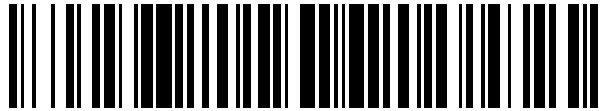


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 772**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0797 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2005 E 05752405 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 1758986**

54 Título: **Células madre neuronales**

30 Prioridad:

09.06.2004 GB 0412887

14.02.2005 GB 0503044

17.03.2005 GB 0505510

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

28.01.2016

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY
OF EDINBURGH (100.0%)
OLD COLLEGE SOUTH BRIDGE
EDINBURGH EH8 9YL, GB**

72 Inventor/es:

**CONTI, LUCIANO;
POLLARD, STEVEN MICHAEL y
SMITH, AUSTIN GERARD**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 557 772 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células madre neuronales

5 La presente invención se relaciona con células madre neuronales y con condiciones y métodos de cultivo para cultivar células madre neuronales (células NS o NSCs) con el fin de promover la división simétrica y la autorrenovación de las células madre. También se divulgan composiciones, poblaciones celulares, líneas celulares y células madre neuronales individuales.

10 A la vez que se ha pretendido aislar células madre neuronales *in vitro* a partir de una variedad de fuentes no ha sido posible, hasta la fecha, expandir las células en cultivo a gran escala en un estado no diferenciado de división simétrica. La expansión a largo plazo de las células en este estado sería altamente deseable, tanto desde un punto de vista experimental como terapéutico. El disponer de poblaciones de células madre neuronales puras permitiría la diferenciación dirigida hacia los tres tipos celulares de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

15 Un método conocido para cultivar células madre neuronales no obstante como un componente menor en una población heterogénea de células, es el sistema de neuroesferas. Este sistema involucra el paso seriado de agregados de células heterogéneas de las cuales solo una pequeña fracción son células madre neuronales verdaderas. La mayoría de las células en las neuroesferas son progenitores comprometidos.

Hay muchos reportes de la heterogeneidad e inestabilidad de las neuroesferas, y su capacidad limitada para generar neuronas (e.g. Morshead et al., 2002). Rappa et al., Neuroscience 2003 reportan un método para transfectar células en neuroesferas sembrándolas sobre fibronectina durante 1-7 días y luego reformando las neuroesferas pero no proveen caracterización significativa de las células madre, si las hay, dentro de las neuroesferas.

20 Suslov et al., 2002 proveen datos claros de que el sistema de neuroesferas es demasiado heterogénea para permitir una caracterización significativa de cualquier célula madre que este dentro de ellas. Las principales conclusiones son que no solamente hay una heterogeneidad dentro de las neuroesfera –“que exhiben una diversidad de linaje celular neuronal intraclonal, esto es, contienen, además de NSCs, progenitores neuronales y gliales en diferentes estados de diferenciación”- sino que también Suslov et al. 2002 proveen datos claros de que el sistema de neuroesferas es demasiado heterogénea para permitir una caracterización significativa de cualquier célula madre dentro del mismo. Las principales conclusiones es que no solamente hay heterogeneidad con las neuroesferas -“que exhiben diversidad en linaje celular neuronal intraclonal, esto es, contienen además de NSCs, progenitores neuronales y gliales en diferentes estados de diferenciación”- sino que también existen grandes diferencias en los perfiles de expresión genética entre diferentes líneas de neuroesferas clonales. La perfilación de la expresión genética de Suslov no constituye una definición de células madre dentro de neuroesferas como se confirmó explícitamente en el artículo: “los fenotipos moleculares que fueron obtenidos indican que las NSCs clonogénicas en nuestro sistema son heterogéneas, con subconjuntos que reflejan distintos compromisos de desarrollo neuronales”-.

35 Abundante literatura en este campo describe las propiedades de las células gliales. Skogh et al. MCN 2001 describe cultivos de células gliales que expresan GFAP y variabilidad en tinción para RC2 y nestina –nótese que el GFAP de ratón no se expresa en glia radial *in vivo* (Rakic, 2003). Reportan que sus células no expresan Pax6, la marca principal de las glías radiales neurogénicas (Malatesta et al., 2001, 2003), y no examinan otros marcadores gliales radiales. Tienen cultivos heterogéneos y no llevan a cabo análisis clonales.

40 Otros recuentos de glías radiales *in vitro* los consideran intermediarios de diferenciación o productos terminales. Así Bibel et al (Nat Neurosci, 2004) reportan la generación de neuronas a partir de células ES a través de una célula tipo glia radial transiente, y Gregg y Weiss (J Neurosci, 23: 11587-601, 2003; Publicación de Patente de los Estados Unidos 2003/0032181) describen “la diferenciación” de células en neuroesferas en glías radiales. Hartfuss et al (Dev Biol, 2001) muestran que las glías radiales están presentes en las neuroesferas.

45 Gregg y Weiss encontraron que las glías radiales son productos de diferenciación de neuroesferas, concluyendo que “estos resultados sugieren que las células madre neuronales pueden dar lugar a RGCs (células gliales radiales) y que la migración guiada por RGC puede ser recapitulada en el CNS adulto”. La visión prevalente es que las glías radiales son uno de los tipos celulares diferenciados que surgen de las neuroesferas.

50 Lior y Yu (Glia, 2003) muestran que la diferenciación celular de glías radiales puede ser obtenida a partir de células ES, pero como sucede con otros reportes en este campo no informa acerca de la expansión de las glías radiales neurogénicas.

Gobbel et al. Brain Res 2003 reportan la propagación de células de ratas multipotentes “como aglomeraciones esféricas de células que crecen unidas de manera precaria al sustrato”, esto es, no como monocapas uniformes. Adicionalmente, el resumen de este artículo concluye “estas células producen células postmitóticas en

aproximadamente dos de tres divisiones, haciendo así difícil la expansión". Hay una extensa diferenciación gliogénica en sus cultivos, pero los autores encuentran "relativamente pocas" (<3%) neuronas. No proveen fenotipos moleculares de sus células.

5 La WO 01/30981 describe cultivos de células que pueden diferenciarse en neuronas. Pero estas células son positivas para GFAP y nestina, están descritas como células astrogiales y son una población mixta, relativamente impura.

10 El concepto de que las células madre requieren microambientes celulares específicos, o nichos, es una ortodoxia en la biología de las células madre. Es sabido, aunque no siempre reconocido, que en las neuroesferas las células madre constituyen solamente una pequeña fracción de las células totales entre los progenitores, células blast y progenie diferenciada inmadura. Esta agregación de tipos celulares mixtos puede constituir un nicho para la pequeña proporción de células dentro de las que pueden estar las células madre.

No hay reportes en la literatura de la derivación de poblaciones homogéneas de células madre neuronales a partir de células ES, derivándose solo células precursoras neuroepiteliales que pueden ser expandidas de manera transiente antes de convertirse en células restringidas gliales (por ejemplo Brustle et al., Science 1999).

15 Por lo tanto, existe un cierto número de problemas en el arte.

20 Todos los reportes reconocen que sus cultivos son heterogéneos. No ha sido posible utilizar el sistema de neuroesferas para mantener cultivos a gran escala de células madre neuronales en un estado de división simétrica y no diferenciado. Otros intentos para cultivar grandes números de células madre neuronales no han tenido éxito más allá de 5-20 replicaciones, y han sido impedidos también por una alta tendencia de las células a diferenciarse. Una excepción es el trabajo sobre células madre de hipocampo de rata adulta, pero estas son cariotípicamente anormales y forman neuronas con baja eficiencia.

Mientras que son conocidos los precursores del desarrollo neuronal transiente, no se han aislado ni purificado células madre autorrenovables, permanentes o casi permanentes.

25 Se desea derivar células madre neuronales a partir de células ES, y luego mantener estas células madre neuronales en cultivos puros, pero esto hasta el momento no es posible. Se ha deseado derivar células madre neuronales a partir de células ES para trasplante pero la persistencia de ES y otras células no neuronales en poblaciones celulares derivadas de ES conocidas da lugar a tumores en los animales receptores. Se desea adicionalmente obtener poblaciones de células madre neuronales a partir de CNS fetal y postnatal.

30 Los intentos para producir cultivos puros de células madre neuronales no han divulgado o sugerido poblaciones de células madre neuronales con suficiente pureza para permitir una replicación múltiple de las células a la vez que se mantiene la homogeneidad y pureza (por ejemplo Vescovi et al., 1999; Maric et al., 2003; Ying et al., 2003b; Gritti et al., 1999 US 2004/107454).

35 Un completo entendimiento de los eventos moleculares y celulares que controlan el comportamiento de las células madre neuronales es esencial, no solamente como una ruta para entender la embriogénesis, sino también como un marco dentro del cual puedan aislarse las células madre neuronales, expandirse y controlarse para futuras aplicaciones terapéuticas. Los métodos de cultivo para las células madre neuronales conocidos en el arte son, por las razones descritas más arriba, inadecuados para el uso en tales investigaciones y aplicaciones terapéuticas. Por lo tanto es deseable desarrollar métodos y condiciones para cultivar grandes cantidades de células madre neuronales que permitan que las células sean mantenidas en un estado autorrenovador, de división simétrica.

40 Particularmente es deseable tener medios de cultivo definidos, que satisfagan los requerimientos anteriores puesto que el uso de medios definidos es altamente deseable en un entorno clínico.

La presente invención resuelve uno o más de los problemas antes mencionados.

45 En más detalle, la presente invención provee un método para promover la división simétrica de células madre neuronales (NS), que comprende cultivar dichas células madre neuronales unidas a un sustrato en un cultivo de monocapa adherente en un medio que contiene:-

(a) un agonista de un receptor de EGF; o

(b) un agonista de un receptor EGF y un agonista de un receptor de FGF, en donde al menos 80% de dichas células son células madre neuronales que se dividen de manera simétrica y en donde no más del 1% de las células son positivas para la expresión de marcadores para astrocitos, neuronas y oligodendrocitos maduros.

50 En realizaciones preferidas, las células son cultivadas en la ausencia de suero, por ejemplo, en un medio que está

libre de suero y libre de extracto de suero. Las células son cultivadas unidas a un sustrato, denominado de otra forma como cultivo adherente. También se prefiere que el medio de cultivo contenga insulina u otro agonista de un receptor de insulina sobre las células.

5 En el contexto de la invención, será evidente que el término “promover” incluya el mantenimiento de las células madre neuronales en un estado de división simétrica.

De acuerdo con otro aspecto divulgado aquí se proveen medios de cultivo que soportan y preferiblemente promueven la autorrenovación y división simétrica de células madre neuronales en un estado no diferenciado para muchas replicaciones. El medio sustancialmente evita la división asimétrica y la diferenciación de células madre neuronales.

10 También se divulgan métodos para obtener células madre neuronales, y específicamente como se define en los protocolos aquí, las células obtenidas por tales métodos.

También se divulgan poblaciones celulares neurales, composiciones, líneas celulares, líneas celulares clonogénicas, y células madre neuronales individuales, que comprenden células madre neuronales que se autorrenuevan, y dividen de manera simétrica.

15 Aspectos adicionales divulgados aquí conciernen a los métodos para promover la diferenciación de células ES no humanas a células madre neuronales, y métodos para mantener las células madre neuronales obtenidas en un estado sustancialmente no diferenciado, con autorrenovación y división simétrica.

Sección de definiciones

“Células madre neuronales”

20 El término “células madre neuronales”, tal como se utiliza en la presente especificación, describe una célula que es capaz de experimentar más de 20-30 divisiones celulares a la vez que mantiene la potencia para generar tanto neuronas como glia. Preferiblemente, dichas células son capaces de experimentar más de 40, más preferiblemente más de 50, lo más preferiblemente tales ilimitadas divisiones celulares.

25 Las células madre neuronales son capaces de dividirse bien sea simétrica o asimétricamente. Cuando se dividen simétricamente, las células madre neuronales se dividen para formar dos células madre neuronales hijas o dos progenitores comprometidos, aunque al menos que se especifique otra cosa por división simétrica se entiende aquí autorrenovación simétrica; cuando se dividen asimétricamente, las células madre neuronales se dividen para formar una célula madre neuronal hija y una progenitora comprometida (por ejemplo, bien sea una neurona o una progenitora glial).

30 Las células madre neuronales de la presente invención pueden ser descritas como glías radiales, y han demostrado expresar al menos uno (y preferiblemente todos) de los marcadores gliales radiales RC2, 3CB2, GLAST, BLBP y Pax6. Preferiblemente, las células madre neuronales de la invención expresan RC2, 3CB2 y GLAST. Más preferiblemente, las células expresan RC2, 3CB2, GLAST, y al menos uno de BLBP o Pax-6. Las células madre neuronales de la invención también pueden ser caracterizadas porque son positivas para la expresión de al menos uno (preferiblemente todos) de los marcadores precursores neuronales nestina o vimentina, el antígeno de LewisX, Musashi-1 o prominina, y negativas para la expresión de al menos uno (preferiblemente ambos) de Oct-4 o Nanog (véase también Ejemplos 1-3).

35 40 Las células madre neuronales de la invención son por definición multipotentes, esto es son capaces de diferenciarse en un cierto número de tipos celulares neuronales (por ejemplo neuronas/glia). Los ejemplos a continuación confirman que las células madre neuronales cultivadas de acuerdo con los métodos de la invención retienen su potencia y son capaces de diferenciarse en todos los tipos celulares esperados.

“Fuentes de células madre neuronales”

45 Es posible derivar células madre neuronales de la invención a partir de una amplia variedad de fuentes. Por ejemplo las células madre neuronales pueden ser derivadas directamente de embriones, de tejido adulto, de tejido fetal, o de células madre (ES) de embrión (bien sea células ES tipo silvestre o modificadas genéticamente). Preferiblemente, las células madre neuronales de la invención son derivadas a partir de células ES de ratón o son derivadas de células fetales de ratón o humanas.

50 Las células madre neuronales de la invención pueden ser derivadas a partir, entre otros, humanos, primates, roedores y aves. Preferiblemente, las células madre neuronales son derivadas de mamíferos, especialmente ratones, ratas y humanos. En el caso de las células madre neuronales humanas, la invención no incluye células

derivadas de embriones humanos.

“Familia de receptores de EGF”

5 El término “familia de receptores de EGF”, tal como se utiliza en la presente especificación, describe una familia de receptores (usualmente receptores homodiméricos o heterodiméricos) que pueden ser activados por una familia de factores de señalización de EGF. Los receptores están constituidos de una familia de cuatro glicoproteínas transmembrana altamente homólogas: ErbB-1 (también conocida como EGF-R), ErbB-2, ErbB-3 y ErbB-4.

La referencia a un “receptor de EGF” incluye cualquier complejo receptor monomérico o dimérico de la familia de receptores de EGF.

10 Cada receptor tiene un dominio de enlazamiento aligando extracelular, un dominio de barrido de membrana hidrófobo individual, y un dominio de tiroxina quinasa citoplasmático, que es responsable por la transducción a través de la actividad del receptor de tiroxina quinasa tipo 1. El enlazamiento aligando de cualquiera de los receptores da como resultado la dimerización y la autofosforilación del receptor, seguidas por la fosforilación de un cierto número de sustratos celulares que llevan a una disposición de efectos biológicos. La dimerización del receptor puede ser disparada por diversos estímulos, incluyendo ligandos del receptor y estímulos ambientales tóxicos tales como radiación UV. Cada receptor dimérico inicia una ruta de señalización distinta reclutando diferentes proteínas efectoras que contienen SH2. Por ejemplo, el dímero de EGF-R puede complejarse con la proteína adaptadora Grb, acoplada a un factor de liberación del nucleótido guanina, SOS. El complejo Grb-SOS puede bien enlazarse directamente a los sitios fosfotirosina en el receptor, o indirectamente a través de Shc. Estas interacciones proteínicas llevan el SOS a proximidad cercana con Ras, permitiendo la activación de Ras. Esto activa subsecuentemente la ruta de señalización de ERK y JNK que a su vez activa los factores de transcripción, tales como c-fos, AP-1 y Elk-1, que regulan la expresión genética. Los receptores de EGF pueden activar también la ruta de señalización de PLCy.

“Receptor de FGF”

25 El término “receptor de FGF”, tal como se utiliza en la presente especificación, describe cualquier miembro de la familia de tirosina quinastas receptoras de FGF transmembrana. Hay cuatro principales isotipos de estos receptores, FGFR1, 2, 3 y 4, y son conocidos por actuar en asociación cercana con los sistemas de heparina y sulfato de heparano (HS). La referencia a un receptor de FGF incluye cualquier complejo monomérico o dimérico (homo o heterodímero) de la familia de receptores de FGF.

30 Las rutas de señalización celular asociadas con los receptores de FGF incluyen la ruta de la MAP quinasa, y la ruta de PLCy.

“Medios de cultivo”

Los medios de cultivo utilizados en la presente invención comprenden preferiblemente un medio basal, opcionalmente suplementado con componentes adicionales.

35 El medio basal es un medio que suministra fuentes esenciales de carbono y/o vitaminas y/o minerales a las células madre neuronales. El medio basal está generalmente libre de proteínas y es incapaz por sí mismo de soportar la división autorrenovable/simétrica de células madre neuronales.

40 Preferiblemente, los medios de cultivo usados en la invención no contienen componentes que son indefinidos (por ejemplo, suero y/o células alimentadoras), es decir componentes cuyo contenido es desconocido o que pueden contener factores indefinidos o variables que no están especificados. Una ventaja de utilizar medios definidos completamente, libres de suero y libres de extractos de suero, es que pueden derivarse protocolos eficientes y consistentes para cultivo y manipulación subsecuente de células madre neuronales.

“Superficies de cultivo”

45 Las superficies típicas para cultivo de las células madre neuronales en todos los aspectos de la invención son superficies de cultivo reconocidas en este campo como útiles para el cultivo de células, y estas incluyen superficies de plásticos, metal, composiciones, aunque se utiliza comúnmente una superficie tal como una placa de cultivo de tejidos plástica, disponible comercialmente de manera amplia. Tales placas tienen frecuentemente unos pocos centímetros de diámetro. Para escalar, este tipo de placa puede ser utilizada en diámetros mucho más grandes y pueden usarse unidades de placa repetidas.

50 La superficie de cultivo puede comprender adicionalmente una proteína de adhesión celular, usualmente colocada como recubrimiento sobre la superficie. Los receptores u otras moléculas presentes en las células madre se enlazan

a la proteína o a otro sustrato de cultivo celular y esto promueve la adhesión a la superficie y promueve el crecimiento. Se prefieren particularmente placas recubiertas con gelatina.

5 La presente invención se basa sobre la observación de que al cultivar células madre neuronales unidas a sustratos en medios que comprenden agonistas del receptor de EGF, o agonistas de ambos receptores EGF y FGF-2, se promueve la división simétrica ilimitada de las células madre, y se evita sustancialmente su diferenciación en neuronas/glia.

Los diversos aspectos de la invención y la presente divulgación se discuten ahora en detalle.

10 Un primer aspecto de la invención provee un método para promover la división simétrica de células madre (NS) neuronales, que comprenden cultivar dichas células madre unidas a un sustrato en un cultivo de monocapa adherente en un medio que contiene:

(a) un agonista de un receptor EGF; o

(b) un agonista de un receptor de EGF y un agonista de un receptor de FGF, en donde al menos 80% de dichas células son células madre neurales de división simétrica y en donde no más de 1% de las células son positivas para la expresión de marcadores para astrocitos, neuronas y oligodendrocitos maduros.

15 Otro método divulgado aquí, para obtener células madre neuronales comprende:

(1) obtener una población mixta de células que contienen una célula madre neuronal;

(2) resembrar las células en un medio que comprende (a) un activador de una ruta de señalización corriente abajo desde un receptor de la familia EGF; y (b) un activador de una ruta de señalización corriente abajo de un receptor de FGF;

20 (3) cultivar las células;

(4) recolectar los agregados de células;

(5) resembrar las células en un medio que comprende (a) un activador de una ruta de señalización corriente abajo para un receptor de la familia de EGF; y (b) un activador de una ruta de señalización corriente abajo de un receptor de FGF;

25 (6) cultivar las células;

(7) resembrar las células como células individuales en un medio que contiene (a) un activador de una ruta de señalización corriente abajo de un receptor de la familia de EGF; y (b) un activador de una ruta de señalización corriente abajo de un receptor de FGF.

30 El método puede ser suplementado seleccionando células que expresen un marcador específico de células madre neuronales, por ejemplo por expresión de enlazamiento de un marcador tal a un promotor preferencialmente activo en células madre neuronales en comparación con su expresión en progenies diferenciadas de las mismas. Preferiblemente el método comprende replicar las células a o por debajo de 65% de confluencia, más preferiblemente a o por debajo de 55% de confluencia, especialmente por debajo de 50% de confluencia.

35 Otras características preferidas de los métodos de la invención son como se define en los protocolos de la invención en el Ejemplo 9.

Los cultivos de la invención son cultivos adherentes, esto es, las células están unidas a un sustrato.

40 El sustrato es típicamente una superficie en un recipiente de cultivo u otro soporte físico, por ejemplo, una placa de cultivo, un matraz, una perla u otro portador. Preferiblemente, el sustrato está recubierto para mejorar la adhesión de las células y recubrimientos adecuados incluyen laminina, polilisina, poliornitina y gelatina. Las células se hacen crecer en un cultivo de monocapa y no de suspensión y no como bolas o racimos de células. A densidades más altas, las células pueden empezar a apilarse una sobre otra, pero los cultivos son esencialmente monocapas o comienzan como monocapas, unidas al sustrato.

