoras neurales, se consideró que las células inducidas poseían de este modo las propiedades de las células neurales.

65 Una investigación llevada a cabo utilizando anticuerpos contra el neurotransmisor sintetasa tiroxina hidrolasa (AB151, Chemicon) y los neurotransmisores o proteínas relacionadas con neurotransmisores, transportador de la

acetilcolina vesicular (AB1578, Chemicon), neuropéptido Y (RIN7172, Peninsula Lab Inc.), sustancia P (RPN1572, Amersham Inc.), etc., tal como se muestra en la Fig. 3, desveló células aproximadamente 2-4% positivas para cada uno, indicando por tanto la presencia de células neurales productoras de neurotransmisores.

- 5 Se indujeron las células neurales mediante este procedimiento, y en esta etapa  $2,9 \pm 0,5\%$  de las células neurales inducidas por diferenciación total presentaron reacción para la tirosina hidroxilasa, un marcador de neuronas dopaminérgicas, tal como se muestra en el lado izquierdo de la gráfica de la Fig. 5. También, tal como se muestra en el lado izquierdo de la gráfica de la Fig. 7,  $1,78 \pm 0,75\%$  del total de las células neurales inducidas para su diferenciación presentaron reacción para el transportador de la acetilcolina vesicular, un marcador de las neuronas acetilcolinérgicas que son normalmente neuronas motoras.

#### Ejemplo 2: Inducción de neuronas dopaminérgicas

15 Las células neurales inducidas para su diferenciación se cultivaron a continuación en medio Alfa Esencial Mínimo con la Modificación de Eagle (M4526, Sigma Co.) que contenía suero de feto de bovino al 10% (14-501F, Lote nº 61-1012, BioWhittaker Co.), con purificación adicional de 50 ng/ml de factor neurotrófico derivado de glía (GDNF) (GDNF recombinante humano nº 450-10, Peprotech EC Ltd.), 5 mM de forskolina (344273, Calbiochem), 10 ng/ml de factor básico de crecimiento de fibroblastos (100-18B, Peprotech EC, Ltd.) y 5 ng/ml factor de crecimiento derivado de plaquetas-AA (396-HB, Peprotech EC Ltd.).

20 Como resultado de este procedimiento, las neuronas dopaminérgicas presentaron reacción para la tiroxina hidroxilasa que aumentó drásticamente a  $17,2 \pm 5,1\%$  de las células neurales totales (véase el lado derecho de la gráfica en la Fig. 5). Tal como se muestra en la fotografía de la Fig. 4, la proporción de proteína teñida verde con FIPC aumentó drásticamente tras el tratamiento con GDNF.

25

#### **Ejemplo 3. Inducción de neuronas acetilcolinérgicas**

30 Las células neurales inducidas para su diferenciación del Ejemplo 1 se cultivaron en Medio Alfa Esencial Mínimo con la Modificación de Eagle (M4526, Sigma Co.) que contenía suero de feto de bovino al 10% (14-501F, Lote nº 61-1012, BioWhittaker Co.), con la adición adicional de factor de crecimiento del nervio (2.5 S NGF, nº T002A, Takara), 5  $\mu$  M de forskolina (344273, Calbiochem), 10 ng/ml de factor básico de crecimiento de fibroblastos (100-18B, Peprotech EC, Ltd.) y 5 ng/ml factor de crecimiento derivado de plaquetas-AA (396-HB, Peprotech EC Ltd.).

35 Como resultado de este procedimiento, las neuronas acetilcolinérgicas presentaron reacción al transportador de la acetilcolina vesicular, que aumentó drásticamente a  $20,5 \pm 0,05\%$  de las células neurales totales (véase el lado derecho de la gráfica en la Fig. 7). Tal como se muestra en la fotografía de la Fig. 6, la proporción de proteína transportadora de la acetilcolina vesicular teñida de verde con FIPC aumentó drásticamente después del tratamiento con NGF (neurotrofina (NTS)).

#### **Ejemplo 5: Efecto terapéutico de las neuronas dopaminérgicas obtenido mediante el método de inducción de la diferenciación de la invención cuando se trasplanta en el cuerpo estriado de modelos de enfermedad de Parkinson en rata**

45 Los inventores examinaron el efecto de trasplantar neuronas dopaminérgicas obtenidas mediante el método de inducción de la diferenciación de la invención en modelos de enfermedad de Parkinson en ratas. Se había establecido ya la inyección de 6-OHDA (6-hidroxidopamina) en la sustancia negra del cerebro de rata como un método para crear modelos de Parkinson, y estos modelos se usaron para el presente experimento (Svensen y col., Exp. Neurol. 137:376-388 (1996); Svensen y col., Exp. Neurol. 148:135-146 (1997)). Se sabe que la administración de apomorfina a dichos modelos de rata provoca movimientos giratorios, con rotaciones crecientes que sugieren el deterioro y la reducción de los rotaciones sugiere una mejora.

50 Tal como se muestra en la parte superior de la gráfica de la Fig. 8, con el injerto de células neurales inducidas en el cuerpo estriado, el número de rotaciones por minuto durante un periodo de observación de 9 semanas permaneció aproximadamente inalterado en comparación con inmediatamente después del injerto. En la ausencia de tratamiento, el número de rotaciones por minuto tendió a aumentar gradualmente (no se muestra), el nivel de la pendiente indicó que al menos se evitó el agravamiento.

60 Tal como se muestra en la parte inferior de la gráfica de la Fig. 8, con el injerto de neuronas dopaminérgicas inducidas en el cuerpo estriado, el número de rotaciones por minuto comenzó a disminuir desde la primera semana después del injerto, y en aproximadamente la mitad de los animales, se encontró una mejora muy notable alcanzando el número de rotaciones por minuto cero o solo 1 o 2 después de 9 semanas. (Se cree que los dos casos en la parte inferior de la gráfica de la Fig. 8 que presentaron más de 8 rotaciones/minuto después de 9 semanas representan fracasos de los injertos y se excluyeron de la evaluación).

65 A fin de investigar el tipo de células en el cual se diferenciaron las neuronas dopaminérgicas de la invención inyectadas (injertadas) en el cuerpo estriado, se extrajo el tejido del cuerpo estriado después de 10 semanas y se

cortó con micrótopo para someter el mismo a un examen inmunohistoquímico.

El gen de la proteína verde fluorescente (GFP) se emite luz fluorescente verde se incorporó a los cromosomas de las células estromales de médula ósea utilizando un retrovirus. De esta manera, tal como se observa en las fotografías que se muestran en la Fig. 9, se indujo a las células neurales a diferenciarse a partir de las células estromales de la médula ósea, y por tanto las neuronas dopaminérgicas injertadas en el cuerpo estriado, emiten luz fluorescente verde.

También, se usó emisión de luz roja para el neurofilamento como marcador de células neurales, tiroxina hidroxilasa como marcador de neuronas dopaminérgicas, GFAP como marcador de astrocitos (células gliales) y 04 como marcador de oligodendrocitos (células gliales).

De esta manera, la superposición de luz verde mediante GFP y luz roja de los marcadores anteriormente mencionados produce luz amarilla, para la distinguir el tipo de células en el que las neuronas dopaminérgicas injertadas se habían convertido a las 10 semanas después del injerto.

Como se observa en la Fig. 9, casi todas las células injertadas del cuerpo estriado se diferenciaron a células neurales pero no a células gliales 10 semanas después del injerto. También, teniendo en cuenta el considerable número de células neurales positivas para la tiroxina hidroxilasa (es decir, neuronas dopaminérgicas), se concluyó que el método de inducción para la diferenciación in vitro de la presente invención aumentó la proporción de neuronas dopaminérgicas en 17,2 +/- 5,1% de las células neurales totales, y que el injerto anteriormente mencionado aumentó adicionalmente esta proporción.

La Fig. 10 es una combinación de fotografías inmunofluorescentes ampliadas que muestra la coloración de la tiroxina hidroxilasa. En la Fig. 10, los núcleos de las células se tiñeron de azul (contratinción) independientemente del tipo de célula. Las localizaciones de los núcleos teñidos de azul indican las localizaciones de las células.

Este procedimiento demostró que en estos modelos de enfermedad de Parkinson en rata, el injerto de neuronas dopaminérgicas contenidas mediante el método de inducción de la diferenciación de la invención aumentó drásticamente en el cuerpo estriado los síntomas de la enfermedad de Parkinson.

Lo que sigue a continuación son los protocolos experimentales que se utilizaron en los Ejemplos 6 a 11 siguientes.

## Protocolos experimentales

### Cultivo de células estromales de médula ósea

Se ha descrito el aislamiento de MSC a partir de médula ósea de ratas Wistar en publicaciones anteriores de los presentes inventores<sup>(4)</sup>. Las MSC humanas se obtuvieron de una fuente comercialmente disponible (PT-2501, BioWhittaker, Walkersville, Maryland) y un donante sano (obtenido de conformidad con las directrices del Comité Ético de la Kyoto University Graduate School of Medicine). Las MSC se aislaron mediante un método anteriormente descrito<sup>(3)</sup>. Las células se cultivaron en alfa-MEM (M-4526, Sigma, St. Louis, Missouri) que contenía suero de feto de bovino al 10% (FBS).

### Análisis FACS

Se incubaron MSC de rata con anticuerpo de ratón dirigido contra CD34 marcado con FITC (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California), anticuerpo de ratón dirigido contra CD54, anticuerpo de ratón dirigido contra CD90 y anticuerpo de ratón dirigido contra CD11b/c o anticuerpo de hámster dirigido contra CD29 (PharMingen, San Diego, California). Se incubaron los controles tanto con anticuerpo dirigido contra IgG de ratón marcado con FITC o anticuerpo dirigido contra IgG de hámster marcado con FITC, o suero de ratón no inmune. Para las MSC humanas se utilizaron anticuerpos de ratón dirigidos contra CD34, CD34, CD29, CD90, CD54,-CD11c marcados con ficoeritrina y factor de von Willebrand. Los controles incluyeron células teñidas con anticuerpo dirigido contra IgG de ratón marcado con ficoeritrina. Se adquirieron y analizaron los datos en FACScalibur con el software CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey).

### Plásmidos

La numeración de Notch1 estuvo de acuerdo con Weinmaster y col. (1991) 39. El ADNc para el dominio intracelular NICD de m-Notch 1 (comenzando en el aminoácido 1703 y terminando en la secuencia 3' no traducida), TM (aminoácidos 1747-2531), M2 (modificado a partir de TM mediante mutación de dos aminoácidos Ala-Ala (1992 y 1993) en Glu-Phe) (NICD, TM y M2 fueron proporcionados por el Dr. Masashi Kawaichi) (17,34), mNIC Δ3' (aminoácidos 1846-2477, fueron proporcionados por el Dr. Jeffery Nye) (35), RAMIC (aminoácidos 1703-1969, obtenidos a partir del ADNc de NICD mediante digestión con NotI, y AcclII), y TADIC (aminoácidos 2192-2531, obtenidos a partir del ADNc de NICD mediante digestión con XhoI y XbaI) se subclonaron en el vector de expresión de mamíferos (Promega, Madison, Wisconsin). Los plásmidos indicadores de la luciferasa de 3-PGDH (de longitud

completa y M1965) fueron proporcionados por el Dr. Shigeki Furuya (19), NeuroD por Ming-Jer Tsai (40), y el promotor GFAP por Caleb E Flinch (41). Se transfectaron las MSC con estos plásmidos utilizando lipofectamina 2000 Invitrogen, Carlsbad, California) y se seleccionaron mediante G418 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5

#### Experimento de inducción neural

Para la inducción del factor trófico, cultivos subconfluentes de MSC transferidas a NICD se incubaron en alfa-MEM que contenía FBS al 10%, 5  $\mu$ M de FSK Calbiochem, La Jolla, California), 10 ng/ml de bFGF (Peprotech, Londres, Reino Unido) y 10 ng/ml de CNTF (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota). Para el tratamiento de GDNF, se administraron 50 ng/ml de GDNF (Peprotech) en medio de cultivo alfa-MEM que contenía FBS al 10%.

