

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 373**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0793** (2010.01)

**A61K 35/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2009 E 09824217 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2352817**

54 Título: **Células madre derivadas del epitelio olfativo y procedimientos para su utilización**

30 Prioridad:

**13.10.2009 US 278840 P**

**31.10.2008 US 197896 P**

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

**10.05.2016**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF LOUISVILLE RESEARCH  
FOUNDATION, INC. (100.0%)**

**Jouett Hall 2301 South Third Street Suite LL02  
Louisville, KY 40208, US**

72 Inventor/es:

**ROISEN, FRED, J.;**  
**LU, CHENGLIANG;**  
**WANG, MENG y**  
**QIU, MENGSHENG**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 569 373 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 derivadas del epitelio olfativo y procedimientos para su utilización

## 5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La materia aquí descrita se refiere, en general, a las células madre derivadas del epitelio olfativo. Más particularmente, la materia aquí descrita se refiere a células madre derivadas del epitelio olfativo y a procedimientos para el empleo de las mismas para mejorar el daño en el sistema nervioso en un sujeto en necesidad de las mismas.

## 10 ANTECEDENTES

[0002] Los trastornos neurológicos, que incluyen los que surgen de manera espontánea (por ejemplo, la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Alzheimer) y las que resultan de una lesión aguda en el tejido neural, generalmente dan como resultado reducciones significativas en la calidad de vida de aquellos que desarrollan los trastornos. Desafortunadamente, los tratamientos para estos trastornos generalmente son de eficacia limitada debido a la incapacidad para prevenir o incluso revertir la naturaleza progresiva del trastorno y/o la incapacidad de proporcionar a un individuo que tiene dicho trastorno con cualquier forma de reparación del daño causado al tejido nervioso.

[0003] La enfermedad de Parkinson (EP) sigue siendo una de las principales causas de discapacidad neurológica crónica, que afecta a más de 1.500.000 estadounidenses. La incidencia aumenta con la edad, siendo aproximadamente 1:1000 en general, pero que afecta al 2% de la población mayor de 65 años. Se presentan aproximadamente 60.000 nuevos casos cada año, y en los últimos años el número anual de muertes por la EP ha aumentado de forma constante (Stahel, 2006). A nivel internacional, la tasa de incidencia de la EP se aproxima a 17 por 100.000 por año, aunque esto es probablemente una subestimación. La enfermedad de Parkinson (PD) se caracteriza por la gran pérdida de neuronas dopaminérgicas (DA) en la sustancia negra (SN) en el cerebro medio (Hornykiewicz, 1973b). Actualmente el tratamiento principal para la EP es L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa) oral, que es el precursor de la dopamina que puede pasar la barrera hematoencefálica (Hornykiewicz, 1973a).

[0004] L-dopa proporciona ampliamente un alivio sintomático, pero con el tiempo se vuelve menos eficaz por dos razones. En primer lugar, durante la progresión de la enfermedad las neuronas se vuelven menos sensibles al fármaco. En segundo lugar, la L-dopa no retrasa o disminuye la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Lang y Lozano, 1998). Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad continua para la identificación de nuevas estrategias para inhibir o incluso revertir la progresión de la EP y de otros trastornos neurológicos.

[0005] La investigación reciente ha intentado identificar y aislar poblaciones de células que se pueden utilizar para reemplazar las neuronas dopaminérgicas perdidas o en degeneración (Marshall et al, 2006; Anderson & Caldwell, 2007). Un principio subyacente de la terapia de reemplazo celular es que la restauración de la función perdida como resultado de un daño o enfermedad en el SNC puede llevarse a cabo mediante la sustitución de células muertas o moribundas por las sanas. Estudios recientes sugieren además que el injerto de células madre o progenitoras puede regular o mejorar las poblaciones de progenitoras endógenas existentes y posiblemente rescatar las células dañadas (Redmond et al., 2007). Otros investigadores han empleado trasplantes de células neurales obtenidas de las neuronas dopaminérgicas mesencefálico ventrales (VM) fetales (Lindvall et al, 1988; Madrazo et al, 1988; Lindvall et al, 1992; Freeman et al, 1995; Borlongan, 2000). Sin embargo, estos trasplantes con frecuencia conducen a una discinesia molesta (Freed et al, 2001; Olanow et al., 2003). Incluso cuando se obtuvo una excelente reinervación dopaminérgica, que produjo mejoras clínicas positivas en la ausencia de la discinesia, la cantidad de tejido necesario para cada paciente de EP necesitó un mínimo de 4-5 cerebros fetales (Mendez et al., 2005). Este requisito aumentó la posibilidad de infección viral o bacteriana que limitó significativamente la utilidad de esta estrategia. Además, el número de neuronas supervivientes fue muy limitado, ya que la mayoría de las células injertadas murieron (Borlongan, 2000). El suministro limitado de células VM fetales junto con su pobre supervivencia del injerto limita seriamente la utilidad terapéutica de esta estrategia para el tratamiento de la EP. Por lo tanto, la identificación y el aislamiento de fuentes alternas expandibles de neuronas dopaminérgicas se han convertido en un importante foco de investigación (Daadi, 2002; Doss et al, 2004; Lindvall et al, 2004) y continúa siendo una necesidad continua.

[0006] El documento WO 01/53461 describe células madre neurales multipotentes de tejidos del sistema nervioso periférico capaces de diferenciarse en tipos de células neurales y no neurales.

[0007] El documento WO 03/064601 describe la preparación de células madre olfativas humanas aisladas mediante el cultivo de tejido humano de neuroepitelio olfativo para formar neuroesferas.

[0008] El documento WO 2004/029229 describe la promoción del desarrollo neuronal dopaminérgico y la producción de células neurales que tienen un fenotipo dopaminérgico.

[0009] Roisen FJ et al., Brain Research, vol. 890 (1), 26 enero de 2001, páginas 11-22, describe células madre

olfativas humanas adultas.

[0010] Zhang X. et al., Brain Research, vol. 1073-1074, 16 febrero de 2006, páginas 109-119, describe la inducción de la diferenciación neuronal de células progenitoras derivadas de neuroepiteliales olfativas humanas adultas.

[0011] Zhang X. et al., Stem Cells, vol. 24 (2), febrero de 2006, páginas 434-442, describe el papel de los factores de transcripción en la diferenciación motoneuronas de células progenitoras derivadas de neuroepiteliales olfativas humanas adultas.

[0012] Marshall CT et al., Histology and Histopatology, vol. 21 (6), 1 junio de 2006, páginas 633-643, describe los usos terapéuticos de células madre derivadas de olfativas humanas.

[0013] Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de nuevas estrategias para generar poblaciones de células trasplantables adecuadas para una variedad de aplicaciones, incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento de la lesión y/o enfermedad de tejidos neurológicos.

[0014] Esta descripción resumida muestra varias realizaciones de la materia aquí descrita, y en muchos casos se muestran variaciones y permutaciones de estas realizaciones. Esta descripción resumida es simplemente un ejemplo de las numerosas y variadas realizaciones. La mención de una o más características representativas de una realización dada es igualmente de ejemplo. Dicha realización habitualmente puede existir con o sin la característica o características mencionadas; del mismo modo, estas características se pueden aplicar a otras realizaciones de la materia aquí descrita, tanto si aparece o no en esta descripción resumida. Para evitar la repetición excesiva, esta descripción resumida no muestra ni sugiere todas las combinaciones posibles de tales características.

[0015] La materia aquí descrita proporciona neuronas dopaminérgicas recombinantes o células progenitoras recombinantes de las mismas. En algunas realizaciones, las neuronas dopaminérgicas recombinantes o células progenitoras recombinantes de las mismas comprenden uno o más transgenes que codifican un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un fragmento biológicamente activo de los mismos, un derivado biológicamente activo de los mismos, y/o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, un solo transgén codifica dos o más de un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un fragmento biológicamente activo de los mismos, un derivado biológicamente activo de los mismos, y/o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el único transgén codifica un polipéptido nurr-1 y un polipéptido pitx3. En algunas realizaciones, el progenitor recombinante de las mismas comprende una célula madre derivada del epitelio olfativo recombinante que comprende dicho uno o más transgenes, o un derivado diferenciado de los mismos.

[0016] La presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para la producción de una neurona dopaminérgica recombinante, tal como se expone en las reivindicaciones. El procedimiento comprende (a) proporcionar células madre derivadas del epitelio olfativo (b) introducir uno o más transgenes en las células madre derivadas del epitelio olfativo adultas, en el que dichos uno o más transgenes codifican una combinación de un polipéptido nurr-1 y un polipéptido pitx3, mediante lo cual se produce una neurona dopaminérgica recombinante. En algunas realizaciones, la célula madre derivada del epitelio olfativo adulta es de un cadáver. En algunas realizaciones, la célula madre derivada del epitelio olfativo adulta es de un donante vivo. En algunas realizaciones, el donante vivo es un sujeto que tiene un trastorno neurológico. En algunas realizaciones, el trastorno neurológico es la enfermedad de Parkinson. En algunas realizaciones, las células madre derivadas de epitelio olfativo adultas son células madre derivadas de epitelio olfativo adultas y al menos uno del polipéptido nurr-1, el polipéptido pitx3, el polipéptido lmx1a o la combinación de los mismos, derivados de una especie distinta de humano. En algunas realizaciones, el polipéptido pitx3 es un polipéptido pitx de rata. En algunas realizaciones, el polipéptido lmx1a es un polipéptido lmx1a de ratón. En algunas realizaciones, el polipéptido nurr-1 es un polipéptido nurr-1 de ratón. En algunas realizaciones, el procedimiento *in vitro* comprende además cultivar las células madre derivadas de epitelio olfativo adultas antes, durante y/o después de la etapa de introducción en un medio que comprende un polipéptido Sonic hedgehog (Shh), un fragmento biológicamente activo del mismo, ácido retinoico (RA) o un derivado biológicamente activo del mismo, forskolina (FN) o un derivado biológicamente activo de la misma, o cualquier combinación de los mismos, en condiciones suficientes para inducir la diferenciación neuronal en las células madre derivadas del epitelio olfativo adultas, tal como se expone en las reivindicaciones.

[0017] La materia aquí descrita también proporciona procedimientos para producir células cebadas de linaje. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden cultivar una célula madre derivada del epitelio olfativo en un medio que comprende un polipéptido Sonic hedgehog (Shh), un fragmento biológicamente activo del mismo, un derivado del mismo, ácido retinoico (RA) o un derivado biológicamente activo del mismo, forskolina (FN) o un derivado biológicamente activo de la misma, o cualquier combinación de los mismos, en condiciones suficientes para inducir la diferenciación neuronal en las células madre derivadas del epitelio olfativo, mediante lo cual se produce una célula cebada de linaje que comprende una neurona dopaminérgica o célula progenitora de la misma. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden además expresar en la célula madre derivada de epitelio olfativo recombinante uno o más transgenes que codifican un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un fragmento biológicamente activo de los mismos, un derivado biológicamente activo de los mismos, y/o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, dicho uno o más del polipéptido nurr-1, el

polipéptido pitx3, el polipéptido lmx1a, el fragmento biológicamente activo de los mismos, el derivado biológicamente activo de los mismos, y/ o la combinación de los mismos codificados por dicho uno o más transgenes comprende un ortólogo de ratón, un ortólogo de rata, y/o un ortólogo humano, un fragmento biológicamente activo del mismo, un derivado biológicamente activo del mismo, o cualquier combinación de los mismos.

5  
 [0018] La materia aquí descrita proporciona también procedimientos para mejorar al menos un síntoma asociado con un trastorno neurológico en un sujeto. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden proporcionar una neurona dopaminérgica que expresa uno o más de un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un fragmento biológicamente activo o un derivado de los mismos o un progenitor de la misma; y trasplantar la  
 10 neurona dopaminérgica recombinante o el progenitor de la misma en el sujeto, opcionalmente en la sustancia negra del sujeto. En algunas realizaciones, la neurona dopaminérgica es una neurona dopaminérgica recombinante que comprende un transgén que (a) codifica uno o más de un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un fragmento biológicamente activo de los mismos, y un derivado biológicamente activo de los mismos; y/o  
 15 (b) comprende un promotor que es transcripcionalmente activo en la neurona dopaminérgica o un progenitor de la misma que está operativamente ligado a una secuencia codificante que codifica el polipéptido nurr-1, el polipéptido pitx3, el polipéptido lmx1a, o el fragmento biológicamente activo o derivado de los mismos. En algunas realizaciones, el progenitor es no recombinante. En algunas realizaciones, el progenitor es un progenitor recombinante que comprende uno o más transgenes que codifican un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un  
 20 fragmento biológicamente activo de los mismos, un derivado biológicamente activo de los mismos, y/o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el trastorno neurológico es la enfermedad de Parkinson. En algunas realizaciones, un solo transgén codifica dos o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un fragmento biológicamente activo de los mismos, un derivado biológicamente activo de los mismos, y/o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el único transgén codifica los polipéptidos nurr-1 y pitx3. En algunas realizaciones, la neurona dopaminérgica recombinante trasplantada o progenitor recombinante de la misma inducen el crecimiento y/o la regeneración de una  
 25 o más neuronas endógenas en el sujeto.

[0019] La materia aquí descrita proporciona también procedimientos para el trasplante. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden trasplantar en un sujeto una célula madre derivada de epitelio olfativo cebada de linaje  
 30 dopaminérgico o un progenitor de la misma, en el que la célula madre derivada de epitelio olfativo cebada de linaje dopaminérgico expresa uno o más transgenes que (a) codifican una o más de un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un fragmento biológicamente activo de los mismos, y un derivado biológicamente activo de los mismos; y/o (b) comprenden un promotor que es transcripcionalmente activo en la neurona dopaminérgica o un progenitor de la misma que está operativamente ligado a una secuencia codificante que codifica el polipéptido  
 35 nurr-1, el polipéptido pitx3, el polipéptido lmx1a, o el fragmento biológicamente activo o derivado de los mismos, y además en el que el cebado del linaje tiene una eficacia de al menos el 1%, el 5, ó el 10%. En algunas realizaciones, el linaje de cebado comprende (a) proporcionar una célula madre derivada del epitelio olfativo, opcionalmente una pluralidad de células madre derivadas del epitelio olfativo, opcionalmente además en forma de una o más neuroesferas; y (b) introducir en la célula madre derivada del epitelio olfativo uno o más transgenes que codifican un  
 40 polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un fragmento biológicamente activo de los mismos, un derivado biológicamente activo de los mismos, y/o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la pluralidad de células madre derivadas del epitelio olfativo se aísla de un cadáver, de un donante vivo, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el donante vivo es el sujeto. En algunas realizaciones, las condiciones suficientes para inducir la diferenciación neuronal comprenden cultivar la célula madre derivada del epitelio olfativo en un medio de cultivo que comprende ácido  
 45 retinoico aproximadamente 1 µM, forskolina aproximadamente 5 µM, y Sonic hedgehog aproximadamente 15 nM durante al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, o 7 días. En algunas realizaciones, la etapa de cultivo produce una neurona dopaminérgica o un progenitor recombinante de la misma que expresa un producto de gen endógeno de tirosina hidroxilasa (TH), produce dopamina, segrega dopamina, o combinaciones de los mismos. En algunas  
 50 realizaciones, los procedimientos comprenden, además, cultivar la célula madre derivada de epitelio olfativo antes, durante y/o después de la etapa de introducción en el medio que comprende un polipéptido Sonic hedgehog (Shh), un fragmento biológicamente activo del mismo, un derivado del mismo, ácido retinoico (RA) o un derivado biológicamente activo del mismo, forskolina (FN) o un derivado biológicamente activo del mismo, o cualquier combinación de los mismos, en condiciones suficientes para inducir la diferenciación neuronal en la célula madre  
 55 derivada de epitelio olfativo. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un trastorno neurológico. En algunas realizaciones, el trastorno neurológico es la enfermedad de Parkinson.