45 Una o más rutas de señalización corriente abajo de un receptor de la familia de EGF pueden ser activados preferiblemente utilizando un agonista de un receptor de la familia de EGF. Un agonista de un receptor de la familia de EGF es de manera adecuada un miembro de la familia de EGF de factores de señalización, y preferiblemente se

enlaza al dominio extracelular del receptor de EGF. El término "agonistas" también abarca imitadores, proteínas de fusión, anticuerpos para o quimeras de la familia EGF de factores de señalización, y fragmentos, variantes y derivados de los mismos, capaces de activar los receptores de la familia EGF.

5 Las moléculas que constituyen la familia EGF de factores de señalización pueden ser caracterizadas porque contienen al menos un dominio tipo EGF. Este dominio puede ser definido por 6 residuos de cisteína que generan tres bucles de péptidos a través de la formación de puentes disulfuro.

Agonistas específicos capaces de actuar a través de los receptores de la familia de receptores EGF, y así de activar las rutas corriente abajo de estos receptores, incluyen EGF, TGF- α , amfirregulina, EGF de enlazamiento a heparina, epirregulina, betacelulina, neurorregulinas 1-4, y Cripto-1. Preferiblemente, el agonista es EGF en sí misma.

10 Una o más rutas de señalización corriente abajo de un receptor de FGF pueden ser activadas utilizando un agonista de un receptor de FGF. Un agonista de un receptor de FGF es adecuadamente un miembro de la familia de FGF de factores de señalización. El término "agonista" también pretende abarcar imitadores, proteínas de fusión, anticuerpos para o quimeras de la familia FGF de factores de señalización, y fragmentos, variantes y derivados de los mismos, capaces de activar los receptores de FGF.

15 Preferiblemente, el agonista del receptor de FGF es FGF-2, o laminina-FGF.

Será evidente que la activación de una ruta de señalización corriente abajo de un receptor de la familia de receptores EGF o de un receptor FGF también puede efectuarse mediante receptores constitutivamente activos, o por efectores corriente abajo (por ejemplo, MEK o Bcl2) de las respectivas rutas de transducción de señal. En una realización particularmente preferida de la invención, las rutas de señalización son activadas por moléculas pequeñas permeables a las células, que pueden sobrepasar los receptores respectivos y activar las rutas de señalización directamente. Así, en la presente invención, el término "activador" abarca todas las moléculas capaces de activar una ruta de señalización corriente abajo de los receptores de la familia EGF de receptores, o de un receptor FGF.

25 La efectividad de los activadores en el mantenimiento de los cultivos celulares de células madre de la presente invención está demostrada en los ejemplos 1-1 y 1-2 más abajo. Aquí, se mantienen poblaciones voluminosas y clonales de células madre neuronales en medios que comprenden EGF y FGF-2 y pueden ser replicados muchas veces. Además, hay una diferenciación despreciable/ninguna de las células madre neuronales, como lo demuestra la presencia ubicua de los marcadores de células madre neuronales en las poblaciones celulares probadas (véanse Ejemplo 1-3), y retienen su potencia y son capaces de diferenciarse en todos los tipos celulares esperados (véanse Ejemplos 1-4).

35 Así, la invención provee un método eficiente para mantener grandes poblaciones de células madres neuronales, en un estado no diferenciado, de autorrenovación, de división simétrica. Las composiciones de la invención incluyen composiciones que comprenden células madre neuronales, en donde las células madre neuronales están en un cultivo adherente y al menos 50%, 70% u 80% de las células en la composición son células madre neuronales. La proporción de células madre neuronales es preferiblemente de manera adicional al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, muy preferiblemente al menos 97%. Adicionalmente, las células madre neuronales de la invención pueden ser replicadas extensivamente. Es preferible que las células madre neuronales hayan sido replicadas al menos 30 veces, más preferiblemente al menos 60 veces, muy preferiblemente al menos 90 veces. Todavía adicionalmente, en una población de células neuronales de la invención al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, de dichas células son células madre neuronales de división simétrica. Las células en esta composición pueden ser caracterizadas adicionalmente por cualquiera y o todas las características de la invención, solas o en combinación.

También se divulgan composiciones, que comprenden:

células madre neuronales;

45 un activador de una ruta de señalización corriente abajo de un receptor de la familia de EGF; y

un activador de una ruta de señalización corriente abajo de un receptor de FGF.

Las composiciones comprenden preferiblemente un medio basal. También es preferible que al menos 80%, preferiblemente 90%, más preferiblemente 95% de las células madre neuronales en la composición sean células madre neuronales de división simétrica.

50 Tanto en las poblaciones como en las composiciones de células neuronales descritas más arriba, las células madre neuronales están preferiblemente libres de material genético exógeno que codifique un oncógeno, esto es que no

han sido sometidas a estrategias de inmortalización. En realizaciones específicas, las células madre neuronales de las poblaciones/composiciones están caracterizadas porque son positivas para la expresión de al menos uno de:

Los marcadores de precursor neuronal nestina o vimentina;

Sox-2;

5 los marcadores específicos para células gliales radiales RC2, 3CB2, GLAST, BLBP o Pax-6;

el antígeno de LewisX;

Musashi-1; y

Prominina;

y son negativas para la expresión de al menos uno de:

10 Oct4, y

Nanog.

Preferiblemente, las células son positivas para la expresión de RC2, 3CB2 y GLAST. En otras realizaciones, (opcionalmente además del perfil marcador precedente) las células son positivas para la expresión de al menos uno de BLBP, Pax-6, los marcadores de precursores neuronales nestina o vimentina, el antígeno de LewisX, Musashi-1 o prominina. En realizaciones particularmente preferidas (y opcionalmente además de los perfiles marcadores precedentes) las células son negativas para la expresión de al menos uno de Oct4 o Nanog.

En realizaciones adicionales (opcionalmente además de los perfiles marcadores anteriores), las células son positivas para la expresión de Sox-2, y negativas para la expresión de Sox-1. En ciertas composiciones/poblaciones que comprenden células NS derivadas de ratón, no más de 1% de las células son positivas para la expresión de GFAP o β III tubulina, confirmando por lo tanto que hay una diferenciación despreciable de las células a astrocitos o neuronas. En otras composiciones/poblaciones, no más del 1% de las células son positivas para la expresión de marcadores para astrocitos, neuronas u oligodendrocitos maduros.

La invención también ha sido llevada a cabo con células de rata. Así, hemos tomado células de CNS de rata y utilizando los métodos de la invención hemos obtenido un cultivo de células madre neuronales de rata que tiene las propiedades de (i) alta pureza, típicamente por encima de 80% o 90% de células madre neuronales de rata, y (ii) ser células con una alta proporción (un mínimo de 50%) de las cuales después de muchas duplicaciones, en exceso de 50, en exceso de 100, incluso en exceso de 200 duplicaciones, retenían la capacidad de formar neuronas y glias. En las células de ratas existentes en el arte, las células de las ratas fueron claramente de alta heterogeneidad y solamente del hipocampo de adultos. No hemos obtenido células de esta fuente, pero en vez de ello las hemos obtenido de CNS de ratas. Es notable en este aspecto que el método fue trabajado a través de todas las tres especies –rata, ratón, humanos. En general se ve que si es una célula individual forma una colonia de células madre neuronales siguiendo los métodos de la invención pueden obtenerse entonces neuronas a partir de las células en esa colonia. Esto se mide por ejemplo tiñendo separadamente (i) núcleos (esto es, tiñendo toda la células) y (ii) neuronas (esto es solamente neuronas). Comparando los números relativos de las células teñidas, puede calcularse la proporción de células que forman neuronas.

Un segundo aspecto divulgado aquí se relaciona con un método para la preparación de una célula madre neuronal, que comprende (i) cultivar células madre neuronales de acuerdo con los métodos descritos anteriormente, obteniendo de esa manera un cultivo de células madre neuronales, y (ii) aislar una célula madre neuronal a partir de dicho cultivo. Preferiblemente, la célula madre neuronal aislada es una que ha sido acondicionada para dividirse de manera simétrica.

Puede utilizarse un cierto número de fuentes de células a partir de las cuales derivar las células madre neuronales. En un método, las células son obtenidas a partir del tejido nervioso de un animal y cultivadas de acuerdo con la invención, para obtener un cultivo de células madre neuronales de división simétrica. El tejido nervioso puede ser de tejido adulto o fetal. El tejido nervioso puede ser de CNS, y pueden obtenerse poblaciones de células madre neuronales de división simétrica a partir de extractos tomados de CNS tanto adulto como fetal, tanto de humano como de ratón. El tejido nervioso comprende preferiblemente células identificadas por tener un fenotipo glial radial, por ejemplo se han identificado células que tienen este fenotipo en extractos de cerebelo y retina, los cuales representan ambas fuentes adicionales adecuadas de células. Las células madre neuronales pueden ser obtenidas a partir de tejido nervioso enfermo, útil para modelar la enfermedad, por ejemplo, pueden obtenerse células a partir de tumores cerebrales para este propósito.

Una opción es utilizar el método para derivar células madre neuronales a partir de un individuo enfermo y luego (i) usar esas células para ensayos, o (ii) llevar a cabo modificaciones genéticas antes del trasplante de las células de regreso a ese individuo. Pueden así obtenerse células a partir de un individuo con un trastorno neurodegenerativo, incluyendo los ejemplos enfermedades de Alzheimer y de Parkinson; o con un tumor cerebral.

5 Otro método para obtener una célula madre neuronal comprende:

(i) obtener una célula madre multipotente o pluripotente capaz de diferenciarse en una célula madre neuronal,

(ii) cultivar la célula (i) en un medio que es no permisivo para células pluripotentes y en la presencia de (a) un agonista de una ruta de señalización corriente abajo de un receptor de la familia EGF y (b) un agonista de una ruta de señalización corriente abajo de un receptor de la familia FGF.

10 Durante el uso, las células ES no humanas potencialmente contaminantes son retiradas por este método, o al menos reducidas sustancialmente en número, dando un cultivo más puro y uno que probablemente de menos lugar a teratomas por trasplante.

La célula madre es adecuadamente una célula madre pluripotente, especialmente una célula ES o EG no humana. El método comprende preferiblemente cultivar las células en presencia de un agonista del receptor EGF y un agonista de receptor FGF.

15 Utilizando células NS de la invención hemos obtenido astrocitos eliminando EGF y FGF y agregando suero o BMP4, hemos obtenido neuronas quitando EGF, y quitando FGF después de un intervalo de aproximadamente una semana y sembrando las células sobre laminina y hemos obtenido oligodendrocitos retirando tanto EGF como FGF. En general, todos los métodos de la invención utilizados para generar una célula madre neuronal comprenden opcionalmente una etapa adicional para diferenciar la célula madre neuronal en una neurona, un astrocito o un oligodendrocito, y luego opcionalmente de manera adicional utilizar la neurona, el astrocito o el oligodendrocito, por ejemplo, en un ensayo, para trasplante u otros.

Una vez que un cultivo de células madre neuronales ha sido aislado, puede ser utilizado para establecer una línea de células madre neuronales. El establecimiento de tal línea celular incluye preferiblemente las etapas de:

25 (a) obtener una célula madre neuronal individual,

(b) cultivar la célula madre neuronal de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos previamente,

y por lo tanto obtener una población clonal de células madre neuronales.

30 En realizaciones específicas, la célula madre neuronal individual utilizada para establecer la línea celular es una célula madre neuronal de división simétrica, o una célula madre neuronal que ha sido acondicionada para dividirse de manera simétrica. Preferiblemente, la célula madre neuronal individual es obtenida de acuerdo con el método descrito más arriba para preparar una célula madre neuronal.

En realizaciones preferidas, la línea de células madre neuronales obtenida por el método anterior es una población clonal de células madre neuronales, esto es, en donde todas las células son progenie de una célula madre neuronal individual.

35 Las células madre neuronales individuales y líneas de células madre (opcionalmente obtenibles por los métodos descritos más arriba) también forman parte de la invención. En una primera realización, se proveen líneas celulares en donde las células son mantenidas en la presencia de un activador de una ruta de señalización corriente abajo de un receptor de la familia de receptores EGF, y un activador de una ruta de señalización corriente abajo de un receptor FGF. En otras realizaciones, las células madre neuronales individuales y las células de las líneas celulares son caracterizadas porque son positivas para la expresión de al menos uno de:

los marcadores del precursor neuronal nestina o vimentina;

Sox-2;

los marcadores específicos de células radiales RC2, 3CB2, GLAST, BLBP o Pax-6;

el antígeno de LewisX;

45 Musashi-1; y

Prominina;

y son negativas para la expresión de al menos uno de:

Oct4, y

Nanog.

- 5 Preferiblemente, las células son positivas para la expresión de RC2, 3CB2 y GLAST. En otras realizaciones, (opcionalmente además del perfil de marcador precedente) las células son positivas para la expresión de al menos uno de BLBP, Pax-6, los marcadores de precursor neuronal nestina o vimentina, el antígeno LewisX, Musashi-1 o prominina. En realizaciones particularmente preferidas (y opcionalmente además de los perfiles de marcador precedentes) las células son negativas para la expresión de al menos uno de Oct4 o Nanog.
- 10 En otras realizaciones específicas (opcionalmente además de los perfiles de marcador anteriores), las células son positivas para la expresión de Sox-2, y negativas para la expresión de Sox-1. En ciertas líneas celulares derivadas de ratón, no más de 1% de las células son positivas para la expresión de GFAP o β III tubulina. En otras líneas celulares (por ejemplo humanas), no más de 1% de las células son positivas para la expresión de marcadores para astrocitos, neuronas u oligodendrocitos maduros.
- 15 Es preferible que tanto las células madre neuronales individuales, como las células de las líneas celulares, estén libres de material genético exógeno que codifique un oncógeno, esto es, que no hayan sido sometidas a estrategias de inmortalización. También es preferible que las líneas celulares descritas sean líneas de células madre neuronales.
- 20 En un tercer aspecto, se divulga un método para obtener y mantener una población transfectada de células madre neuronales de división simétrica, que comprende:
- (a) transfectar células ES no humanas con un constructo que codifica un marcador A, seleccionable, en donde en el uso dicho marcador seleccionable se expresa bajo el control de un promotor específico de las células precursoras neuronales;
- (b) promover la diferenciación de las células ES en células precursoras neuronales;
- 25 (c) seleccionar células precursoras neuronales que expresen el marcador A seleccionable; y
- (d) cultivar las células seleccionadas de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos previamente.
- El marcador A seleccionable puede codificar resistencia a antibióticos, un marcador de superficie celular u otro marcador seleccionable tal como se describe, por ejemplo, en EP-A-0695351. El promotor específico para células precursoras neuronales puede ser seleccionado a partir del grupo consistente de Sox-1, Sox-2, Sox-3, BLBP y el potenciador neuronal de nestina. En el ejemplo 1-1 se proveen detalles adicionales de esta estrategia de selección.
- 30 Las células madre neuronales divulgadas aquí (esto es, células madre neuronales individuales, y células madre neuronales presentes en las composiciones, líneas celulares y poblaciones) pueden ser modificadas genéticamente. Por lo tanto se divulga un método para transfectar las células madre neuronales de la invención que comprende:
- 35 (a) transfectar las células madre neuronales con un constructo que codifica un marcador B seleccionable y un polipéptido; y
- (b) seleccionar células madre neuronales que expresen el marcador B seleccionable.
- El marcador B seleccionable puede codificar resistencia a antibióticos o un marcador de superficie celular, y puede ser el mismo que o diferente del marcador A seleccionable. Métodos de transfección adecuados son conocidos, incluyendo electroporación, lipofección, nucleofección y transfección retro y lentiviral.
- 40 Las células madre neuronales modificadas genéticamente también forman parte de la presente divulgación, y la divulgación incluye por lo tanto una célula madre neuronal individual, o células madre neuronales cuando están presentes en las composiciones, poblaciones o líneas celulares de la invención, comprendiendo adicionalmente el constructo. Será evidente que tales células madre neuronales pueden comprender ya el marcador A seleccionable,
- 45 además del marcador B seleccionable.

- 5 Como se mencionó previamente, los métodos de la invención son adecuados para uso con células madre neuronales derivadas de cualquier fuente. Se describe aquí un método para obtener células madre neuronales a partir de una fuente de células ES. En el caso de células madre neuronales humanas, la invención no incluye células derivadas de embriones humanos. De acuerdo con el método, la diferenciación de las células ES en células madre neuronales es promovida por la conversión de las células ES en progenitores neuronales, por ejemplo, por cultivo en una monocapa o diferenciación en un cuerpo embrioide, y luego cultivo de los progenitores neuronales en medio NSA. Además, se contempla que el medio NSA puede comprender componentes suplementarios, tales como glucosa y HEPES suplementarios. Como alternativa, los medios suplementados (preferiblemente medios basales) con glucosa y HEPES también pueden ser utilizados para promover esta diferenciación.
- 10 En la presencia de NSA y/o glucosa y HEPES, las condiciones son tales que la propagación de las células madre neuronales se ve favorecida, con la ventaja agregada de que cualquier célula no neuronal presente en el cultivo preferiblemente muere. Esto da como resultado un cultivo sustancialmente puro de células madre neuronales (por ejemplo, al menos 80%, preferiblemente 90%, más preferiblemente 95% de todas las células presentes). Los Ejemplos 1-5 proveen detalles adicionales de este método.
- 15 En una realización preferida, el método del Ejemplo 1-5 puede ser utilizado para preparar una población de células madre neuronales de división simétrica, las cuales son mantenidas subsecuentemente utilizando cualquiera de los métodos de cultivo de la invención descritos anteriormente.
- 20 El método de los Ejemplos 1-5 también pueden ser utilizados para probar el efecto de factores sobre la diferenciación de las células ES en células madre neuronales. En una realización de ensayo preferida, se cultivan células ES utilizando el método descrito en el Ejemplo 1-5, en la presencia del factor que se va a probar. El efecto del factor puede ser establecido, por ejemplo, determinando el perfil de marcador de las células resultantes, esto es, para mostrar si las células tienen un perfil de marcador similar a las células de la invención, o si el perfil de marcador ES es mantenido. Los factores probados pueden ser factores inductivos o bloqueadores.
- 25 Hay mucho interés en el uso de células madre neuronales en el tratamiento de enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, y lesiones cerebrales. En particular en el tratamiento de enfermedades tales como enfermedad de Parkinson y de Alzheimer, esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica. Los métodos, y las composiciones, poblaciones celulares, líneas celulares y células individuales divulgadas de la presente invención son todos capaces de ser utilizados en tal tratamiento, así como en la manufactura de preparaciones para tal tratamiento.
- 30 Enfermedades neurológicas/neurodegenerativas particulares que pueden ser tratadas utilizando la invención incluyen: enfermedad de Parkinson, enfermedad neuronal motora, apoplejía, esclerosis múltiple y enfermedad de Huntington.
- 35 En un quinto aspecto, se divulga por lo tanto el uso de líneas celulares, poblaciones de células neuronales, células neuronales individuales y composiciones descritas más arriba para terapia celular y para la manufactura de una preparación para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y lesiones en el cerebro. Tales preparaciones pueden ser formuladas en solución salina regulada con fosfato (PBS).
- 40 Los métodos de tratamiento de las enfermedades listadas más arriba pueden comprender el trasplante de células individuales, líneas celulares, composiciones, o poblaciones celulares de la invención a un paciente. Preferiblemente, el paciente es un mamífero, más preferiblemente el paciente es humano. Tal trasplante ha demostrado ser exitoso en CNS tanto de embrión como de adulto y se describe en más detalle en el Ejemplo 1-6.
- 45 Las células, y en particular las líneas celulares divulgadas aquí, pueden ser utilizadas para probar el efecto de factores inductivos o de bloqueo en la diferenciación de células madre neuronales. Tal ensayo puede comprender poner en contacto una célula madre neuronal (esto es, tal como está presente en las composiciones, líneas celulares y poblaciones, o una célula madre neuronal individual) con el factor que se va a probar. El efecto del factor sobre la diferenciación de la célula madre neuronal puede ser establecido de manera adecuada determinando el perfil de marcador de las células resultantes, esto es, mostrar si las células tienen un perfil de marcador similar a las células de la invención, o si estos marcadores han sido perdidos. Las células también son adecuadas para probar agentes farmacéuticos.
- 50 Para establecer la proporción de células que formaran neuronas o glías, las células son preparadas por vía clonal; las células son sembradas individualmente y no todas las células forman colonias clonales pero aquellas que lo hacen generalmente por encima de 50% harán neuronas (bajo el protocolo apropiado) o glías (de nuevo, bajo el protocolo apropiado). Las células se distinguen del arte pues en tanto el arte reclama la identificación e incluso la propagación de células que tienen propiedades de células madre neuronales las poblaciones fueron altamente heterogéneas. Esta es una importante distinción puesto que las poblaciones impuras incluyen células que proveen señalización a células madre neuronales remanentes lo cual estimula la diferenciación y la posterior reducción de la
- 55 proporción de células madre neuronales. Mientras que los métodos del arte anterior pueden generar neuroesferas a partir de células individuales la invención permite la generación de poblaciones sustancialmente puras a partir de células individuales.