10

#### Marcado de Brd-U

Tras la inducción del factor trófico (5 días), se añadió Brd-U (10  $\mu$ M) al medio de cultivo y se llevó a cabo el cultivo durante 24 horas. A continuación las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS y se marcaron por duplicado para MAP-2ab y Brd-U, antes de la contra tinción TOTO-3 (Molecular Probes).

15

#### Análisis de la RT-PCR

20

Se aisló el ARN celular total utilizando un sistema de aislamiento de ARN total SV (Promega). Para analizar la expresión relativa de los diferentes ARNm, se normalizó la cantidad de ADNc basándose en la señal procedente del ARNm de la  $\beta$ -actina expresado de forma ubicua. Se llevó a cabo la PCR utilizando protocolos normalizados con la polimerasa Taq (Sigma). Los parámetros de ciclación fueron la desnaturalización a 94° C durante 30 s, la hibridación a 54-68° C durante 1 min dependiendo del cebador y el alargamiento a 72° C, con 35 ciclos.

25

#### Inmunocitoquímica

Se ha descrito anteriormente el procedimiento específico (4). El Dr. Masahiko Watanabe (18), proporcionó anticuerpos para GLAST y el Dr. Shigeki Furuya (19) para 3-PGDH. Los siguientes anticuerpos primarios se adquirieron comercialmente: nestina (1:500, PharMingen), MAP-2ab (1:250, Sigma), neurofilamento-M (1:200, Chemicon, Temecula, California), isotipo 3 de la  $\beta$ -tubulina (1:400, Sigma), TuJ-1 (1:100, Babco, Richmond, California), GFAP (1:1, DAKO, Carpinteria, California), 04 (1:20, Boehringer Mannheim, Alemania), GalC (1:30, Chemicon), GABA (1:1000, Sigma), transportador de la serotonina (1:200, Chemicon), Transportador de la acetilcolina vesicular (1:100, Chemicon), glutamina (1:100, Chemicon), neuropéptido Y (1: 1000, Peninsula Laboratories Inc., Belmont, California), TH (1:200, Chemicon), VIP (1:500, Incstar, Stillwater, Minnesota), CGRP (1:1200, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido), SP (1:500, Amersham), DAT (1:200, Chemicon). Se incubaron las células con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 488 o 546, y se llevó a cabo la contra tinción de yoduro TOTO-3. Se examinaron las células en un microscopio de barrido de laser confocal (Radians 2000, Bio-Rad, Hertfordshire, Reino Unido).

30

35

40

#### Ensayos de indicadores

Se transfectaron las células utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se evaluaron las células para determinar las actividades de la luciferasa de luciérnaga y pensamiento de mar utilizando un kit de ensayo de la luciferasa por duplicado (Promega). Se corrigieron los valores de la luciferasa de luciérnaga para la eficacia de la transfección incluyendo plásmidos que expresaban la luciferasa del pensamiento de mar.

45

#### Análisis de transferencia Western

Se prepararon lisados celulares y 50  $\mu$ g de lisado de proteínas se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 5% y al 10%. Se detectaron los antígenos para los anticuerpos MAP-2 (1:500, Chemicon), GFAP (1:500, Dako) and TH (1:1000, Chemicon) utilizando la fosfatasa alcalina.

50

#### Métodos electrofisiológicos

Se midieron las corrientes a temperatura ambiente (20-25° C) con un amplificador de fijación de membranas CEZ-2300 (Nihon Kohden, Tokio, Japón) La adquisición de los datos y estimulación se controlaron con el software pClamp 6.0 (Axon Instruments, Inc., Foster City, California). Las señales se filtraron a 5 KHz y se muestrearon a 10-50 KHz. Los experimentos se llevaron a cabo en una configuración de fijación de membranas de célula completa utilizando pipetas (vidrio de borosilicato, Narishige, Tokio, Japón) con valores de resistencia en el intervalo de 4-8 M $\Omega$ . Para registrar las corrientes retardadas del rectificador de potasio, la disolución extracelular normalizada contenía (nM) NaCl (150), KCl (4), CaCl<sub>2</sub> (2), MgCl<sub>2</sub> (2), glucosa (10) y Hepes (10) (pH 7.4 con NaOH). La disolución normalizada de la pipeta fue (mM) KCl (130), MgCl<sub>2</sub> (5), EGTA (10), y Hepes (10) (pH 7.4 con KOH).

60

65

Análisis del modelo de la enfermedad de Parkinson en ratas

- Se ha descrito un procedimiento para crear este modelo de enfermedad en una notificación previa<sup>(45)</sup>. De forma breve, se anestesiaron ratas Wistar macho adultas (que pesaban 250-300 g) con pentobarbital de sodio (40 mg/kg, intraperitoneal) y a continuación se inyectó una disolución de 6-OHDA (8 µg/4 µl de disolución salina de ascorbato al 0,1%) en el haz prosencefálico medial izquierdo (A/P = -4,4 mm; L = +1,1 mm desde bregma, V = -7.7 mm desde la dura).
- Se usó el giro contralateral prolongado como un comportamiento diana, y se excluyeron las ratas que mostraron un promedio de menos de 6 rotaciones por minuto durante los primeros 30 minutos después de la administración de apomorfina (0,8 mg/Kg, subcutánea) 1 x 10<sup>5</sup> células/8 µl se injertaron en el cuerpo estriado lesionado en las siguientes coordenadas: A/P = +0,5 mm; L = +3,0 mm desde bregma, y V = -4,5 mm. El número de animales fue de 5 en el grupo MSC, 6 en el grupo N-MSc y 10 en el grupo G-MSc.
- Para la inmunohistoquímica del cuerpo estriado injertado (grupo G-MSc 10 semanas después de la operación), se incubaron secciones de glía con anticuerpos dirigidos contra el neurofilamento-M, TH, DAT, GFAP y O4. A continuación se detectaron estos mediante anticuerpos secundarios marcados con Alexa Fluor 546 (Molecular Probes), antes de la contra tinción de yoduro TOTO-3.
- Para el trasplante de MSC humanas, se injertaron 5 animales y se sometieron a inmunosupresión mediante inyección subcutánea de FK506 (1 mg/kg, Fujisawa, Osaka, Japón) una vez al día. Cuatro semanas después del trasplante, se midió el giro inducido por apomorfina. Para la medida de la dopamina en HPLC, se obtuvieron cortes a micrótopo del cerebro coronal de 1 mm de grosor (A/P +2,5 mm a -1,5 mm desde bregma; un total de 4 cortes a micrótopo, se separaron en la línea media, y cada lado se cultivó por separado en alfa-MEM que contenía FBS al 10%. Después de 24 horas, se recogieron los medios de cultivo y SRL Communication and Health, Tokio, Japón, los suministró para el análisis de HPLC. Todos los experimentos animales fueron aprobados por el Comité de Cuidados y Experimentación Animal de la Kyoto University Graduate School of Medicine.

**Análisis estadístico**

- Se expresaron los datos como promedio +/- SEM. Se compararon los datos utilizando ANOVA con comparaciones entre pares mediante el método de Bonferroni. Se notificaron los valores P <0,05 como significativos, y <0,01 como muy significativos.

**Ejemplo 6: Identificación de MSC**

- Las MSC de rata y seres humanos se utilizaron para el siguiente experimento. Las MSC de rata (Wistar) se aislaron mediante un método descrito anteriormente y se cultivaron <(4)>. Se obtuvieron las MSC humanas de un donante sano o se adquirieron de una fuente comercial (BioWhittaker).
- Se evaluaron los marcadores superficiales celulares en las MSC de rata y las MSC humanas utilizando la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Las MSC expresaron CD29 (beta 1-integrina), CD90 (Thy-1) y CD54 (ICAM-1), pero no CD34 (marcador de hemocitoblastos), CD11b/c (marcador relacionado con macrófagos) o factor de Von Willebrand (marcador celular endotelial humano, no se muestran los datos) (Fig. 11a). Este resultado se correspondió con el de informes anteriores <(3,11)>. Se obtuvieron resultados similares mediante examen inmunohistoquímico (Figs. 11b-f). Se confirmó la diferenciación lipogénica, condrogénica y osteogénica de las MSC de rata y ser humano de acuerdo con el método descrito en Pittenger y col. (1999) <(3)>. Esto indicó que las células eran una fuente del mesénquima (no se muestran los datos).

**Ejemplo 7: Efecto de la transfección de NICD sobre las MSC**

- Se transfectaron NICD en las MSC, debido a que la actividad de señalización de Notch se encuentra en el dominio intracelular de la proteína Notch y las delecciones que eliminan el dominio extracelular puede estimular una forma constitutivamente activa de Notch <(16)>. NICD comprende una secuencia de codificación para una pequeña porción del dominio extracelular, la región transmembrana y el dominio intracelular completo de Notch de ratón <(17)>, y fue proporcionado por el Dr. Kawaichi del Instituto Nara de Ciencia y Tecnología. El fragmento se subclonó en pCI-neo, un vector de expresión de mamífero que contenía el promotor del CMV, y a continuación se transfectó en las MSC mediante lipofección y posterior selección de G418.
- Debido a que se detectaron los dominios extracelular e intracelular de Notch, las MSC no tratadas expresaron pequeñas cantidades de Notch endógeno. Sin embargo las MSC transfectadas con NICD expresaron de forma predominante solo NICD y no se detectó el dominio extracelular (Fig. 12a).
- El transportador GLAST del glutamato y la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (3PGDH) están presentes en los neurocitoblastos (NSC) y la glía radial <(18,19)>. Se cree que estos están linealmente relacionados con los citoblastos, y pueden servir como una fuente de neuronas durante la embriogénesis <(20)>. Las NSC positivas para

bromodesoxiuridina (Brd-U) en el giro dentado del hipocampo de ratón adulto fueron casi invariablemente inmunopositivas para 3PGDH <(19)>. Tras la transfección de NICD, las MSC de ratas regularon por exceso la transcripción y la expresión de estas moléculas así como de la nestina, un conocido marcador de las NSC y las células progenitoras neurales (NPC) <(21)>. Las MSC no tratadas casi no presentaron expresión de GLAST o 3PGDH, pero una fracción muy pequeña de células fueron positivas para la nestina (0,74 +/- 0,1%). Tras la transfección de NICD, sin embargo, estas células regularon en exceso GLAST, 3PGDH y la nestina (4,92 +/- 1,0%, p<0.01) (Figs. 15b-g). En un ensayo del promotor de la luciferasa, las actividades 3PGDH de los nucleótidos 5'-flanqueantes de longitud completa (nucleótidos - 3472 a -1) y M1965 5' flanqueante (-1792 a -1) (notificadas por ser activas en la glía radial y en los citoblastos neuroepiteliales <(19)>) aumentaron de forma significativa en las MSC de rata después de la transfección de NICD (p<0,01) (Fig. 12h) (Los promotores fueron proporcionados por el Dr. S. Furuya, Brain Science Institute, RIKEN).

En los vertebrados, las NSC y los citoblastos de las crestas neurales adoptan un destino glial tras la inhibición de la diferenciación neural <(13,14,16)>. Los presentes inventores han confirmado que la inserción de NICD en las NSC de ratas genera astrocitos positivos para GFAP, pero se descubrieron muy pocas células positivas para GFAP en las MSC transfectadas con NICD (no se muestran los datos). Por otra parte, se ha notificado que la introducción de Notch1 activado en el prosencéfalo de ratón promueve la identidad de la glía radial durante la embriogénesis <(15)>. Como las MSC expresaron los marcadores relacionados con NSC y NPC tras la introducción de NICD, es plausible que la transfección de NICD de lugar a que las MSC cambien su fenotipo a uno parecido a las NSC y/o a las NPC.