[0020] La materia aquí descrita también proporciona procedimientos para inducir el crecimiento y/o regeneración de una neurona en un sujeto. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden trasplantar una pluralidad de  
 60 células madre derivadas del epitelio olfativo en el sujeto en un lugar y en un número suficiente para inducir el crecimiento y/o regeneración de una neurona en el sujeto. En algunas realizaciones, el trasplante es en un sitio del sistema nervioso central en el sujeto. En algunas realizaciones, el sitio del sistema nervioso central es la sustancia negra. En algunas realizaciones, el sitio del sistema nervioso central es el cerebro medio del sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un trastorno neurológico asociado con la pérdida de neuronas dopaminérgicas, opcionalmente en el que el trastorno neurológico es la enfermedad de Parkinson. En algunas realizaciones, los  
 65 procedimientos comprenden además diferenciar la célula madre derivada de epitelio olfativo *in vitro* mediante la

expresión en la célula madre derivada de epitelio olfativo de uno o más transgenes que codifican un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un fragmento biológicamente activo de los mismos, un derivado biológicamente activo de los mismos, y/o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, al menos uno del polipéptido nurr-1, el polipéptido pitx3, y el polipéptido lmx1a es un ortólogo humano del mismo. En algunas realizaciones, el trasplante proporciona a la neurona una cantidad eficaz de un factor neurotrófico suficiente para proporcionar/causar que la neurona crezca y/o se regenere y/o sobreviva. En algunas realizaciones, el factor neurotrófico incluye un factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

**[0021]** La materia aquí descrita proporciona también procedimientos para liberar una citoquina o un factor de crecimiento al sistema nervioso central de un sujeto. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden trasplantar en el sujeto una célula madre derivada de epitelio olfativo o un derivado diferenciada de la misma que expresa la citoquina o factor de crecimiento, en el que el trasplante es en un sitio del sistema nervioso central en el sujeto. En algunas realizaciones, la citoquina o factor de crecimiento se seleccionan del grupo que consiste en factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotropina 3 (NT3), neurotropina 4/5 (NT4/5), y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En algunas realizaciones, la liberación da lugar a la restauración de un déficit funcional en el sujeto. En algunas realizaciones, el déficit funcional resulta de una lesión neurológica en el sujeto. En algunas realizaciones, el derivado diferenciado de la misma comprende una neurona dopaminérgica recombinante o progenitor recombinante de la misma que comprende uno o más transgenes que codifican un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un fragmento biológicamente activo de los mismos, un derivado biológicamente activo de los mismos, y/o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, al menos uno del polipéptido nurr-1, el polipéptido pitx3, y el polipéptido lmx1a es un ortólogo humano de los mismos.

**[0022]** La materia aquí descrita proporciona también procedimientos para proporcionar una función de neuronas dopaminérgicas a un sujeto con necesidad de la misma. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden introducir una pluralidad de células madre derivadas del epitelio olfativo y/o derivados diferenciados *in vitro* de las mismas en el cerebro medio del sujeto en un número y en condiciones suficientes para permitir que al menos una de la pluralidad de células madre derivadas de epitelio olfativo se diferencie en una neurona dopaminérgica funcional, proporcionando de este modo una función de neuronas dopaminérgicas a un sujeto. En algunas realizaciones, los derivados diferenciados *in vitro* se diferencian mediante la expresión en al menos una célula madre derivada de epitelio olfativo de uno o más transgenes que codifican un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un fragmento biológicamente activo de los mismos, un derivado biológicamente activo de los mismos, y/o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los derivados diferenciados *in vitro* se diferencian mediante la exposición de al menos una célula madre derivada de epitelio olfativo a un factor neurotrófico que induce la diferenciación de la célula madre derivada de epitelio olfativo a una neurona dopaminérgica y/o que ceba la célula madre derivada de epitelio olfativo para diferenciarse en una neurona dopaminérgica. En algunas realizaciones, las células madre derivadas del epitelio olfativo y/o derivados diferenciados *in vitro* de las mismas se diferencian terminalmente en una neurona dopaminérgica funcional en el tema. En algunas realizaciones, la introducción induce a una célula endógena en el sujeto a diferenciarse en una neurona dopaminérgica funcional. En algunas realizaciones, la introducción induce la reparación de una neurona dopaminérgica endógena no funcional o subóptimamente funcional o un precursor de la misma en el sujeto. En algunas realizaciones, la introducción rescata una neurona dopaminérgica y/o un precursor de la misma de la inactivación y/o muerte que habría experimentado en ausencia de la pluralidad de células madre derivadas del epitelio olfativo y/o derivados diferenciados *in vitro* de las mismas introducidos. En algunas realizaciones, los derivados diferenciados *in vitro* se diferencian mediante el crecimiento de al menos una célula madre derivada de epitelio olfativo sobre un sustrato en condiciones suficientes para inducir la diferenciación de la célula madre derivada de epitelio olfativo en una neurona dopaminérgica y/o cebar la célula madre derivada de epitelio olfativo para diferenciarse en una neurona dopaminérgica.

**[0023]** La materia aquí descrita proporciona también cultivos de células que comprende una célula madre derivada de epitelio olfativo recombinante y/o un derivado diferenciado de la misma. En algunas realizaciones, la célula madre derivada de epitelio olfativo recombinante y/o el derivado diferenciado de la misma comprende uno o más transgenes que codifican un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un fragmento biológicamente activo de los mismos, un derivado biológicamente activo de los mismos, y/o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el cultivo comprende un medio de cultivo que comprende un polipéptido Sonic hedgehog (Shh), un fragmento biológicamente activo del mismo, un derivado del mismo, ácido retinoico (RA) o un derivado biológicamente activo del mismo, forskolina (FN) o un derivado biológicamente activo de la misma, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende ácido retinoico aproximadamente 1  $\mu$ M, forskolina aproximadamente 5  $\mu$ M, y Sonic hedgehog aproximadamente 15 nM.

**[0024]** Un objetivo de la materia aquí descrita es proporcionar una población de células trasplantables adecuadas para una variedad de aplicaciones, incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento de la lesión y/o enfermedad de los tejidos neurológicos.

**[0025]** Un objetivo de la materia aquí descrita expuesto anteriormente, y que se logra en su totalidad o en parte por

la materia aquí descrita, otros objetivos resultarán evidentes a medida que avance la descripción cuando se tome en relación con los dibujos adjuntos como mejor se describe a continuación en este documento.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

5  
**[0026]**  
 Las Figuras 1A-1H son micrografías de fluorescencia de células formadoras de neuroesferas (NSFC) transfectadas con plásmidos de expresión que codificaban y se tiñeron con anticuerpos que se unen a tirosina hidroxilasa (TH), pitx3, o nurr1. Tal como se observa en las Figuras 1A-1H, esencialmente todas las NSFC transfectadas con pIRES-pitx3-nurr1, pLNCX2-pitx3 y pLNCX2-nurr1 expresaban TH después de 4 meses de selección con G418 (véanse las Figuras 1C, 1D, 1F, y 1G), pero las NSFC transfectadas con pLNCX2-lmx1a o los vectores de control (pIRES o pLNCX2) eran negativas a TH (véanse las Figuras 1B, 1E, y 1H). Todas las células se tiñeron con clorhidrato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para mostrar los núcleos.

10  
 La Figura 1A es un control negativo para el anticuerpo secundario empleado en la las Figuras 1B-1H. La señal observada es de DAPI. La Figura 1B es un control negativo para los anticuerpos primarios que se unen a la tirosina hidroxilasa (TH) o a pitx3. Las células teñidas en la Figura 1B se transfectaron con un vector de expresión vacío pIRES, y la señal observada es de DAPI. Las células teñidas en las Figuras 1C, 1D, 1F y 1G se transfectaron con los plásmidos de expresión pIRES-pitx3-nurr1 (Figuras 1C y 1D), pLNCX2-pitx3 (Figura 1F), o pLNCX2-nurr1 (Figura 1G), y después de 4 meses la selección con G418 se tiñó con anticuerpos que se unían a TH y también con anticuerpos que se unían a pitx3 o nurr1 tal como se indica. En cada uno de estos casos, las células fueron positivas en TH. Las figuras 1E y 1H muestran los resultados de NSFC transfectadas con los vectores de control pLNCX2 o pLNCX2-lmx1a, respectivamente. En estos casos, las células fueron negativas a TH.

15  
 La figura 2A representa un análisis de transferencia Western con un anticuerpo que se une a TH (58 kilodaltons (kDa)) de lisados de células transfectadas con, de izquierda a derecha, pLNCX2, pLNCX2-pitx3, pLNCX2-nurr1, pLNCX2-lmx1a, pIRES, o pIRES-pitx3-nurr1. Las transferencias Western también se sondaron con un anticuerpo que se une a actina (43 kDa) como control de carga, en las que las intensidades consistenes de las señales de actina demostraron que la cantidad de proteína cargada en cada carril fue muy similar.

20  
 Las figuras 2B-2G son curvas que muestran la expresión de actina como por la densidad de la señal de actina en la la figura 2A para pLNCX2, pLNCX2-pitx3, pLNCX2-nurr1, pLNCX2-lmx1a, pIRES, y pIRES-pitx3-nurr1, respectivamente. Las Figuras 2H-2M son curvas que muestran la expresión de TH como por la densidad de la señal de actina en la figura 2A para pLNCX2, pLNCX2-pitx3, pLNCX2-nurr1, pLNCX2-lmx1a, pIRES, y pIRES-pitx3-nurr1, respectivamente. La Figura 2N es un gráfico de barras que muestra las diferencias de cada línea de NSFC transfectada en la proparte de expresión de TH a actina (por ejemplo, la Figura 2H frente a la Figura 2B, Figura 2I frente a la Figura 2C, etc.).

25  
 Las figuras 3A-3I son los resultados de inmunocitoquímica y análisis de transferencia Western de células o lisados ensayados con anticuerpos que se unen a TH, pitx3, o nurr1, lo que demuestra que las NSFC transfectadas con pLNCX2-pitx3, pLNCX2-nurr1 y pIRES-pitx3-nurr1 permanecen sanos y positivas a TH (Figuras 3D, 3F, 3G y 3I), mientras que una línea SNCF transfectada con pLNCX2-lmx1a perdió la expresión de TH después de la extracción en almacenamiento criogénico y bajo presión de selección (Figuras 3H y 3I). En las figuras 3A-3H, todas las células también se tiñeron con DAPI para mostrar los núcleos.

30  
 La figura 3A representa inmunocitoquímica de un control negativo para analizar el anticuerpo secundario utilizado en la inmunocitoquímica y análisis de transferencia Western representados en las Figuras 3B-3I. La Figura 3B representa los resultados de inmunocitoquímica de otro control negativo, lo que demuestra que las NSFC no transfectadas son TH<sup>-</sup>. La figura 3C representa los resultados de inmunocitoquímica de otro control negativo, lo que demuestra que NSFC transfectadas con un vector vacío (pIRES) son TH<sup>-</sup>. La figura 3D representa los resultados de inmunocitoquímica de NSFC transfectadas con pIRES-pitx3-nurr1, lo que demuestra que estas células son TH<sup>+</sup>. La Figura 3E representa los resultados de inmunocitoquímica de otro control negativo, lo que demuestra que las NSFC transfectadas con un vector vacío (pLNCX2) son TH<sup>-</sup>. Las Figuras 3F-3H representan los resultados de inmunocitoquímica que demuestran que las NSFC transfectadas con pLNCX2-pitx3 o pLNCX2-nurr1 son TH<sup>+</sup>, pero que las células transfectadas con pLNCX2-lmx1a son TH<sup>-</sup>. La Figura 3I muestra los resultados de análisis de transferencia de Western que confirma que las NSFC transfectadas con pLNCX2-pitx3, pLNCX2-nurr1, o pIRES-pitx3-nurr1 son TH<sup>+</sup>, pero las células transfectadas con pLNCX2-lmx1a son TH<sup>-</sup>. Un anticuerpo que se une a actina se utilizó como control de carga en cada carril.

35  
 Las figuras 4A y 4B son gráficos de barras que representan los resultados de ensayo de los niveles de dopamina por la proteína total (expresado como pg/μl/mg de proteína) de NSFC transfectadas con diferentes construcciones de expresión. Las cajas sombreadas individualmente corresponden a las células cultivadas en ausencia de ácido retinoico (RA), forskolina (FN), y Sonic hedgehog (Shh), mientras que las cajas doblemente sombreadas corresponden a las células cultivadas en presencia de RA, FN, y Shh (RA1FN5Shh, que es RA 1 μM, FN aproximadamente 5 μM, y Shh aproximadamente 0,025 μg/ml). Como se muestra en estas figuras, las NSFC transfectadas con pIRES-pitx3-nurr1 fueron las líneas productoras de dopamina más eficaces tanto intracelularmente

40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

como intercelularmente. Se aumentaron los niveles de dopamina en las NSFC y en el medio agotado.

La Figura 4A es un gráfico de barras que representa los resultados de ensayo de los niveles de dopamina intracelulares por la proteína total de NSFC transfectadas con diferentes construcciones de expresión, y la Figura 4B es un gráfico de barras que representa los resultados de ensayo de los niveles de dopamina extracelular por proteína total de NSFC transfectadas con diferentes construcciones de expresión. Tal como se muestra en estas figuras, las NSFC transfectadas con el plásmido de expresión pIRES-pitx3-nurr1 fueron las células productoras de dopamina más eficaces con respecto tanto a los niveles de dopamina intracelular y extracelular. Los niveles de dopamina intracelular y extracelular aumentaron con el tratamiento de las células con RA1FN5Shh en cada línea específica.

Las Figuras 5A-5C representan la inmunocitoquímica de NSFC tratadas en DMEM/F12 suplementado con 1% B27 y 0,5% N<sub>2</sub> y gentamicina 100 µg/ml (DFBNM) suplementado con ácido retinoico 1 µM y forskolina 5 µM (RA1FN5) con diferente fuentes de Shh durante 3 días. Todas las células también se tiñeron con DAPI para mostrar los núcleos.

La Figura 5A representa los resultados de cultivo de las células en ausencia de Shh. La Figura 2B representa los resultados de cultivo de las células en presencia de forskolina 0,25 mg/ml de Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, Missouri, Estados Unidos de América). La Figura 2C representa los resultados de cultivo de las células en presencia de 0,25 mg/ml de una preparación altamente purificada de forskolina. La comparación de las Figuras 5B y 5C muestra que las células tratadas con Shh altamente purificado expresaban TH a un nivel más alto que las células tratadas con el producto disponible en el mercado.

Las figuras 6A y 6B representan los resultados de inmunocitoquímica de NSFC cultivadas en DFBNM complementado con 0,025 mg/ml de Shh (altamente purificado), en presencia o ausencia de RA (1 µM) y FN (5 µM) durante el número de días indicados. Todas las células también se tiñeron con DAPI para mostrar los núcleos.

La Figura 6A muestra una comparación de la tinción de TH de células a las 18 horas, 4 días, y 7 días en DFBNM suplementado con 0,025 mg/ml de Shh solo altamente purificado (tres paneles superiores), en presencia de 0,025 mg/ml de Shh altamente purificado y RA 1 µM (tres paneles medios), o en presencia de 0,025 mg/ml de Shh altamente purificado y RA 1 µM y FN 5 µM (tres paneles inferiores). La Figura 6B representa inmunocitoquímica de NSFC que muestran tinción positiva de TH después del tratamiento de 7 días con 0,025 mg/ml de Shh altamente purificado, RA 1 µM y FN 5 µM (RA1FN5Shh).

La Figura 7 representa las estructuras de los plásmidos de expresión pLNCX2-nurr1, pLNCX2-pitx3, pLNCX2-lmx1a, y pIRES-pitx3-nurr1.

La Figura 8 es un gráfico de barras que muestra los niveles de neurotrofinas en NSFC (pg/ml) que habían sido transfectadas con diferentes plásmidos de expresión en comparación con el control y NSFC no transfectadas.

Las Figuras 9A-9F resumen los resultados de los experimentos de injerto en los que las células transfectadas con pIRES-pitx3-nurr1 se injertaron en modelos de rata con EP inducida por 6-ODHA.

Las figuras 9A y 9B son gráficos que muestran la reducción de la velocidad de rotación bajo la misma dosis de estimulación con anfetaminas en un modelo de MFB (58,2%) y en un modelo de striatum (40,13%) en relación con los animales de control no injertados.

Las Figuras 9C y 9D son imágenes del aparato de modelo de rotación.

Las Figuras 9E y 9F muestran análisis inmunocitoquímicos de los cerebros de animales trasplantados, que muestran que las células positivas en TH se encuentran en los cerebros de estos animales 3 meses después del injerto. Estas micrografías muestran que la población injertada permanece positiva en TH y parece viable incluso después de un período de tres meses de trasplante en el cerebro, lo que es indicativo de una alta probabilidad de supervivencia a largo plazo.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

**[0027]** La presente materia se describirá a continuación más completamente en lo sucesivo con referencia a los Ejemplos adjuntos, en los que se describen realizaciones de ejemplo de la materia aquí descrita. La materia aquí descrita puede, sin embargo, realizarse de diferentes formas y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas en el presente documento. Más bien, estas realizaciones se proporcionan para que esta descripción sea minuciosa y completa, y transmita completamente el alcance de la materia aquí descrita a los expertos en la técnica.