5 En realizaciones particulares de la invención, descritas en más detalle en un ejemplo más adelante, todas las colonias de células NS producen 15% o más, preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 20 a 30% de neuronas positivas a TuJ. En cultivos de alta densidad hemos contado células positivas TuJ. El 35% de las células NS LC1 adquirieron morfología neuronal y expresaron la beta III-tubulina después de 115 replicaciones, más de un año después de cultivo continuo. Estas células retuvieron un cariotipo diploide en esta etapa. La LC1 es una población no clonada. Por lo tanto los datos indican que hubo una mínima presión selectiva para los precursores restringidos gliales o para transformación genética.

10 Las células de la invención pueden ser cultivadas sin cocultivo con células heterólogas y sin medio condicionado indefinido, fracciones de matriz extracelular o suero, una característica no mostrada previamente por ninguna célula madre de un tipo diferente a las células ES. Por lo tanto siguiendo la invención, las células madre neuronales son cultivadas preferiblemente en cultivos homogéneos en condiciones definidas. Incluso una NSC individual aislada en un micropozo puede expandirse, indicando una mínima dependencia en señales extracelulares diferente a EGF y FGF y que pueden reducirse señales de autorrenovación extrínseca esenciales para las NSCs a EGF y FGF *in vitro*.

15 En realizaciones adicionales ilustradas en un ejemplo en más detalle, sustancialmente cada colonia, esto es al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 97% de las colonias que se desarrollan a partir de la siembra de células individuales (i) muestran expresión homogénea idéntica de marcadores de precursores neuronales y ausencia de marcadores de diferenciación en FGF más EGF, y (ii) generan neuronas al retirar el factor de crecimiento. En un ejemplo específico, cada colonia tenía estas propiedades. Esto es evidencia de autorrenovación simétrica. Adicionalmente, los datos de los ensayos en colonias sobre cultivos celulares de NS no clonados fueron comparables con los datos de la línea NS5 clonal. La formación en serie de colonias no diferenciadas expandibles a partir de NS5 muestra que las células clonogénicas son células madre y que sus números se expanden en proporción con la población de NS. Formalmente un incremento en el número de células madre puede ocurrir a través de dos mecanismos: generación de novo o divisiones con autorrenovación simétrica. La primera requiere una fuente de células premadre esto es, una célula pluripotente o un anlage fetal, ninguno de los cuales está presente en los cultivos de células NS aquí, de manera que la autorrenovación simétrica debe funcionar en los cultivos de células NS.

30 Las células NS específicas, obtenidas en un ejemplo más adelante, expresan Sox2, Pax6, Emx2, Olig1, Olig2, Nestina, BLBP, GLAST, Vimentina, y son inmunorreactivas para RC2, 3CB2, SSEA-1, y Prominina. Preferiblemente no expresan Sox1 y son negativas para GFAP y antígenos neuronales. Estas células NS carecen de marcadores de pluripotencia y marcadores de otras capas germinales. Nosotros asumimos que el carácter de células madre neuronales está enmascarado durante el desarrollo del CNS y es solamente demostrable de manera verdadera *ex vivo*, como es en el caso de las células ES. El hallazgo de que la expresión de Sox1 no se mantenía en las células NS es nuevo, no predicho, e indica que una selección de linaje continuo utilizando Sox1 no sería productiva.

35 En realizaciones adicionales de la invención las células NS, ejemplificadas por líneas NS no clonadas derivadas de células ES (CGR8-NS) y clonadas (NS5) y líneas derivadas de córtex fetal no clonadas (Cor1) y clonadas (Cor1-3), muestran expresión de marcadores gliales radiales 3CB2, BLBP, GLAST, Nestina, RC2 y Vimentina en cultivo. La expresión de GFAP es preferiblemente inferior a 10%, más preferiblemente inferior a 5% especialmente inferior a 2% de células en cualquiera de estos cultivos. En un ejemplo específico la expresión de GFAP fue vista en menos del 1% de las células. También hemos demostrado la expresión uniforme de nestina y RC2 con ausencia de GFAP y β III-tubulina en células NS derivadas de células ES después de 115 replicaciones indicando que el fenotipo celular NS es estable. Células preferidas de la invención son diferenciadas de células ES no humanas y (1) continúan expresando nestina y RC2 y (2) continúan no expresando GFAP y β III-tubulina después de 30 replicaciones, preferiblemente después de 60 replicaciones, más preferiblemente después de 100 replicaciones. La no expresión de GFAP y beta III-tubulina significa que la expresión es observada en menos del 5% de las células, preferiblemente menos del 2% de las células.

50 Hemos llevado a cabo análisis a través de RT-PCR los cuales confirmaron la ausencia de factores de transcripción específicos pluripotentes, mesodérmicos o endodérmicos en células NS específicas. También llevamos a cabo la perfilación de la expresión Affymetrix (RTM) que confirma la ausencia de transcriptos inapropiados del linaje y demuestra una expresión consistente de marcadores gliales neuronales y radiales en tres diferentes cultivos de células NS (derivadas de ES, derivadas de córtex fetal y derivadas de córtex fetal clonal).

55 La obtención de células NS por diferenciación a partir de células ES no humanas comprende preferiblemente mantener las células en un cultivo adherente continuo, y más preferiblemente omitir una etapa de formación de una neuroesfera. Sin embargo, la obtención de células NS por diferenciación de células a partir de aislados celulares primarios de cerebro fetal o adulto comprende opcionalmente (i) formar primero un agregado en suspensión o una neuroesfera, y (ii) mantener subsecuentemente las células en cultivo adherente. Hemos encontrado en ejemplos que después de algunos pocos días los agregados pueden ser unidos a plástico recubierto con gelatina y entonces las células NS crecerán.

Determinamos la proporción de neuronas y astrocitos generados en replicaciones tempranas y tardías de células de

la invención, específicamente para las células NS LC1 en las replications 8 y 115. Este último cultivo representa 12 meses de expansión con un período de duplicación de 24 horas. Hay una declinación modesta en el número de neuronas obtenido en la replicación tardía, pero esto todavía totaliza >35%. La línea clonal NS5, derivada independientemente de células ES 46C, muestra un nivel similar de eficiencia en la diferenciación neuronal en la replicación 30. La generación de astrocitos inmunorreactivos GFAP se acercó a 100% en ambos puntos del tiempo para las células NS LC1 y también para las células NS5. Adicionalmente, los datos *in vivo*, que muestran una diferenciación extensa de tanto neuronas como astrocitos, fueron obtenidos utilizando células NS LC1 cultivadas por replications múltiples, luego transducidas con lentivirus GFP y expandidas adicionalmente antes del trasplante. En combinación con la uniformidad de la expresión del marcador glial radial, los datos sobre el potencial de diferenciación estable para las células NS LC1 no clonadas indica que el cultivo adherente en FGF y EGF favorece la autorrenovación de células madre y suprime el compromiso a destinos gliales o neuronales.

Encontramos que las células NS, obtenidas por diferenciación a partir de células ES, podrían ser trasplantadas sin formación de tumores durante un período de 5 semanas, siendo así distintas de las células ES las cuales darían lugar a teratomas macroscópicos al cabo de 4 semanas en el cerebro del ratón.

También se divulgan métodos de reprogramación nuclear y células y animales obtenidos a través de estos métodos.

La reprogramación nuclear es una técnica mediante la cual el núcleo de una célula somática, opcionalmente una célula madre o una célula terminalmente diferenciada, es reprogramada de tal manera que se comporte como un núcleo de una célula de potencia relativamente mayor; finalmente un núcleo reprogramado completamente actúa como el núcleo de una célula pluripotente y la reprogramación se toma frecuentemente para indicar la reprogramación hasta terminar en la pluripotencia. Los métodos de reprogramación por transferencia nuclear están bien establecidos en el arte y se publicaron completamente después de la invención descrita en WO 96/07732, algunas veces nominada como la invención de "Dolly la oveja". La transferencia nuclear puede ser utilizada así para clonar animales no humanos.

Los métodos de transferencia nuclear tienen un cierto número de problemas. Primariamente permanecen con baja eficiencia, puesto que las células obtenidas son raramente reprogramadas de tal manera que sean verdaderamente pluripotentes. También es deseable tener la capacidad de llevar a cabo la manipulación genética sobre el núcleo como parte de la reprogramación. Pero, actualmente esta manipulación no es posible o es no confiable debido a la dificultad en obtener poblaciones clonales de núcleos donantes. Incluso con núcleos clonales los métodos de reprogramación son procedimientos complejos que requieren muchas etapas individuales. Finalmente, las células ES de algunas especies siguen siendo difíciles de aislar. Utilizando técnicas de reprogramación, si estuviesen disponibles y fuesen confiables, se podría ofrecer una ruta alternativa a células pluripotentes en estas especies.

Aspectos adicionales divulgados aquí tiene como objetivo proveer metodologías alternativas a los problemas anteriores y proveer soluciones a los mismos.

De acuerdo con lo anterior, se divulga un método para reprogramación nuclear, en donde el núcleo donante es obtenido de una célula madre neuronal de la invención.

Se ha encontrado que las células madre neuronales de la invención son reprogramables con alta eficiencia, y por lo tanto la invención provee un método de reprogramación eficiente y también facilita la producción de células reprogramadas modificadas genéticamente, especialmente células madre pluripotentes, de muchas especies. Esta capacidad, a través de la invención, de propagar células madre neuronales individuales por vía clonal significa que después de la manipulación genética pueden obtenerse poblaciones clonales de células, todas con la misma modificación genética, y utilizarse en métodos de reprogramación.

También es posible identificar células madre neuronales de acuerdo con la presencia de marcadores de superficie celular específicos y/o la ausencia de otros —esto tiene la ventaja de que la etapa de cultivo de acuerdo con aspectos de la invención descritos aquí puede ser omitida, puesto que la célula madre neuronal puede ser seleccionada directamente de una población mixta, por ejemplo, un homogenizado de cerebro.

Se divulga por lo tanto un método de reprogramación nuclear, en donde el núcleo donante es de una célula madre neuronal obtenida de acuerdo con cualquier realización o aspecto de la invención.

Un método particular de reprogramación nuclear, comprende:

- obtener una célula donante;
- obtener una célula receptora;
- transferir el núcleo de la célula donante a la célula receptora, en donde la célula donante es (i) una célula madre

neuronal, o (ii) una célula obtenida de acuerdo con un método de la invención; y

- cultivar la célula de tal manera que se re programe el núcleo de la célula donante, obteniendo por lo tanto una célula reprogramada.

5 El núcleo de la célula receptora podrá ser retirado generalmente en una etapa en el proceso de tal manera que la célula resultante sea diploide, lo que se hace opcionalmente antes de transferir el núcleo de la célula donante y opcionalmente después de transferir el núcleo de la célula donante.

10 Una de las posibilidades interesantes ofrecidas por las células NS de la invención es introducir lesiones genéticas, por ejemplo, que pueden inducir enfermedad maligna. Una opción adicional es así manipular genéticamente el núcleo de la célula donante. Esto puede ser utilizado para introducir mutaciones o genes de interés, por ejemplo, para generar células o animales para ensayos u otros propósitos de prueba en donde se obtiene una pluralidad de células todas con la misma manipulación. El rango de manipulación es amplio. Un ejemplo es introducir una secuencia genética que causa una enfermedad o una secuencia genética putativa que causa una enfermedad en el núcleo de la célula donante, útil para la criba de fármacos. Una opción adicional es obtener un animal que comprende tejido derivado de la célula reprogramada y llevar a cabo un ensayo utilizando el tejido. Se prefiere que la célula sea reprogramada de nuevo hacia la pluripotencia, por ejemplo, mediante transferencia nuclear en un oocito.

20 En realizaciones particulares divulgadas aquí, aprovechando el conocimiento de la invención de los marcadores de superficie celular en las células madre neuronales deseadas se permite la omisión de etapas de cultivo de otra manera necesarias para aislar una célula madre neuronal a partir de una población mixta. Tal método de reprogramación comprende proveer una población mixta de células, aislar una célula madre neuronal de la población mixta con base en su perfil de marcadores de superficie celular y trasferir el núcleo de la célula aislada a una célula receptora.

25 Como sucede con los otros métodos, la célula aislada puede ser manipulada genéticamente antes de transferir su núcleo a la célula receptora. También, la célula aislada puede ser cultivada para obtener una población clonal de células antes de la transferencia del núcleo de una célula en la población a la célula receptora.

30 En más detalle, una aplicación de las células de la invención es en la criba de fármacos de alto rendimiento. Tanto las células madre neuronales de la invención como las neuronas, glías, etc., obtenidas de la misma pueden ser utilizadas para la criba, por ejemplo, para identificar factores activos sobre cada tipo de célula. Las células o la progenie pueden utilizarse en modelos de cáncer de cerebro. Las células y la progenie pueden ser obtenidas a partir de un tumor del sistema nervioso, especialmente del CNS y las células neuronales derivadas del mismo y su progenie pueden ser utilizadas en cribas: la naturaleza de la criba se considera evidente para todos, pero en resumen comprende obtener una célula de la invención o una progenie diferenciada de la misma, cultivar la célula o progenie en la presencia de un factor de prueba y determinar un efecto del factor sobre la célula o progenie. En un uso de criba particular, se provee una célula, la cual es una célula de la invención u obtenida por la invención y que ha sido modificada de tal manera que exprese un receptor EGF o un receptor EGF adicional.

40 Las células pueden ser modificadas antes de ser usadas en una criba. Por ejemplo, las células pueden ser modificadas genéticamente para introducir una mutación en un gen, o para introducir un ácido nucleico que codifica un producto genético conocido por estar, o del que se sospecha que está implicado en una enfermedad, especialmente una enfermedad de las células neuronales incluyendo Parkinsonismo y enfermedad de Alzheimer. La mutación Parkin puede ser introducida. Un gen que codifica una proteína, por ejemplo APP, implicado en la enfermedad de Alzheimer puede ser expresado o mutado o tener su expresión alterada.

45 Las células de la invención son de uso como fuente de células para la terapia celular. Ofrecen una fuente de células madre de un paciente que potencialmente puede ser fuente de núcleos para transferencia nuclear. Pueden ser utilizadas para la administración de terapia genética, incluyendo terapia genética neuroprotectora. En una terapia de ejemplo, una célula de la invención expresa factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF). Estas células pueden ser obtenidas siguiendo la invención y manipulando genéticamente las células. Las células pueden ser trasplantadas para restaurar circuitos neuronales dañados y/o restaurar la función cerebral.

50 Una ventaja de la invención yace en la pureza de las células obtenidas. Una población pura es más fácil de controlar en trasplante o cultivo, puesto que en un cultivo heterogéneo se obtiene un porcentaje reducido de neuronas puesto que más células se han comprometido ya en un destino glial. Algunas terapias necesitaran tanto neuronas como astrocitos. Otras terapias necesitaran células gliales (por ejemplo oligodendrocitos para MS, astrocitos, células migratorias, para otras aplicaciones).

También se divulgan métodos de clonación de animales no humanos. Un método para clonar un animal no humano, comprende (i) obtener una célula madre neuronal del animal no humano, (ii) obtener un oocito de la misma especie

que el animal no humano, (iii) transferir el núcleo de una célula madre neuronal al oocito, y (iv) implantar la célula obtenida en (iii) en una hembra de la misma especie. La presente divulgación provee por lo tanto un método eficiente de clonación animal no humana con base en el aislamiento de células madre neuronales. Se considera que el método de clonación es de aplicación a sustancialmente todos los animales no humanos, aunque especialmente animales domésticos incluyendo vacas, cerdos, ovejas, gatos, perros, pollos y otros y también animales de laboratorio incluyendo ratones y ratas.

La invención permite, por primera vez, el crecimiento de una población pura de células madre de tejido diploide, clonogénicas, transfectables de la misma forma que las células ES. Esta es una etapa significativa de avance en la biología de las células madre que abre un rango de nuevas oportunidades experimentales. Por ejemplo, estudios previos sobre la perfilación de "células madre neuronales" están comprometidos seriamente por la confianza en los cultivos de neuroesferas heterogéneos (por ejemplo Suslov et.). Además, las características gliales radiales de las células ES definen su contraparte *in vivo*. La capacidad de cultivar y manipular genéticamente por acciones puras de glías radiales también abre nuevas oportunidades para analizar la biología celular de estas notables células, que puede funcionar tanto como células madre así como células de armazón especializadas. Finalmente, la capacidad de propagar las células NS en medios simples sin células heterólogas o extractos celulares establece que la autorrenovación puede ser guiada por factores de crecimiento solos y que no requiere un nicho microambiental complejo, hasta ahora considerado indispensable por los biólogos de células madre. La invención abre nuevas aproximaciones hacia la reprogramación nuclear y a la manipulación genética opcional utilizando las células.

La invención provee la generación eficiente de neuronas a partir de células NS. En un método, fijado en más detalle en un protocolo aquí, un método para la obtención de neuronas comprende (a) cultivar células madre neuronales en la presencia de un agonista de un receptor FGF y en la ausencia de un agonista de un receptor EGF; y (b) después de esto, cultivar las células en ausencia de un agonista de un receptor FGF y en la ausencia de un agonista de un receptor EGF. Se encuentra que el período durante el cual por ejemplo, el EGF está ausente prima que las células se conviertan en neuronas cuando por ejemplo FGF es retirado subsecuentemente. Las células madre neuronales son sembradas preferiblemente en un cultivo monocapa. Típicamente, las células NS son transferidas a medio libre de EGF pero que contiene FGF-2 y cultivadas durante un período, por ejemplo de al menos 2 días, o al menos 4 días, antes de que se retire también el FGF-2 del medio (lo cual incluye que las células sean transferidas a un medio que no lo contiene). En un método específico las células son cultivadas en FGF-2 pero no EGF durante una semana y luego se retira el FGF-2. El retiro de FGF lleva a algo de muerte celular en el cultivo, pero un buen porcentaje sobrevive y forma neuronas. Este método puede ser utilizado como una adición opcional a cualquiera de los métodos descritos aquí para derivación de células NS.

Será evidente que los métodos/usos de acuerdo con todos los aspectos de la invención pueden ser llevados a cabo bien sea *in vivo* o *in vitro*.

Los métodos y composiciones de la invención o descritos aquí se ilustran en los dibujos acompañantes en los cuales:

la figura 1 muestra la generación de células madre neuronales (NS) a partir de células ES;

la figura 2 muestra que las células NS pueden ser derivadas a partir de diversas líneas celulares ES y cerebro anterior fetal;

la figura 3 muestra que las células NS se incorporan y se diferencian dentro del cerebro adulto;

la figura 4 muestra células ES humanas o células NS derivadas de feto; y

la figura 5 muestra actividad eléctrica bajo condiciones de voltaje y pinza de corriente de células NS cultivadas en medio diferenciador.

Con referencia a las figuras en más detalle, la figura 1 muestra la generación de células madre neuronales (NS) a partir de células ES: A. El cultivo de células NS adherente (LC1) propagado en EGF y FGF-2 (a) no muestra expresión de antígenos neuronales (b) o astrocitos (c) y expresión uniforme del marcador precursor RC2 (d) y nestina (no mostrada). Las células LC1 se diferencian en astrocitos inmunopositivos (e) por adición de suero y generan neuronas (f-h) al retirar el factor de crecimiento. La proporción de neuronas obtenida sigue siendo mayor >35% de las células totales después de 115 replicaciones (i). B, se generaron células NS-5 clonales a través de la selección de linaje neuronal Sox1. a y c, imagen de fago de precursores neuronales en las replicaciones 1 y 5 respectivamente. b y d fluorescencia de Sox1-GFP correspondiente. e, célula individual 1 hora después de sembrar en pozo de Terasaki. f, imagen de contraste de fases de línea celular clonal en la replicación 20. C, RT-PCR para células ES y marcadores de células madre neuronales/células gliales radiales (46C, línea ES progenitora; P5, 5 replicaciones después de diferenciación neuronal; NS-5 línea NS clonal; LC1, población NS (replicación 17); cerebro (cerebro de ratón E12.5/E16.5). D, inmunorreactividad de NS-5 para marcadores de células madre

neuronales/gliales radiales. E, diferenciación de NS-5 en astrocitos (a, b) y neuronas (d, e) sin pérdida de inmunorreactividad a la nestina (c, f) F, colonias de células NS-5 (a) generan neuronas al retirar el factor de crecimiento (b) y en la presencia de EGF/FGF retienen expresión homogénea de RC2 y BLBP sin inmunorreactividad para GFAP (c, d). G, dispersión de metafase de NS-5 (replicación 31).

5 La figura 2 muestra células NS que pueden ser derivadas a partir de diversas líneas celulares ES y cerebro anterior fetal: las células NS fueron derivadas de líneas celulares ES independientes (CGR8, E14Tg2a) o tejido cortical primario (Cor-1) y estriatal (Str-1). A, RT-PCR de marcadores de células madre/gliales radiales. B, RT-PCR para reguladores transcripcionales. C, la línea derivada de ES (CGR8-NS) y la línea derivada de feto (Cor-1) son indistinguibles de LC1 por morfología (a, f) y por inmunorreactividad de marcadores de células madre
10 neuronales/gliales radiales (b, c, g, h), y puede cada una diferenciarse en neuronas (d, i) y astrocitos (e, j).