### Inducción neural de MSC transfectadas con NICD

Los presentes inventores han investigado las condiciones necesarias para generar selectivamente células neurales a partir de MSC transfectadas con NICD. Los inventores han ensayado de este modo diversos factores conocidos por actuar sobre la neurogénesis <(22)> (neurotrofinas, factor inhibidor de leucemia, bFGF y CNTF) y forskolina. Los inventores han encontrado que la condición más eficaz para la inducción específica de células neurales fue la introducción simultánea de FSK, bFGF y CNTF (denominada a partir de ahora en el presente documento como "introducción de factor trófico" a lo largo de la presente memoria descriptiva).

Tras la transfección de NICD en las MSC, el cultivo de las células hasta un 60-70% de confluencia y la introducción de tres factores tróficos (FSK + pFGF + CNTF), 96,5 +/- 0,6% de las células fueron positivas para MAP-2ab después de 5 días (Fig. 13, Figs. 14a-d). Los presentes inventores han observado tasas de positividad de MAP-2ab de 73,2 +/- 5,1% solo con bFGF y 87,5 +/- 3,1% y 83,6 +/- 3,4% cuando se añadieron también FSK y CNTF. Esta diferencia no fue significativa (p>0.05) (Fig. 16). FSK y CNTF produjeron respectivamente tasas de 29,2 +/- 5,4 y 4,3 +/- 1,9% solos (p<0.01) y 11,4 +/- 2,4% juntos (Fig. 13).

La inducción de células MAP-2ab mediante factores tróficos fue muy probablemente producida por la inhibición de células de la glía y otra diferenciación celular procedente de MSC más bien que por la destrucción específica de células no neurales, ya que prácticamente no se observó muerte de células mediante la tinción nuclear de TOTO-3 tras la inducción del factor trófico (no se muestran los datos).

La inducción del factor trófico por sí mismo, o tras la inserción de un vector control pCL-neo sin NICD, dio como resultado fenotipos neurales no reconocibles (Fig. 13). Por tanto, podría verse que la transfección de NICD es crítica para la inducción neural de las MSC.

### Caracterización de células neurales MSC

Las células neurales derivadas de las MSC de rata y ser humano anteriormente mencionadas mostraron distintas características morfológicas de las neuronas, que incluyen los procesos de tipo neurita con abundantes varicosidades, y expresaron marcadores neurales típicos tales como el neurofilamento-M, la beta 3-tubulina y Tuj1 (Figs. 14a-g). Las células positivas para nestina, aunque pocas, también podían reconocerse (2,03 +/- 0,7%) (no se muestran los datos). Las células neurales inducidas fueron incapaces de proliferar cuando se subcultivaron tras el tratamiento con tripsina. La incorporación de Brd-U estudiada 5 días después de la inducción del factor trófico mostró un mínimo marcado de células positivas para MAP-2ab (Fig. 14h) sugiriendo que estas células neurales están mitóticamente terminadas.

Mediante la transferencia Western, no se detectó MAP-2ab en MSC no tratadas pero se encontró tras la inducción del factor trófico (Fig. 14i(1)).

Un aumento del desarrollo en la corriente rectificadora retardada del potasio está asociada con la maduración de la excitabilidad celular y la diferenciación neural <(23)>. Los presentes inventores han investigado esta propiedad en las células neurales inducidas utilizando el método de fijación de membranas por voltaje. Se estimuló una corriente de K<sup>+</sup> rectificadora hacia el exterior mediante etapas de voltaje positivas en MSC inducidas derivadas de ratas y seres humanos. La amplitud de esta corriente fue drásticamente mayor que en las MSC no tratadas (Figs. 14m-q). Los presentes inventores han investigado también el potencial de membrana en reposo en condiciones de fijación de corriente inmediatamente después de haberse formado la configuración de célula completa. El potencial de

membrana en reposo fue menor entre las células neurales que en las MSC no tratadas (-50 a -60 mV y -30 a -40 mV respectivamente). Estas propiedades neurofisiológicas indujeron en las MSC cierto parecido con el de las neuronas maduras.

5 En la comprobación de las células gliales, los presentes inventores han llevado a cabo la inmunohistoquímica utilizando GFAP como marcador de los astrocitos, y galactocerebrósido (GalC) y O4 como marcadores de oligodendrocitos. No se detectaron células gliales positivas para el marcador tras la inducción del factor trófico de las MSC de rata o de ser humano (Figs. 14i-k). Esto se confirmó mediante la transferencia Western (Fig. 14l(2)). Para confirmar adicionalmente la especificidad de la inducción neural, los presentes inventores midieron las actividades del promotor de NeuroD y GFAP, en MSC no tratadas de rata, las tasas de NeuroD y GFAP fueron 67,2 +/- 15,3 y 5,16 +/- 1,36, respectivamente. Tras la inducción del factor trófico, sin embargo, la actividad de NeuroD aumentó significativamente hasta 132,7 +/- 20,0 aunque GFAP disminuyó significativamente a 0,63 +/- 0,22 (Fig. 15). Estos resultados indican que solo se indujeron específicamente las células neurales a partir de las MSC transfectadas con NICD tras la inducción del factor trófico.

15

### Generación de células positivas para TH

La función neural está estrechamente relacionada con los neurotransmisores específicos del tipo de célula. Los presentes inventores llevaron a cabo, de este modo, el examen inmunocitoquímico de los neurotransmisores y las proteínas relacionadas tras la inducción del factor trófico (Fig. 16a). Se sabe que GDNF está implicado en la generación y desarrollo de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo <(36)>. Los presentes inventores han examinado también si la administración de GDNF induce las MSC neurales para aumentar su proporción de células positivas a la tirosina hidroxilasa (TH). Este porcentaje aumentó desde 3,9 +/- 0,6% tras la inducción trófica solo hasta 41,0 +/- 14,1 tras la administración de GDNF (Figs. 16a a c) GDNF indujo también la expresión de Nurr-1, que es un factor de transcripción que tiene un papel en la diferenciación de los precursores del mesencéfalo en las neuronas dopaminérgicas <(37)> (Fig. 16d). La transferencia Western confirmó además estos resultados (Fig. 16e).

20

25

### El trasplante de células neurales en modelos de la enfermedad de Parkinson en ratas

30 A fin de explorar la capacidad de las MSC derivadas de células neurales para sobrevivir y funcionar in vivo, se trasplantaron las células de rata y seres humanos en el cuerpo estriado de modelos de enfermedad de Parkinson en ratas. La administración unilateral de 6-OHDA en el haz prosencefálico medial destruye de forma selectiva las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, proporcionando de esta manera un modelo útil de la enfermedad de Parkinson. Se trasplantaron tres tipos de MSC de rata marcadas con proteína fluorescente verde (GFP) <(4)> : no tratado (grupo MSC), 2) tras la inducción del factor trófico en células neurales (grupo N-MSC), y 3) administración de GDNF tras la inducción (grupo G-MSC). Los animales recibieron el implante de  $1 \times 10^5$  de MSC ipsilateral al cuerpo estriado lesionado. Se examinó el comportamiento de rotación inducido por apomorfina durante 10 semanas tras el implante celular. El grupo MSC mostró un sesgo de rotación alejado del lado lesionado que persistió, mientras que el grupo N-MSC mostró una ligera recuperación en el tiempo. En contraste, el grupo G-MSC demostró una significativa recuperación del comportamiento de rotación (Fig. 16f). Los animales trasplantados se vigilaron hasta 40 16 semanas, no se observó formación de tumor en el cerebro.

35

Diez semanas después del injerto, se examinaron los cerebros histológicamente, incluyendo la inmunohistoquímica. El cuerpo estriado injertado mostró células positivas para GFP, mientras que las células trasplantadas fueron positivas para el neurofilamento y, en unos pocos casos, mostraron un marcado con un anticuerpo dirigido contra GFAP o anticuerpo dirigido contra O4. Muchas de las células trasplantadas fueron también positivas para TH y el transportador de la dopamina (DAT) (Figs. 16g-k). El porcentaje de células positivas para GFAP entre las MSC marcadas con GFP fue de 2,5 +/- 1,4%, mientras que los porcentajes de células positivas para TH y DAT fueron de 45,7 +/- 4,2% y de 30,7 +/- 0,9%, respectivamente. En secciones en serie del grupo G-MSC, se encontró que las células injertadas migraban y se extendían en el cuerpo estriado del hospedador (Fig. 16l) Se contaron aproximadamente  $3,4 \times 10^4$  células (34%) en el cuerpo estriado.

45

50

Las MSC neurales tratadas con GDNF humana se trasplantaron de forma similar en el cuerpo estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA. Los animales se sometieron a inmunosupresión con FK 506 diariamente, y se registró el comportamiento de rotación a las 4 semanas. El injerto dio como resultado una mejora significativa en el comportamiento de rotación (el índice de rotación promedio, posterior/previo a la operación, fue de 0,44 +/- 0,2) (Fig. 16 m). Se evaluó la capacidad de las MSC humanas injertadas para sintetizar y liberar dopamina midiendo la concentración de dopamina en el medio de cultivo de cortes de micrótopo de cerebro trasplantado mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Los cortes con micrótopo del cerebro se separaron en la línea media en lados injertados e intactos y se cultivaron por separado. Se midió la concentración de dopamina en el medio de cultivo de cada lado y se calculó la relación del lado lesionado al intacto. Ratas Sham operadas mostraron una relación de 0,57 +/- 0,01 (n = 3) en contraste con la relación de animales injertados de 0,67 +/- 0,04 (n = 3).

55

60

Referencias bibliográficas

1. Bishop, A.E., Buttery, L.D. y Polak, J.M. Embryonic stem cells (Revisión). *J. Pathol.* 197, 424-429 (2002).
- 5 2. Weissman, I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution (Revisión). *Cell* 100, 157-168 (2000).
3. Pittenger, M.F. y col. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147 (1999).
4. 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).
- 10 5. Jiang, Y. y col. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49 (2002).
6. Eglitis, M.A., Dawson, D., Park, K.W. y Mouradian, M.M. Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. *Neuroreport* 10, 1289-1292 (1999).
7. Kopen, G.C., Prockop, D.J. y 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).
- 15 8. Terada, N. y col. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542-545 (2002).
9. Wagers, A.J., Sherwood, R.I., Christensen, J.L. y Weissman, I.L. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297, 2256-2259 (2002).
- 20 10. Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J. y Black, I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61, 364-370 (2000).
11. 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).
12. Sanchez-Ramos, JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J. Neurosci. Res.* 69, 880-893 (2002).
- 25 13. Lundkvist, J. y Lendahl, U. Notch and the birth of glial cells (Review). *Trends Neurosci.* 24, 492-494 (2001).
14. 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).
15. Gaiano, N., Nye, J.S. y Fishell, G. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26, 395-404 (2000).
- 30 16. Nye, J.S., Kopan, R. y Axel, R. An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development* 120, 2421-2430 (1994).
17. Yamamoto, N. y col. Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 45031-45040 (2001).
- 35 18. 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).
19. Yamasaki, M. y col. 3-Phosphoglycerate dehydrogenase, a key enzyme for 1-serine biosynthesis, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage and olfactory unsheathing glia in the mouse brain. *J. Neurosci.* 21, 7691-7704 (2001).
- 40 20. Gregg, C.T., Chojnacki, A.K. y Weiss, S. Radial glial cells as neural precursors: the next generation? *J. Neurosci. Res.* 69, 708-713 (2002).
21. Roy, N.S. y col. In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 6, 271-277 (2000).
22. 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).
- 45 23. Grosse, G. y col. Expression of Kvl potassium channels in mouse hippocampal primary cultures: development and activity-dependent regulation. *J. Neurosci.* 20, 1869-1882 (2000).
24. Morrison, S.J. Neural differentiation: proneural genes inhibit gliogenesis (Review). *Curr. Biol.* 11, R349-351 (2001).
- 50 25. Sun, Y. y col. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104, 365-376 (2001).
26. 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).
27. Furukawa, T. y col. rax, Hes1, and notch1 promote the formation of Muller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron* 26, 383-394 (2000).
- 55 28. Seidel, H.M., Lamb, P. y Rosen, J. Pharmaceutical intervention in the JAK/STAT signaling pathway (Review). *Oncogene* 19, 2645-2656 (2000).
29. Burdon, T., Smith, A. y Savatier, P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* 12, 432-438 (2002).
- 60 30. 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).
31. Stork, P.J. y Schmitt, J.M. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* 12, 258-266 (2002).
- 65 32. 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).