**[0028]** El uso de células madre y derivados de células madre ha ganado un mayor interés en la investigación médica, particularmente en el área de proporcionar reactivos para el tratamiento del daño tisular que resulta de, por

ejemplo, defectos genéticos, lesiones y/o procesos de enfermedades. Idealmente, las células que son capaces de diferenciarse en los tipos celulares afectados podrían ser trasplantadas en un sujeto en necesidad de las mismas, donde interactuarían con el microambiente del tejido y suministrarían los tipos de células necesarias para reparar la lesión. Alternativamente, o adicionalmente, las células trasplantadas también podrían influir en el microambiente del tejido para proporcionar señales que repararían y/o rescatarían los tipos de células afectadas en el sujeto y/o induciría las células endógenas del propio sujeto para diferenciarse en tipos de células adecuadas para mejorar así el daño presente en el tejido.

**[0029]** Las células madre son células no diferenciadas que poseen una capacidad de auto-renovación y el potencial de restricción de linaje (maduración) en uno o más tipos de células diferentes en función de su origen y las señales microambientales que reciben (Lindvall et al., 2004) . Estas características hacen de las células madre una población diana atractiva para la terapia de reemplazo celular (Snyder y Olanow, 2005; Sonntag et al, 2005). Las células madre embrionarias humanas (hESC), restringidas en linaje hacia neuronas dopaminérgicas cuando se trasplantan en un modelo de roedor de EP, proporcionan un alivio significativo de los síntomas. Sin embargo, con el tiempo, los animales injertados con hESC desarrollaron teratomas graves (Brederlau et al., 2006). El uso de células madre parcialmente restringidas podría proporcionar células que son equivalentes a las progenitoras.

**[0030]** El epitelio olfativo (EO) es una fuente única para progenitores neurales que se pueden cultivar con cirugía endoscópica nasal sin craneotomía invasiva (Winstead et al., 2005). Además, puesto que no hay déficits olfativos demostrables resultantes de la biopsia OE (Winstead et al., 2005), el tejido se puede utilizar para generar poblaciones de células (por ejemplo, células progenitoras autólogas o no autólogas y/o derivados diferenciados de las mismas) para los pacientes con EP. Una fuente de células autólogas proporciona histocompatibilidad total y por lo tanto elimina la necesidad de una terapia inmunosupresora, así como largas listas de espera para un tejido compatible disponible. Alternativamente, o adicionalmente, las células no autólogas se pueden emplear con tratamientos inmunosupresores adecuados, según sea necesario.

**[0031]** Los presentes coinventores han creado procedimientos para el aislamiento y cultivo de una población formadora de neuroesferas a partir de OE (Roisen et al, 2001; Winstead et al, 2005). Hasta la fecha, se han establecido más de 100 líneas celulares específicas para cada paciente de las células formadoras de neuroesferas (NSFCs) a partir de cultivos primarios de epitelio olfativo humano adulto aislado a partir de cadáveres (Roisen et al., 2001) y pacientes sometidos a cirugía endoscópica de los senos (Winstead et al., 2005). Los presentes coinventores también han demostrado que las NSFC tienen el potencial de diferenciarse a lo largo de varios linajes neuronales diferentes después de la exposición a señales ambientales *in vitro* (Zhang et al., 2006).

**[0032]** La materia aquí descrita se refiere, en algunas realizaciones a procedimientos para restringir el linaje de NSFC hacia neuronas dopaminérgicas. En algunas realizaciones, las técnicas moleculares se aplican para la transfección de los factores de transcripción de *nurr1*, *pitx3*, y/o *lmx1a* en NSFC para promover la diferenciación dopaminérgica. En algunas realizaciones, las NSFC están expuestas a Sonic hedgehog (Shh), un factor de regulación aguas arriba en la formación de las neuronas dopaminérgicas, en presencia o ausencia de ácido retinoico (RA) y/o Forskolina (FN). En algunas realizaciones, estas estrategias se combinan en un esfuerzo por obtener además un aumento de la eficacia y una expresión dopaminérgica más potente.

#### I. Definiciones

**[0033]** Todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento, a menos que se defina lo contrario a continuación, tienen la intención de tener el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la técnica. Las referencias a técnicas empleadas en el presente documento pretenden referirse a las técnicas tal como se entienden habitualmente en el sector, incluyendo las variaciones de estas técnicas o sustituciones de técnicas equivalentes que serían evidentes para un experto en la técnica. Aunque se cree que los siguientes términos son bien entendidos por un experto en la técnica, las siguientes definiciones se exponen para facilitar la explicación de la materia aquí descrita.

**[0034]** Siguiendo la convención de la ley de patentes de muchos años, los términos "un", "una" y "el/la" significan "uno o más" cuando se usa en esta solicitud, incluyendo las reivindicaciones. Por lo tanto, la frase "una célula madre" se refiere a una o más células madre, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

**[0035]** El término "aproximadamente", tal como se utiliza aquí para referirse a un valor medible, tal como una cantidad de peso, tiempo, dosis, etc., tiene por objeto abarcar variaciones en algunas realizaciones de  $\pm 20\%$ , en algunas realizaciones  $\pm 10\%$ , en algunas realizaciones  $\pm 5\%$ , en algunas realizaciones  $\pm 1\%$ , en algunas realizaciones  $\pm 0,1\%$ , y en algunas realizaciones  $\pm 0,01\%$  de la cantidad especificada, ya que tales variaciones son apropiadas para llevar a cabo los procedimientos descritos.

**[0036]** Tal como se usa en este documento, el término "lesión" debe interpretarse en sentido amplio para incluir cualquier impacto en una célula, tejido, u órgano que se traduce en una consecuencia indeseable a la célula, tejido, u órgano. En algunas realizaciones, una lesión resulta de un daño que es observable o no definible, pero la capacidad de identificar el origen de la lesión no es limitante. En algunas realizaciones, una lesión comprende una



lesión en una célula y/o un tejido del sistema nervioso incluyendo, pero no limitado a, una neurona. Alternativamente, o adicionalmente, en algunas realizaciones, una lesión puede incluir lesiones posteriores a las que una célula, tejido, u órgano muestran un deterioro de la función que es secundario a una o más causas, identificables o no.

5 **[0037]** El término "aislado", tal como se utiliza en el contexto de una célula (incluyendo, por ejemplo, una célula madre derivada del epitelio olfativo), indica que la célula existe separada de su entorno nativo. Una célula aislada también puede existir en una forma purificada o puede existir en un entorno no nativo.

10 **[0038]** Tal como se utiliza aquí, la expresión "trastorno neurológico" se refiere a cualquier trastorno, incluyendo trastornos psiquiátricos, que afectan a una parte del sistema nervioso, tales como los nervios, la médula espinal o el cerebro. Los trastornos neurológicos incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, lesión de la médula espinal, la esquizofrenia, el autismo y el trastorno bipolar.

15 **[0039]** Tal como se utiliza aquí, el término "neurotransmisor" se refiere a cualquier producto químico o sustancia capaz de inhibir o excitar una célula postsináptica. Algunos ejemplos de neurotransmisores incluyen dopamina, serotonina y acetilcolina. Es bien conocido que los niveles inadecuados de neurotransmisores se asocian con numerosos trastornos, incluyendo trastornos neurológicos tales como los descritos anteriormente.

20 **[0040]** Tal como se utiliza aquí, el término "neuritogénesis" se refiere a la formación de nuevos procesos y la extensión de los procesos existentes parecidos a los de las neuronas.

25 **[0041]** Tal como se utiliza en el presente documento, una célula existe en una "forma purificada" cuando se ha aislado de una o más de otras células que existen en su entorno nativo, pero también cuando la proporción de esa célula en una mezcla de células es mayor que la que se encontraría en su entorno nativo. Dicho de otra manera, en algunas realizaciones una célula se considera en "forma purificada" cuando la población de células en cuestión representa una población enriquecida de la célula de interés, aunque otras células y tipos de células también estén presentes en la población enriquecida. Una célula puede considerarse en forma purificada cuando comprende, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente un 5% de una población mixta de células, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 10% de una población mixta de células, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 20% de una población mixta de células, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 25% de una población mixta de células, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 30% de una población mixta de células, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 40% de una población mixta de células, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 50% de una población mixta de células, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 60% de una población mixta de células, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 70% de una población mixta de células, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 75% de una población mixta de células, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 80% de una población mixta de células, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 90% de una población mixta de células, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 95% de una población mixta de células, y en algunas realizaciones, aproximadamente 100% de una población mixta de células, con la condición de que la célula comprenda un mayor porcentaje de la población total de células en la población "purificada" que en la población antes de la purificación. A este respecto, los términos "purificado" y "enriquecido" pueden ser considerados como sinónimos.

45 **[0042]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "pluripotentes" se refiere a una célula que tiene una ruta de desarrollo que es al menos parcialmente indeterminada, y por consiguiente, la célula puede diferenciarse en diversos tipos de células diferenciadas que incluyen, por ejemplo, neuronas, oligodendrocitos, astrocitos, células envainadas o células gliales. El término "multipotente" también se refiere a dicha célula. Aunque las células pluripotentes son capaces de convertirse en varios tipos de células, varias células pluripotentes pueden limitarse en el número de rutas de desarrollo que pueden viajar. Una célula pluripotente se distingue así de una célula "totipotente", que en sí misma o una célula hija de la misma, puede diferenciarse en cualquiera y todos los tipos de células en el organismo pertinente. Cabe señalar, sin embargo, que los términos "totipotente" y "pluripotente" no pretenden ser mutuamente excluyentes en el sentido de que una célula totipotente también se puede considerar pluripotente, aunque lo contrario no siempre es cierto.

50 **[0043]** Una "célula progenitora" describe cualquier célula precursora, capaz de auto-renovación, cuyas células hijas pueden comprometerse a diferenciarse en otros tipos de células (células no progenitoras). En general, una célula progenitora es capaz de una proliferación extensa, generando más células progenitoras (auto-renovación), así como más células de linaje restringido. Las células progenitoras pueden dividirse asimétricamente, manteniendo una célula hija el estado de células progenitoras y siendo la otra algo más restringida en el linaje (por ejemplo, expresando alguna otra función y/o fenotipo distinto específico). Alternativamente, algunas de las células progenitoras en una población se pueden dividir simétricamente en células progenitoras, manteniendo así algunas células progenitoras en la población de forma completa, mientras que otras células en la población dan lugar sólo a las células no progenitoras. Los ejemplos de células progenitoras incluyen ciertas células obtenidas de epitelio olfativo, la médula ósea, la grasa, y folículo epidérmico. Los ejemplos de células progenitoras también incluyen

5 cualquier célula derivada de un cultivo de células primarias que muestra los atributos de las células progenitoras. Un ejemplo de una célula progenitora de este tipo incluye células formadoras de neuroesferas (NSFC) obtenidas a partir de cultivo de tejido de biopsia de epitelio olfativo (en algunas realizaciones, tejido de biopsia de epitelio olfativo humano, y en algunas realizaciones, tejido de biopsia de epitelio olfativo humano adulto) tal como se describe en la Publicación de la solicitud de patente internacional PCT No. WO 2003/064601.

10 **[0044]** La frase "célula progenitora" se refiere por lo tanto a una célula que muestra la capacidad de experimentar especificación de linaje restringido. Como tal, en algunas realizaciones, una célula progenitora es una célula que está en una posición intermedia a lo largo de una ruta de diferenciación entre una célula totipotente y una célula que está comprometida a la diferenciación terminal. En algunas realizaciones, una célula progenitora es regenerativa y pluripotente.

15 **[0045]** Tal como se utiliza aquí, la expresión "derivado diferenciado" se refiere a una célula que está más lejos a lo largo de una ruta de diferenciación que una célula de referencia, que es habitualmente una célula pluripotente o totipotente. En el contexto de derivados diferenciados de un progenitor, un derivado diferenciado es una célula que está más lejos a lo largo de una ruta de diferenciación particular que el progenitor. En algunas realizaciones, un derivado diferenciado de una célula madre derivada de epitelio olfativo es una célula que está al menos una etapa más allá a lo largo de una ruta de diferenciación determinada que la célula madre derivada de epitelio olfativo.

20 **[0046]** El término "tejido diana", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un sitio previsto para la acumulación de una o más células de la materia aquí descrita y/o una o más sustancias producidas por las células de la materia aquí descrita (por ejemplo, un factor neurotrófico) después de la administración de dichas una o más células a un sujeto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los procedimientos de la materia aquí descrita implican un tejido diana que comprende el tejido nervioso (por ejemplo, neuronas) que ha sido dañado, por ejemplo, por defecto genético, lesión, y/o un proceso de enfermedad. Como tal, un "tejido diana" puede ser una localización en la que se implantan las células de la materia aquí descrita y también una localización en la que pretenden actuar las propias células o un factor (por ejemplo, un polipéptido).

30 II. Células madre derivadas de epitelio olfativo

II.A. General

35 **[0047]** La materia aquí descrita se refiere, en algunas realizaciones a células madre derivadas de epitelio olfativo que, en algunas realizaciones, son células madre derivadas de epitelio olfativo humano adulto, y los procedimientos de uso para las mismas. En algunas realizaciones, se emplean células madre derivadas del epitelio olfativo aisladas per se, y en algunas realizaciones, las células madre derivadas del epitelio olfativo se modifican *in vitro* antes de ser empleadas.

40 **[0048]** El epitelio olfativo proporciona una fuente de células madre derivadas del epitelio olfativo adulto viables que se pueden emplear, por ejemplo, en investigación, tratamiento, desarrollo de fármacos, y trasplantes, lo que evita los problemas éticos asociados con el uso de células madre embrionarias y fetales. Aún más, el uso de células madre derivadas del epitelio olfativo evita problemas éticos asociados con el uso de modelos animales y se pueden utilizar incluso cuando no existen modelos animales. Las células madre derivadas del epitelio olfativo tienen una capacidad de regeneración de larga vida; las células madre derivadas del epitelio olfativo situadas en el epitelio olfativo pueden reemplazar neuronas envejecidas y/o dañadas y sus células sustentaculares, así como proporcionar factores que inducen la reparación y/o regeneración de varios tipos de células neurales.

45 **[0049]** La accesibilidad del epitelio olfativo y la capacidad proliferativa hacen que sea una fuente única de células progenitoras. Además, la capacidad para obtener células madre derivadas del epitelio olfativo, que incluye, pero sin limitación, células madre derivadas del epitelio olfativo humano y/o células madre derivadas del epitelio olfativo humano adulto, de la cavidad nasal elimina la necesidad de utilizar procedimientos muy invasivos y perjudiciales que están disponibles actualmente para obtener células madre post-embrionarias. Además, dado que uno de los mayores problemas encontrados en los trasplantes es el rechazo de tejidos, la disposición de células de la materia aquí descrita para el trasplante autólogo elimina la necesidad de identificar un donante histocompatible y por lo tanto elimina el rechazo. Se observa, sin embargo, que también pueden emplearse, si se desea, células no autólogas, y si es necesario, pueden utilizarse tratamientos inmunosupresores apropiados para reducir el rechazo.

50 **[0050]** Tal como se utiliza en el presente documento, la frase "célula madre derivada de olfativo epitelial" se refiere a una célula que, en algunas realizaciones, tiene al menos dos de las siguientes características, en algunas realizaciones, tiene al menos tres de las siguientes características, en algunas realizaciones, tiene al menos cuatro de las siguientes características, en algunas realizaciones, al menos cinco de las siguientes características, y en algunas realizaciones, todas las siguientes características:

- 55 i) se divide cada 18-24 horas durante más de 200 pasajes cuando se cultiva en medio de cultivo tisular estándar suplementado con hasta un 10% suero de ternera fetal inactivado por calor;
- 60 ii) la inmunoreactividad para el marcador  $\beta$ -tubulina isotipo III es significativamente elevada cuando la célula se cultiva en varios sustratos, tal como una matriz recubierta con una mezcla de entactina, laminina y colágeno IV

- (matriz ECL), o alternativamente una matriz recubierta con laminina o fibronectina;
- iii) la inmunoreactividad para  $\beta$ -tubulina isotipo III es pronunciada y generalmente muestra una red de microtúbulos bien desarrollada;
- iv) la adición de dibutilil AMPc a un cultivo en crecimiento en una matriz ECL da lugar a que las células formen procesos;
- v) inmunopositiva para nestina;
- vi) expresa y es inmunopositiva para periferina;
- vii) no requiere una capa de alimentación para el crecimiento y la proliferación;
- viii) no requiere EGF o FGF exógeno para su supervivencia o la diferenciación en el cultivo; y
- ix) inmunopositiva para uno o más receptores Trk.