La figura 3 muestra células NS que se incorporan y diferencian dentro de cerebro de adulto: a-h Imágenes confocales de células NS LC1, transducidas lentiviralmente con eGFP, cuatro semanas después del injerto en el hipocampo (a, b) o estriato (c-h). b, d, magnificación superior de los insertos en paneles a y c, respectivamente. e, f, ejemplos de células NS injertadas en eGFP (verde) que muestran la coexpresión (amarillo) de los marcadores neuronales TuJ (e, rojo) o MAP-2 (f, rojo). g, marcador GFAP astrogial (rojo). h, marcador en progenitor neural de nestina (rojo). i, análisis cuantitativo de células neuronales derivadas de injerto (MAP2), astrogiales (GFAP), progenitoras (Nestina), y proliferantes (Ki67), cuatro semanas después del trasplante en estriato de ratón adulto. Los datos son media (\pm desviación estándar) de al menos 500 eGFP+ células de cinco animales independientes. Barras de escala: a, c, 100 hm; b, d, e, 40 hm.; f-h, 20 hm.

20 La figura 4 muestra células ES humanas o células NS derivadas de feto: A, derivación de células ES humanas. a, cultivo primario de ES humanas. b, diferenciación de células ES humanas en estructuras de roseta neuronales. c, replicación 9 en medio de expansión NS. d, células individuales que exhiben morfología glial radial. e-h, inmunotinción para marcadores de células madre neuronales/gliales radiales. B, derivación a partir de cerebro anterior fetal humano. i, neuroesferas generadas a partir de córtex. j, unión y crecimiento. k, replicación 5 en medio de expansión NS. l, morfología glial radial. m-p, marcadores de células madre neuronales/gliales radiales. C, diferenciación. q, neuronas inmaduras positivas a TuJ. r, astrogiales positivas GFAP.

La figura 5 muestra: A. rutas actuales de entrada y salida en diferentes potenciales de membrana (entre -70 y +40 mV a partir de un potencial de sostenimiento de -90 mV), de tres diferentes células NS después de la incubación en medio diferenciador durante seis (a), veinte (b) y treinta (c) días. B. Se obtuvieron respuestas a voltaje superimpuesto obtenidas después de la inyección de pulsos de corriente rectangulares despolarizantes en las mismas tres células (a, b y c) como en (A) conmutando de pinza voltaje a corriente inmediatamente después de los registros de corriente mostrados en (A). Las líneas punteadas representan un nivel de voltaje de -60 mV. C. corrientes de Na⁺ promedio generadas a -20 mV a partir de células cultivadas en medio diferenciador incrementando tiempos como se indica mediante las etiquetas. Las barras indican SE. D. corrientes de entrada superpuestas generadas a -40 mV y 0 mV en Ba²⁺ 10 mM y en la presencia de TTX; el potencial de sostenimiento fue de -90 mV. E. relación corriente/voltaje de la misma célula como en (D).

La invención se demuestra en uso mediante los siguientes ejemplos. Debe entenderse que, hasta el nivel en que estos ejemplos se relacionan con el uso de células embrionarias humanas, son ejemplos de referencia y no realizaciones de la invención.

40 Ejemplos

Ejemplo 1-1.

Aislamiento y cultivo de poblaciones en volumen de células NS

Un protocolo de diferenciación de células ES fue establecido recientemente el cual permite la generación eficiente y consistente de entre 50-70% de precursores neuronales positivos Sox1 en cultivos en monocapa adherente. Con el fin de aislar, expandir y caracterizar los precursores neuronales (derivados de ratón) dentro de estos cultivos, se utilizó una línea celular previamente generada (células 46C) la cual contenía un casete informador de GFP-IRES-puromicina direccionado al locus Sox1 (Ying et al., 2003b). Se agregó la puromicina a los cultivos de diferenciación después de 7 días, y al cabo de 3 días más del 95% de las células restantes eran precursores neuronales GFP+. En este punto, las células fueron sembradas en medio N2B27 suplementado con EGF/FGF-2 (sin puromicina). Estas células crecieron rápidamente, al cabo de unas pocas repeticiones tomando una morfología homogénea.

Estas células precursoras neuronales 46C (46C-NP) fueron mantenidas de manera continua en cultivo durante más de 20 repeticiones reteniendo una morfología bipolar característica. Estos cultivos mostraron muy poca muerte celular y no tuvieron una alta eficiencia en siembra duplicando el tiempo de aproximadamente 25 horas.

Ejemplo 1-2.

Cultivo de líneas celulares

5 Para aislar líneas celulares clonales, se sembraron células individuales de los cultivos en volumen de replicación 5 de células 46C-NP en pozos separados de una placa de micropozos. De las 95 células individuales calificadas, 15 crecieron en colonias, y, de estas, 4 líneas fueron mantenidas en crecimiento continuo a lo largo de más de 10 replicaciones. Una línea (NP5) mostró las células bipolares características con morfología homogénea idéntica a la observada en la población en volumen. Esta línea NP5 había sido mantenida en cultivo indefinidamente (NP5 replicación 41; más de 5 meses).

Ejemplo 1-3.

10 Caracterización de células NS

15 Con el fin de caracterizar tanto la población celular en volumen como las líneas clonales se utilizó inmunocitoquímica para una variedad de marcadores. Como se esperaba, cada una de las líneas celulares se encontró positiva para los marcadores de precursor neuronal, nestina o vimentina. De manera importante, estas células también fueron positivas para los marcadores específicos gliales radiales RC2, 3CB2 y el transportador de glutamato específico para astrocitos (GLAST). Menos de 1% de las células fueron positivas para GFAP o β III tubulina sugiriendo que ocurre muy poca diferenciación espontánea a astrocitos o neuronas durante la replicación de estas células. A diferencia de células de primate/humana, las glías radiales de roedores son negativas para GFAP. Además, estas células son inmunorreactivas para SSEA-1, un anticuerpo que reconoce el antígeno de LewisX, usado previamente para enriquecer células madre neuronales en adultos.

20 Se llevó a cabo RT-PCR con un rango de marcadores para confirmar su identidad como gliales radiales. Todas las cuatro líneas clonales así como la población en volumen fueron negativas para Oct4 o Nanog confirmando que no eran células ES, a la vez que expresaban nestina, vimentina y GLAST, en consistencia con la inmunocitoquímica. Adicionalmente, cada línea celular mostró expresión de BLBP, un marcador glial radial. Estas células también expresan Musashi-1 y prominina.

25 De manera interesante, el cultivo en volumen de 46C-NP perdió gradualmente la expresión de Sox-1 según se estableció mediante el informador GFP, de tal manera que en la replicación 5 (~2 semanas) muy pocas células permanecieron verdes. También, ninguna de las líneas clonales mostró expresión de GFP guiada por Sox1 y el RT-PCR confirmó que estas células no expresan Sox1, sino que a cambio expresan la proteína de clase SoxB1 relacionada, Sox2. Estos resultados juntos sugieren que un rango de precursores neuronales que expresan Sox1
30 puede ser aislado utilizando una estrategia de selección con puromicina, y que las células Sox1-. Sox2+ con propiedades de gliales radiales de cerebro anterior fetal pueden ser aisladas y expandidas por clonación.

Ejemplo 1-4

Diferenciación de línea celular NS en neuronas y glías

35 Los marcadores moleculares expresados por las líneas celulares NS confirman que son un tipo de células precursoras neuronales. Para confirmar que estas células eran verdaderas células madre multipotentes (esto es capaces de diferenciación bien sea como neuronas o glías), se probó un rango de condiciones diseñadas para probar la potencia de las células.

40 Investigaciones previas de precursores neuronales indujeron diferenciación a través de protocolos que involucraban retiro de mitógenos y/o adición de suero u otras citoquinas. En el caso presente, las EGF, FGF, o ambas fueron retiradas de células NP5 y 46C-NP proliferantes cultivadas sobre plástico. La eliminación simultánea tanto de EGF como de FGF dio como resultado una muerte celular rápida y extendida al cabo de 24 horas. El cultivo con FGF solo, por contraste, llevo a la muerte celular en el transcurso de 3 días. El cultivo EGF solo no dio como resultado la muerte o diferenciación celular, sino que se redujo la proliferación celular. Así, el EGF actúa claramente como una
45 señal de supervivencia celular esencial (compensada parcialmente por la señalización de FGF) para células NS cultivadas sobre plástico.

El efecto del suero sobre células proliferantes después de la eliminación de citoquinas también fue probado. Las células tratadas de esta manera sobrevivieron, incluso en la ausencia de EGF, y rápidamente se diferenciaron de manera sincrona tal que el 100% de las células adquirieron un gran astrocito plano que se tiñó positivo para GFAP y negativos para nestina. Por lo tanto, todas las células NS con una población proliferante son capaces de diferenciación como astrocitos. Este efecto puede ser imitado por la adición de BMP4 en ausencia de suero después de la eliminación de EGF/FGF sobre plástico. Las CNTF y TGF- β se comportaron de manera similar a BMP4, aunque la morfología de los astrocitos fue diferente y hubo más muerte celular inicialmente. BMP, CNTF y LIF han

mostrado cada una la inducción del destino de los astrocitos a partir de progenitores corticales primarios (Gross et al., 1996; Lillien and Raff, 1990; Nakashima et al., 1999). En consistencia con estos estudios, se encontró una rápida inducción de genes *Id* (>30 veces) con tratamiento con BMP-4 o suero (datos no mostrados).

5 En un intento para inducir diferenciación neuronal, se probó la eliminación de EGF o de placas tratadas con laminina. Para evitar la muerte celular vista en cultivo de células sobre plástico, las células fueron sembradas sobre un sustrato de laminina en la presencia de FGF, pero sin EGF. La PCD vista en estas condiciones sobre plástico o gelatina no se presentó y las células sobrevivieron. Hubo un cambio en la morfología de las células a procesos bipolares más extendidos, con proyecciones características de gliales radiales. Estas células mostraron una reducción drástica en proliferación (a través de la incorporación de BrdU) pero mantuvieron los marcadores gliales radiales (RC2, vimentina, nestina) y no se diferenciaron, puesto que solamente una pequeña porción de neuronas o astrocitos fue vista en regiones de alta densidad. Para inducir la diferenciación neuronal, después de 6 días el medio fue cambiado de NSA/N2 +FGF2 a NSA/B27 sin FGF2. Este promovió alrededor del 40-60% de diferenciación celular de las células según se juzga mediante tinción de anticuerpo de MAP2 y β III tubulina. Estas neuronas fueron GABAérgicas según se estableció mediante inmunoreactividad con GABA, mientras que hubo pocos astrocitos (GFAP). Estos resultados son consistentes con el papel previamente descrito de FGF en la prevención de la diferenciación neuronal.

También se encontró que cada línea celular podría ser congelada y descongelada con similar éxito que las células ES.

20 En pruebas adicionales, las diferenciaciones fueron intentadas partiendo de células individuales. Esta expansión y diferenciación clonal mostró que todas las células tienen la capacidad de formar neuronas.

Ejemplo 1-5.

Aislamiento de células NS a partir de una línea celular ES sin uso de estrategias de selección genética

25 El medio N2B27 utilizado para aislar NP5 fue optimizado originalmente para la conversión de células ES a precursores neuronales y por lo tanto permitió una buena supervivencia de células ES y progenitores neuronales. Así, en la ausencia de selección por puromicina, no fue posible expandir eficientemente las células 46C-NP con EGF y FGF-2 debido al arrastre de células ES y del tipo celular no neural (datos no mostrados). Para superar esto y permitir la generación de células gliales radiales a partir de otras líneas ES no direccionadas, se probaron otras combinaciones de medios basales que permitían la supervivencia y expansión de precursores neuronales pero no de otros tipos de células.

30 Utilizando un medio comercialmente disponible, medio NS-A (Euroclone), se encontró que la resiembra de una diferenciación de monocapa de células ES 46C en el día 7 dio como resultado la formación de aglomerados/esferas de células, así como una muerte celular de células no neuronales. Se presentó unión subsecuente de estas aglomeraciones celulares y creció una población homogénea de células. La caracterización posterior de esta población replicable (>75 replicaciones) de células reveló un perfil idéntico de marcadores expresados visto previamente utilizando la estrategia de selección con puromicina. Así, las células fueron positivas para marcadores de precursor neuronal (nestina, vimentina) y también marcadores gliales radiales (RC2, GLAST, BLBP y Pax6). Las células 46C-NP se comportaron de manera similar en medios N2B27 o NSA una vez se establecieron con solo pequeñas diferencias en morfología y sin diferencia en los genes marcadores.

40 Usando este protocolo, las líneas celulares de otras seis líneas ES fueron aisladas: CGR8, E14T, Oct4-GIP, S11, R1 y V6.5. Cada una de estas líneas celulares tienen una morfología y perfil de expresión similares y pueden ser replicadas extensamente

Ejemplo 1-6.

Trasplante de células NS

45 Para probar el potencial de las células NS *in vivo*, fueron trasplantadas en CNS tanto embrionario como de adulto, así como en un injerto en cápsula renal.

Se probó la electroporación sobre NP5. Se encontró que experimentaban electroporación eficientemente utilizando un electroporador de onda cuadrada. Las células también son transfectables utilizando lipofectamina más reactivo. Esta es una ventaja principal puesto que toda la manipulación genética utilizadas en ratón se hacen ahora disponibles.

50 Para permitir una evaluación rápida de las células injertadas, las 46C-NP fueron transducidas con partículas lentivirales que portaban el gen marcador eGFP. La infección fue altamente eficiente y casi el 95% de las células

fueron marcadas exitosamente, siendo la señal eGFP fuerte y estable con las replicaciones. El uso de la infección lentiviral permitió que el transgen fuera integrado de manera estable y la señal permaneciera estable para análisis a largo plazo de las células injertadas.

5 Se evaluó el comportamiento de las células después del trasplante en el cerebro embrionario (un ambiente que contiene todas las moléculas y factores capaces de sostener y dirigir la diferenciación de células neuronales inmaduras). 100,000 células fueron suspendidas en un volumen final de 2 microlitros siguiendo el procedimiento descrito previamente por Magrassi y colega (Magrassi et al., Development 1999) usando embriones de ratón E14.5 como receptores. Las células sobrevivieron bien después del trasplante (se hizo una evaluación aproximada de alrededor de 20000 células en el injerto), y la señal eGFP fue fácilmente detectable y desplegaron actividad de migración ya en puntos de tiempo temprano después del injerto. Se analizaron los destinos que las células injertadas adquirieron en diferentes puntos de tiempo (4 días, 7 días, 2 semanas y 1 mes) después del injerto. En los puntos de tiempo del día 4 y semana 1, la mayoría de las células eran todavía inmaduras según lo indicaba la inmunorreactividad a nestina, mientras que el 23% expresaron el marcador neuronal Tuj-1 y 16.3% adquirieron el marcador glial GFAP. Estos datos indican que las NS trasplantadas son capaces de generar tanto neuronas como glías *in vivo* según se esperaba a partir de las células NS multipotentes.

15 Las células NS también fueron trasplantadas en el estriato de adulto. En estos trasplantes, las células sobrevivieron bien (la supervivencia de cualquier manera es inferior que en los injertos embrionarios) y se diferenciaron hacia destinos tanto neuronales como gliales. Los análisis cuantitativos ejecutados 2 semanas después del trasplante indicaron que el 43.3% de las células expresaron el marcador específico neuronal Tuj-1, mientras que 26.6% desplegaron inmunorreactividad para el marcador glial GFAP. Una pequeña fracción de las células (11.1%) retuvo un fenotipo inmaduro según se indica mediante la expresión de nestina.

Las células NP5-GFP en cápsula renal no se elevaron a teratomas (n=4, datos no mostrados).

Ejemplo 2

Ejemplo 2-1

25 Métodos

Cultivo y diferenciación de células de ratón

30 Las células ES y la diferenciación neuronal son detalladas por Ying & Smith, 2003. Las células NS denominadas LC1 y otras células NS derivadas de ES fueron generadas de manera rutinaria sembrando en el día 7 cultivos en monocapa de diferenciación neuronal sobre plástico no recubierto en un medio NS-A (Euroclone) suplementado con N2 y 10 ng/ml de EGF y FGF-2 (medio de expansión NS). Las células formaron agregados que se unieron subsecuentemente y crecieron células NS. Las células denominadas células 46C-NS fueron generadas después de la adición de 0.5 µg/ml de puomicina para diferenciar cultivos adherentes en el día 7. Las células fueron sembradas 3 días después en un matraz T75 sin recubrimiento en medio N2B27 con 10 ng/ml de EGF y FGF-2 (Peprotech) en la ausencia de puomicina. Se generó una línea clonal, NS-5, sembrando células individuales en placas de micropozos de 96 pozos (Nunc) limitando la dilución (las células individuales clasificaron 1 hora después de la siembra). Se generaron cultivos primarios utilizando protocolos estándar de córtex/estriato de embriones de ratón E16.5 y se les permitió unirse sobre matraces tratados con 0.1% de gelatina. Se expandieron entonces las células Cor-1 y Str-1 sobre gelatina utilizando medio de expansión NS. Para la diferenciación de astrocitos, las células NS fueron sembradas sobre placas de 4 pozos a 1×10^5 células/pozo en medio NS-A suplementado con 1% de suero de ternera fetal o 10 ng/ml de BMP4 (Sistema R&D). Para la diferenciación neuronal se sembraron 5×10^4 células NS sobre pozos tratados con poliornitina/laminina en NS-A suplementado con FGF-2 solo. Después de 7 días el medio fue cambiado a NS-A suplementado con B27 (Gibco) sin factor de crecimiento. Para la diferenciación clonal, cultivos de 1000 células de NS-5 o Cor-1 fueron sembrados en placas de 10 cm pretratadas con laminina, se expandieron durante 12 días en EGF/FGF-2, y se diferenciaron *in situ* como se indicó anteriormente.

45 Caracterización de células NS

La inmunocitoquímica fue llevada a cabo utilizando conjugados secundarios TRITC o FITC y contratención nuclear con DAPI. Los anticuerpos primarios fueron utilizados en las siguientes diluciones: Nestina (1:10), Vimentina (1:50), Pax6 (1:5), 3CB2 (1:20), RC2 (1:50) (DSHB); TuJ (1:200) (Covance); GFAP (1:300) (poli y mono, Sigma), MAP2 (1:200) (Chemicon and Becton Dickinson); NeuN (1:200), GABA (1:200), Gad65/67 (1:200) (Chemicon); Sinaptofisina (1:200) (Sigma); Olig2 (1:5000) (H. Takebayashi); Emx2 (1:2000) (A. Corte); BLBP (1:500) (N. Heintz); prominina/mAb13A4 (1:200) (W. Huttner). Los controles negativos fueron células ES, células NS diferenciadas o secundarias solas. Para el RT-PCR, se extrajo el ARN total utilizando el kit RNeasy (Qiagen), y el ADNc fue generado utilizando Superscript II (Invitrogen). El PCR se llevó a cabo durante 30 ciclos para todos los marcadores excepto la β-actina (25 ciclos). Para la metafase se trataron células esparcidas con 5 ml de KCl al 0.56% durante 20

minutos, se fijaron con metanol: ácido acético (3:1) sobre hielo durante 15 minutos, se distribuyeron sobre láminas de vidrio y se tiñeron con TOPRO-3 (sondas moleculares).

Para referencia solamente:

Cultivos de embrión y feto humanos

5 La investigación sobre tejido humano con consentimiento informado fue aprobada por la Research Ethics Committee of Lothian Health Board. Se donaron embriones humanos supernumerarios congelados para investigación bajo licencia R0132 emitida por el Human Fertilisation and Embryology Authority. Se diseccionó córtex humano a partir de un feto en etapa Carnegie 19/20 después de la terminación electiva con consentimiento para la investigación bajo las guías Polkinghorne.

10 Trasplantes

La cirugía fetal fue llevada a cabo como lo describe Magrassi et al., 1998. Utilizando un capilar de vidrio, 5×10^4 células en un volumen de 1 μ l de HBSS fueron inyectadas en los vesículos telencefálicos de fetos de rata E14.5 Sprague Dawley expuestos bajo transiluminación. Los fetos inyectados fueron recolocados en la cavidad abdominal para desarrollo hasta su término. Después del nacimiento los animales fueron sacrificados a los siete días (día postnatal (P) 1, n=16) y cinco semanas (P30, n=8) después del trasplante. Para los trasplantes a adultos, ratones 129 o CD1 fueron colocados en un marco de estereotaxia Kopf y recibieron una inyección de 2×10^5 células NS suspendidas en 5 μ l de HBSS en el estriato (n=22) o el hipocampo (n=21). Los ratones trasplantados fueron sacrificados después de dos (n=16) y cuatro semanas (n=10) y fueron perfusionados por vía transcardíaca con 4% de paraformaldehído. Se tiñeron criosecciones (16 μ m) con los siguientes anticuerpos: (ratón): NeuN (1:100) y Ki67 (1:10) (Chemicon), MAP2 (1:200; Becton Dickinson), Nestina (1:5; Ron McKay); (conejo): β III tubulina (1:500; Covance); GFAP (1:200; Dako); anticuerpos secundarios, Texas Red (Vector) (Jackson ImmunoResearch) y AlexaFluor 488 (Sondas moleculares). Las secciones fueron preservadas en solución antidecaimiento y analizadas en microscopios confocales Nikon TE2000-S ECLIPSE y Biorad Radiance 2100.