33. Shimazaki, T., Shingo, T. y 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 34. Kurooka, H., Kuroda, K. y Honjo, T. Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse notch1 intracellular region. *Nucleic Acids Res.* 26, 5448-5455 (1998).
35. Franklin, J.L. y col. Autonomous and non-autonomous regulation of mammalian neurite development by Notch1 and Deltal. *Curr. Biol.* 9, 1448-1457 (1999).
36. 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).
- 10 37. Sakurada, K., Ohshima-Sakurada, M., Palmer, T.D. y 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).
38. 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).
- 15 39. Weinmaster, G., Roberts, V.J. y Lemke, G. A homolog of Drosophila Notch expressed during mammalian development. *Development* 113, 199-205 (1991).
40. 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).
- 20 41. Rozovsky, I. y col. Estradiol (E2) enhances neurite outgrowth by repressing glial fibrillary acidic protein expression and reorganizing laminin. *Endocrinology* 143, 636-646 (2002).
42. Seta, Y., Toyono, T., Takeda, S. y Toyoshima, K. Expression of Mash1 in basal cells of rat circumvallate taste buds is dependent upon gustatory innervation. *FEBS Lett.* 444, 43-46 (1999).
43. 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).
- 25 44. Kawasaki, H. y col. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell derived inducing activity. *Neuron* 28, 31-40 (2000).
45. 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).

30

## REIVINDICACIONES

1. Un método para inducir células estromales de médula ósea (BMSC) a diferenciarse en células precursoras neurales *in vitro* que comprende las etapas de:
- 5 (1) aislar BMSC procedentes de médula ósea, y cultivar dichas células en un medio de cultivo esencial normalizado suplementado con un suero; e  
 (2) introducir en dichas células, unas secuencias que comprenden un ácido nucleico que codifica un dominio intracelular de Notch, y cultivar adicionalmente dichas células para producir células precursoras neurales.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dichas BMSC aisladas se derivan de un ser humano.
3. Una población de células precursoras neurales producida mediante el método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde los miembros de la población de células precursoras neurales comprenden un dominio intracelular de Notch, donde además, las células no expresan el dominio extracelular de Notch.
- 15 4. La población de células precursoras neurales de la reivindicación 3, donde los miembros de la población de células precursoras neurales expresan los marcadores de células precursoras neurales, GLAST, 3PGDH, y nestina.
- 20 5. Un método para inducir BMSC a diferenciarse en células neurales *in vitro* que comprende las etapas de:
- (1) aislar BMSC procedentes de médula ósea, y cultivar dichas células en un medio de cultivo esencial normalizado suplementado con un suero;  
 (2) introducir en dichas células, secuencias que comprenden un ácido nucleico que codifican un dominio intracelular de Notch y cultivar además dichas células; y  
 (3) añadir un agente que aumenta el monofosfato de adenosina cíclico /AMPc) o un análogo de AMPc, y/o un factor estimulador de la diferenciación celular a dicho medio de cultivo, y cultivar además dichas células para producir las mencionadas células neurales, donde las células diferenciadas resultantes son progenie de las BMSC donde se han introducido las secuencias que comprenden dicho ácido nucleico que codifica un dominio intracelular de Notch.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicha introducción de las secuencias que comprenden dicho ácido nucleico que codifica un dominio intracelular de Notch se lleva a cabo mediante lipofección con un vector que se puede expresar en un mamífero.
- 35 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, que comprende además, entre la Etapa (2) y la Etapa (3), una etapa de selección de células donde se ha introducido dicho ácido nucleico, durante un periodo predeterminado de tiempo.
- 40 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde dicho factor estimulador de la diferenciación celular se selecciona entre el grupo que consiste en un factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor neurotrófico ciliar (CNTF) y sus mezclas.
- 45 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-8, donde dichas BMSC se derivan de un ser humano.
10. El método de la reivindicación 5, que comprende además las etapas de:
- (4) cultivar las células neurales obtenidas en la Etapa (3) en un medio de cultivo esencial normalizado suplementado con un suero; y  
 (5) añadir un factor neurotrófico derivado de glía (GDNF) y un agente que aumenta el AMPc o un análogo de AMPc, y/o un factor estimulador de la diferenciación celular diferente de dicho GDNF a dicho medio de cultivo, y cultivar adicionalmente dichas células para obtener neuronas dopaminérgicas.
- 50 donde las neuronas dopaminérgicas resultantes son progenie de las BMSC donde se ha introducido dicho ácido nucleico.
- 55 11. El método de la reivindicación 5, que comprende además las etapas de:
- (4) cultivar las células naturales obtenidas en la Etapa (3) en un medio de cultivo esencial normalizado suplementado con un suero; y  
 (5) añadir factor de crecimiento del nervio (NGF), y un agente que aumenta el AMPc o un análogo de AMPc y/o u factor estimulador de la diferenciación celular diferente de dicho NGF a dicho medio de cultivo y cultivar adicionalmente las mencionadas células para obtener neuronas acetilcolinérgicas,
- 60 donde las neuronas acetilcolinérgicas resultantes son progenie de las BMSC donde se ha introducido dicho ácido nucleico
- 65

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde dichas BMSC se derivan de un ser humano.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10-12 donde dicho agente que aumenta el AMPc o análogo de AMPc, en la etapa (3) es forskolina.
- 5 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10-13, donde dicho factor estimulador de la diferenciación celular, en la etapa (3), se selecciona entre el grupo que consiste en el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) el factor neurotrófico ciliar (CNTF), y sus mezclas.
- 10 15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-15, donde dicho medio de cultivo esencial normalizado en la Etapa (4) es un medio alfa esencial mínimo modificado por Eagle.
16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-15 donde dicho suero en la Etapa (4) es suero de feto de ternera.
- 15 17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-16 donde dicho agente que aumenta el AMPc o análogo de AMPc es la Etapa (5) es forskolina.
- 20 18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-17, donde dicha concentración de dicho agente que aumenta el AMPc o análogo de AMPc en la Etapa (5) está entre 0,001 nM y 100 microM.
- 25 19. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 o 12-18, donde dicho factor estimulador de la diferenciación celular diferente de dicho GDNF en la Etapa (5) se selecciona entre el grupo que consiste en el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas-AA (PDGF-AA), y sus mezclas.
20. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 o 12-19, donde una concentración de dicho GDNF en la Etapa (5) está entre 1 ng/ml y 100 ng/ml.
- 30 21. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 o 12-20, donde una concentración de dicho factor estimulador de la diferenciación celular diferente de GDNF en la Etapa (5) está entre 0,001 ng/ml y 100 microgramos/ml.
- 35 22. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-18, donde dicho factor estimulador de la diferenciación celular diferente de NGF en la Etapa (5) se selecciona entre el grupo que consiste en el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas-AA (PDGF-AA), y sus mezclas.
- 40 23. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-18 o 22, donde una concentración de dicho NGF en la Etapa (5) está entre 1 ng/ml y 100 ng/ml.
24. el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-20, 24 o 25, donde una concentración de dicho factor estimulador de la diferenciación celular diferente de NGF en la Etapa (5) está entre 0,001 ng/ml y 100 microgramos/ml.
- 45 25. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-9, donde dicho medio de cultivo esencial normalizado es un medio alfa esencial mínimo modificado por Eagle.
- 50 26. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-9 o 25, donde dicho suero es suero de feto de ternera.
27. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-9, 25 o 26, donde dicho agente que aumenta AMPc o análogo de AMPc en la Etapa (3) es forskolina.
- 55 28. El método de acuerdo con cualquiera 5-9 o 25-27, donde una concentración de dicho agente que aumenta el AMPc o análogo de AMPc en la Etapa (3) está entre 0,001 nM y 100 microM.
29. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-9 o 25-28, donde una concentración de dicho factor estimulador de la diferenciación celular está entre 0,001 ng/ml y 100 microgramos/ml.
- 60 30. Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de la población de células precursoras neurales de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4 en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un paciente que padece de una enfermedad, trastorno o dolencia implicada en el sistema nervioso central.
- 65 31. El uso de acuerdo con la reivindicación 30, donde dicha enfermedad, trastorno o dolencia es un daño en la médula espinal inducido por lesión.