**[0051]** En algunas realizaciones, la célula madre derivada de epitelio olfativo es una célula madre derivada de epitelio olfativo de mamífero. En algunas realizaciones, la célula madre derivada de epitelio olfativo es una célula madre derivada de epitelio olfativo humano, que opcionalmente puede ser una célula madre derivada de epitelio olfativo adulto.

**[0052]** Las células madre derivadas de epitelio olfativo humano se pueden manipular *in vitro* para formar neuroesferas de donantes de hasta 95 años de edad demuestra un notable grado de neuroplasticidad en estas células. Además, la accesibilidad quirúrgica directa, mínimamente invasiva, de las células madre derivadas de epitelio olfativo humano, junto con su pluripotencia, hace que las células madre derivadas del epitelio olfativo sean una buena fuente autóloga de células progenitoras. Estas células se pueden extraer, expandir y, opcionalmente, manipular *ex vivo* antes de volver, a través de trasplante de donante, para la regeneración y/o reparación de tejido neural dañado. Estas células madre pluripotentes se pueden utilizar también para generar poblaciones de células específicas del paciente para la evaluación y el tratamiento genético o de diagnóstico.

**[0053]** Como tal, las expresiones "células madre derivadas del epitelio olfativo" y "célula formadora de neuroesferas" (NSFC) se utilizan indistintamente para referirse a células progenitoras pluripotentes regenerativas del epitelio olfativo (incluyendo, pero sin limitación, el epitelio olfativo de un humano, opcionalmente un adulto humano) que muestran la capacidad de formar un grupo de aproximadamente 20 a 80 o más precursores neurales mitóticamente activos (por ejemplo, neuronales y gliales) que en algunas realizaciones son positivos para la proteína marcadora de células madre neurales nestina. Morfológicamente, las NSFC representan una población de células neurales en diferentes estados de maduración formados por un solo progenitor que se expande clonalmente que forma estructuras celulares esféricas muy empaquetadas. En algunas realizaciones, las NSFC humanas reaccionan con anticuerpos específicos para polipéptidos humanos y tienen al menos dos, tres, cuatro, cinco, o más de las características enumeradas anteriormente en el presente documento para células madre derivadas del epitelio olfativo.

## II.B. Aislamiento y cultivo de células madre de derivadas de epitelio olfativo humano

**[0054]** Se han descrito procedimientos de ejemplo para el aislamiento de células madre derivadas de epitelio olfativo humano, y se pueden emplear procedimientos similares para aislar y cultivar células madre derivadas de epitelio olfativo de otros animales (por ejemplo, otros mamíferos). Véase la solicitud de patente internacional PCT n° WO 2003/064601. Como se establece en la misma, se extrae en primer lugar el tejido epitelial olfativo humano de la cavidad nasal. El experto en la técnica entenderá que el tejido epitelial olfativo se puede extraer usando una variedad de procedimientos. Un procedimiento de ejemplo para extraer el tejido epitelial olfativo implica el uso de un endoscopio que tiene un cable de fibra óptica con una "pinza" ("pincher") en un extremo para realizar una biopsia. Una ventaja de este procedimiento de ejemplo es que permite la obtención de muestras de tejido de individuos donantes vivos con una invasividad e incomodidad mínimas. Una ventaja adicional de la extracción de tejidos epiteliales olfativos usando un endoscopio es la capacidad de congelar o cultivar las células madre del epitelio olfativo obtenidas en una colección inicial y la capacidad de tomar múltiples colecciones cuando sea necesario para la viabilidad de cultivo *in vitro* o para alcanzar un nivel deseado de cantidad de células madre.

**[0055]** Un rinotomía lateral es otro ejemplo de procedimiento para la extracción de tejidos del epitelio olfativo. Una rinotomía lateral es un procedimiento quirúrgico en el que se hace una incisión en la nariz a lo largo de un lado de modo que se puede girar para proporcionar acceso completo a la cavidad nasal y al tejido del epitelio olfativo. Sin embargo, este procedimiento es altamente invasivo. En algunas realizaciones, el procedimiento de rinotomía lateral se utiliza para extraer tejidos de epitelio olfativo de un cadáver. En este procedimiento, el cadáver es, en algunas realizaciones, de no más de dieciocho horas después de la muerte, en algunas realizaciones, es de no más de seis horas después de la muerte, y en algunas realizaciones, el cadáver se inmediatamente después de morir.

**[0056]** Una vez extraído, el epitelio olfativo humano puede cultivarse. Por ejemplo, el epitelio olfativo puede cultivarse en medio que contiene medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) y F12 (1:1) con suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (FBS; todos los componentes del medio están disponibles en GIBCO, Grand Island, Nueva York). Se pueden utilizar otros medios, tal como se reconoce por el experto en la materia, así como diferentes fuentes animales de sueros o el uso de medios libres de suero. Además, algunas cultivos pueden emplear suplementos adicionales, incluyendo, pero no limitado a, aminoácidos (tales como glutamina), factores de

crecimiento, etc.

5 **[0057]** Se puede utilizar una variedad de sustratos para cultivar las células, por ejemplo, sustratos de plástico o de vidrio, recubiertos o sin recubrir. Por ejemplo, un sustrato puede ser una placa de plástico recubierto con laminina-fibronectina. Alternativamente, el sustrato se puede recubrir con moléculas de la matriz extracelular (por ejemplo, para fomentar la adhesión o para el control de la diferenciación celular), colágeno, o poli-L-lisina (por ejemplo, para fomentar la adhesión libre de efectos biológicos). El sustrato del cultivo celular también se puede tratar para que esté cargado.

10 **[0058]** En el caso en el que la adhesión del sustrato es indeseable, se pueden utilizar cultivos rotatorios, en el que las células se mantienen en suspensión. Además, en algunas realizaciones, la composición del sustrato puede desempeñar un papel en la diferenciación de las células madre del epitelio olfativo.

15 **[0059]** El epitelio olfativo extraído no sólo contiene células madre pluripotentes derivadas del epitelio olfativo/NSFC, sino que también puede contener las neuronas receptoras olfativas (ORN), células envainadas olfativas (OEC; también referidas como células sustentaculares), células de soporte epitelial, fibroblastos y/o células endoteliales y/o leucocitos que pueden aislarse junto con las células madre derivadas del epitelio olfativo del tejido conectivo subyacente. Después de cultivar durante varias semanas, aparece una población de células mitóticamente activas, mientras que las ORN y la OEC normalmente se vacuolan, retractan sus procesos, y mueren al cabo de aproximadamente tres a ocho semanas *in vitro*. Las células mitóticamente activas normalmente pueden duplicarse cada día en el cultivo.

20 **[0060]** Después de algunos días adicionales de proliferación sin perturbaciones, se empiezan a formar neuroesferas. Esto tiene lugar generalmente en 5-60% o más de los cultivos, de manera que se pueden producir múltiples cultivos para asegurar una colección de células. Las neuroesferas se pueden recoger del cultivo mediante una variedad de procedimientos. En algunas realizaciones, las neuroesferas comienzan a flotar y se pueden extraer con simple aspiración. Después de la recogida, las neuroesferas (y las células que componen las neuroesferas) se pueden lavar y separar de los restos celulares no deseados por centrifugación con o sin un gradiente (continuo o por etapas, tal como con polietilenglicol o sacarosa), o clasificar, si se desea, mediante FACS u otras técnicas basadas en la unión, tales como, pero no limitado a, el uso de anticuerpos para un marcador celular específico que reviste microesferas (en algunas realizaciones microesferas magnéticas).

25 **[0061]** En algunas realizaciones, todos los procedimientos de recogida se llevan a cabo de forma aséptica. Un experto en la técnica sabrá cómo determinar correctamente los parámetros útiles, tales como los tiempos de incubación con agentes de extracción celular (químicos o enzimáticos), las temperaturas, la fuerza centrífuga, y el número y tipo de lavados. Después de la recogida, las neuroesferas se pueden dispersar mecánicamente en células individuales, lavarse repetidamente con una solución osmóticamente adecuada (tamponada o no tamponada), generalmente proporcionada por soluciones de sales, tales como solución salina o solución de Ringer, centrifugarse para eliminar los restos celulares, y a continuación volverse a sembrar, en algunas realizaciones,  $10^3$  células por  $\text{mm}^2$ . En algunas realizaciones, las células se volvieron a sembrar en pocillos individuales de una placa de cultivo tisular y se hicieron crecer clonalmente.

30 **[0062]** Las células se pueden aislar posteriormente de estas células sembradas y se caracterizaron mediante el sondeo de las células con anticuerpos específicos de linaje, o se examinaron para otros marcadores útiles. Inicialmente, puede ser deseable determinar si las neuronas están presentes en los cultivos de células aisladas. Además de la inspección microscópica simple, las neuronas se pueden detectar con mayor sensibilidad mediante la presencia de uno o más de los siguientes marcadores de ejemplo: nestina, proteínas de neurofilamentos, periferina, proteína asociada a microtúbulos 2ab (MAP2ab),  $\beta$ -tubulina isotipo III, A2B5 (ver Dubois et al., 1990; Roisen et al., 2001; disponible de INVITROGEN® Corp., Carlsbad, California, Estados Unidos de América), y el receptor de NGF. Ver también la Tabla 1 de la publicación de la solicitud de patente internacional PCT No. WO 2003/064601.

35 **[0063]** Las células gliales se pueden detectar en algunas realizaciones mediante la presencia de un gangliósido enriquecido en membrana glial con un anticuerpo monoclonal, tal como A2B5 (ver Dubois et al., 1990; Roisen et al., 2001; disponible de INVITROGEN® Corp., Carlsbad, California, Estados Unidos de América).

40 **[0064]** Los astrocitos se pueden detectar en algunas realizaciones mediante la presencia de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) utilizando técnicas estándar conocidas por un experto normal en la técnica después de la revisión de la presente descripción.

45 **[0065]** La materia aquí descrita por lo tanto también proporciona cultivos celulares que comprenden una célula madre derivado de epitelio olfativo (en algunas realizaciones, una célula madre derivada de epitelio olfativo de origen humano y, en algunas realizaciones, una célula madre derivada de epitelio olfativo humano adulto) y/o un derivado diferenciado de las mismas. En algunas realizaciones, la célula madre derivada de epitelio y/o un derivado diferenciado de la misma es una célula madre derivada de epitelio recombinante y/o un derivado diferenciado de la misma, en la que la célula madre derivada de epitelio olfativo recombinante y/o el derivado diferenciado de la misma comprenden uno o más transgenes que codifican un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un

fragmento biológicamente activo de los mismos, un derivado biológicamente activo de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el cultivo celular comprende un medio de cultivo que comprende un polipéptido Sonic hedgehog (Shh) (incluyendo, pero no limitado a, un polipéptido Shh humano) y/o un fragmento biológicamente activo o derivado de los mismos; ácido retinoico (RA) y/o un derivado biológicamente activo del mismo, forskolina (FN) y/o un derivado biológicamente activo de la misma, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende ácido retinoico aproximadamente 1  $\mu$ M, forskolina aproximadamente 5  $\mu$ M, y Sonic hedgehog (Shh) aproximadamente 15 nM. En algunas realizaciones, el Shh comprende un polipéptido Shh humano.

## 10 II.C. Manipulación de células madre derivadas de epitelio olfativo

**[0066]** El término "vector" se refiere a cualquier ácido nucleico que es capaz de suministrar una secuencia de nucleótidos a una célula, y/o expresar una secuencia de nucleótidos exógena, y/o recombinarse con una secuencia endógena después de la introducción en una célula.

**[0067]** Se puede utilizar un "marcador" para determinar el estado diferenciado de una célula. Los marcadores son característicos, ya sea de tipo morfológico o bioquímico (enzimático), particulares a un tipo de célula, o moléculas expresadas por el tipo de célula. En algunas realizaciones, tales marcadores son proteínas, y, en algunas realizaciones, poseen un epítipo para los anticuerpos u otras moléculas de unión disponibles. Sin embargo, un marcador puede comprender cualquier molécula que se encuentra en una célula, incluyendo, pero no limitado a, proteínas (péptidos y polipéptidos), lípidos, polisacáridos, gangliósidos, ácidos nucleicos, esteroides y derivados de los mismos. Los marcadores pueden detectarse mediante cualquier procedimiento disponible para un experto en la técnica.

**[0068]** Además de los anticuerpos (y todos los derivados de anticuerpos) que reconocen y se unen a al menos un epítipo en una molécula de marcador, los marcadores se pueden detectar usando técnicas analíticas, tales como, pero no se limitan a, transferencias de puntos de proteínas, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), y cualquier otro sistema de gel que separa proteínas, con la posterior visualización del marcador (por ejemplo, transferencias Western); filtración en gel; purificación en columna de afinidad; morfológicamente, tal como, pero no limitado a, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), tinción con colorantes que tienen una reacción específica con una molécula de marcador (tal como, rojo rutenio y moléculas de la matriz extracelular), características morfológicas específicas (tales como la presencia de microvellosidades en el epitelio, o la pseudópodos/filopodios en células migratorias, tales como fibroblastos y mesénquima); y/o bioquímicamente, tal como el ensayo de un producto enzimático o intermedio, o la composición general de una célula, tal como la proparte de proteína a lípido o de lípido a azúcar, o incluso la proparte de dos lípidos específicos entre sí, o polisacáridos. En el caso de marcadores de ácido nucleico, se puede utilizar cualquier procedimiento conocido. Si dicho marcador es un ácido nucleico, se pueden utilizar PCR, RT-PCR, hibridación in situ, hibridación de transferencia puntual, transferencias Northern, transferencias Southern y similares, acopladas a procedimientos de detección adecuados.

**[0069]** Un marcador o una combinación de marcadores pueden mostrar especificidad para un tipo de célula.

**[0070]** Las miofibrillas, por ejemplo, son características únicamente de las células musculares; los axones se encuentran sólo en el tejido nervioso, las cadherinas son típicas del epitelio, las  $\beta_2$ -integrinas a los glóbulos blancos del sistema inmunitario, y un alto contenido de lípidos es característico de los oligodendrocitos, mientras que las gotas de lípidos son exclusivas de los adipocitos. En la Tabla 1 de la solicitud de patente internacional PCT No. de publicación WO 2003/064601 se proporciona una lista de marcadores que se pueden utilizar en la materia aquí descrita.

**[0071]** Alternativamente, si los anticuerpos comerciales no están disponibles, los expertos en la técnica conocerán cómo fabricar anticuerpos, incluyendo, pero no limitado a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de los mismos (tales como, pero no limitado a, Fab, Fv, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y dederivados de una sola cadena y humanizados de los mismos). Por ejemplo, se puede fabricar un anticuerpo de la siguiente manera.

**[0072]** Los anticuerpos policlonales se pueden desarrollar en contra de un huésped mamífero mediante una o más inyecciones de un inmunógeno y, si se desea, un adyuvante. Habitualmente, el inmunógeno (y adyuvante) se inyecta en el mamífero mediante una inyección subcutánea o intraperitoneal. El inmunógeno puede incluir moléculas tales como polipéptidos, células completas o fracciones de células, y pueden producirse de forma recombinante.

**[0073]** o no recombinante. Ejemplos de adyuvantes incluyen completo de Freund y monofosforil lípido A sintético-dicorinomicolato de trehalosa (MPL-TDM). Para mejorar la respuesta inmune, puede conjugarse un inmunógeno a un polipéptido que es inmunogénico en el huésped, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Los protocolos para la producción de anticuerpos son bien conocidos (Harlow y Lane, 1988). Alternativamente, los pAbs se pueden fabricar en pollos produciendo moléculas de IgY (Schade y Hlinak, 1996).