Ejemplo 2-2

25 Se indujo diferenciación monocapa de células ES durante 7 días y luego se sembraron en medio basal (NS-A más N2) suplementado con EGF y FGF-2. Las células que sobrevivieron bajo estas condiciones mínimas (no permisivas para supervivencia de células ES) se asociaron predominantemente en aglomeraciones flotantes. Después de 3-5 días estos agregados fueron recolectados y sembrados en medio fresco. Se unieron al cabo de 2-3 días y crecieron en una población morfológicamente homogénea de células bipolares, denominadas LC1. Al replicar las células LC1 continuaron creciendo como cultivos adherentes, formando frecuentemente redes reticulares. Pueden ser continua y rápidamente propagados con un tiempo de duplicación de aproximadamente 24 horas. Las células LC1 despliegan los marcadores precursores neuronales nestina y RC2 pero la expresión del marcador de diferenciación en astrocitos GFAP o de antígenos neuronales es despreciable (figura 1A). Por exposición a suero o BMP, las células LC1 adoptan la morfología típica de los astrocitos al cabo de 48 horas y subsecuentemente expresan de manera uniforme GFAP (figura 1A, e). En contraste, las células con procesos neuronales aparecen después de la resiembra sobre laminina sin EGF durante 5-7 días y luego retirando el FGF-2. Estas células expresan marcadores neuronales tipo III β -tubulina, MAP2 (figura 1A, f, g) y neuN (no mostrado). La mayoría de las neuronas muestran tinción para GAD67 (figura 1A, g) y GABA (no mostrado) y a los 7 días una subpoblación muestra la expresión del marcador maduro sinaptofisina (figura 1A, h). Se generan altos números de neuronas (>35%) incluso después de 115 replicaciones (figura 1A, i). Junto con la observación de que las células LC1 retienen un contenido de cromosoma diploide en las últimas replicaciones (no mostradas), esto confirma la presencia de células madre neuronales (NS) autorrenovadoras.

Ejemplo 2-3

45 Para determinar si la agregación celular es esencial para la generación de células NS, mantuvimos la unión celular a lo largo del proceso de derivación. Para esto explotamos la selección de linaje (Li et al., 1998) usando células ES 46C en las cuales el casete informador/de selección GFPirespac está integrado en el gen Sox1, un marcador específico de la especificación neuronal (Aubert et al., 2003). La selección de puomicina transiente después de la inducción de la diferenciación generó una población purificada de precursores neuronales sin células ES residuales (Stavridis et al., 2003) (figura 1B, a, b). Se aplicaron entonces FGF-2 y EGF a los precursores neuronales que expresan Sox1 en medio enriquecido. Las células siguieron estando adherentes en esta condición. La heterogeneidad celular se redujo al cabo de 3-4 replicaciones puesto que las células bipolares se incrementaron progresivamente en número y comenzaron a formar redes extensas. De manera intrigante, la expresión de Sox1 se perdió en esta etapa (figura 1B c, d) pero las células permanecieron positivas para Sox2 y nestina. Para establecer la presencia de células madre neuronales (NS), se aislaron células individuales en pozos Terasaki y se expandieron como cultivos adherentes (figura 1B, e, f). Inicialmente se derivaron 5 líneas clonales de morfología y características

de crecimiento similares a la población LC1 en volumen. Estas células carecían de expresión detectable de los factores de pluripotencia Oct4 y Nanog, y también del marcador neuronal temprano Sox1, pero retenían los marcadores pan-neuroepiteliales Sox2 y nestina (figura 1C). Las células NS fueron generadas así a través de un precursor neuroectodérmico temprano positivo a Sox1 a través de cultivo adherente continuo.

5 Ejemplo 2-4

El clon NS-5 fue examinado en mayor detalle y se encontró que expresaba ARNm de Pax6, Glast y BLBP, y por ser inmunopositivo para RC2, vimentina, 3CB2, SSEA1/Lex1 y prominina (figura 1 D). Este conjunto de marcadores se considera diagnóstico para gliales radiales neurogénicas, los precursores tanto de neuronas como de astrocitos durante el desarrollo del sistema nervioso (Campbell et al., 2002; Hartfuss et al., 2001). Como sucede con las células LC1 no clonadas, las células NS-5 fueron competentes para la diferenciación de astrocitos y neuronas (figura 1E). Las células NS-5 sembradas a una densidad clonal en EGF más FGF-2 dieron lugar a colonias de células bipolares. Cada colonia mostró la expresión de RC2 y BLBP en virtualmente todas las células y ausencia de GFAP (figura 1 F, c, d). Estos subclones pudieron ser tomados y expandidos de manera continua. Para determinar la frecuencia de células dentro de los cultivos NS que son capaces de diferenciación celular se sembraron de nuevo células NS-5 en densidad clonal, se expandieron durante 12 días en EGF/FGF-2 seguido por FGF-2 solo durante 5 días, y luego 7 días adicionales sin factor de crecimiento. Cada colonia (126/126) produjo células positivas en TuJ (figura 1F, b). Estos datos indicaron que todas las células formadoras de colonias en cultivos NS eran competentes para la diferenciación neuronal. Finalmente, al igual que LC1, las células NS-5 mantuvieron un complemento de cromosoma diploide (figura 1 G) y representaron una línea de células madre (NS) clonales no transformada que se autorrenovaba sin requerir un microambiente celular complejo.

Ejemplo 2-5

Para establecer si el protocolo de inducción en monocapa libre de suero es un prerrequisito para la generación de células NS, se indujeron células ES para diferenciarlas por formación de cuerpo embriode y exposición a ácido retinoico en un medio con contenido de suero (Bain et al., 1995). Los agregados fueron sometidos a la selección de linaje por Sox2 (Li et al., 1998; Billon et al., 2002) con G418 durante 48 horas y luego fueron resembrados en la presencia de FGF-2 y EGF sin suero. Después de la unión, las células positivas a Sox2, positivas a nestina proliferaron de tal forma que desplegaron la morfología bipolar y crecimiento en red típico de las células NS más la capacidad para la diferenciación en astrocitos y neuronas después de múltiples replicaciones (datos no mostrados). Así se derivaron células NS a partir de cuerpos embrioides.

30 Ejemplo 2-6

Se derivaron células NS utilizando inducción monocapa sin selección de linaje tal como se describe para LC1 a partir de tres aislados de células ES independientes, E14TG2a, CGR8 y R1. Todas las líneas NS examinadas expresaron nestina y RC2 en al menos el 95% de las células. Una inspección más detallada de células NS derivadas de CGR8 y E14TG2a mostraron el panel completo de marcadores gliales radiales (figura 2A), los marcadores precursores neuronales Sox2 y Sox3, más los factores de transcripción de bHLH Olig2 y Mash1 (figura 2B). La subregulación de Sox1 pero con mantenimiento de Sox2 fue una característica impactante de estas células NS, a la vista de la función determinativa postulada de estos factores de transcripción (Pevny et al., 1998). Así, mientras que Sox1 marca todos los precursores neuroectodérmicos, no es retenido en células madre donde Sox2 probablemente juegue un papel clave. Estas células NS también expresaron Emx2 el cual está implicado en la expansión de las células precursoras neuronales (Hein et al., 2001; Galli et al., 2002). Todos los cultivos de NS probados experimentaron diferenciación en astrocitos y neuronas establecida tanto por morfología como inmunotinción (figura 2C).

Ejemplo 2-7

A la luz de su relación aparente con las gliales radiales, examinamos si las células NS resultaban de la preadaptación de las células ES a la propagación *ex vivo* o podrían ser derivadas de tejido neuronal fetal. Células CNS fetales primarias de cerebro fetal de E16.5 se adhirieron pobremente a plástico en medio basal más factores de crecimiento y espontáneamente formaron agregados. Después de 6-7 días estos agregados se depositaron sobre plástico recubierto con gelatina. Catorce días después, los crecimientos fueron tripsinizados y sembrados sobre plástico recubierto con gelatina. En tres experimentos separados las células morfológicamente identificables como células NS proliferaron y fueron subsecuentemente expandidas en líneas celulares continuas. Estos derivados de cerebro fetal expresaron los mismos marcadores gliales radiales y neurogénicos que las células NS derivadas de células ES (figura 2A, B) y mostraron perfiles de ARNm consistentes. Fueron de la misma manera competentes para la diferenciación en astrocitos y neuronas (figura 2C). Las células Cor-1 derivadas de córtex fueron sembradas como células individuales y luego las colonias fueron sometidas a eliminación secuencial del factor de crecimiento como se describió para NS-5. Cada colonia produjo neuronas positivas a TuJ. Esto indicó que todas las células clonogénicas en el cultivo de Cor1 eran neurogénicas. Las células Cor-1 también fueron subclonadas fácilmente y se expandieron continuamente a partir de células individuales, lo que indica autorrenovación. Así las células NS fueron derivadas de cerebro fetal y compartieron las propiedades claves de las células NS derivadas de células ES.

5 La mayoría de las células NS tenían la morfología bipolar elongada, extensiones lameladas en proyección y núcleos ovoides anticipados para gliales radiales (Rakic, 2003). Las células aplanadas y compactas con cortas extensiones también estaban presentes. La inmunotinción para la histona H3 fosforilada del marcador de metafase indicó que las células compactas eran mitóticas. La videomicroscopía de lapso de tiempo confirmó el cambio dinámico en morfología antes de la división celular. Además, el lapso de tiempo reveló que la célula NS experimenta migración nuclear intercinética, un rasgo bien caracterizado de las células neuroepiteliales y gliales radiales *in vivo*.

Las células NS fueron por lo tanto expandibles de manera continua en análogos *in vitro* de los gliales radiales neurogénicos.

Ejemplo 2-8

10 Neuroesferas de ratón congeladas/descongeladas en replicación 40 se dejaron unir a plástico recubierto con gelatina en medio de expansión NS. Crecieron células bipolares que son indistinguibles de células NS. Estas células pueden ser propagadas en serie como poblaciones uniformemente positivas en RC2, negativas en GFAP y luego fueron inducidas para diferenciarse en astrocitos o neuronas.

Ejemplo 2-9

15 Se investigó el comportamiento de células NS por trasplante en cerebro de ratón. Las células LC1 derivadas de células ES transducidas con un vector de expresión eGFP lentiviral fueron introducidas en el cerebro en desarrollo por inyección intrauterina en E14.5 (Magrassi et al. 1998). Los animales fueron sacrificados después del nacimiento y en la presencia de células positivas a eGFP examinadas en secciones del cerebro. La progenie de células NS había migrado hacia diversas regiones del cerebro. Los análisis inmunohistoquímicos revelaron la coexpresión de eGFP con el marcador precursor nestina, marcadores neuronales TuJ, Neun y MAP2, y en números menores con GFAP. Las células NS también fueron inyectadas en el estriato de ratón adulto. En este caso las células positivas a GFP permanecieron localizadas en la vecindad del sitio de inyección. Cuatro semanas después del injerto, el 44.4±5.7% de las células que expresaban GFP tenían morfología neuronal y eran inmunopositivas para MAP2, el 37.4±6.1% expresaban GFAP y el 4.2±1.9% retuvieron la expresión de nestina (figura 3). El marcador proliferativo Ki67 fue detectado solamente en 1.0±0.6% de células positivas a GFP indicando que las células NS se salen del ciclo celular *in vivo*. En consistencia con esto no se observó evidencia histológica de proliferación no regulada o formación tumoral en un total de 35 cerebros examinados un mes después del trasplante. Además, las células NS injertadas a cápsulas renales de ratón no proliferaron o dieron lugar a teratomas. Estos datos indican que las células NS pueden sobrevivir y diferenciarse tanto en ambientes de cerebro fetal como de adulto y a diferencia de las células ES (Brustle et al., 1997), no dan lugar a teratomas. Además, la frecuencia relativamente alta de diferenciación neuronal está en marcado contraste con los injertos de neuroesferas replicadas (Rossi et al., 2002).

Ejemplo de referencia 2-10

35 Finalmente investigamos si células NS similares podrían ser aisladas a partir de fuentes humanas. En el proceso de derivar células ES humanas a partir de embriones supernumerarios donados, observamos después de 5-6 semanas de cultivo una diferenciación extensiva en estructuras rosetas típicas de células neuroepiteliales. Estas células fueron transferidas a medio de expansión NS. Después de 3-4 semanas adicionales emergieron células bipolares similares a células NS a partir de estos cultivos (figura 4A) y habían sido cultivadas de manera continua durante 5 meses. También extrajimos córtex fetal humano en etapa 19-20 Carnegie a partir de una terminación electiva. Las células disociadas inicialmente formaron agregados flotantes que después de 7 días fueron sembrados y se dejaron enlazar a plástico recubierto con gelatina como se hizo para la derivación de células NS a partir de cerebro fetal de ratón. Se estableció un cultivo proliferante (figura 4B). Los cultivos NS humanos tanto de células ES como de tejido fetal fueron caracterizados por la presencia de células aplanadas asociadas con las células bipolares. Sin embargo, todas las células expresaron los marcadores precursores inmaduros nestina, vimentina y 3CB2 (figura 4B). La monitorización por lapso de tiempo confirmó que las dos morfologías celulares son plásticas e interconvertibles. 45 Estas células humanas también exhibieron bajos niveles de GFAP en consistencia con la actividad del promotor GFAP humano en gliales radiales (Rakic, 2003; Malatesta et al., 2000). Proliferaron más lentamente que las células de ratón, con tiempos de duplicación de varios días. Después de la eliminación secuencial de EGF y FGF-2 parecieron generar células neuronales inmaduras (figura 4C). Las células de morfología típica de astrocitos con intensa inmunorreactividad a GFAP fueron producidas después de replicación en suero (figura 4C).

50 Ejemplo 3

Las propiedades electrofisiológicas de las células NS en cultivo fueron investigadas durante la diferenciación *in vitro* empleando la variante de célula entera de la técnica parche-pinza, con el fin de determinar, si siguiendo tratamientos específicos, estas células podrían ser transformadas eficientemente en neuronas funcionales y maduras desde un punto de vista electrofisiológico.

Soluciones para el registro electrofisiológico

Se establecieron sellos entre electrodos y células en una solución de baño que consistía de (en mmoles/l): 155 NaCl, 1.0 CaCl₂, 1 MgCl₂, 3.0 KCl, 10 glucosa, 10 HEPES/NaOH (pH 7.4). Después de establecer la configuración de célula entera, para el registro de corriente-pinza y para el registro de corriente total en voltaje-pinza, la solución para llenado de pipeta contenía (en mmoles/l): 128 KCl, 10 NaCl, 11 EGTA, 4 Mg-ATP, 10 HEPES/KOH (pH 7.4). Para el estudio de los canales de Na⁺ controlados por voltaje bajo condiciones de voltaje-pinza, la pipeta de parche fue llenada con (en mmoles/l): 130 CsCl, 10 NaCl, 20 TEA-Cl, 10 EGTA, 2 MgCl₂, 4 Mg-ATP, 10 HEPES/CsOH (pH 7.4) y la solución extracelular contenía (en mmoles/l): 130 NaCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 glucosa, 5 tetraetilamonio-Cl, CdCl₂ 0.2, 10 HEPES/NaOH (pH 7.4). Para el estudio de los canales de Ca²⁺ controlados por voltaje, la pipeta de parche fue llenada con (en mmoles/l): 120 CsCl, 20 TEA-Cl, 10 EGTA, 2 MgCl₂, 4 Mg-ATP, 10 HEPES/CsOH (pH 7.4) y la solución extracelular contenía (en mmoles/l): 130 NaCl, 10 BaCl₂, 10 glucosa, 5 tetraetilamonio-Cl, 10 4-AP 1, TTX 10⁻³, HEPES/NaOH (pH 7.4).

Registro de parche-pinza

Las corrientes iónicas fueron registradas bajo condiciones de voltaje-pinza utilizando la configuración de célula completa parche-pinza (19) a temperatura ambiente (20-24°C) con un amplificador de parche-pinza Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., Burlingame, CA) y se digitó en intervalos de muestreo de 26-100 μ segundos utilizando un convertidor Digidata 1322A A/D (Axon Instruments Inc., Burlingame, CA) en interfaz con un PC compatible con IBM. La estimulación, adquisición y análisis de datos se llevaron a cabo utilizando los siguientes paquetes de software: pClamp 9 (Axon Instruments Inc., Burlingame, CA) y ORIGIN 6 (Microcal Software Inc., Northampton, MA). Para los experimentos voltaje-pinza se redujeron primero los componentes lineales de corrientes de fuga y capacitivas mediante circuitos análogos y luego se cancelaron casi completamente con el método P/N. Las pipetas de parche fueron hechas a partir de vidrio de borosilicato y pulidas al fuego. Las pipetas tenían una resistencia final de 3-4 M Ω cuando se llenaron con solución interna. Las corrientes fueron filtradas a 5 KHz.

La figura 5A muestra registros de corriente obtenidos durante las etapas de voltaje-pinza de célula completa para potenciales de prueba de despolarización en tres células NS en diferentes etapas de diferenciación *in vitro* (cultivadas respectivamente durante 6, 20 y 30 días en un medio de diferenciación), utilizando baño y solución de llenado de pipeta adecuados para el aislamiento de las corrientes iónicas controladas por voltaje de entrada (Na⁺) y salida (K⁺). A partir de una inspección simple de los trazados de corriente es evidente que una corriente controlada por voltaje de salida dimensionable ya está presente en las etapas tempranas de la diferenciación *in vitro* (6 días, traza a). Esta corriente, bloqueada por la aplicación de una solución salina extracelular que contiene tetraetilamonio-Cl 5 mM, tiene las características de una corriente rectificadora retardante de K⁺. Su amplitud se incrementa solo ligeramente en las etapas posteriores de la diferenciación (20-30 días, trazas b y c respectivamente). En contraste, la amplitud de la corriente de entrada, despreciable después de 6 días, se incrementa dramáticamente incrementando el tiempo de exposición al medio de diferenciación. La figura 5B muestra las respuestas de voltaje disparadas después de la inyección intracelular de estímulo de corriente despolarizante rectangular entre 70 y 300 pA a partir de un potencial de sostenimiento de aproximadamente -80 mV, después de conmutar del modo voltaje-pinza a corriente-pinza en las mismas células mostradas en la figura 5A. En efecto, el incremento en amplitud de la corriente de entrada controlada por voltaje refleja la capacidad de las células diferenciadoras para disparar potenciales de acción. En efecto, la célula expuesta durante solamente seis días a los agentes de diferenciación y que muestra una corriente de entrada despreciable no fue capaz de disparar una respuesta en voltaje regenerativa (traza marcada con (a) en la figura 5B). En contraste, un potencial de acción excesivo con una rata de despolarización relativamente rápida pudo ser disparado en el cultivo celular en medio de diferenciación por 30 días (traza marcada con (c) en la figura 5B) y desplegó una corriente de entrada grande (traza c en la figura A). Una situación intermedia, con un potencial de acción abortivo, fue encontrada en la célula tratada durante veinte días con los agentes diferenciadores (traza marcada con (b) en la figura 5B) y desplegando una corriente de entrada moderada (traza b en la figura A). De este análisis preliminar surge que las propiedades de excitabilidad de estas células están estrictamente correlacionadas con la magnitud de la conductancia de entrada regulada por voltaje. Para un análisis cuantitativo de esta conductancia como función del tiempo de exposición al medio de diferenciación, las corrientes de entrada fueron disparadas utilizando células en diferentes etapas de diferenciación y aplicando soluciones salinas intra y extracelulares específicas para el estudio de la actividad de los canales de Na⁺ controlados por voltaje (véase métodos). En cualquier momento de la diferenciación celular la corriente de entrada inactivadora rápida fue completamente bloqueada por el bloqueador del canal de Na selectivo tetrodotóxina (1 μ M) y alcanzó un pico en un potencial de prueba entre -20 y -10 mV, mostrando las características típicas de las corrientes de Na⁺ controladas por voltaje en neuronas (datos no mostrados). En la figura 5C se muestra el desarrollo de la amplitud de corriente Na⁺ a -20 mV como función del tiempo de exposición al medio de diferenciación. De manera interesante, el incremento de la conductancia de Na⁺ se correlaciona bien con la exposición creciente de las células al medio de diferenciación. En efecto, en promedio la amplitud de corriente de Na⁺ se incrementa en un factor de aproximadamente diez al cabo de 30 días de tratamiento (desde -55 \pm 14 pA (n=17) durante los primeros 5 días a -434 \pm 135 pA (n=13) por más de 25 días). De la misma manera, el potencial regenerativo (el Δ V medida entre el umbral y el pico disparado por la corriente Na⁺ bajo condiciones de corriente-pinza varió entre 0 y +20 mV durante los primeros 15 días de la diferenciación *in vitro* (n=6), mientras que después de más de 25 días de tratamiento

alcanzó valores entre +30 y +70 mV (n=6). En total, las propiedades de excitabilidad y las de conductancia de Na⁺ controlados por voltaje subyacentes encontradas en las células NS tratadas por más de 25 días con el medio de diferenciación son típicas de las neuronas que se desarrollan hacia su fenotipo adulto. Otra característica que corrobora las conclusiones previas es la presencia de conductancias en el canal de Ca²⁺ controladas por voltaje en la mayoría de las células probadas después de la exposición al medio de diferenciación durante al menos siete días o más. La figura 5D muestra las tasas de muestra obtenidas por despolarización de membrana a los potenciales de prueba indicados para las mismas células sumergidas en Ba²⁺ 10 mM. El componente de corriente de activación rápida e inactivación relativamente lenta ($\tau_h = 21$ ms) obtenida a -40 mV es reminiscente de la corriente del canal Ca²⁺ LVA neuronal (Carbone y Lux, 1987). En contraste, la corriente de Ba²⁺ obtenida a 0 mV, que despliega una inactivación lenta e incompleta ($\tau_h = 73$ ms), tiene las características típicas de la corriente del canal de Ca²⁺ HVA neuronal. La presencia en esta célula de dos conductancias distintas del canal de Ca²⁺ LVA y HVA está confirmada por la relación corriente-voltaje de la figura 5E. En promedio la corriente LVA tiene un pico a -40 mV, mientras que la relación I/V para la corriente HVA tiene un pico a 0 mV. Una corriente de Ba²⁺ HVA fue detectable en 19 de 27 células, mientras que un componente de corriente LVA fue medido en el 60% de las células que ya expresaban una corriente de Ca²⁺ HVA (n = 13).