Fig.1



Fig.2

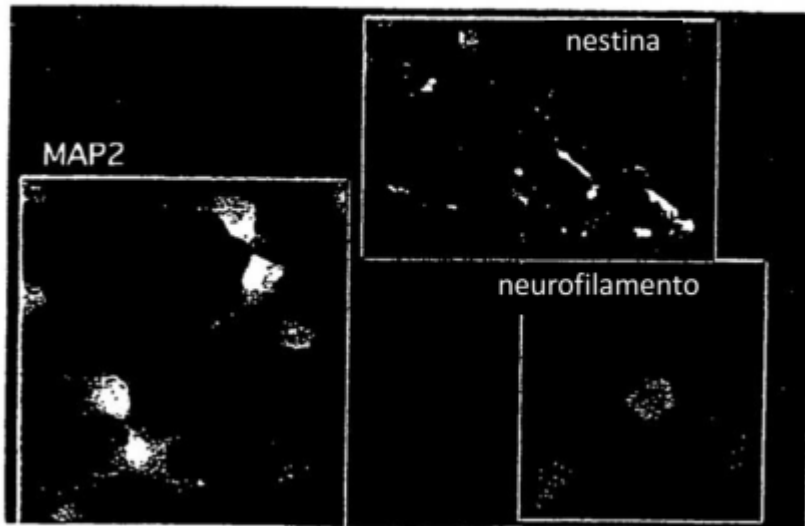


Fig.3

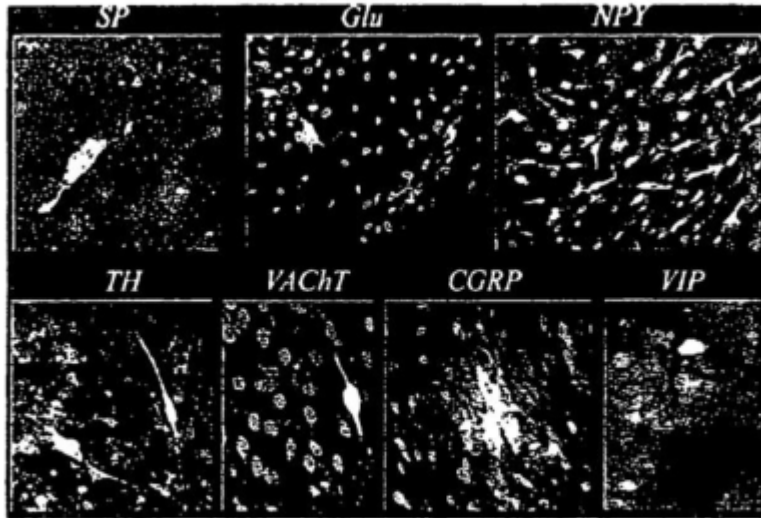


Fig.4

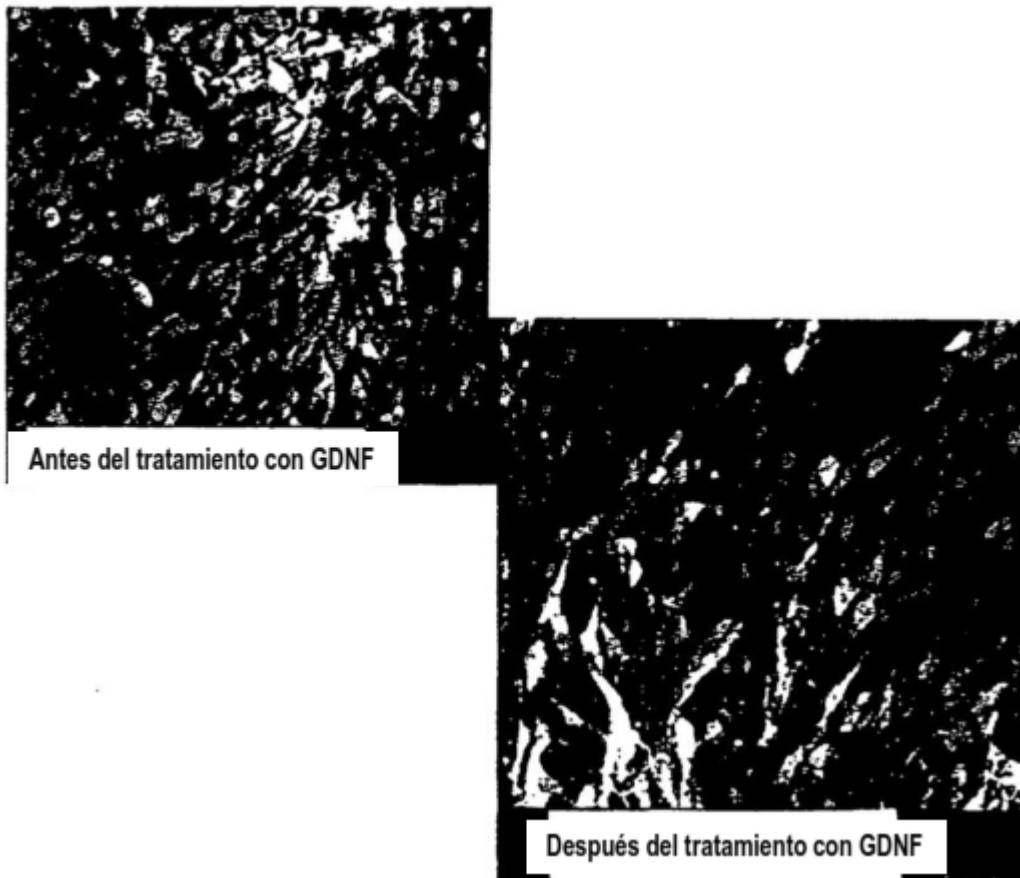


Fig.5

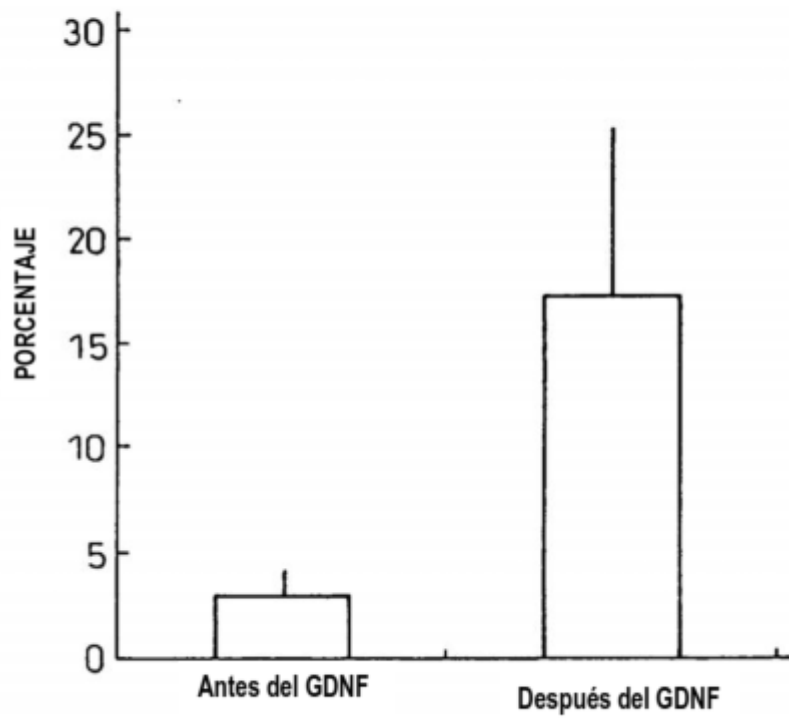
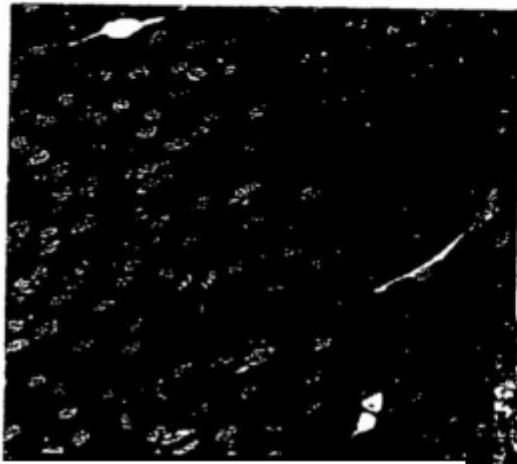