- 5 **[0074]** Un anticuerpo monoclonal (mAb; plural mAbs) también se puede fabricar mediante la inmunización de un huésped o linfocitos de un huésped, la recogida de los linfocitos que secretan (o potencialmente secretan) mAb, fusión de los linfocitos recogidos a células inmortalizadas (por ejemplo, células de mieloma), y selección de las células que secretan el mAb deseado. Los mAbs pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo o fluido ascítico mediante procedimientos convencionales, tales como proteína A-Sepharose®, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, precipitación con sulfato de amonio o cromatografía de afinidad (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988; Harlow y Lane, 1999; patente de Estados Unidos nº 5.753.230; 5.733.876; 5.762.918; 5.776.427; 5.766.591; y 5.660.827).
- 10 **[0075]** El término "plasticidad" se refiere a la capacidad de una célula de variar en un patrón de desarrollo; es decir, la capacidad de ser moldeada o alterada. En algunas realizaciones, una célula que muestra "plasticidad" demuestra la capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células. Como tal, el término "neuroplasticidad" se refiere a la capacidad de una célula de diferenciarse en una célula del linaje neural.
- 15 **[0076]** El término "diferenciación" se refiere a la adquisición o posesión de una o más características o funciones diferentes de la del tipo de célula predecesora. Una célula diferenciada es una que tiene un carácter o función diferente de las estructuras circundantes o del precursor de esa célula (incluso la misma célula).
- 20 **[0077]** La diferenciación da lugar a partir de un conjunto limitado de células (por ejemplo, en los vertebrados, las tres capas germinales del embrión: ectodermo, mesodermo y endodermo) a la diversidad celular, creando todos de los muchos tipos de células especializadas que forman un individuo.
- 25 **[0078]** La diferenciación es un proceso de desarrollo mediante el cual las células asumen un fenotipo especializado; es decir, adquieren una o más características o funciones distintas de otros tipos de células. En la mayoría de los usos, el fenotipo diferenciado se refiere a un fenotipo celular que es en el punto final maduro de alguna ruta de desarrollo. En muchos, pero no todos los tejidos, el proceso de diferenciación está acoplado con la salida del ciclo celular; en estos casos, la célula pierde o está muy restringida en su capacidad de proliferar.
- 30 **[0079]** Un "factor de diferenciación" es cualquier sustancia química o cosa que provocará la diferenciación. Esto incluye, por ejemplo, sustratos y factores de crecimiento.
- 35 **[0080]** Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "factor de crecimiento" se refiere a una sustancia (por ejemplo, una citoquina) que promueve el crecimiento y desarrollo celular mediante la dirección de la maduración y diferenciación celular. Los factores de crecimiento también pueden mediar en el mantenimiento y la reparación de tejidos. Los factores de crecimiento se unen mediante receptores específicos y actúan a concentraciones muy bajas. Muchos factores de crecimiento están mediados, al menos parcialmente, por segundos mensajeros, tales como AMP cíclico (AMPC). Los miembros de la familia de las neurotrofinas (NGF, BDNF, NT-3, y NT4/5) juegan un papel clave en el desarrollo, la diferenciación y la supervivencia neuronal. Los factores de crecimiento de la familia de las neurotrofinas habitualmente actúan a través de receptores de tirosina quinasa (Trk).
- 40 **[0081]** En algunas realizaciones, una célula madre derivada del epitelio olfativo, o un derivado de la misma, expresa un factor de crecimiento o citoquina de interés. Ejemplos de factores de crecimiento y citocinas expresadas por las células madre derivadas del epitelio olfativo y sus derivados incluyen, pero no se limitan a, NGF, BDNF, NT3, NT4/5, y VEGF.
- 45 **[0082]** Los medios y condiciones para la generación de cultivos primarios y el mantenimiento de los cultivos de neuroesferas anteriores son bien conocidos en la técnica y pueden variar dependiendo de los tipos de células presentes. Por ejemplo, las células de músculo esquelético, hueso, neuronas, piel, hígado y madre embrionarias son adultos todas crecen en medios que difieren en sus contenidos específicos. Además, los medios para un tipo de célula pueden diferir significativamente de un laboratorio a otro y de una institución a otra. Para mantener las células en división, se añade suero, tal como suero de ternera fetal, al medio en cantidades relativamente grandes, 1-30% en volumen, de nuevo dependiendo del tipo de célula o de tejido. También se pueden añadir factores de crecimiento purificados específicos o cócteles de múltiples factores de crecimiento o a veces se sustituyen por suero. Cuando se desea la diferenciación y no la proliferación, el suero con sus mitógenos se limita generalmente a aproximadamente 0-2% en volumen. También se pueden utilizar factores u hormonas específicas que promueven la diferenciación y/o promueven la detención del ciclo celular.
- 50 **[0083]** Se pueden utilizar condiciones de oxígeno fisiológico y oxígeno subatmosférico en cualquier momento durante el crecimiento y diferenciación de células en cultivo, como un complemento fundamental para la selección de los fenotipos celulares específicos, crecimiento y proliferación de tipos celulares específicos, o la diferenciación de tipos celulares específicos. En general, el cultivo fisiológico o de bajo nivel de oxígeno se consigue mediante procedimientos que limitan la acidosis de los cultivos, tales como la adición de tampón fuerte a medio (tal como HEPES), y los cambios de medio frecuentes y los cambios en la concentración de CO<sub>2</sub>.
- 55 **[0084]** Además de oxígeno, los otros gases para el cultivo habitualmente son aproximadamente el 5% de dióxido de carbono y el resto es nitrógeno, pero opcionalmente pueden contener cantidades variables de óxido nítrico (a partir

de tan sólo 3 ppm), monóxido de carbono y otros gases de efecto, tanto inertes como biológicamente activos. Las concentraciones de dióxido de carbono habitualmente varían alrededor del 5%, pero pueden variar entre 2 y 10%. Tanto el óxido nítrico como el monóxido de carbono, cuando es necesario, se administran habitualmente en cantidades muy pequeñas (es decir, en el rango de ppm), determinadas empíricamente o a partir de la literatura.

**[0085]** El medio se puede complementar con una variedad de factores de crecimiento, citoquinas, suero, etc. Ejemplos de factores de crecimiento adecuados son el factor de crecimiento neuronal (NGF), NT3, NT4/5, factor neuronal derivado del cerebro (BDNF) y factor estimulante de colonias (CSF). Ejemplos de aditivos del medio hormonales son estrógeno, progesterona, testosterona, o glucocorticoides, tales como dexametasona. Ejemplos de aditivos del medio de citoquinas son interferones, interleucinas, o factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Un experto en la materia entenderá cómo probar aditivos y componentes de cultivo en diferentes condiciones de cultivo, ya que pueden alterar la respuesta celular, la vida activa de los aditivos, u otras características que afectan a su bioactividad. Además, la superficie sobre la que se cultivan las células puede recubrirse con una variedad de sustratos que contribuyen a la supervivencia, el crecimiento y/o diferenciación de las células. Estos sustratos incluyen, pero no se limitan a, la laminina, matriz ECL, colágeno, poli-L-lisina, poli-D-lisina, poliornitina y fibronectina. En algunos casos, cuando se desean cultivos de 3 dimensiones, se pueden utilizar geles de matriz extracelular, tales como colágeno, matriz ECL o gelatina. Las células pueden ser cultivadas en la parte superior de tales matrices, o pueden integrarse dentro de los propios geles. Por ejemplo, el uso de una matriz de ECL promovía la restricción de linaje de las células derivadas del epitelio olfativo hacia la maduración de neuronas, tal como se indica por el nivel de neuritogénesis.

**[0086]** Para manipular ADN *in vitro* de modo que las células de la materia aquí descrita estén modificadas con secuencias de ácidos nucleicos exógenos, están disponibles muchas técnicas para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, 2001; Ausubel et al., 2002; Ausubel et al, 2003).

**[0087]** Los vectores son herramientas utilizadas para transferir ADN entre las células huésped o como una estrategia para expresar una secuencia de nucleótidos. Algunos vectores funcionan solamente en procariontes, mientras que otros funcionan tanto en procariontes como en eucariotas, lo que facilita la preparación de ADN a gran escala a partir de procariontes para la expresión en eucariotas. La inserción del ADN de interés se consigue mediante técnicas de ligación y/o protocolos de apareamiento bien conocidos por el experto en la materia. El ADN se inserta de manera que su integración no altera ninguno de los componentes necesarios del vector. En el caso de vectores que se utilizan para expresar el polipéptido codificado insertado, el ADN introducido puede ligarse operativamente a los elementos del vector que gobiernan su transcripción y traducción.

**[0088]** Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "ligado operativamente" se refiere a una secuencia de nucleótidos de interés que está ligada a una o más secuencias reguladoras de tal manera que se consigue la expresión de la secuencia de nucleótidos bajo el control de dicha una o más secuencias reguladoras.

**[0089]** Los vectores se pueden dividir en dos clases generales: Los vectores de clonación de ejemplo incluyen plásmidos de replicación, cósmidos, fagos, y cromosomas artificiales bacterianos (BAC) que comprenden regiones que son no esenciales para la propagación en una célula huésped apropiada y en los que se puede insertar ADN exógeno, dando lugar a la replicación del ADN exógeno y propagación en la célula huésped. Se puede utilizar un vector de expresión (tal como un plásmido, levadura o genoma del virus animal) para introducir material genético exógeno en una célula huésped o tejido con el fin de transcribir y traducir el ADN exógeno. En los vectores de expresión, el ADN introducido está operativamente ligado a elementos, tales como promotores, que señalan a la célula huésped para transcribir el ADN insertado. Los promotores de ejemplo incluyen promotores constitutivos, promotores inducibles (es decir, que controlan la transcripción de genes en respuesta a factores específicos), y promotores específicos de tejido.

**[0090]** Los vectores tienen muchas manifestaciones. Un "plásmido" es una molécula de ADN de doble cadena circular que puede aceptar fragmentos de ADN adicionales. Los vectores virales también pueden aceptar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamíferos episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) se integran en el genoma de una célula huésped y se replican como parte del genoma del huésped. En general, los vectores de expresión útiles son plásmidos y vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados de replicación defectuosa); también se pueden utilizar otros vectores de expresión.

**[0091]** Alternativamente, los vectores se pueden transcribir y traducir *in vitro*, por ejemplo utilizando secuencias reguladoras del promotor T7 y T7 ARN polimerasa.

III. Neuronas dopaminérgicas recombinantes y progenitores recombinantes de las mismas, incluyendo procedimientos para producir los mismos

**[0092]** La materia aquí descrita usa el descubrimiento de procedimientos para la manipulación de células progenitoras, tales como células formadoras de neuroesferas (NSFC) para producir células cebadas de linaje

adecuadas para usar en estrategias de reemplazo celular y/o para la liberación de factores neurotróficos a tejidos diana. El cebado de linaje de NSFC da lugar a mecanismos de linaje restringido a células que conducen en algunas realizaciones a las células cebadas de linaje dopaminérgicas. Estas células cebadas de linaje pueden trasplantarse a sujetos con traumas del sistema nervioso central y/o enfermedades neurodegenerativas, y son particularmente útiles para el trasplante autólogo.

**[0093]** Las células progenitoras que se pueden del epitelio olfativo (en algunas realizaciones, epitelio olfativo humano y en algunas realizaciones epitelio olfativo humano adulto) permanecen relativamente no diferenciadas cuando se mantienen en un medio mínimo, tal como, pero no limitado a MEM10, o cuando se exponen a una variedad de medios definidos y factores tróficos. Estos cultivos de NSFC parecen tener un defecto neuronal inmaduro en el que más del 97% de las células expresan tanto  $\beta$  tubulina III como periferina y habitualmente más de una mitad de la población de las células expresan nestina. Esto sugiere que los cultivos de NSFC obtenidos a partir de epitelio olfativo humano adulto podrían ser diferentes de células madre embrionarias y/o otros tipos de células madre neurales.

**[0094]** Sin embargo, en algunas realizaciones los cultivos de NSFC humanos descritos en este documento tienen características de células progenitoras neurales. Por ejemplo, las células habitualmente no parecen expresar la proteína astrocítica fibrilar ácida de la glía (GFAP) marcadora, el marcador microglial OX42, los marcadores de oligodendrocitos galactocerebrósido (GalC) o la proteína básica de mielina (MBP), o los marcadores neuronales maduros núcleos neuronales (NeuN), HB9, Isl 1/2, transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), colina acetiltransferasa (ChAT), y tirosina hidroxilasa (TH), cada uno de los cuales es indicativo de un tipo de célula del sistema nervioso central que ha experimentado la especificación de linaje restringido más allá la etapa progenitora. Se observa, sin embargo, que una pequeña fracción de las células puede expresar uno o más de estos marcadores, y este hecho no excluye que esta fracción de las células esté comprendida por el término "NSFC".

**[0095]** Para determinar si las NSFC pueden experimentar un cebado de linaje a lo largo de las vías de linaje restringido a células utilizando agentes de cebado de linaje, los cultivos de NSFC fueron tratados simultáneamente con diferentes concentraciones y combinaciones de RA, FN, y Shh *in vitro*. Dependiendo del régimen de tratamiento, los cultivos de NSFC pueden, en algunas realizaciones, someterse a cebado de linaje para producir neuritas que tienen características de células cebadas de linaje cebado motoneuronal y células cebadas de linaje dopaminérgicas. En algunas realizaciones, las NSFC no forman estos tipos de células cebadas de linaje después del tratamiento con RA, FN, o Shh solo.

**[0096]** En algunas realizaciones, el cebado de linaje puede realizarse mediante el tratamiento de cultivos de NSFC durante siete días con RA en presencia de FN, Shh, o una combinación de FN y Shh. En algunas realizaciones, al menos 1  $\mu$ M de AR en combinación con FN a una concentración de 1  $\mu$ M a 10  $\mu$ M, incluyendo, pero no limitado a, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 4  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 6  $\mu$ M, 7  $\mu$ M, 8  $\mu$ M, 9  $\mu$ M, y 10  $\mu$ M, puede dar lugar a células cebadas de linaje motoneuronal y dopaminérgico. Alternativamente, al menos 1  $\mu$ M de RA en combinación con Shh a una concentración de 5 nM a 20 nM, incluyendo, pero no limitado a, 5 nM, 6 nM, 7 nM, 8 nM, 9 nM, 10 nM, 11 nM, 12 nM, 13 nM, 14 nM, 15 nM, 16 nM, 17 nM, 18 nM, 19 nM, y 20 nM, puede dar lugar a células cebadas de linaje motoneuronal y dopaminérgico. En algunas realizaciones, al menos 1  $\mu$ M de RA en combinación con FN a una concentración de 1  $\mu$ M a 10  $\mu$ M (incluyendo, pero no limitado a, 2  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 4  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 6  $\mu$ M, 7  $\mu$ M, 8  $\mu$ M, y 9  $\mu$ M) y Shh a una concentración de 5 nM a 20 nM (incluyendo, pero no limitado a, 5 nM, 6 nM, 7 nM, 8 nM, 9 nM, 10 nM, 11 nM, 12 nM, 13 nM, 14 nM, 15 nM, 16 nM, 17 nM, 18 nM, 19 nM, y 20 nM) da lugar a células cebadas de linaje motoneuronal y dopaminérgico. Y en algunas realizaciones, al menos 1  $\mu$ M de RA en combinación con 5  $\mu$ M de FN y 15 nM de Shh da lugar a células cebadas de linaje motoneuronal y dopaminérgico. En algunas realizaciones, ninguno de estos tratamientos afecta a la viabilidad celular.

**[0097]** Después del tratamiento de las cultivos de NSFC con, por ejemplo, 1  $\mu$ M de RA en combinación con 5  $\mu$ M de FN y 15 nM de Shh durante siete días, las células cebadas de linaje motoneuronal y dopaminérgico resultantes expresan antígenos neuronales maduros. Aproximadamente el 97% de las NSFC eran positivas en  $\beta$ -tubulina III y positivas en periferina, aproximadamente el 82% eran positivas en Tau, y aproximadamente el 86% eran positivas en  $\alpha$ -internexina. Además, aproximadamente el 31% de las NSFC tratadas expresaron NF68 localizado en el soma celular mientras que aproximadamente el 27% de las células expresaron NF160 y el 24% de las células expresaron NF200 en el soma y procesos neuríticos. Por el contrario, la expresión de nestina disminuyó en las células tratadas a aproximadamente el 17% y no se detectaron GFAP, OX42, GalQ, o MBP. Además, los experimentos de etiquetado confirmaron que las NSFC tratadas con 1  $\mu$ M de RA en combinación con 5  $\mu$ M de FN y/o 15 nM de Shh no incorporaban cantidades significativas de BrdU, pero inducían la expresión de NeuN. Por lo tanto, las NSFC se someten a una especificación de linaje restringido a lo largo de una vía neuronal que incluye células cebadas de linaje motoneuronal y dopaminérgico.

**[0098]** Además, aproximadamente el 12% de las NSFC tratadas forman células cebadas de linaje dopaminérgico, como lo demuestra la expresión del antígeno específico neuronal dopaminérgico, la tirosina hidroxilasa. Las células positivas en TH no pudieron expresar ChAT o VACHT, definiendo por lo tanto estas células como células cebadas de linaje dopaminérgico en lugar de células cebadas de linaje motoneuronal.