Estos datos muestran que las neuronas producidas a partir de células madre neuronales de la invención pueden funcionar: pueden disparar potenciales de acción, la marca característica de las neuronas activas.

Así, hemos derivado y propagado de manera homogénea células NS definidas como progenie diferenciada de células ES y extractos cerebrales de feto. Las células NS proliferaron de manera clonal en monocultivo adherente simple y permanecieron diploides. Después de expansión prolongada, se diferenciaron eficientemente en neuronas y astrocitos tanto *in vitro* como en trasplante en cerebro adulto. Las células NS también formaron oligodendrocitos *in vitro*. Las células NS expresaron de manera uniforme características morfológicas y moleculares de gliales radiales, precursores fetales de neuronas y astrocitos. Fuimos capaces de establecer líneas celulares NS adherentes de cerebro fetal de ratón y humano.

Ejemplo 6

Se obtuvieron células NS a partir de células ES de ratón y córtex fetal utilizando el protocolo a continuación. Las células NS derivadas expresaron uniformemente marcadores gliales radiales. Las células NS derivadas específicamente de células CGR8 ES o de córtex fetal E16 (referencia interna: Cor-1 y derivado clonal Cor-1.3) fueron analizadas en cuanto a la expresión de los marcadores indicadores por inmunquímica. El examen en potencia alta mostró que los marcadores gliales radiales se expresaron cada uno en casi todas las células mientras que eran uniformemente negativos para GFAP.

Ejemplo 7

Las células NS fueron derivadas a partir de neuroesferas de cerebro anterior fetal de ratón expandidas utilizando el protocolo que sigue. Una línea NS derivada de un cultivo de neuroesferas fetal a largo plazo (40 replicaciones) exhibió morfología idéntica a líneas NS derivadas de ES, expresaron inmunorreactividad al marcador de células precursoras neuronales/gliales radiales, y pudieron diferenciarse en neuronas y astrocitos. Esto demuestra que las células NS obtenidas de neuroesferas fetales frescas eran las mismas que las neuroesferas congeladas y luego cultivadas como neuroesferas durante un largo tiempo.

Ejemplo 8

Células NS de ratón LC1 fueron trasplantadas en cerebro de rata fetal. Las imágenes confocales de las células NS, transducidas lentiviralmente con eGFP, fueron tomadas una semana después del trasplante en el ventrículo de ratas E14.5. Las células donantes migraron desde el ventrículo hacia el parénquima en aglomeraciones y como células individuales. Las células injertadas mostraron colocalización de eGFP y el marcador neuronal MAP2, el marcador astrogliar GFAP o el marcador de células progenitoras nestina. Así, las células NS migraron y se diferenciaron después del trasplante a cerebro de rata fetal.

Ejemplo 9

Protocolos para la derivación y manipulación de líneas celulares NS

Hemos diseñado los siguientes protocolos para la derivación y manipulación de líneas celulares NS.

Derivación de líneas celulares NS de ratón a partir de células ES

Las células ES pueden ser convertidas eficientemente en progenitores neuronales que expresan Sox1 en cultivo de monocapa adherente [P1]. Protocolos detallados y problemas para esta diferenciación de células ES están descritos

abundantemente [P2]. En resumen, las células ES son cultivadas de manera rutinaria bajo condiciones libres de alimentación en medio suplementado con suero de ternera fetal al 10% y factor inhibidor de leucemia recombinante a 100 U/ml (LIF) sobre plástico para cultivo de tejido recubierto con gelatina [P3]. Las células ES no diferenciadas se expanden a ~80% de confluencia en un matraz T75 (Iwaki), se tripsinizan y resucitan en medio N2B27 [P2]. Las células son sembradas sobre placas de 9 centímetros (Iwaki) que habían sido recubiertas con una solución de gelatina al 0.1% (Sigma) durante al menos 10 minutos y luego se dejaron secar. Puesto que la densidad de siembra inicial es un parámetro crucial para la inducción neuronal eficiente, y puede variar entre líneas de células ES, hemos sembrado de rutina diferentes densidades celulares (0.8×10^6 , 1×10^6 y 1.2×10^6) por placa. El medio de cultivo se cambia cada día, retirando en el proceso células desprendidas o muertas. Bajo estas condiciones el 50-80% de las células experimentará especificación de linaje neuronal al cabo de 4-5 días y expresará diferenciación neuronal detectable del día 5 en adelante.

La conversión de cultivos progenitores heterogéneos a líneas celulares NS homogéneas puede alcanzarse como sigue. Los cultivos diferenciados en el día 7 son tripsinizados y se resiembran 2-3 x 10 células en un matraz T75 no cubierto en medio de expansión NS, que comprende medio NS-A (Euroclone) suplementado con L-glutamina 2 mM final (Gibco), suplemento N2 modificado (recién preparado internamente) [P2] y 10 ng/ml de EGF de ratón (PeproTech) y FGF-2 humano (PeproTech). Los medios de expansión pueden ser almacenados a 4°C por hasta 4 semanas. Al cabo de 2-3 días el matraz contendrá muchos miles de agregados flotantes en cultivo en suspensión (el número absoluto varía de acuerdo con la eficiencia de la diferenciación de las células ES inicial). Los agregados celulares son recolectados por centrifugación moderada o se dejan decantar por gravedad en un tubo universal de 30 ml durante 10 minutos. Esta etapa elimina residuos y células muertas, enriqueciendo así las células NS de inicio, y asegura un intercambio completo de medio. Las células son sembradas en 10 ml de medio de expansión NS fresco sobre un matraz T75 recubierto con gelatina (Iwaki). Después de 3-7 días adicionales, los agregados celulares se unirán al matraz y prontamente después de esto las células crecerán con morfología bipolar característica de células NS. Después del crecimiento extenso de las células (3-4 días adicionales) la población completa es tripsinizada y resembrada como células individuales sobre un matraz T75 recubierto con gelatina en medio de expansión. Las células crecen muy rápidamente (tiempo de duplicación ~25 horas) y permanecen adherentes. Al cabo de varias replications se eliminan las células diferenciales y explotadas residuales (monitorizadas por tinción con GFP-A y TuJ1) y los cultivos son uniformemente positivos para los marcadores de células NS.

Para células 46C ES (Sox1-GFP-IRES-pac anulación) [P4] puede utilizarse una selección transiente con puromicina (0.5 µg/ml) para eliminar células no neuronales y derivar células NS a través de cultivo adherente continuo. Las células 46C ES (1×10^6) son sembradas en medio N2B27 sobre una placa de 9 cm recubierta con gelatina para inducir el compromiso neuronal. Seis días después se agrega puromicina durante 48 horas. La población celular que expresa Sox1 enriquecida ($\sim 3\text{-}5 \times 10^6$) es resembrada entonces en medio N2B27 que contiene EGF (10 ng/ml) y FGF-2 (10 ng/ml) sobre placas de 9 cm recubiertas con gelatina. La población que expresa Sox1 inicialmente heterogénea morfológicamente adquiere progresivamente un carácter negativo a Sox1 y después de 3-4 replications una expresión de morfología y marcadores de células NS uniforme.

Derivación de líneas de células NS de ratón a partir de CNS y neuroesferas fetales

Los agregados celulares se forman en suspensión por disociación de córtex fetal de E16.5 y cultivo primario en medio de expansión para células NS. Estos agregados primarios pueden ser convertidos fácilmente en líneas celulares NS adherentes sembrándolos sobre sustrato recubierto con gelatina en medio de expansión. Con el fin de promover el enlace, es importante que los residuos/células muertas sean retirados efectivamente primero por sedimentación y se cambie el medio completamente. Los agregados celulares se unirán y crecerán al cabo de 2-5 días. Las células en crecimiento pueden ser tripsinizadas subsecuentemente a células individuales, sembradas y propagadas en medio de expansión para células NS. A partir de neuroesferas fetales replicadas [P5], las células NS pueden ser establecidas convenientemente por disociación y sembrarse directamente sobre plástico recubierto con gelatina en medio de expansión para NS. Durante las pocas replications iniciales las líneas derivadas de NS tienen una tendencia a agregarse, desprenderse del matraz y reconstituir neuroesferas, particularmente si la densidad celular se hace alta. Los cultivos por lo tanto deberían ser replicados a o en menos de 50% de confluencia. La tendencia a agregarse espontáneamente es variable, pero en general se reduce por replications adicionales, o a través del establecimiento de líneas celulares clonales.

Replicación y expansión de células NS

Una vez establecidas, las células NS se propagan en medio de expansión para NS. Las células NS son cultivadas sobre placas/matrazes recubiertos con gelatina y se dividen rutinariamente 1 en 2 a 1 en 5. Las células NS tienen un tiempo de duplicación de alrededor de 25 horas. Las células son replicadas utilizando tripsina/EDTA o a través de incubación con PBS libre de calcio/magnesio (Sigma). Para establecer líneas clonales, las células individuales pueden ser depositadas en micropozos recubiertos con gelatina en medio de expansión. Menos rigurosamente, las células pueden ser sembradas a densidad muy baja, 1000 células por placa de 9 cm. Las colonias aparecen al cabo de dos semanas y pueden ser extraídas y expandidas.

Criopreservación y recuperación de células NS

5 Las células NS son recuperadas fácilmente después de congelación/descongelación. Rutinariamente se tripsiniza un matraz T75 con 60-90% de confluencia, y se resuspende la pella en 1.5 ml de medio de expansión para NS más 10% de DMSO. Este luego es dividido en 3 criotubos x 1 ml (Nunc) y se almacenan a -80°C. Las células NS son recuperables después de más de 6 meses de almacenamiento en estas condiciones. Para almacenamiento a largo plazo los viales congelados son transferidos a nitrógeno líquido. Las células NS son descongeladas llevando rápidamente el vial a 37°C seguido por transferencia a 10 ml de medio de expansión NS precalentado. Las células son convertidas en pella y luego resuspendidas en medio de expansión fresco para eliminar el DMSO. La recuperación celular después de la criopreservación es >95% para células NS.

10 Diferenciación en astrocitos y neuronas de células NS

La diferenciación rápida de células NS a astrocitos positivos para GFAP ocurre al cabo de 2 días de exposición de las células NS a BMP4 (10 ng/ml) o 1% de FCS en NS-A (con N2, sin EGF/FGF) sobre matraces/placas recubiertos con gelatina. La densidad celular no es un parámetro crucial para la diferenciación en astrocitos.

15 Para la diferenciación en neuronas las células NS son recolectadas utilizando Accutase (Sigma) o PBS libre de calcio/magnesio para desprender las células y $0.5-1.0 \times 10^4$ células son sembradas en cada pozo de una placa multiplatos de 4 pozos recubiertos con poliornitina/laminina (Nunc) en medio NS-A suplementado con FGF-2 (5 ng/ml), N2 modificado y B27 (Gibco). Hemos encontrado que el medio basal NS-A es más permisivo para la diferenciación neuronal que otros medios basales. La mitad del volumen del medio se reemplaza cada 2-3 días para mantener el acondicionamiento del medio. Después de 7 días en estas condiciones cambiamos el medio a NS-A mezclado con medio neurobasal (Gibco) en una proporción de 1:1 suplementado con 0.25x N2 más B27 y sin EGF o FGF. Esta formulación promueve la diferenciación y maduración neuronal adicional. Para cultivos a plazo más largo de neuronas (más allá de 14 días) se intercambia el medio a neurobasal suplementado con B27 sin N2 en la presencia de BDNF (10 ng/ml).

Diferenciación de cultivo y neuronal de células NS humanas

25 Las células NS humanas se expanden sobre matraces/placas recubiertas con gelatina al 0.1% (Sigma) en medio de expansión como se hace para las células NS de ratón suplementado adicionalmente con 100 U/ml de factor inhibidor de leucemia humana recombinante (LIF). Las células tienen un tiempo de duplicación de aproximadamente 1 semana. Son replicadas con tripsina una vez que alcanzan ~30% de confluencia y se dividen 1 en 2. El sobrecrecimiento debe ser evitado para mantener el cultivo en monocapa y evitar la agregación y desprendimiento.

30 Para la diferenciación neuronal, las células NS humanas son recolectadas utilizando Accutase (Sigma) y alrededor de 1×10^4 células son sembradas en cada pozo de una placa de 12 pozos recubierta con poliornitina/laminina (Sigma) (Iwaki) en medio de expansión. Las células son expandidas hasta que alcanzan alrededor de 80% de confluencia. La diferenciación neuronal es inducida eliminando EGF y LIF del medio de expansión. Después de 7 días en la ausencia de EGF y LIF, se intercambia el medio a NS-A mezclado con medio neurobasal en una proporción de 1:1 (Gibco) suplementado con 0.5X N2, B27, FGF2 (5 ng/ml) y BDNF (10 ng/ml). Después de 7 días adicionales en estas condiciones, el medio es cambiado a medio neurobasal suplementado con B27 y BDNF (10 ng/ml) sin N2 ni FGF-2. La mitad del medio es cambiada cada 2 o 3 días como se hace para las células NS de ratón a lo largo de este protocolo. Después de 10 días adicionales las células de morfología neuronal inmunorreactivas con TuJ1 y MAP2 representan hasta 40% del número total de células. También se generan números significativos de astrocitos, en contraste con el protocolo para células NS de ratón para diferenciación neuronal en el cual emergen pocas células positivas a GFAP.

45 La invención se relaciona así con métodos y medios para obtener y mantener células madre neuronales de muchas especies en un estado de división simétrica, no diferenciado. La invención ha sido llevada a cabo utilizando células obtenidas o extraídas de fuentes de células ES, fetales y adultas excepto células ES humanas. En todos los casos las células resultantes obtenidas al seguir los métodos descritos aquí parecen y se comportan sustancialmente igual; todas ellas pueden ser mantenidas en cultivos de alta pureza por encima de números altos de, por ejemplo, cientos de, duplicadas con una alta proporción de las células que retienen la capacidad de formar neuronas y glías. Se describen aquí células NS obtenidas a partir de humanos (ES, CNS fetal), ratón (ES, CNS fetal, CNS de adulto) y rata (CNS fetal). Las células madre neuronales de ratón han sido cultivadas en cultivo en poblaciones puras y después de haber sido trasplantadas crecieron sin formar tumores pero diferenciadas *in vivo*.

Referencias

1. Reynolds, B. A. & Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-10 (1992).

2. Garcion, E., Halilagic, A., Faissner, A. & French-Constant, C. Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development* 131, 3423-32 (2004).
3. Morshead, C. M., Benveniste, P., Iscove, N. N. & van der Kooy, D. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med* 8, 268-73 (2002).
- 5 4. Suslov, O. N., Kukekov, V. G., Ignatova, T. N. & Steindler, D. A. Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14506-11 (2002).
5. Malatesta, P. et al. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37, 751-64 (2003).
6. Anthony, T. E., Klein, C., Fishell, G. & Heintz, N. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 41, 881-90 (2004).
- 10 7. Ying, Q.-L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M. & Smith, A. Conversion of embryonic stem cells to neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nature Biotechnology* 21, 183-186 (2003).
8. Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J. E. & Gottlieb, D. I. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 168, 342-57. (1995).
- 15 9. Li, M., Pevny, L., Lovell-Badge, R. & Smith, A. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr Biol* 8, 971-4 (1998).
10. Aubert, J. et al. Screening for mammalian neural genes via fluorescence-activated cell sorter purification of neural precursors from Sox1-gfp knock-in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1, 11836-41 (2003).
11. Stavridis, M. P. & Smith, A. G. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biochem Soc Trans* 31, 45-9. (2003).
- 20 12. Campbell, K. & Gotz, M. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* 25, 235-8 (2002).
13. Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N. & Gotz, M. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol* 229, 15-30 (2001).
- 25 14. Billon, N., Jolicoeur, C., Ying, Q. L., Smith, A. & Raff, M. Normal timing of oligodendrocyte development from genetically engineered, lineage-selectable mouse ES cells. *J Cell Sci* 115, 3657-65. (2002).
15. Bibel, M. et al. Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nat Neurosci* 7, 1003-9 (2004).
16. Gabay, L., Lowell, S., Rubin, L. L. & Anderson, D. J. Dereglulation of dorsoventral patterning by FGF confers trilineage differentiation capacity on CNS stem cells in vitro. *Neuron* 40, 485-99 (2003).
- 30 17. Hack, M. A., Sugimori, M., Lundberg, C., Nakafuku, M. & Gotz, M. Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6. *Mol Cell Neurosci* 25, 664-78 (2004).
18. Pevny, L. H., Sockanathan, S., Placzek, M. & Lovell-Badge, R. A role for SOX1 in neural determination. *Development* 125, 1967-78. (1998).
- 35 19. Heins, N. et al. Emx2 promotes symmetric cell divisions and a multipotential fate in precursors from the cerebral cortex. *Mol Cell Neurosci* 18, 485-502 (2001).
20. Galli, R. et al. Emx2 regulates the proliferation of stem cells of the adult mammalian central nervous system. *Development* 129, 1633-44 (2002).
21. Rakic, P. Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. *Glia* 43, 19-32 (2003).
- 40 22. Gregg, C. & Weiss, S. Generation of functional radial glial cells by embryonic and adult forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 23, 11587-601 (2003).
23. Magrassi, L. et al. Basal ganglia precursors found in aggregates following embryonic transplantation adopt a

- striatal phenotype in heterotopic locations. *Development* 125, 2847-55 (1998).
24. Brustle, O. et al. In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14809-14 (1997).
- 5 25. Rossi, F. & Cattaneo, E. Opinion: neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nat Rev Neurosci* 3, 401-9 (2002).
26. Malatesta, P., Hartfuss, E. & Gotz, M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127, 5253-63 (2000).
27. Gottlieb, D. I. Large-scale sources of neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 25, 381-407 (2002).
28. Temple, S. Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. *Nature* 340, 471-3 (1989).
- 10 29. Johe, K. K., Hazel, T. G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M. M. & McKay, R. D. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* 10, 3129-40 (1996).
30. Frederiksen, K., Jat, P. S., Valtz, N., Levy, D. & McKay, R. Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron* 1, 439-48 (1988).
- 15 31. Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J. M. & Tramontin, A. D. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2, 287-93 (2001).
32. Palmer, T.D., Takahashi, J. & Gage, F. H. The adult hippocampus contains primordial stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 389-404 (1997).
33. Ying, Q.-L. & Smith, A. G. in *Differentiation of Embryonic Stem Cells* (eds. Wassarman, P. & Keller, G.) 327-341 (Elsevier, 2003).
- 20 34. Carbone E and Lux HD (1987) Kinetics and selectivity of a low voltage activated calcium current in chick and rat sensory neurons. *J Physiol (Lond)* 386:547-570.
35. Nakayama T, Momoki-Soga T, Yamaguchi K, Inoue N. Efficient production of neural stem cells and neurons from embryonic stem cells. *Neuroreport* 15:487-491 (2004).
- 25 36. Vescovi et al. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp. Neurol.* 156:71-83 (1999).
37. Maric D, Maric I, Chang YH, Barker JL. Prospective cell sorting of embryonic rat neural stem cells and neuronal and glial progenitors reveals selective effects of basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor on self-renewal and differentiation. *J Neurosci.* 23:240-251 (2003).
- 30 38. Gritti et al. Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci.* 19:3287-3297 (1999).
- Referencias de protocolo
- P1. Ying Q-L, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A (2003) Conversion of embryonic stem cells to neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nature Biotechnology* 21: 183-186.
- 35 P2. Ying QL, Smith AG (2003) Defined conditions for neural commitment and differentiation. *Methods Enzymol* 365: 327-341.
- P3. Smith AG (1991) Culture and differentiation of embryonic stem cells. *J Tiss Cult Meth* 13: 89-94.
- P4. Stavridis MP, Smith AG (2003) Neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biochem Soc Trans* 31: 45-49.
- 40 P5. Reynolds BA, Weiss S (1996) Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 175: 1-13.

Reivindicaciones

1. Un método para promover la división simétrica de células madre neuronales que comprende cultivar dichas células madre neuronales unidas a un sustrato en un cultivo de monocapa adherente en un medio que contiene:

(a) un agonista de un receptor de EGF; o

5 (b) un agonista de un receptor de EGF y un agonista de un receptor de FGF,

en donde al menos 80% de dichas células son células madre neuronales con división simétrica y en donde no más del 1% de las células son positivas para la expresión de marcadores para astrocitos, neuronas u oligodendrocitos maduros.

10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde al menos 90% de dichas células son células madre neuronales con división simétrica.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde al menos 95% de dichas células son células madre neuronales con división simétrica.

4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células son células madre neuronales humanas.

15 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células madre neuronales son células madre neuronales de rata.