Fig.6



ANTES DEL TRATAMIENTO CON LOS NT



DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON LOS NT

Fig.7

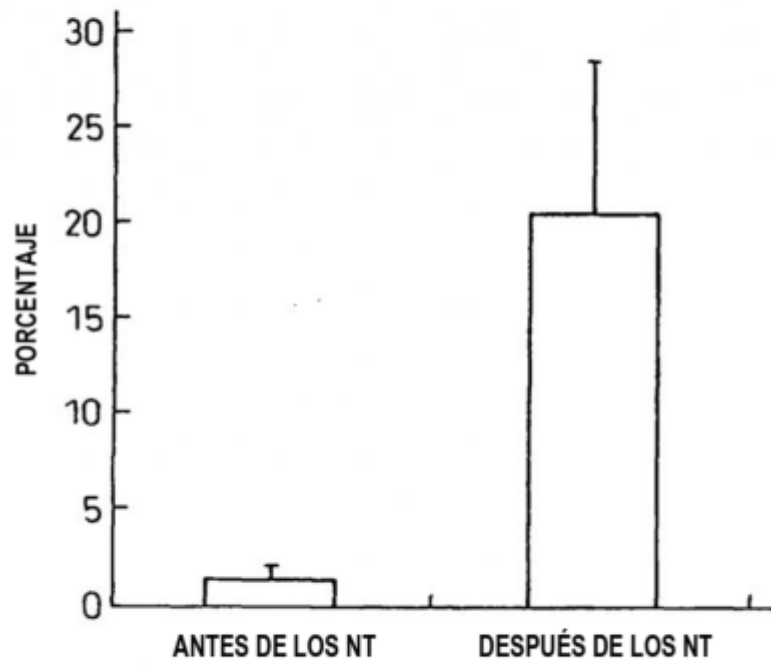




Fig. 8

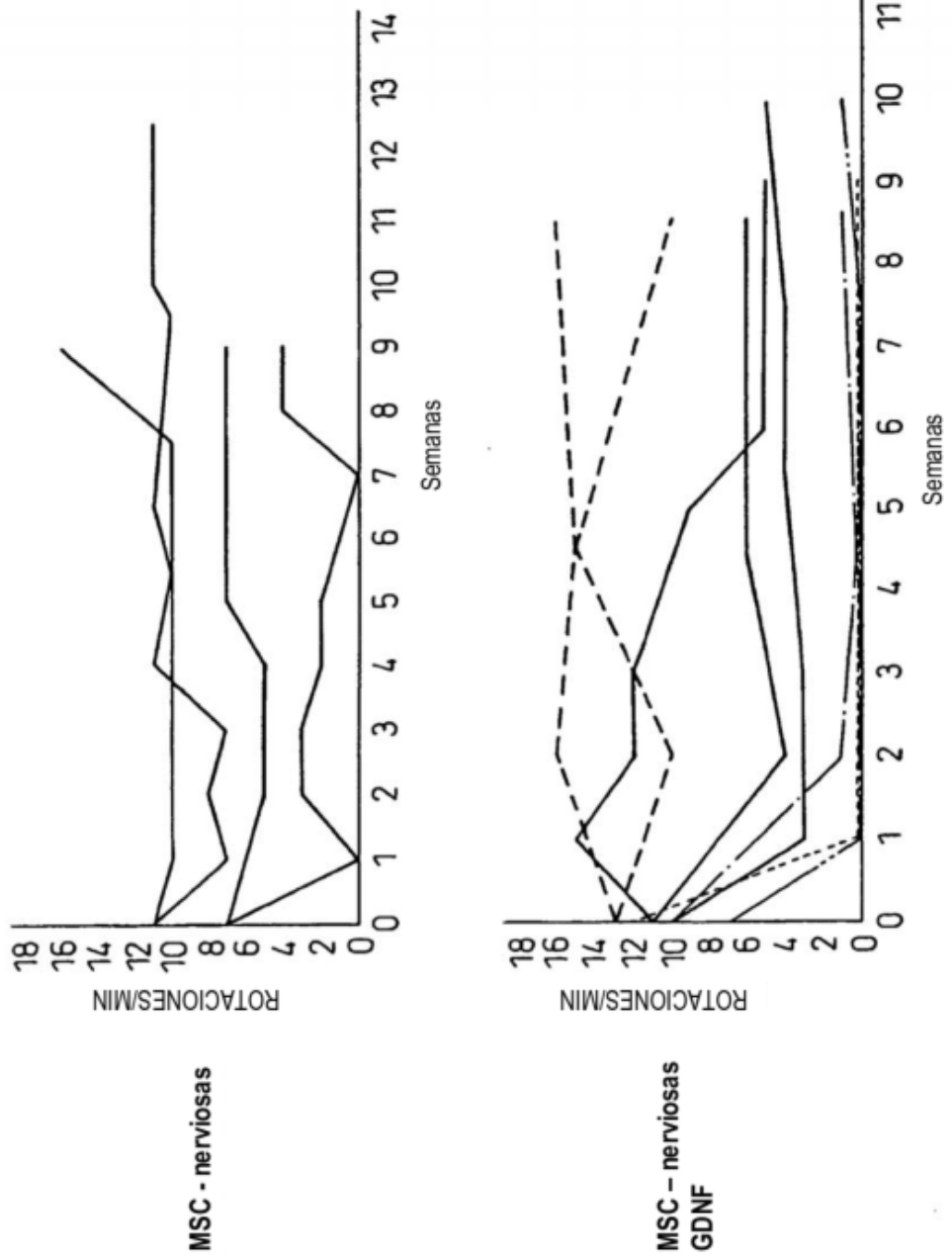


Fig. 9

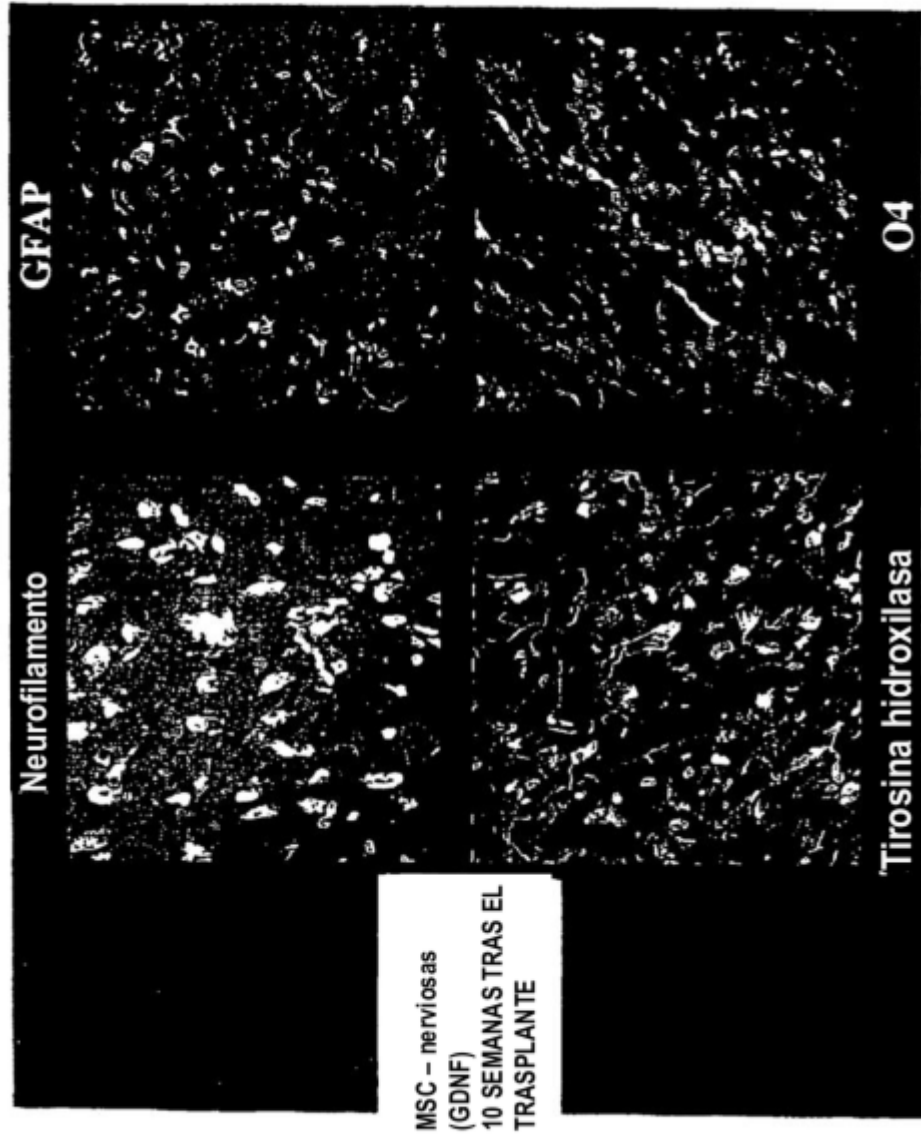
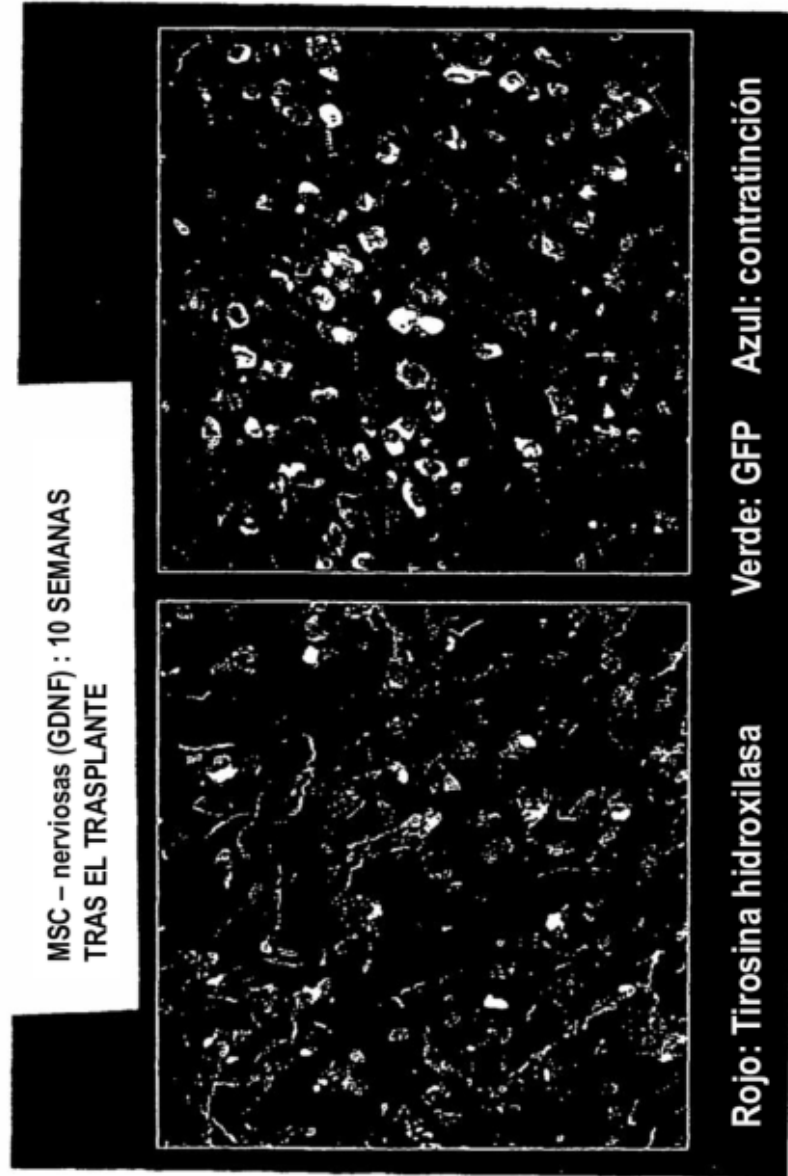


Fig. 10



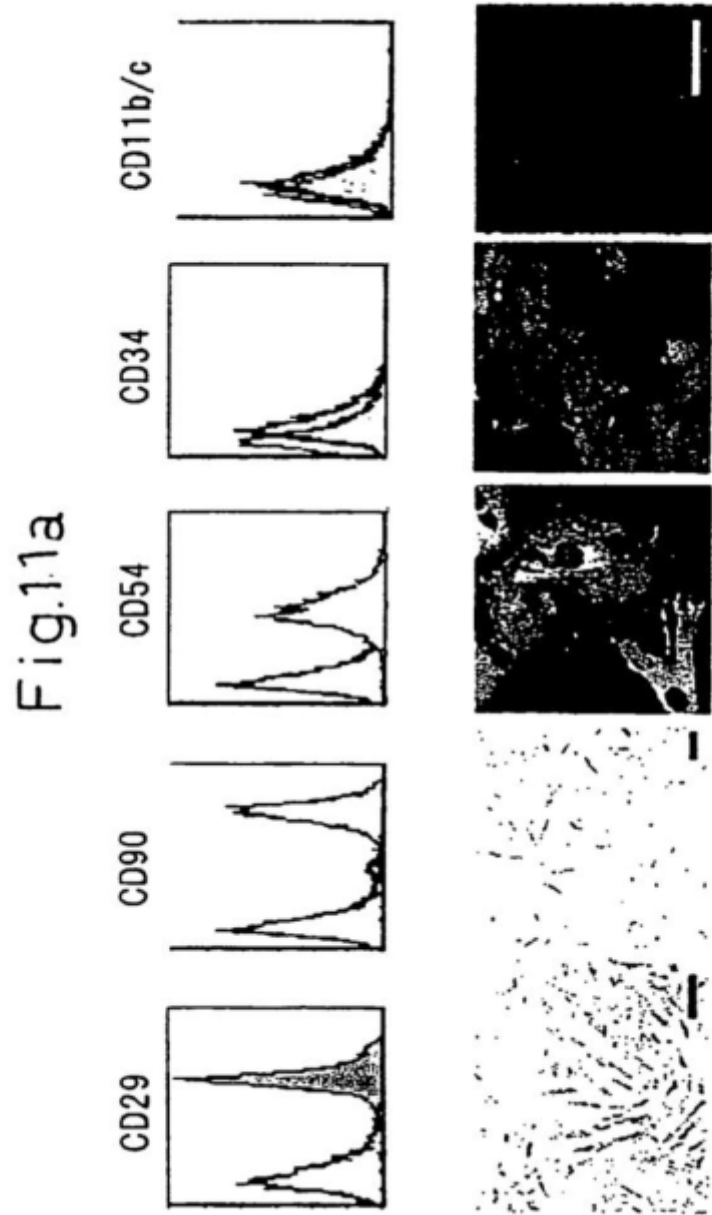


Fig.12a

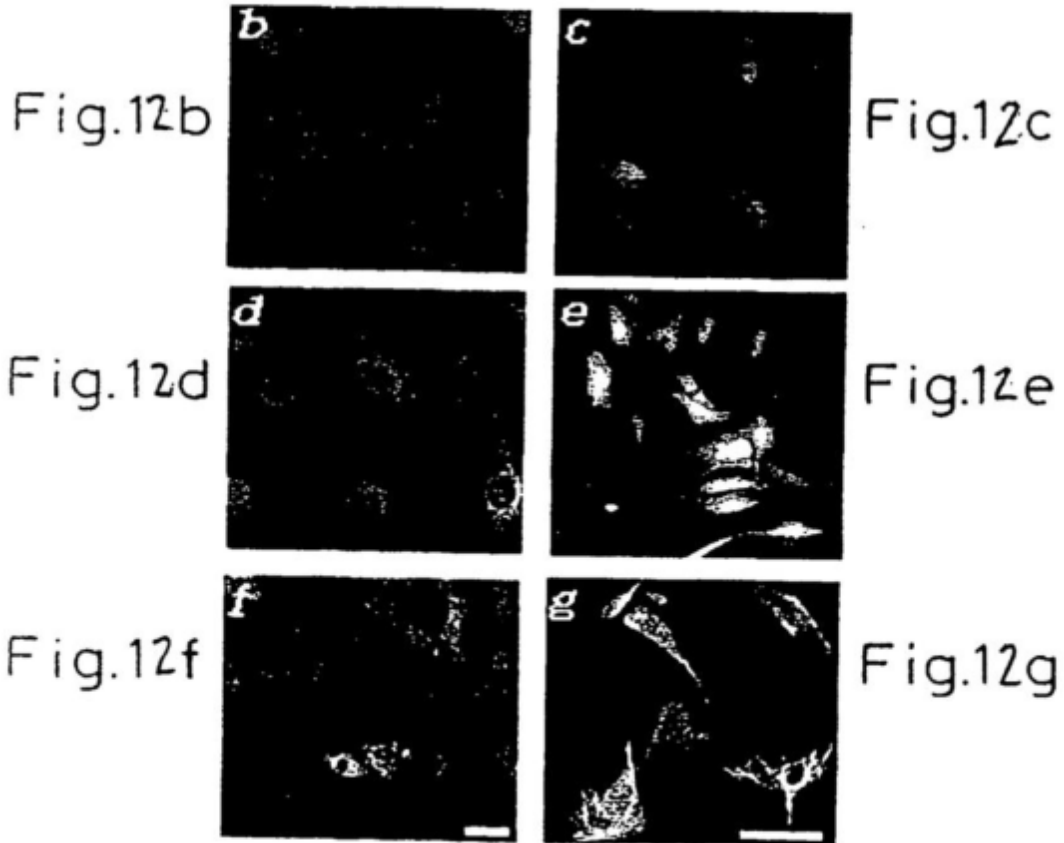
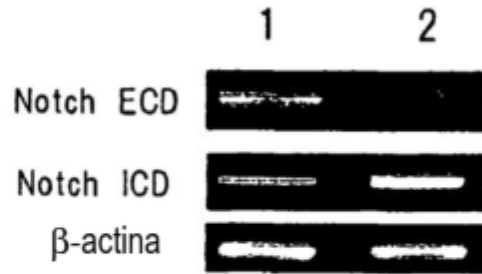