[0099] Por lo tanto, en algunas realizaciones, la materia aquí descrita proporciona neuronas dopaminérgicas recombinantes y/o progenitores recombinantes de las mismas. La presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* de producción de neuronas dopaminérgicas recombinantes, tal como se expone en las reivindicaciones.

[0100] En algunas realizaciones de la materia descrita, las neuronas dopaminérgicas recombinantes se producen mediante la transformación de una célula capaz de diferenciarse en una neurona dopaminérgica con un ácido nucleico (por ejemplo, uno o más transgenes, opcionalmente presentes en un casete de expresión, además opcionalmente presentes en un vector de expresión) que codifica y/o activa transcripcionalmente uno o más polipéptidos que son capaces de inducir la diferenciación de una célula progenitora en una neurona dopaminérgica (por ejemplo, un "agente de cebado de linaje" tal como se define aquí). Tal como se utiliza en el presente documento, la frase "un ácido nucleico que activa transcripcionalmente" se refiere a secuencia de ácido nucleico que cuando se inserta en una célula causa la transcripción de un gen de interés (en algunas realizaciones, un gen endógeno de interés) en la célula que se transcribe a un nivel superior al que habría ocurrido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor que es transcripcionalmente activo en una célula puede introducirse en la célula en condiciones suficientes para integrar de manera homóloga el promotor en una posición en un cromosoma que une operativamente una secuencia de codificación de interés al promotor, lo que provoca que la secuencia de codificación de interés se exprese en la célula. En algunas realizaciones, una célula capaz de diferenciarse en una neurona dopaminérgica comprende una célula madre derivada de epitelial olfativo/NSFC, que puede ser, opcionalmente, una célula madre derivada de epitelial olfativo/NSFC humana o una célula madre derivada de epitelial olfativo/NSFC humana adulta.

[0101] El término "transformación" y las variantes gramaticales del mismo se refieren a cualquier alteración en la expresión de genes que da lugar a un cambio fenotípico a una célula. Ejemplos de transformación incluyen el aumento o disminución de la expresión de un gen endógeno mediante la incorporación de agentes de cebado de linaje en el interior de las células (por ejemplo, proporcionando a las células transgenes que codifican agentes de cebado de linaje) o por contacto de las células con agentes linaje de cebado.

[0102] El término "exógeno" se refiere a cualquier cosa que se expone a una célula o se introduce en una célula que se origina desde el exterior de la célula. Un ejemplo de una secuencia de ácido nucleico exógeno es un transgén. Se observa que un ácido nucleico puede ser considerado "exógeno" si está siendo suministrado a una célula en forma recombinante, a pesar de que la propia célula podría tener una copia endógena de ese ácido nucleico. Por ejemplo, las células humanas (por ejemplo, NSFC humanas) comprenden secuencia de nurr-1 endógena humana y pueden producir endógenamente un polipéptido nurr-1 humano. Sin embargo, un transgén de nurr-1 humano que se transfecta en una NSFC humana se consideraría un ácido nucleico exógeno, ya que se suministra a la NSFC exógenamente en forma recombinante. Del mismo modo, también se consideraría que las células hijas de una NSFC transfectada que llevan un transgén de nurr-1 (es decir, un ácido nucleico de nurr-1 exógeno) comprenden secuencias de nurr-1 exógenas a pesar del hecho de que la propia célula hija no se transfectó con un ácido nucleico exógeno.

[0103] Por el contrario, el término "endógeno" se refiere a una molécula (por ejemplo, un polipéptido, molécula pequeña, etc.) que existe naturalmente en una célula o se produce naturalmente dentro de una célula que no sea por la transcripción y/o traducción de un ácido nucleico exógeno. Como tal, en algunas realizaciones, los términos "endógeno" y "exógeno" son antónimos.

[0104] La frase "agente de cebado de linaje" se refiere a cualquier composición que es capaz de cebar el linaje. Por ejemplo, una proteína de cebado de linaje es una proteína que solo o con otros agentes es capaz de cebar el linaje. Otros ejemplos de agentes de cebado de linaje incluyen secuencias de genes exógenos, incluyendo las secuencias de codificación, tales como marcos de lectura abiertos que codifican una proteína, y secuencias no codificantes, tales como elementos promotores y potenciadores de la transcripción que pueden aumentar la expresión de genes endógenos después de la recombinación de tales secuencias en las células; ácidos nucleicos; y moléculas pequeñas, tales como moléculas orgánicas que tienen una masa inferior a 1.000 daltons, y mezclas de los mismos.

[0105] En algunas realizaciones, un agente de cebado de linaje comprende una secuencia codificante de un gen que cuando se expresa en una célula progenitora sola o en combinación con otros agentes de cebado de linaje induce la diferenciación de la célula progenitora en una neurona dopaminérgica. Los siguientes genes y los productos codificados por ellos, incluyendo el ADN, ARN y proteínas, son agentes de cebado de linaje dopaminérgico, y pueden proceder de cualquier organismo vertebrado, incluyendo el ser humano, mono, ratón, perro, pollo, rana, bovino, equino, ovino y cerdo: sonic hedgehog (Shh), nurr-1, pitx3, y lmx1a. La frase "agente de cebado de linaje" incluye cada uno de estos genes, variantes de los mismos, y mezclas de los mismos. Biosecuencias representativas de homólogos y ortólogos correspondientes a estos productos génicos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1

Nos. de acceso GENBANK® de agente de cebado de linaje de ejemplo			
Gen	Especie	Ácido nucleico	Aminoácido

nurr-1	<i>H. sapiens</i>	NM_006186	NP_006177
	<i>M. musculus</i>	NM_013613	NP_038641
	<i>R. norvegicus</i>	NM_019328	NP_062201
	<i>B. Taurus</i>	NM_001076208	NP_001069676
	<i>C. familiaris</i>	XM_535920	XP_535920
	<i>E. caballus</i>	XM_001490494	XP_001490544
pitx3	<i>H. sapiens</i>	NM_005029	NP_005020
	<i>M. musculus</i>	NM_008852	NP_032878
	<i>R. norvegicus</i>	NM_019247	NP_062120
	<i>B. Taurus</i>	XM_589431	XP_589431
	<i>C. familiaris</i>	XM_543986	XP_543986
	<i>E. caballus</i>	XM_001499135	XP_001499185
Imx1a	<i>H. sapiens</i>	NM_177398.2; NM_177399.2; NM_001033507	NP_796372; NP_796373; NP_001028679
	<i>M. musculus</i>	NM_033652	NP_387501
	<i>R. norvegicus</i>	NM_001105967	NP_001099437
	<i>B. Taurus</i>	XM_001789182	XP_001789234
	<i>C. familiaris</i>	XM_846259	XP_851352
	<i>E. caballus</i>	XM_001493329	XP_001493379
Shh	<i>H. sapiens</i>	NM_000193	NP_000184
	<i>M. musculus</i>	NM_009170	NP_033196
	<i>R. norvegicus</i>	NM_017221	NP_058917
	<i>C. familiaris</i>	XM_856335	XP_861428
	<i>E. caballus</i>	XM_001914885	XP_001914920

**[0106]** El término "ácido retinoico" se refiere a ácido retinoico en sí mismo y cualquier derivado del mismo que puede actuar como un agente de cebado de linaje. Los derivados de ácido retinoico de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, la vitamina A, ácido retinoico todo-trans, y derivados éster y éter de los mismos.

5 **[0107]** El término "forskolina" se refiere al compuesto de forskolina (nombre IUPAC acetato de (3R,4aR,5S,6S,6aS,10S,10aR,10bS)-6,10,10b-trihidroxi-3,4a,7,7,10a-pentametil-1-oxo-3-vinildodecahidro-1H-benzo[f]cromen-5-ilo), tal como el obtenido a partir de *Coleus forskohlii*, y cualquier derivado del mismo que puede actuar como un agente de cebado de linaje. Otros inhibidores de la fosfodiesterasa, además de forskolina, se pueden emplear también como agentes de cebado de linaje, incluyendo, pero no limitado a, papaverina, vinpocetina, nitroprusiato de sodio, milrinona, rolipram, zaprinast y el dipiridamol. También pueden utilizarse otros agentes que aumentan los niveles de AMPc intracelular.

15 **[0108]** Como tal, en algunas realizaciones, una neurona dopaminérgica recombinante y/o un progenitor recombinante de la misma comprende uno o más transgenes que codifican un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido Imx1a, un fragmento biológicamente activo de los mismos, un derivado biológicamente activo de los mismos, y/o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, una neurona dopaminérgica recombinante y/o un progenitor recombinante de la misma comprende un único transgén que codifica dos o más de un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido Imx1a, un fragmento biológicamente activo de los mismos, un derivado biológicamente activo de los mismos, y/o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, una neurona dopaminérgica recombinante o un progenitor recombinante de los mismos comprende un único transgén que codifica un polipéptido nurr-1 y un polipéptido pitx3.

25 **[0109]** En algunas realizaciones, un único transgén que codifica múltiples polipéptidos lo hace mediante la codificación de proteínas de fusión y/o mediante la codificación de los polipéptidos en una unidad de transcripción compleja que se traduce diferencialmente para producir polipéptidos distintos. En algunas realizaciones, múltiples polipéptidos son codificados por un solo transgén mediante el empleo de una o más copias de una secuencia de nucleótidos conocida como "sitios de entrada de ribosoma interno (IRES)". El uso de secuencias IRES para codificar más de un polipéptido distinto en una sola unidad de transcripción se describe en Zhou et al., 1990 y en la patente de Estados Unidos N° 5.648.235.

35 **[0110]** En algunas realizaciones, un progenitor recombinante que puede diferenciarse en una neurona dopaminérgica recombinante comprende una célula cebada de linaje dopaminérgico. La frase "célula cebada de linaje dopaminérgico" se refiere a una célula que, en algunas realizaciones, tiene por lo menos cuatro de las siguientes características, incluyendo la característica (i); en algunas realizaciones, tiene al menos cinco de las siguientes características, incluyendo la característica (i); en algunas realizaciones, tiene al menos seis de las siguientes características, incluyendo la característica (i); en algunas realizaciones, tiene al menos siete de las siguientes características, incluyendo característica (i); y en algunas realizaciones, tiene todas las características siguientes:

40 (i) expresa TH;

- (ii) expresar la dopamina;
  - (iii) expresa el neurofilamento 68 (NF68);
  - (iv) expresa el neurofilamento 160 (NF160);
  - (v) expresa el neurofilamento 200 (NF200);
  - 5 (vi) expresa NeuN;
  - (vii) expresa Isl 1 y/o Isl 2 (Isl 1/2);
  - (viii) no expresa VAcHT o expresa YAcHT en una cantidad de que es indetectable o por debajo de la expresada en células neuronales negativas en TH;
  - 10 (ix) no expresa ChAT o expresa ChAT en una cantidad de que es indetectable o por debajo de la expresada en células neuronales negativas en TH;
  - (x) no expresa GFAP o expresa una cantidad de GFAP que es indetectable o por debajo de la expresada en astrocitos;
  - (xi) no expresa GalC o expresa una cantidad de GalC que es indetectable o por debajo de la expresada en células de oligodendrocitos;
  - 15 (xii) no expresa MBP o expresa una cantidad de MBP que es indetectable o por debajo de la expresada en células de oligodendrocitos; y
  - (xiii) no expresa OX42 o expresa una cantidad de OX42 que es indetectable o por debajo de la expresada en células de la microglía.
- Las células cebadas de linaje dopaminérgico no tienen por qué tener todas las características antes mencionadas, pero tendrán al menos cuatro de estas características simultáneamente, incluyendo en algunas realizaciones, la característica (i).

25 **[0111]** La presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para la producción de una neurona dopaminérgica recombinante, tal como se expone en las reivindicaciones. El procedimiento comprende: (a) proporcionar células madre derivadas de epitelio olfativo adulto (en algunas realizaciones, células madre derivadas de epitelio olfativo humano); (b) introducir uno o más transgenes en células madre derivadas del epitelio olfativo adulto, en el que dichos uno o más transgenes codifican una combinación de un polipéptido nurr-1 y un polipéptido pitx3, mediante lo cual se produce una neurona dopaminérgica recombinante; y que comprende además opcionalmente (c) cultivar las células madre derivadas de epitelio olfativo adulto antes, durante y/o después de la etapa de introducción en un medio que comprende un polipéptido Sonic hedgehog (Shh), un fragmento biológicamente activo del mismo, ácido retinoico (RA) o un derivado biológicamente activo del mismo, forskolina (FN) o un derivado biológicamente activo de la misma, o cualquier combinación de los mismos, en condiciones suficientes para inducir la diferenciación neuronal en las células madre derivadas del epitelio olfativo. En algunas realizaciones, las células madre derivadas de epitelio olfativo adulto son células madre derivadas de epitelio olfativo de adulto humano y al menos uno del polipéptido nurr-1, el polipéptido pitx3, el polipéptido lmx1a o la combinación de los mismos se deriva de una especie distinta de la humana. En algunas realizaciones, el polipéptido pitx3 es un polipéptido pitx de rata. En algunas realizaciones, el polipéptido lmx1a es un polipéptido lmx1a de ratón. En algunas realizaciones, el polipéptido nurr-1 es un polipéptido nurr-1 de ratón.

40 **[0112]** Como tal, la materia aquí descrita también proporciona procedimientos para producir células cebadas de linaje. La frase "especificación de linaje restringido" se refiere al compromiso de una célula progenitora para formar un tipo de células no progenitoras.

45 **[0113]** El cebado de linaje de NSFC con condiciones de medios de cultivo convencionales, tales como suero bovino fetal al 10%, se produce con una eficacia de menos del 1%. En cambio, la eficacia del cebado de linaje de NSFC con los agentes de cebado de linaje descritos en la materia aquí descrita es de al menos 1%. En algunas realizaciones, la eficacia del cebado de linaje de NSFC es de al menos 5%. En algunas realizaciones, la eficacia del cebado de linaje es de al menos el 10%. En algunas realizaciones, la eficacia del cebado de linaje se encuentra dentro del intervalo de 5% a 95%, incluyendo 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75% y 90%. La eficacia del cebado de linaje se puede determinar de varias maneras, incluyendo el uso de análisis inmunocitoquímico para determinar la proparte de células cebadas de linaje de un tipo particular formado en una población de NSFC tratadas con un agente de cebado de linaje.

55 **[0114]** El cebado de linaje de NSFC puede dar lugar a poblaciones de células mixtas que contienen tanto NSFC como uno o más diferentes tipos de células cebadas del linaje. Por ejemplo, las NSFC, células cebadas de linaje motoneuronal, y células cebadas de linaje dopaminérgico están presentes después del tratamiento de los cultivos de NSFC con 1  $\mu$ M de RA en combinación con 5  $\mu$ M de FN y 15 nM de Shh durante siete días. Cada una de estas poblaciones de células muestra marcadores específicos sobre las superficies de las células que distinguen los tipos de células de cebado de linaje entre sí y de NSFC, y esta característica se puede utilizar en un procedimiento para seleccionar poblaciones de células homogéneas de un tipo particular. Uno de tales procedimientos es el uso de un anticuerpo que reconoce como antígeno un marcador específico de células cebadas del linaje que no se expresa en otras células cebadas de linaje cebado de un tipo diferente o en NSFC. El anticuerpo puede inmovilizarse sobre una matriz sólida, tal como una resina o microesfera (por ejemplo, una microesfera magnética), y se utiliza para unir células que contienen antígeno de un tipo particular (por ejemplo, NSFC o poblaciones de células cebadas de linaje específico). Las células cebadas de linaje que carecen del antígeno se separan de las células cebadas de linaje que contienen antígeno mediante la recuperación de la matriz sólida que contiene las células unidas a anticuerpo y

separar por lavado las células no unidas. Las células cebadas de linaje dopaminérgico, por ejemplo, se pueden seleccionar de una población mezclada que contiene NSFC, así como células de cebado de linaje motoneuronal y dopaminérgico utilizando un anticuerpo específico para un antígeno expresado específicamente por las células cebadas de linaje dopaminérgico (por ejemplo, TH). Estas técnicas se pueden adaptar para seleccionar NSFC procedentes de los cultivos originales que contienen epitelio olfativo y recuperar NSFC después de un tratamiento de cebado de linaje. Ejemplos de tales técnicas de selección se describen por Othman et al. 2005 (a) y Othman et al. 2005 (b).

**[0115]** La frase "cebado de linaje" se refiere a cualquier acción que induce a una célula progenitora a someterse a la especificación de linaje restringido.