6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células madre neuronales son células madre neuronales de ratón.

20 7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde las células madre neuronales en la población se caracterizan porque son positivas para la expresión de los marcadores RC2, 3CB2 y BLBP.

8. Un método de acuerdo con cualquiera con la reivindicación 7, en donde las células madre neuronales en la población se caracterizan adicionalmente porque son positivas para la expresión de al menos uno de:

GLAST, Pax-6, los marcadores de precursor neuronal nestina o vimentina, el antígeno LewisX, Musashi-1 o prominina.

25 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde las células madre neuronales en la población se caracterizan adicionalmente porque son negativas para la expresión de al menos uno de:

Oct4 o Nanog.

10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde las células madre neuronales en la población son positivas para la expresión de Sox-2, y negativas para la expresión de Sox-1.

30 11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde las células madre neuronales en la población están libres de ácido nucleico exógeno que codifique un oncógeno, o en donde las células madre neuronales no son células madre inmortalizadas.

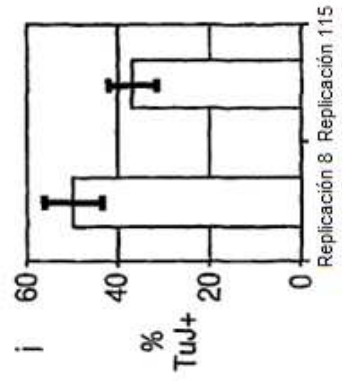
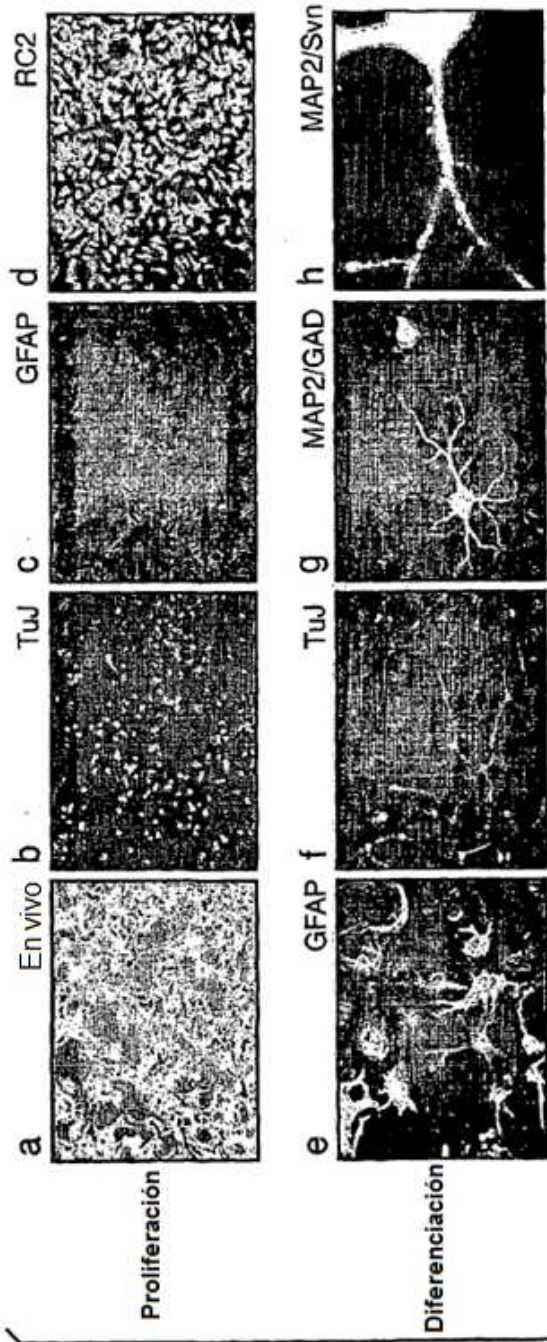


FIG. 1A

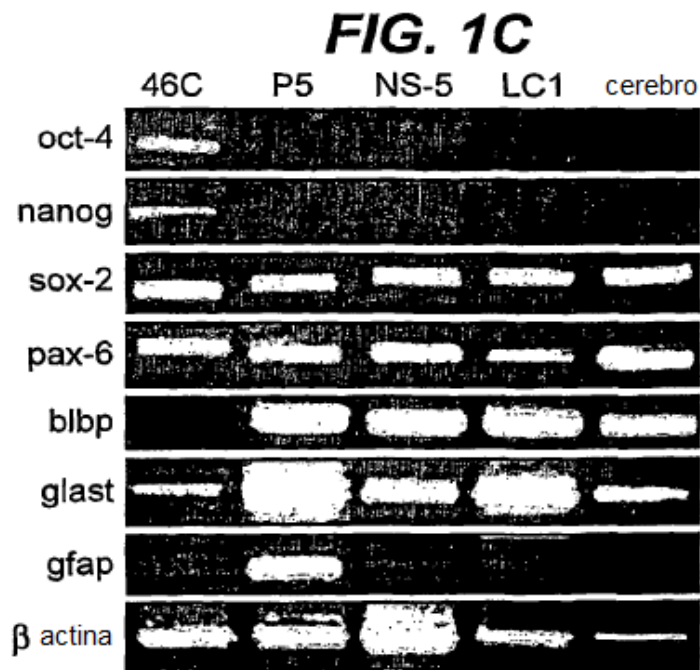
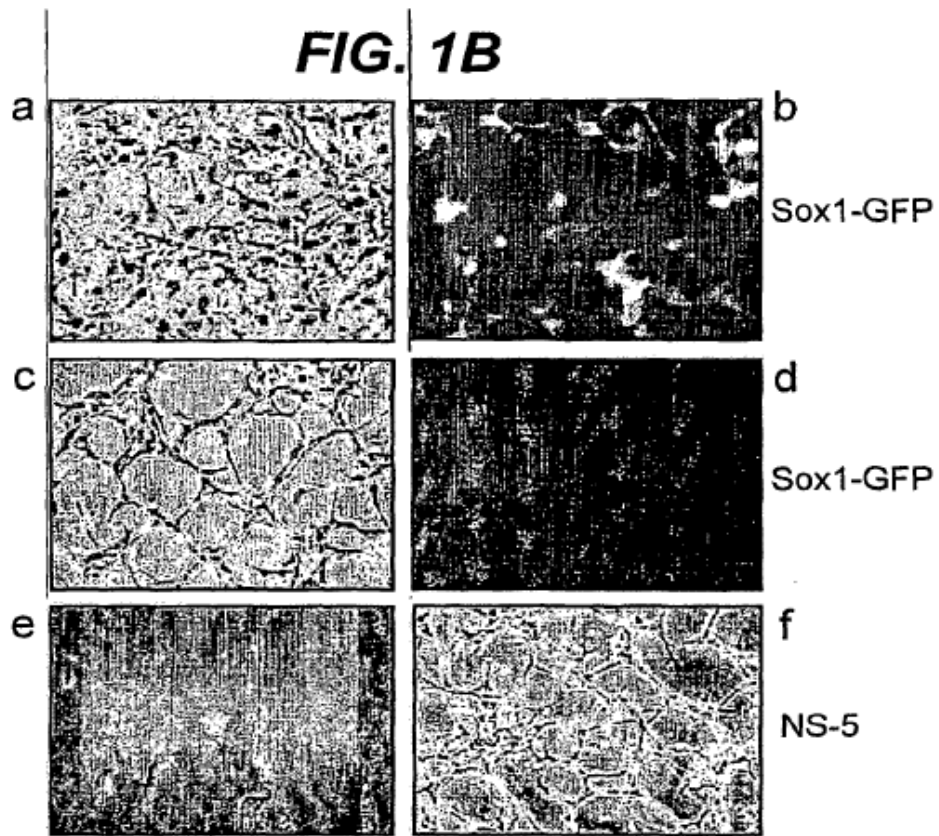


FIG. 1D

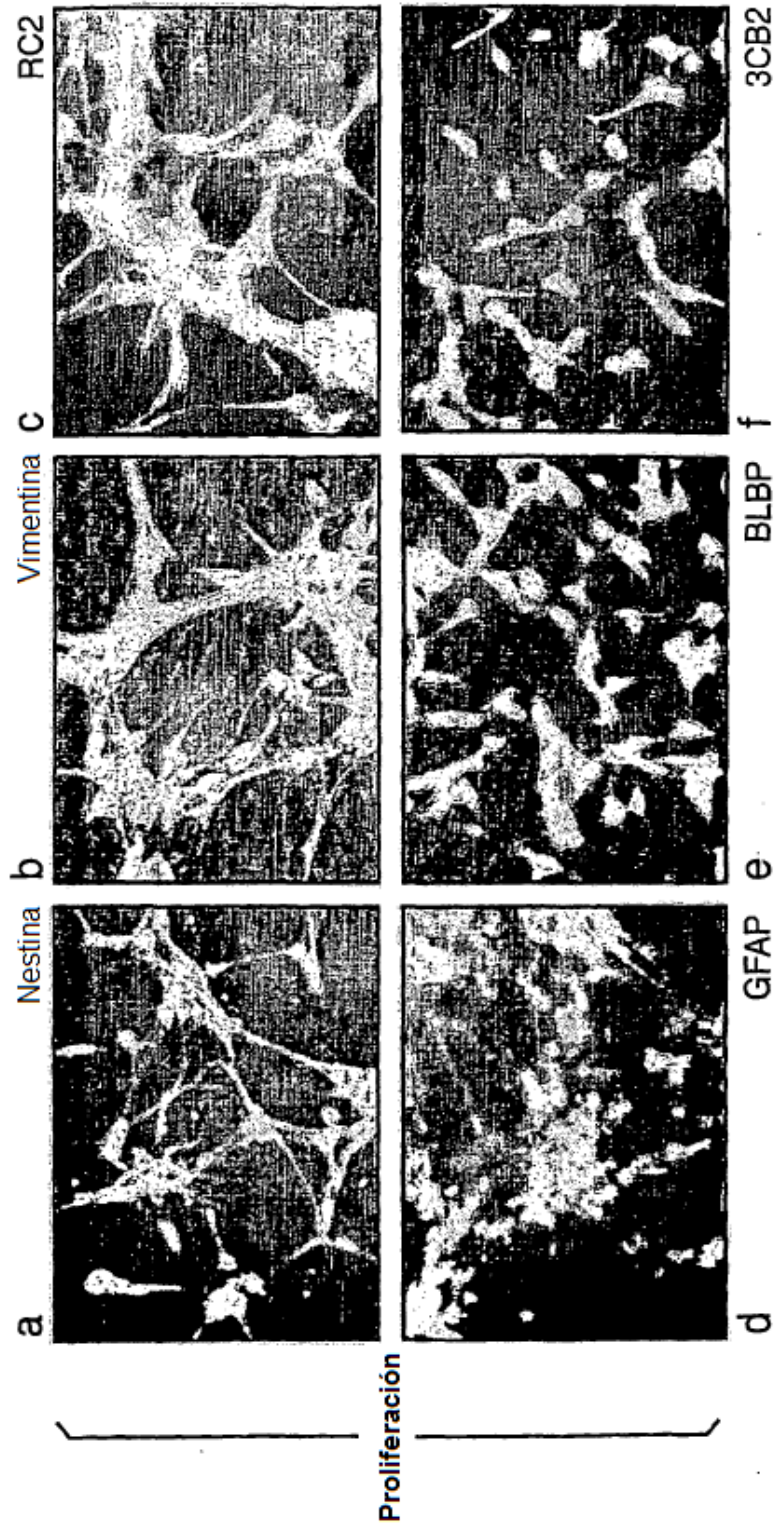


FIG. 1E

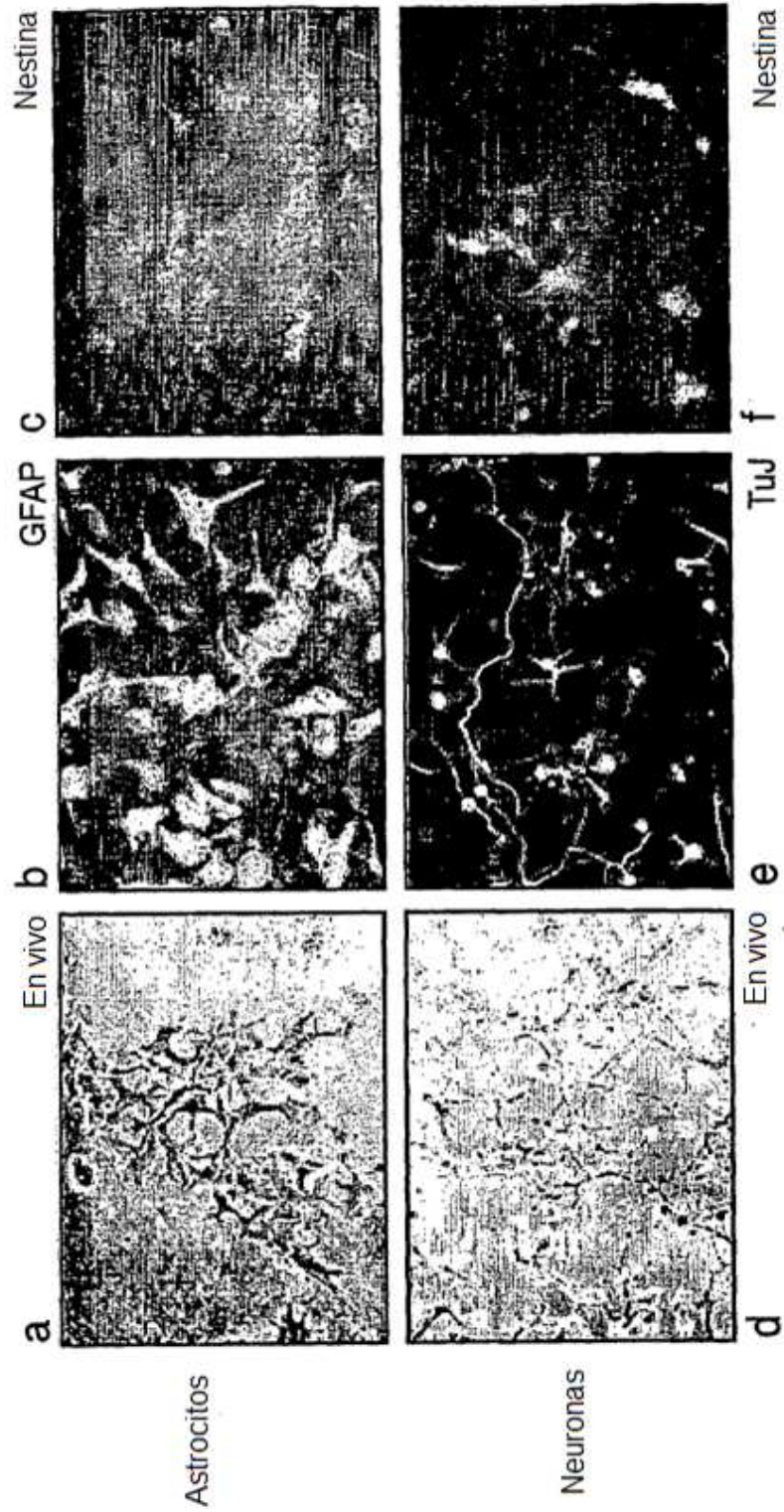


FIG. 1F

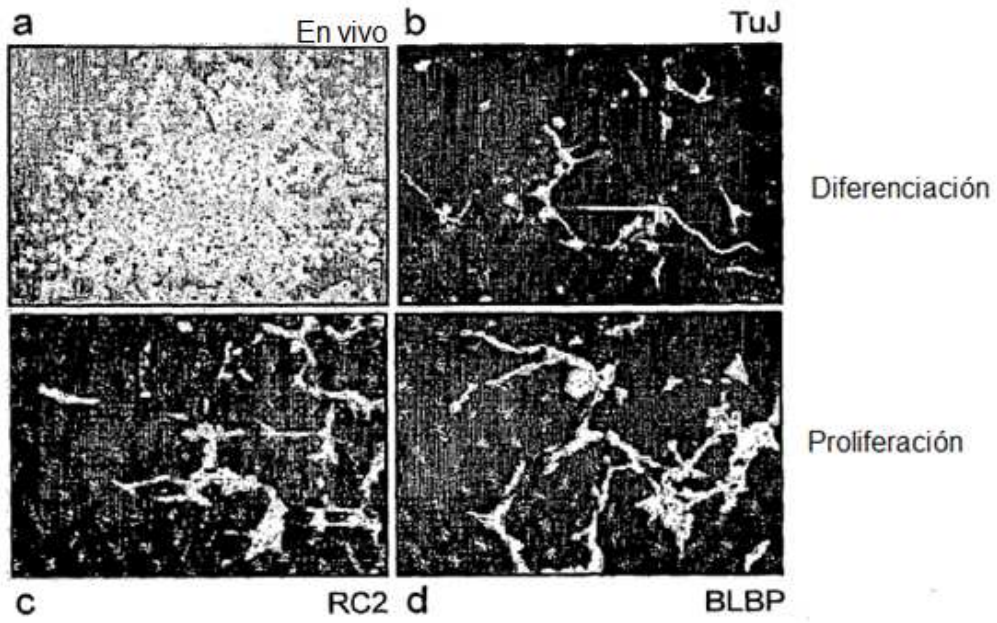


FIG. 1G



FIG. 2A

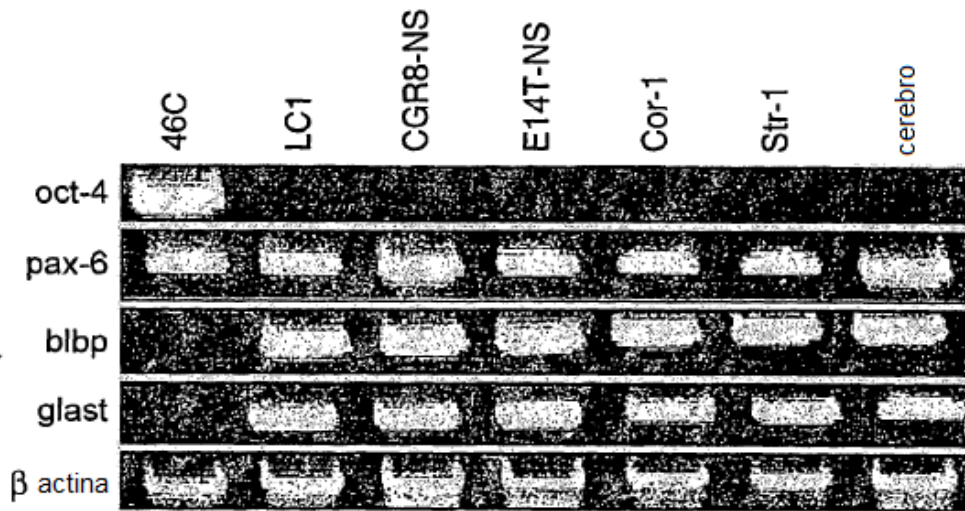


FIG. 2B

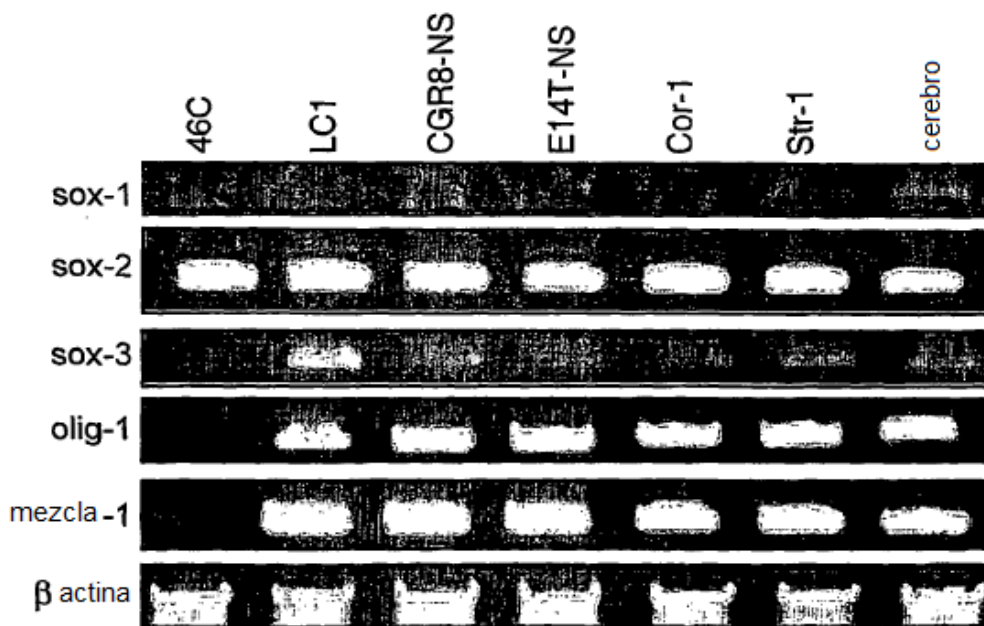
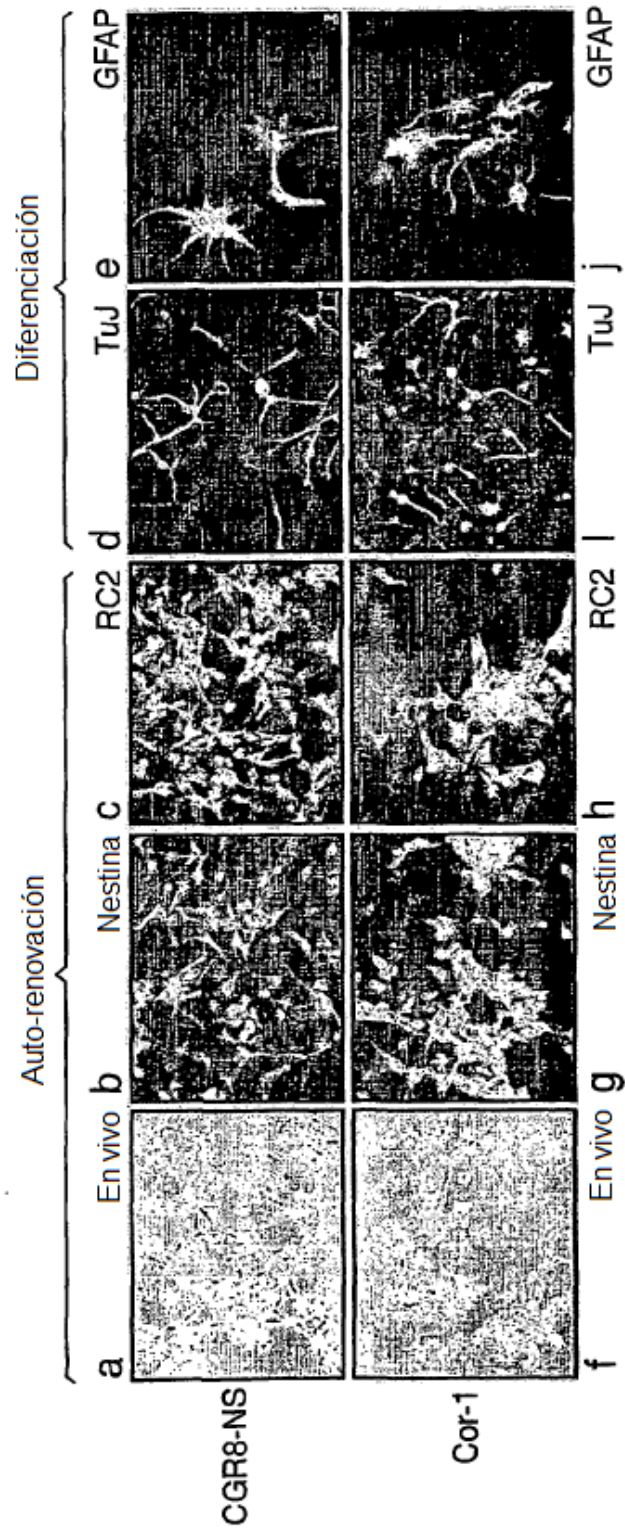