Fig.12h

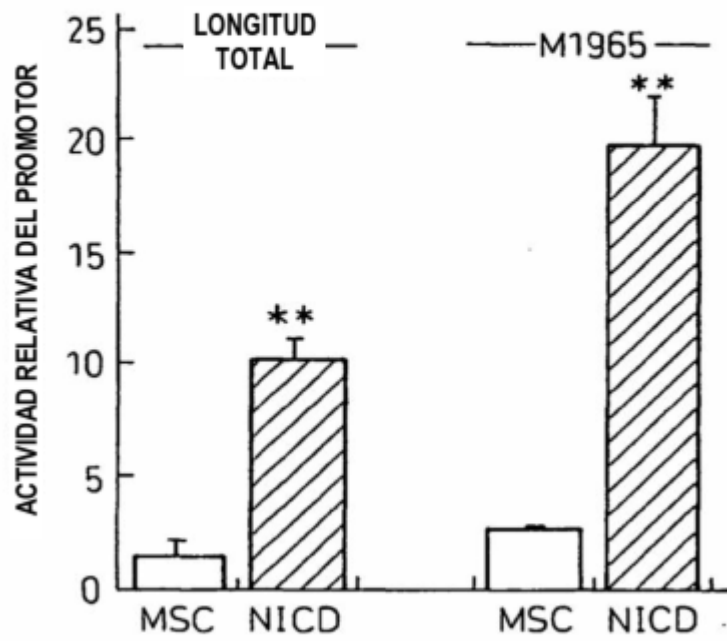
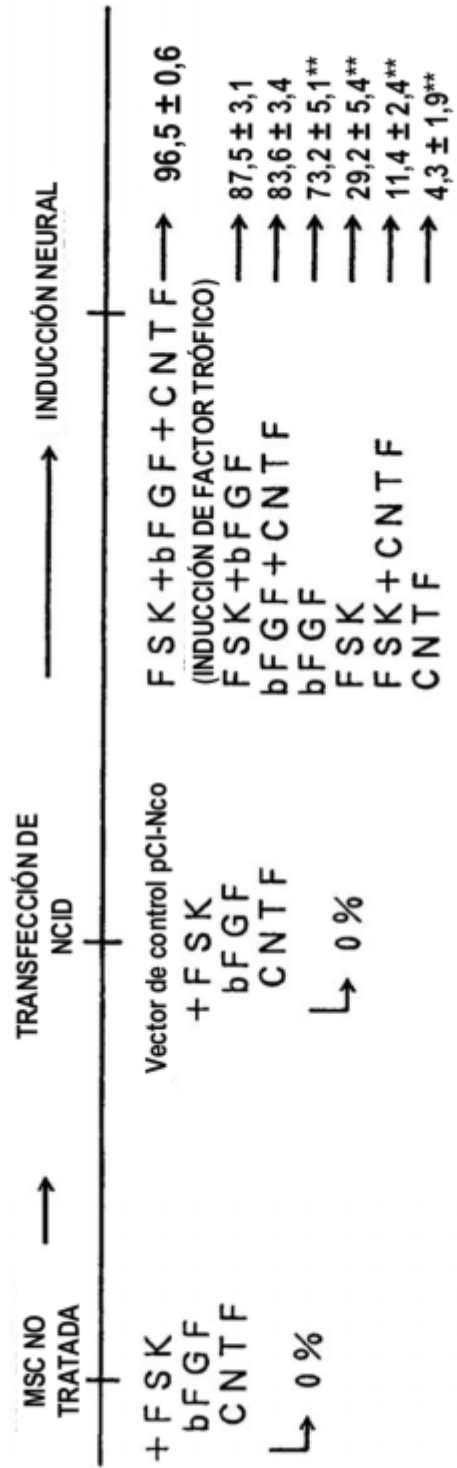


Fig.13



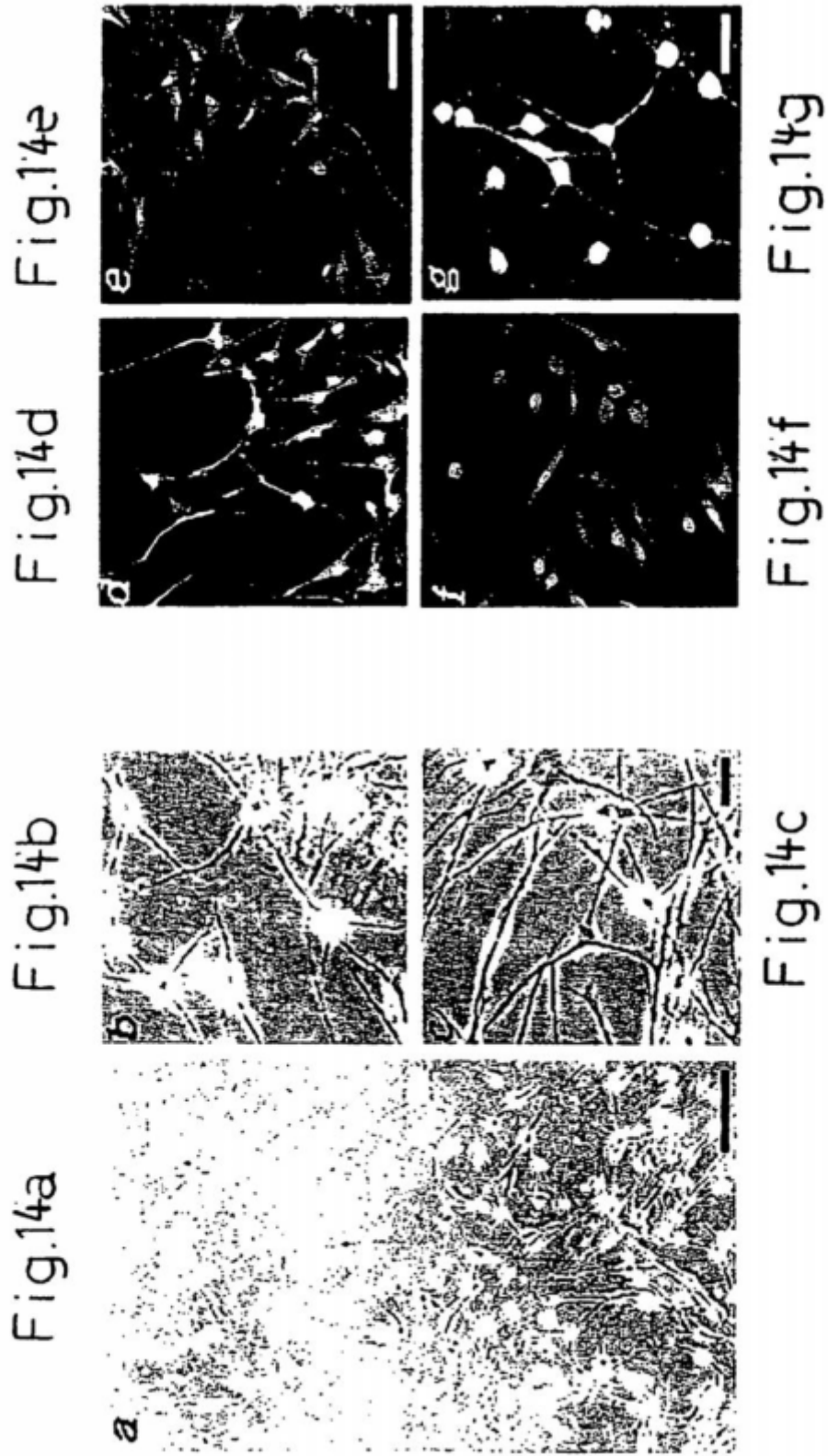




Fig.14h

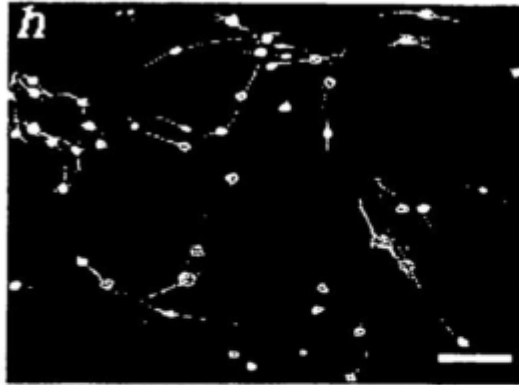


Fig.14i

Fig.14j

Fig.14k

Fig.14l

(1)

(2)