**[0116]** La frase "células cebadas de linaje" se refiere a células que se originan de una célula progenitora como resultado de cebado del linaje.

**[0117]** El término "eficacia" se refiere a la proparte de células no progenitoras formadas a partir de células progenitoras como resultado del cebado de linaje. Un ejemplo de un procedimiento para determinar la eficacia del cebado de linaje es utilizar inmunohistoquímica para visualizar un marcador asociado con sólo una célula no progenitora y para contar el número de células que tienen ese marcador y el número de células totales en la población representativa. La eficacia, expresada como un porcentaje, sería la proparte de células que tienen el marcador con respecto a la población total de células, multiplicado por cien.

**[0118]** Un "mecanismo de linaje restringido a las células" se refiere a estados celulares de células no progenitoras que pertenecen a un mecanismo común de especificación que puede conducir a una célula terminalmente diferenciada.

**[0119]** En algunas realizaciones, los procedimientos para producir células cebadas de linaje por tanto comprenden (a) cultivar la célula madre derivada de epitelio olfativo (en algunas realizaciones, una célula madre derivada de epitelio olfativo de origen humano y en algunas realizaciones una célula madre derivada de epitelio olfativo humano adulto) en un medio que comprende un polipéptido de Sonic hedgehog (Shh), un fragmento biológicamente activo del mismo, un derivado del mismo, ácido retinoico (RA) o un derivado biológicamente activo del mismo, forskolina (FN) o un derivado biológicamente activo del mismo, o cualquier combinación de los mismos, en condiciones suficientes para inducir la diferenciación neuronal en las células madre derivadas del epitelio olfativo; y (b) expresar en la célula madre derivada de epitelio olfativo recombinante uno o más transgenes que codifican un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un fragmento biológicamente activo del mismo, un derivado biológicamente activo del mismo, y/o cualquier combinación de los mismos, mediante lo cual se produce una célula cebada de linaje que comprende una neurona dopaminérgica recombinante o progenitor recombinante de la misma. En algunas realizaciones, dicho uno o más del polipéptido nurr-1, el polipéptido pitx3, el polipéptido lmx1a, el fragmento biológicamente activo de los mismos, el derivado biológicamente activo de los mismos, y/o la combinación de los mismos codificados por dicho uno o más transgenes comprenden un ortólogo de ratón, un ortólogo de rata, y/o un ortólogo humano, un fragmento biológicamente activo de los mismos, un derivado biológicamente activo de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

**[0120]** Por tanto, el cebado de linaje de NSFC a lo largo de los mecanismos de linaje restringido a células neuronales se puede emplear para producir varios tipos de células del SNC no progenitoras, incluyendo las células cebadas de linaje dopaminérgico o células cebadas de linaje motoneuronal. Las combinaciones de agentes de cebado de linaje se puede utilizar para el cebado de linaje de las cultivos de NSFC e incluyen los siguientes regímenes robustos: (1) incubación de NSFC en medio que contiene RA en combinación con FN y/o Shh; y (2) expresión dirigida de un producto génico de nurr-1 gen, un producto génico de pitx3, y/o un producto génico de lmx1a, en transfectantes de NSFC. Estos regímenes tienen utilidad en el establecimiento de tipos de células del sistema nervioso central que tienen un fenotipo morfológico y de linaje restringido. Tales materiales celulares son útiles para las estrategias de terapia de reemplazo celular para pacientes que sufren de enfermedades degenerativas del SNC.

**[0121]** Las células de la materia aquí descrita se pueden utilizar para la fabricación de compuestos farmacéuticamente útiles, tales como dopamina u otros neurotransmisores producidos por neuronas sanas. En algunas realizaciones, una NSFC per se produce uno o más compuestos farmacéuticamente útiles, tales como, pero no limitado a, NGF, BDNF, NT3, NT4/5, y/o VEGF. Alternativamente, o además, mediante el direccionamiento de una célula de la materia aquí descrita aguas debajo de un mecanismo de diferenciación que conduce a la formación de neuronas, un cultivo de células únicas compuestas de neuronas diferenciadas derivadas de la célula madre de la materia aquí descrita puede proporcionar grandes poblaciones de células, capaces de la producción de grandes cantidades de compuestos farmacéuticamente útiles, tales como la dopamina. Además, muchos factores de crecimiento, incluyendo al menos NGF, BDNF, NT3, y NT4/5, se pueden utilizar para inducir las células aquí descritas para someterse a la diferenciación adicional.

**[0122]** Se pueden utilizar segundos mensajeros, tales como AMPc, para mediar en la interacción entre los

receptores de factores de crecimiento de la célula madre diferenciante y los propios factores de crecimiento. Por ejemplo, la exposición de subcultivos de neuroesferas a los medios que contienen 2,5 mM de dibutilil AMPc disminuye drásticamente la actividad mitótica y aumenta los niveles de  $\alpha$ -internexina, un marcador neuronal (filamento intermedio) que aparece antes de la formación de neurofilamentos en el desarrollo de las neuronas.

**[0123]** Además, las células de la materia aquí descrita pueden manipularse para expresar transgenes que codifican productos útiles. Una ventaja de la ingeniería de las células de la materia aquí descrita, ya sean diferenciadas o no, es la posibilidad de producir polipéptidos, tales como polipéptidos neuronales o polipéptidos específicos de células madre, que se procesan de manera que estarían en su contexto nativo y de este modo se pueden cultivar en grandes cantidades. Otra ventaja incluye la ingeniería de dichas células antes del trasplante a un sujeto de tal manera que se expresa una molécula terapéuticamente útil. Por ejemplo, un paciente que sufre de la enfermedad de Parkinson puede tener células del epitelio olfativo recogidas para aislar las células madre de la materia aquí descrita, pero podrían no expresar suficiente dopamina para tratar la enfermedad de Parkinson. Por lo tanto, tales células pueden modificarse genéticamente con un gen de dopamina de tipo salvaje (ya sea operativamente ligado a los promotores endógenos de dopamina o a un promotor exógeno, dependiendo de la regulación y la cantidad de secreción que se desee) antes de la implantación. En algunas realizaciones, las células madre derivadas del epitelio olfativo son autólogas, lo que significa que se recogieron de la paciente o el paciente y/o de otra fuente autóloga.

IV. Procedimientos y composiciones para el tratamiento utilizando subpoblaciones de células madre derivadas de epitelio olfativo

**[0124]** Las células de la materia aquí descrita se pueden usar además para formar, reformar, y/o rescatar estructuras del sistema nervioso central dañadas o que funcionan mal, tales como axones y/o para estimular el nuevo crecimiento de los axones existentes. Por ejemplo, las células pueden diferenciarse, y las células envainadas resultantes se pueden seleccionar y trasplantar para reparar el daño neurológico.

**[0125]** La diferenciación de células madre puede dirigirse para dar lugar a un tipo particular de célula hija que surge de la célula madre parental. Por ejemplo, cuando la célula madre se expone a dibutilil AMPc durante 24 horas, se diferencia entre un progenitor que contiene un precursor de neurofilamentos.

**[0126]** Además, en el cultivo, al menos una parte de las células se diferencian de forma espontánea y se pueden seleccionar. La congelación se puede utilizar para almacenar las células diferenciadas hasta que sean suficientes para recogerse para un trasplante eficaz. Por lo tanto, mediante la inducción de la célula madre de la materia aquí descrita para formar un tipo de célula deseado, y la inyección de esta célula diferenciada en el lugar de la lesión, se pueden tratar las estructuras del sistema nervioso central.

IV.A Trasplante

**[0127]** Por lo tanto, la materia aquí descrita proporciona también procedimientos para el trasplante que comprende trasplantar en un sujeto una célula madre derivada de epitelio olfativo cebada de linaje dopaminérgico (en algunas realizaciones, una célula madre derivada de epitelio olfativo humano, y en algunas realizaciones, célula madre derivada de epitelio olfativo humano adulto) o un progenitor de la misma, en el que la célula madre derivada de epitelio olfativo cebada de linaje dopaminérgico expresa uno o más transgenes que (a) codifican uno o más de un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un fragmento biológicamente activo de los mismos, y un derivado biológicamente activo de los mismos; y/o (b) comprenden un promotor que es transcripcionalmente activo en la neurona dopaminérgica o un progenitor de la misma que está operativamente ligada a una secuencia codificante que codifica el polipéptido nurr-1, el polipéptido pitx3, el polipéptido lmx1a, o el fragmento biológicamente activo o derivado de los mismos, y además en el que el cebado de linaje tiene una eficacia de al menos el 1%. En algunas realizaciones, el cebado de linaje tiene una eficacia de al menos 5%, 10%, 15%, 20%, o más. En algunas realizaciones, el cebado de linaje comprende (a) proporcionar una célula madre derivada de epitelio olfativo (en algunas realizaciones, una célula madre derivada de epitelio olfativo humano, y en algunas realizaciones una célula madre derivada de epitelio olfativo humano adulto), opcionalmente una pluralidad de células madre derivadas del epitelio olfativo, además opcionalmente en forma de una o más neuroesferas; (b) introducir en la célula madre derivada de epitelio olfativo uno o más transgenes que codifican un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un fragmento biológicamente activo de los mismos, un derivado biológicamente activo de los mismos, y/o cualquier combinación de los mismos; y (c) cultivar la célula madre derivada de epitelio olfativo antes, durante y/o después de la etapa de introducción en un medio que comprende un polipéptido Sonic hedgehog (Shh), un fragmento biológicamente activo del mismo, un derivado del mismo, ácido retinoico (RA) o un derivado biológicamente activo del mismo, forskolina (FN) o un derivado biológicamente activo de la misma, o cualquier combinación de los mismos, en condiciones suficientes para inducir la diferenciación neuronal en la célula madre derivada de epitelio olfativo. En algunas realizaciones, las condiciones suficientes para inducir la diferenciación neuronal comprende cultivar la célula madre derivada de epitelio olfativo en un medio de cultivo que comprende aproximadamente 1  $\mu$ M de ácido retinoico, aproximadamente 5  $\mu$ M de forskolina, y aproximadamente 15 nM de Sonic hedgehog durante al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, o 7 días. En algunas realizaciones, la etapa de cultivo produce una neurona dopaminérgica o un progenitor recombinante de la misma que expresa un producto génico endógeno de tirosina hidroxilasa (TH), produce dopamina, segrega

dopamina, o combinaciones de los mismos.

IV.B Procedimientos para aliviar los síntomas asociados con trastornos neurológicos

5 **[0128]** La materia aquí descrita proporciona también procedimientos para mejorar al menos un síntoma asociado con un trastorno neurológico en un sujeto. Tal como se usa en el presente documento, la frase "síntoma asociado con un trastorno neurológico en un sujeto" se refiere a cualquier síntoma que existe en un sujeto que tiene un trastorno neurológico que resulta directa o indirectamente de un funcionamiento anormal o subóptimo del sistema nervioso del sujeto. En algunas realizaciones, el síntoma asociado con un trastorno neurológico en un sujeto resulta del daño a uno o más tipos de células del sistema nervioso del sujeto causado por un defecto genético en el sujeto, una lesión aguda al sujeto, y/o exposición del sujeto a una o más agresiones ambientales.

15 **[0129]** En algunas realizaciones, los procedimientos que proporcionan una neurona dopaminérgica que expresa uno o más de un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un fragmento biológicamente activo o derivado del mismo o un progenitor de la misma, y se transplantan de la neurona dopaminérgica recombinante o el progenitor de la misma en el sujeto, opcionalmente en la sustancia negra del sujeto. En algunas realizaciones, el trastorno neurológico es la enfermedad de Parkinson.

20 **[0130]** En algunas realizaciones, la neurona dopaminérgica recombinante trasplantada o progenitor de la misma (en algunas realizaciones, un progenitor recombinante de la misma) induce el crecimiento y/o regeneración de una o más células madre y/o neuronas endógenas en el sujeto. Tal como se utiliza en el presente documento, la frase "crecimiento y/o regeneración de una o más células madre y/o neuronas endógenas en el sujeto" se refiere al crecimiento y o regeneración de una de las propias células madre y/o neuronas del sujeto (es decir, una célula madre y/o neurona no recombinante que ya está presente en el sujeto cuando la neurona dopaminérgica recombinante o el progenitor recombinante se trasplanta en el sujeto). Aunque no se desea estar limitado a ninguna teoría particular de operación, las neuronas dopaminérgicas recombinantes o progenitores recombinantes de las mismas de la materia aquí descrita secretan varios factores neurotróficos que pueden ayudar en el crecimiento, la reparación y/o regeneración de las propias neuronas del sujeto actuando sobre las neuronas y/o progenitores endógenos de las mismas.

30 IV.C Procedimientos para inducir el crecimiento y/o regeneración de las neuronas

35 **[0131]** La materia aquí descrita también proporciona procedimientos para inducir el crecimiento y/o regeneración de una neurona en un sujeto. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden trasplantar una pluralidad de células madre derivadas de epitelio olfativo y/o derivados diferenciados de las mismas en el sujeto en un lugar y en un número suficiente para inducir el crecimiento y/o regeneración de una neurona en el sujeto. Las células madre derivadas del epitelio olfativo (en algunas realizaciones, células madre derivadas de epitelio olfativo humano, y en algunas realizaciones, células madre derivadas de epitelio olfativo humano adulto) y/o los derivados diferenciados de las mismas se pueden trasplantar en cualquier tejido diana. En algunas realizaciones, las células madre derivadas del epitelio olfativo y/o derivados diferenciados de las mismas se trasplantan en un sitio del sistema nervioso central en el sujeto, incluyendo, pero no limitado a, la sustancia negra. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un trastorno neurológico asociado con la pérdida de las neuronas dopaminérgicas, opcionalmente en el que el trastorno neurológico es la enfermedad de Parkinson.

45 **[0132]** Los procedimientos aquí descritos en la presente también pueden incluir una etapa de diferenciación de la célula madre derivada de epitelio olfativo *in vitro* antes del trasplante mediante la expresión en la célula madre derivada de epitelio olfativo de uno o más transgenes que codifican un agente de cebado de linaje, incluyendo, pero no limitado a, un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un polipéptido lmx1a, un fragmento biológicamente activo de los mismos, un derivado biológicamente activo de los mismos, y/o cualquier combinación de los mismos. Un listado de los ortólogos de mamífero para estos agentes de cebado de linaje se presenta en la Tabla 1. En algunas realizaciones, el polipéptido nurr-1, el polipéptido pitx3, y/o el polipéptido lmx1a son un ortólogo humano de los mismos. En algunas realizaciones, el trasplante proporciona a la neurona una cantidad eficaz de un factor neurotrófico (por ejemplo, BDNF, NGF, CTNF, NT-3, NT-4, o VEGF) suficiente para causar que la neurona crezca y/o se regenere.

55 IV.D Procedimientos para la liberación de factores neurotróficos a sujetos

60 **[0133]** La materia aquí descrita proporciona también procedimientos para liberar un factor neurotrófico a un sujeto, incluyendo, pero no limitado a, la liberación del factor neurotrófico directamente al sistema nervioso central del sujeto y evitando así la barrera hematoencefálica.

65 **[0134]** A modo de ejemplo y sin limitación, los procedimientos aquí descritos pueden comprender la liberación de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) al sistema nervioso central de un sujeto. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden trasplantar en el sujeto una célula madre derivada de epitelio olfativo o un derivado diferenciado de la misma, en el que el trasplante es en un sitio del sistema nervioso central en el sujeto. Como se describe en el presente documento, las células madre derivadas del epitelio olfativo y derivados diferenciados de las

mismas producen y secretan diversos factores neurotróficos, incluyendo, pero no limitado a, BDNF.

[0135] La disposición de dichos factores neurotróficos puede ayudar en la restauración de un déficit funcional en el sujeto. Por ejemplo, se conoce que las lesiones neurológicas dan lugar a déficits funcionales, y la materia aquí descrita puede emplearse para mejorar los déficits funcionales que resultan de este tipo de lesiones.

IV. E. Procedimientos para proporcionar neuronas dopaminérgicas a sujetos

[0136] La materia aquí descrita proporciona también procedimientos para proporcionar una función de neurona dopaminérgica a un sujeto en necesidad del mismo. Tal como se utiliza aquí, la frase "una función de neurona dopaminérgica" se refiere a cualquier función normalmente proporcionada por las neuronas dopaminérgicas en un sujeto. Una función de neurona dopaminérgica de ejemplo es la producción y liberación de dopamina. En algunas realizaciones, la función de neurona dopaminérgica es una función normalmente proporcionada por neuronas dopaminérgicas en un sujeto humano.