FIG. 2C



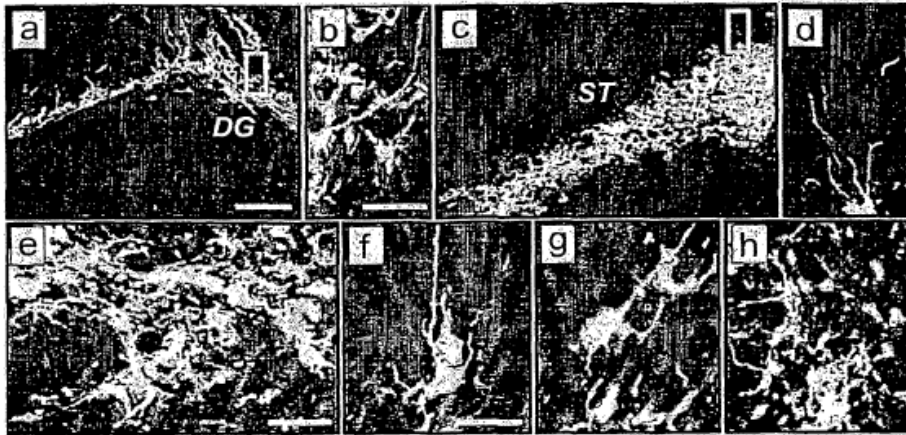


FIG. 3

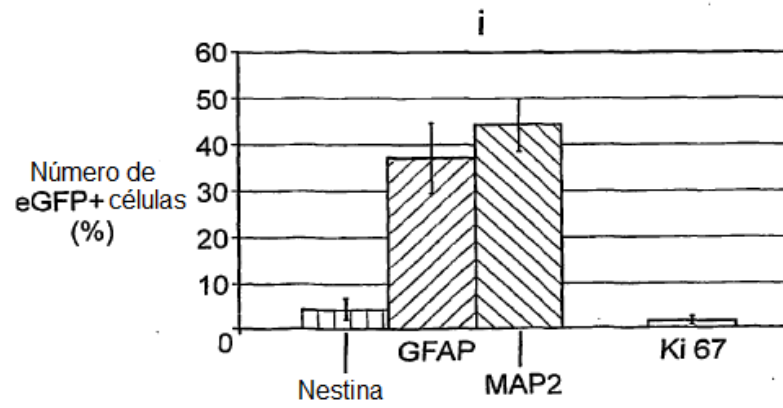


FIG. 4A

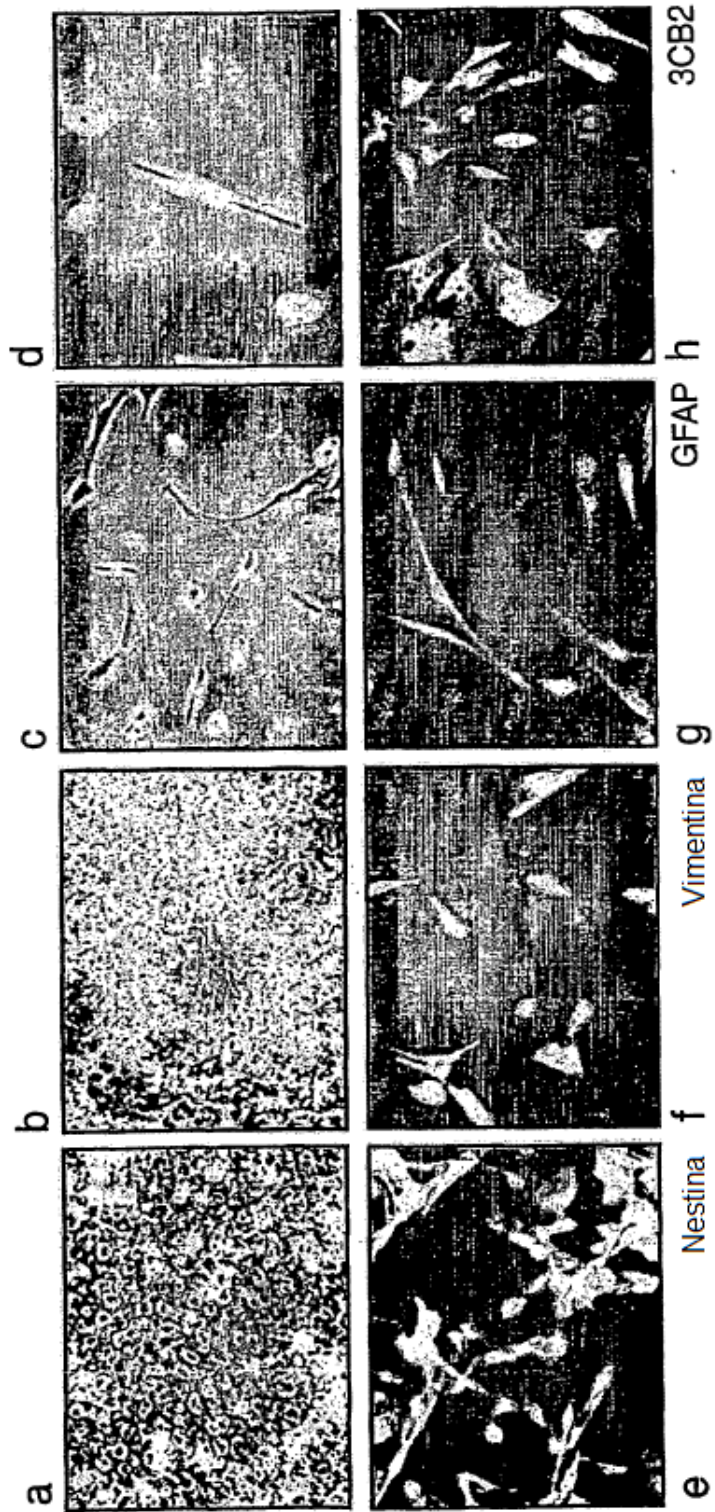


FIG. 4B

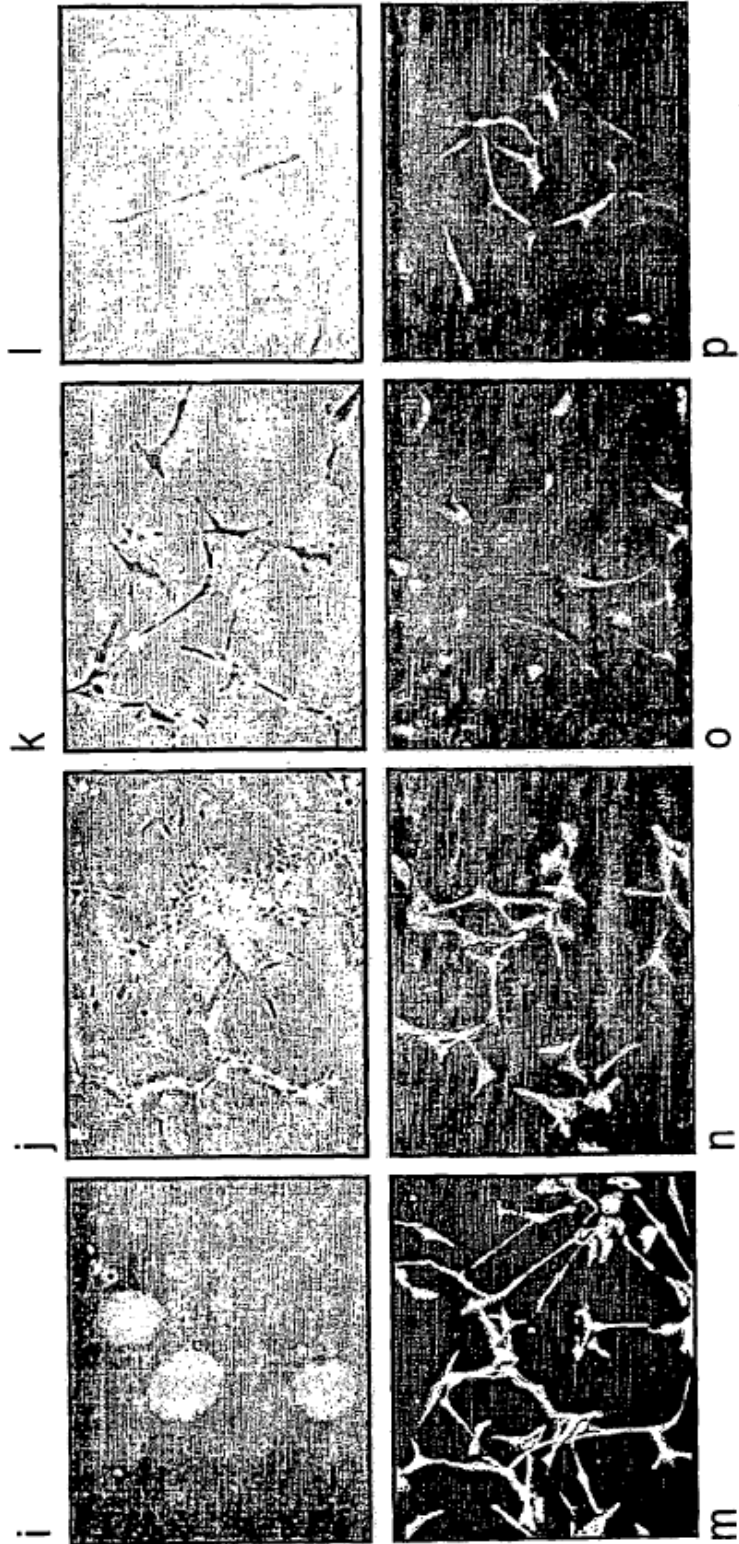


FIG. 4C

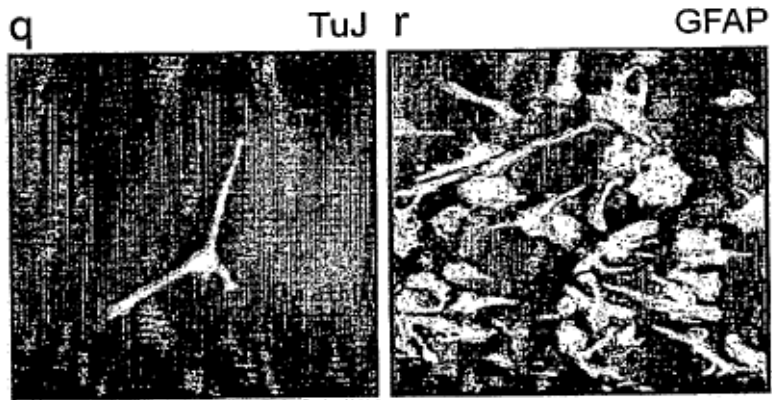


FIG. 5A

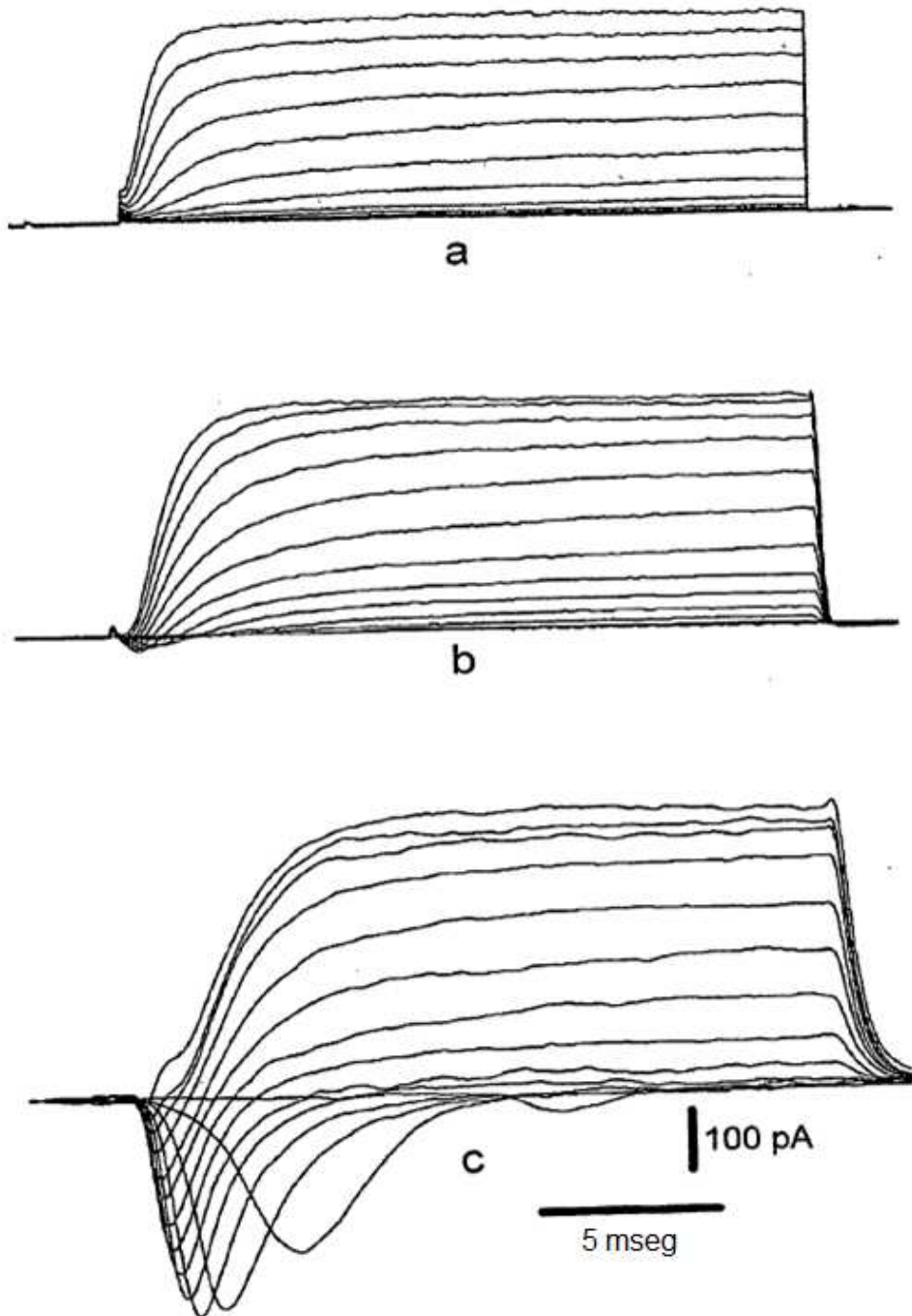


FIG. 5B

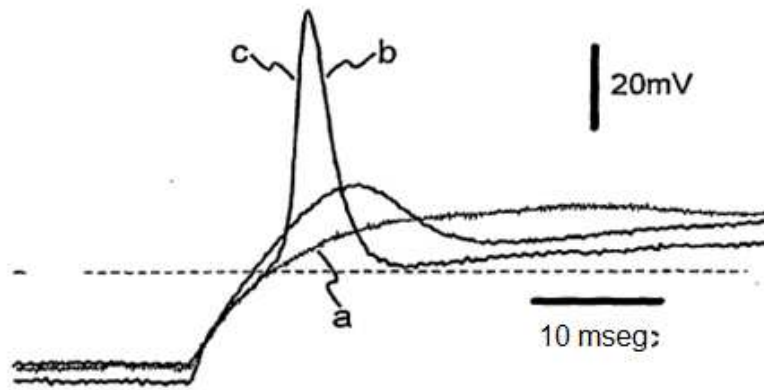


FIG. 5C

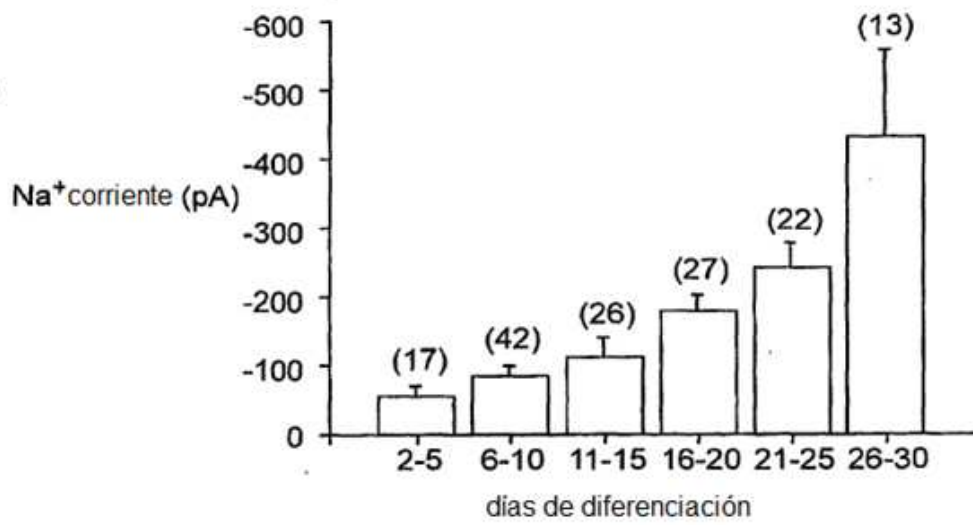


FIG. 5D

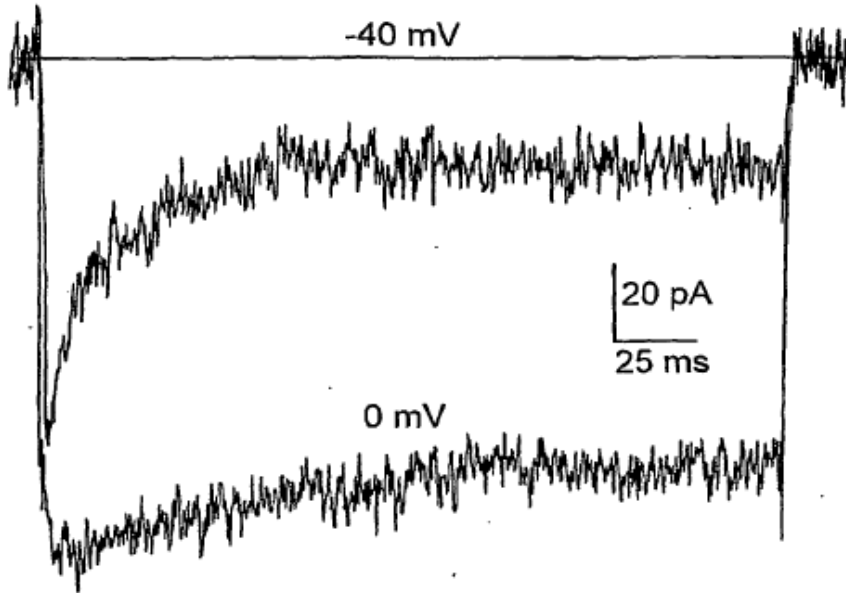


FIG. 5E