B  
1 2

N  
1 2

M  
1 2

B  
1 2

N  
1 2

M  
1 2

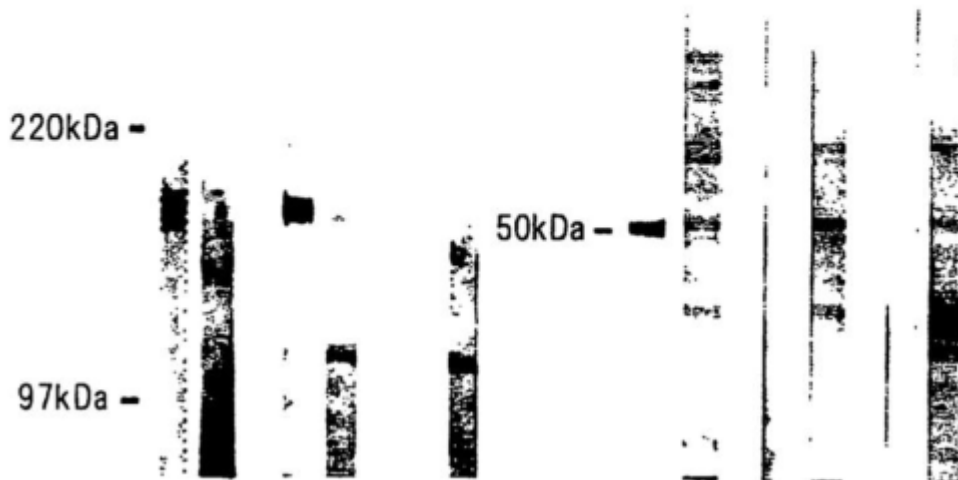


Fig.14m

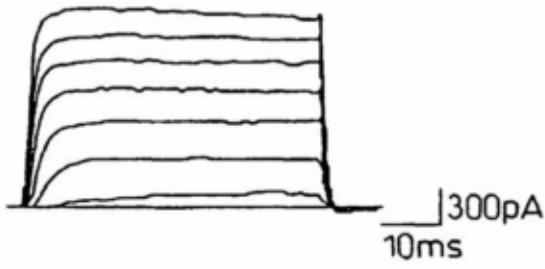


Fig.14n

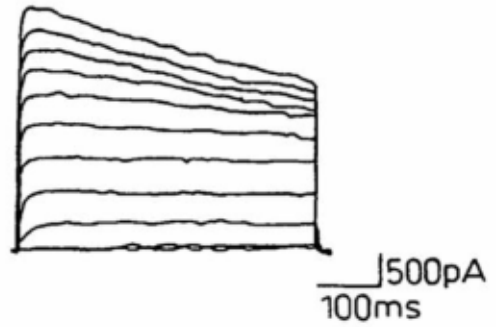


Fig.14o



Fig.14p



Fig.14q



Fig.15

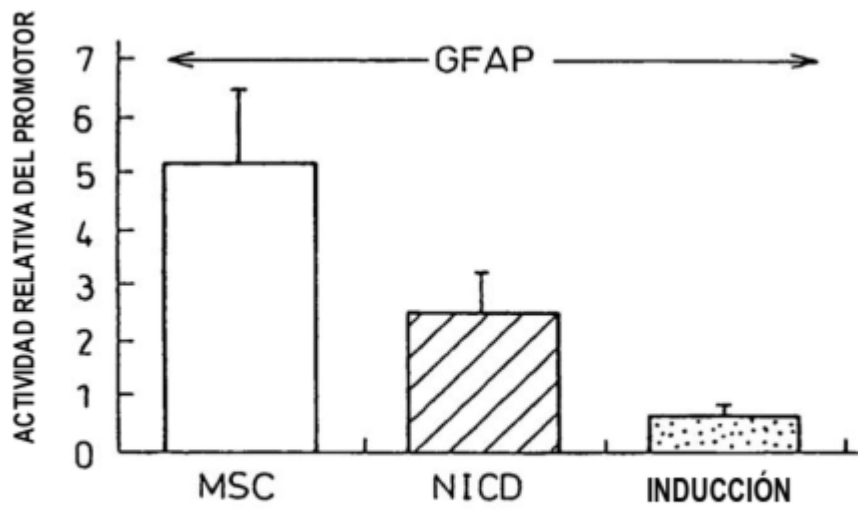
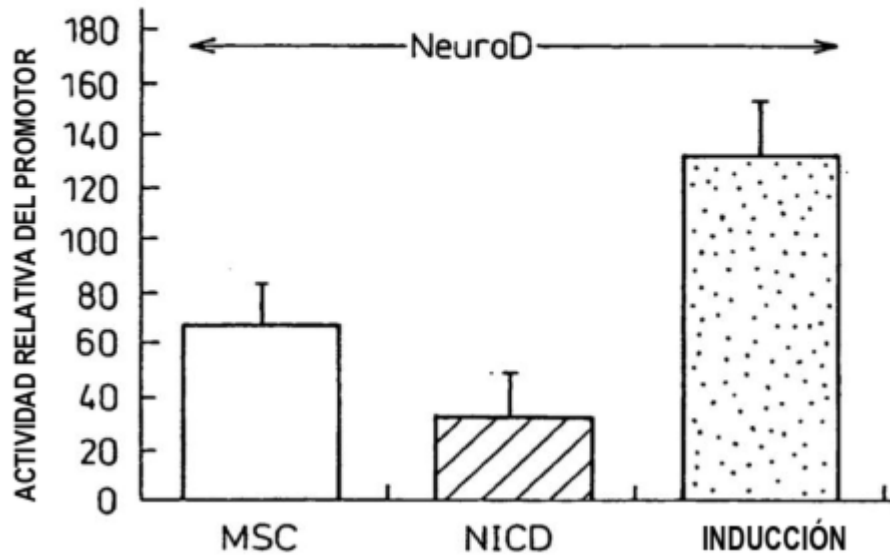


Fig.16a

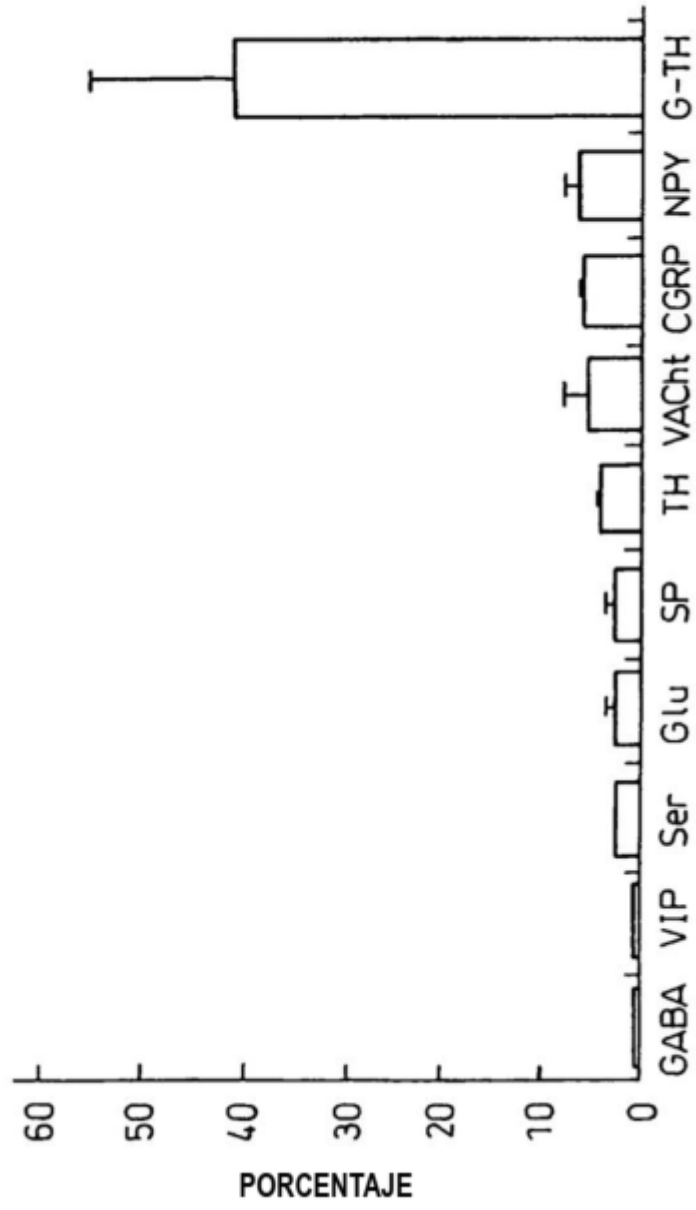


Fig.16b

Fig.16c

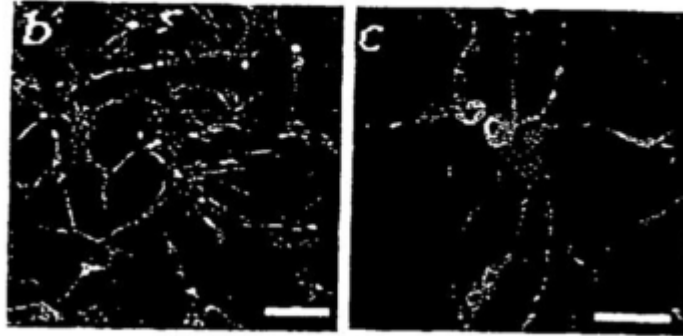


Fig.16d

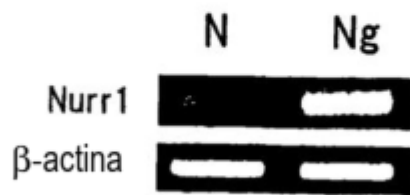


Fig.16e

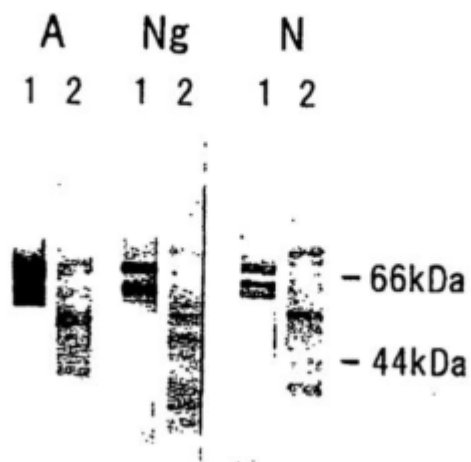


Fig.16f

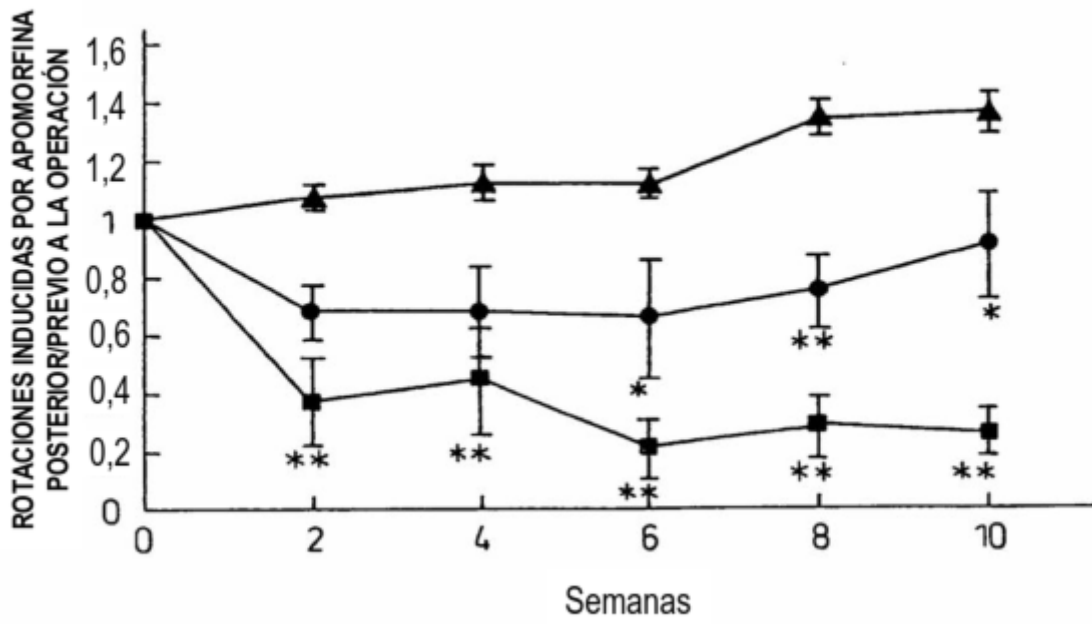


Fig.16g

Fig.16h

Fig.16i

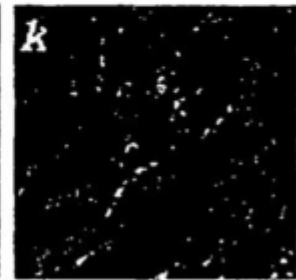
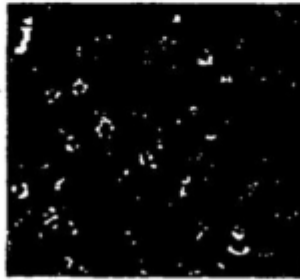
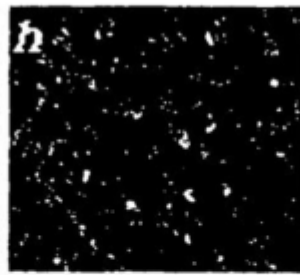
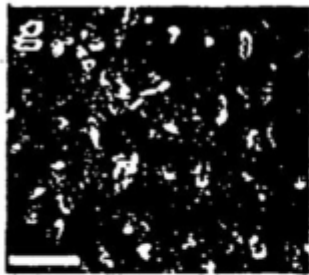


Fig.16j

Fig.16k

Fig.16l

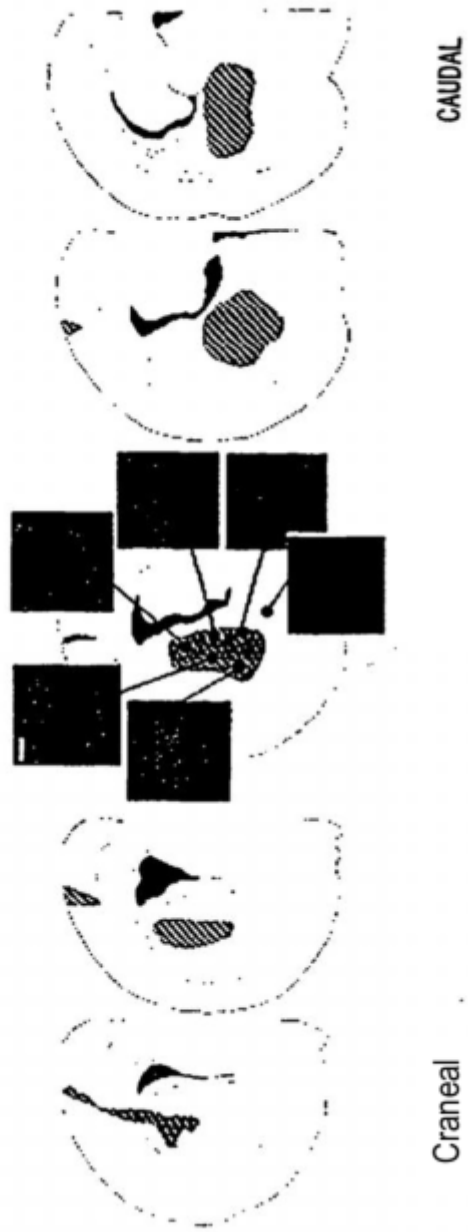




Fig.16m