[0137] En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden la introducción de una pluralidad de células madre derivadas del epitelio olfativo y/o derivados diferenciados *in vitro* de las mismas en el cerebro medio del sujeto en un número y en condiciones suficientes para permitir que al menos una de la pluralidad de células madre derivadas del epitelio olfativo (en algunas realizaciones, células madre derivadas de epitelio olfativo humano, y en algunas realizaciones, células madre derivadas de epitelio olfativo humano adulto) se diferencie en una neurona dopaminérgica funcional, proporcionando de este modo una función de neuronas dopaminérgicas a un sujeto. Alternativamente, o adicionalmente, los derivados diferenciados *in vitro* se pueden diferenciar mediante la expresión en al menos una célula madre derivada de epitelio olfativo de uno o más transgenes que codifican un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3, un lmx1a polipéptido, un fragmento biológicamente activo de los mismos, un derivado biológicamente activo de los mismos, y/o cualquier combinación de los mismos, y/o mediante la exposición de al menos una célula madre derivada de epitelio olfativo a un factor neurotrófico que induce la diferenciación de la célula madre derivada de epitelio olfativo a una neurona dopaminérgica y/o que ceba la célula madre derivada de epitelio olfativo para diferenciarse en una neurona dopaminérgica.

[0138] En los procedimientos aquí descritos, es posible que las células madre derivadas del epitelio olfativo introducidas y/o derivados diferenciados *in vitro* de las mismas se diferencian a sí mismas en neuronas dopaminérgicas y/o induzcan las propias células del sujeto (es decir, endógenas al sujeto) a diferenciarse en neuronas dopaminérgicas. Como tal, en algunas realizaciones, las células madre derivadas del epitelio olfativo introducidas y/o derivados diferenciados de las mismas *in vitro* se diferencian terminalmente en una o más neuronas dopaminérgicas funcionales en el sujeto. Alternativamente, o adicionalmente, la introducción puede inducir una o más células endógenas en el sujeto a diferenciarse en una o más neuronas dopaminérgicas funcionales, puede inducir la reparación de una neurona dopaminérgica endógena no funcional o subóptimamente funcional o un precursor de la misma en el sujeto, y/o puede rescatar una neurona dopaminérgica y/o un precursor de la misma de la inactivación y/o muerte que habría experimentado en ausencia de la pluralidad introducida de células madre derivadas del epitelio olfativo y/o derivados diferenciados *in vitro* de las mismas.

IV.F. Sujetos

[0139] En algunas realizaciones, la materia aquí descrita pretende emplearse en un sujeto. El término "sujeto" como se usa aquí se refiere a un miembro de cualquier especie de invertebrado o vertebrado. En consecuencia, el término "sujeto" pretende abarcar cualquier miembro del reino animal incluyendo, pero no limitado a, el filo Chordata (es decir, los miembros de las clases Osteichthyes (peces óseos), Amphibia (anfibios), Reptilia (reptiles), Aves (aves), y Mammalia (mamíferos)), y todas las órdenes y familias comprendidas en los mismos. En algunas realizaciones, un sujeto es un mamífero, y en algunas realizaciones un sujeto es un humano.

[0140] Del mismo modo, todos los genes, los nombres de genes y productos génicos descritos en este documento pretenden corresponder a homólogos y ortólogos de cualquiera de las especies para las que son aplicables las composiciones y procedimientos descritos en este documento. Por lo tanto, los términos incluyen, pero no se limitan a, genes y productos genéticos de seres humanos y ratones. Se entiende que cuando se describe un gen o producto génico de una especie particular, esta descripción se pretende que sea a modo de ejemplo solamente, y no debe ser interpretado como una limitación a menos que el contexto en el que aparece lo indique claramente. De este modo, por ejemplo, por los genes aquí descritos, que en algunas realizaciones se refieren a secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos humanos por GENBANK® No. de Acceso, pretenden abarcar genes y productos génicos homólogos y ortólogos de otros animales, incluyendo, pero sin limitarse a, otros mamíferos, peces, anfibios, reptiles y aves.

[0141] Los procedimientos de la materia aquí descrita son particularmente útiles para los vertebrados de sangre caliente. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la materia aquí descrita se refiere a mamíferos y aves. Más en particular, se contempla el aislamiento, la manipulación y el uso de células madre derivadas del epitelio olfativo de mamíferos, tales como seres humanos y otros primates, así como aquellos mamíferos de importancia debido al peligro de extinción (tales como tigres siberianos), de importancia económica (animales criados en granjas para el

consumo humano) y/o de importancia social (animales mantenidos como mascotas o en zoológicos) para los seres humanos, por ejemplo, carnívoros no humanos (tales como gatos y perros), cerdos (cerdos, puercos y jabalíes), rumiantes (tales como vacas, bueyes, ovejas, jirafas, ciervos, cabras, bisontes y camellos), roedores (tales como ratones, ratas y conejos), marsupiales, y caballos. También se proporciona el uso de los procedimientos y composiciones descritos en las aves, incluyendo aquellos tipos de aves que están en peligro, de los parques zoológicos, así como aves, y más en particular aves domesticadas, por ejemplo, aves de corral, tales como pavos, pollos, patos, gansos, gallinas de Guinea, y similares, ya que son también de importancia económica para los humanos. Por lo tanto, el aislamiento, la manipulación y uso de células madre derivadas del epitelio olfativo de granja, incluyendo, pero no limitado a, cerdos domesticados (cerdos y puercos), rumiantes, caballos, aves de corral, y similares, también están abarcados por la materia aquí descrita.

#### IV.G. Formulaciones

**[0142]** Las composiciones de la materia aquí descrita comprenden, en algunas realizaciones, una composición que incluye un vehículo, particularmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como, pero no limitado a, un vehículo farmacéuticamente aceptable en seres humanos. Cualquier formulación farmacéutica adecuada se puede utilizar para preparar las composiciones para la administración a un sujeto.

**[0143]** Por ejemplo, las formulaciones adecuadas pueden incluir soluciones acuosas y no acuosas de inyección estéril que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, antibióticos bactericidas y solutos que hacen la formulación isotónica con los fluidos corporales del receptor previsto.

**[0144]** Debe entenderse que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de la materia aquí descrita pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica con respecto al tipo de formulación en cuestión. Por ejemplo, se pueden utilizar las soluciones acuosas y no acuosas estériles libres de pirógenos.

**[0145]** Los regímenes terapéuticos y composiciones de la materia aquí descrita se pueden utilizar con adyuvantes adicionales o modificadores de la respuesta biológica incluyendo, pero no limitado a, citoquinas y otros compuestos inmunomoduladores.

#### IV.H Administración

**[0146]** Las células madre aquí descritas pueden trasplantarse en un paciente que sufre de un trastorno neurológico, tal como una lesión neurológica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, o la esclerosis múltiple, como un procedimiento para tratar el trastorno (por ejemplo, mejorar al menos un síntoma asociado con el trastorno). Los procedimientos de trasplante incluyen la inyección de células transformadas o eficaces para el tratamiento de un trastorno neurológico, a través de una variedad de procedimientos, en el sitio de lesión o un sitio distante. Las células pueden diferenciarse parcial o completamente antes del trasplante.

**[0147]** Por lo tanto, los procedimientos adecuados para la administración de las células aquí descritas incluyen, pero no se limitan a, la liberación directamente en el tejido diana y la liberación a un sitio que permite que los factores neurotróficos producidos por las células de la materia aquí descrita alcancen el tejido diana. En algunas realizaciones, el procedimiento para la administración abarca características para la liberación regionalizada o acumulación de las células en el sitio en necesidad de tratamiento. En algunas realizaciones, las células se administran directamente en el tejido a tratar.

#### IV.I. Dosis

**[0148]** Una dosis eficaz de una composición de la materia aquí descrita se administra a un sujeto en necesidad de la misma. Una "cantidad efectiva del tratamiento" o una "cantidad terapéutica" es una cantidad de una composición terapéutica suficiente para producir una respuesta medible (por ejemplo, una respuesta biológica o clínicamente relevante en un sujeto que está siendo tratado). Los niveles de dosificación reales de las células en las composiciones de la materia aquí descrita se pueden variar con el fin de administrar una cantidad de una célula y/o un factor neurotrófico que sea eficaz para lograr la respuesta deseada biológica o clínicamente relevante para un sujeto particular. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de la actividad de la composición, la vía de administración, la combinación con otros fármacos o tratamientos, la gravedad de la afección a tratar, y la condición y el historial médico previo del sujeto a tratar. Sin embargo, está dentro de la experiencia de la técnica comenzar con dosis de las células a niveles inferiores a los requeridos para lograr la respuesta relevante biológica o clínicamente deseada y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logra la respuesta deseada. La potencia de una composición puede variar, y por lo tanto una "cantidad eficaz del tratamiento" puede variar. Sin embargo, un experto en la técnica puede evaluar fácilmente la potencia y la eficacia de un compuesto candidato de la materia aquí descrita y ajustar el régimen terapéutico en consecuencia.

**[0149]** Después de la revisión de la descripción de la materia aquí descrita presentada en el presente documento, un experto en la técnica puede adaptar la dosis a un sujeto individual, teniendo en cuenta la formulación particular, el



procedimiento de administración a utilizar con la composición, y la enfermedad particular tratada. Otros cálculos de las dosis pueden considerar la altura y peso del sujeto, la gravedad y la etapa de los síntomas, y la presencia de condiciones físicas nocivas adicionales. Dichos ajustes o variaciones, así como la evaluación de cuando y cómo hacer tales ajustes o variaciones, son bien conocidos por los expertos normales en la técnica de la medicina.

5

#### V. Ácidos Nucleicos y Polipéptidos

**[0150]** Un aspecto de la materia aquí descrita se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los productos génicos Sonic Hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a, o partes biológicamente activas de los mismos. También se incluyen en la materia aquí descrita fragmentos de ácido nucleico suficientes para usar como sondas de hibridación para identificar ácidos nucleicos que codifican Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a (por ejemplo, Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y mRNAs lmx1a) y fragmentos para usar como cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación y/o mutación de moléculas sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a. Una "molécula de ácido nucleico" incluye moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), análogos del ADN o ARN generados utilizando análogos de nucleótidos, y derivados, fragmentos, ortólogos y homólogos. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de doble cadena.

10

15

#### V.A. Sondas

**[0151]** Las sondas son secuencias de ácido nucleico de longitud variable (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 nucleótidos (nt), al menos aproximadamente 20 nt, al menos aproximadamente 50 nt, al menos aproximadamente 100 nt, o en algunas realizaciones 200 nt o más) dependiendo del uso específico previsto. Las sondas se pueden utilizar para detectar secuencias de ácidos nucleicos idénticas, similares o complementarias. Las sondas de mayor longitud se pueden obtener de una fuente natural o recombinante, son altamente específicas, y mucho más lentas para hibridarse que las sondas de oligómeros más cortos de longitud. Las sondas pueden ser de una sola o de doble cadena y diseñarse para tener especificidad en la PCR, tecnologías de hibridación basadas en membranas, o tecnologías de tipo ELISA. Las sondas pueden ser oligonucleótidos sustancialmente purificados que se hibridan en condiciones rigurosas con al menos 12, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 o 400 de la secuencia de nucleótidos de cadena sentido consecutivos de un producto génico Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1, o una secuencia de de nucleótidos de cadena anti-sentido de estas secuencias; o de un mutante de origen natural de estas secuencias.

20

25

30

**[0152]** La secuencia nativa de longitud completa o parcial, por ejemplo, se puede utilizar para identificar y aislar secuencias similares (homólogas y/o ortólogas) (Sambrook y Russell, 2001; Ausubel et al, 2002; Ausubel et al, 2003), tales como: (1) de longitud completa o fragmentos de un ADNc de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a de una biblioteca de ADNc de cualquier especie (por ejemplo, humano, murino, felino, canino, peces, aves, y rana), (2) de células o tejidos, (3) variantes dentro de una especie, y (4) homólogos y variantes de otras especies. Para encontrar secuencias relacionadas que pueden codificar genes relacionados, la sonda se puede diseñar para codificar secuencias únicas o secuencias degeneradas. Las secuencias también pueden ser secuencias genómicas que incluyen promotores, elementos potenciadores e intrones de secuencia nativa para productos génicos de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a.

35

40

**[0153]** Por ejemplo, una región codificante de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a en otra especie puede aislarse utilizando tales sondas. Puede diseñarse una sonda de aproximadamente 40 bases y producirse en base a una secuencia de nucleótidos de un producto génico de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a. Para detectar las hibridaciones, las sondas pueden marcarse usando, por ejemplo, radionúclidos tales como <sup>32</sup>P o <sup>35</sup>S, o marcadores enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina, acoplados a la sonda a través de sistemas de avidina-biotina. Las sondas marcadas se pueden utilizar para detectar ácidos nucleicos que tienen una secuencia complementaria a la de las secuencias génicas de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a en las bibliotecas de ADNc, ADN genómico o ARNm de una especie deseada.

45

50

#### V.B. Ácido nucleico aislado

**[0155]** Una molécula de ácido nucleico aislada que se puede separar de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico. En algunas realizaciones, un ácido nucleico aislado está libre de secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo a partir del cual se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los productos génicos de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a aislados pueden contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula/tejido de los que se deriva el ácido nucleico (por ejemplo, cerebro, corazón, hígado, bazo, etc.). Además, una molécula de ácido nucleico aislada, tal

60

65

como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

5 **[0156]** Las técnicas de amplificación de PCR se pueden usar para amplificar un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a usando ADNc, ARNm o alternativamente, ADN genómico, como plantilla y cebadores de oligonucleótidos apropiados. Tales ácidos nucleicos se pueden clonar en un vector apropiado y caracterizarse por análisis de secuencia de ADN. Además, los oligonucleótidos correspondientes a secuencias de los productos  
10 génicos de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a se pueden preparar por técnicas sintéticas estándar, por ejemplo, un sintetizador de ADN automatizado.

#### V.C. Oligonucleótidos

15 **[0157]** Un oligonucleótido comprende una serie de residuos de nucleótidos unidos, cuyo oligonucleótido tiene un número suficiente de bases de nucleótidos a utilizar en una reacción de PCR o en otra aplicación. Una secuencia de oligonucleótidos corta puede basarse en, o diseñarse a partir de, una secuencia genómica o de ADNc y se utiliza para amplificar, confirmar o revelar la presencia de un ADN o ARN idéntico, similar o complementario en una célula o tejido particular. Los oligonucleótidos comprenden partes de una secuencia de ácido nucleico que tienen  
20 aproximadamente 10 nt, 50 nt, o 100 nt de longitud, en algunas realizaciones, aproximadamente de 15 nt a 30 nt de longitud. En algunas realizaciones de la materia aquí descrita, un oligonucleótido que comprende una molécula de ácido nucleico de menos de 100 nt de longitud puede comprender además al menos 6 nucleótidos contiguos de un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a, o un complemento de los mismos. Los oligonucleótidos se pueden sintetizar químicamente y también pueden ser utilizados como sondas.

#### V.D. Secuencias de ácidos nucleicos complementarias: Unión

25 **[0158]** Una molécula de ácido nucleico aislada puede comprender una molécula de ácido nucleico que es un complemento de la secuencia de nucleótidos de un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a o una parte de dicha secuencia de nucleótidos (por ejemplo, un fragmento que puede utilizarse como sonda o cebador o un fragmento que codifica una parte biológicamente activa de un Olig2, HB9, Ngn2, SoxW, o NKX2.2). Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de un producto génico humano de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a es una que es suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno con pocos o ningún desapareamiento a la secuencia de nucleótidos deseada, formando así una doble cadena estable.  
35

**[0159]** Tal como se utiliza aquí, el término "complementario" se refiere al emparejamiento de bases Watson-Crick o Hoogsteen entre unidades de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico, y el término "unión" se refiere a la interacción física o química entre dos polipéptidos o compuestos o polipéptidos asociados o compuestos o combinaciones de los mismos. La unión incluye interacciones iónicas, no iónicas, de van der Waals, hidrófobas, y similares. Una interacción física puede ser directa o indirecta. Las interacciones indirectas pueden ser a través de o debido a los efectos de otro polipéptido o compuesto. La unión directa se refiere a interacciones que no tienen lugar a través de, o debido a, el efecto de otro polipéptido o compuesto, sino que son sin otros intermediarios químicos sustanciales.  
40

45 **[0160]** Los fragmentos de ácido nucleico son de al menos 6 ácidos nucleicos (contiguos), o de 4 aminoácidos (contiguos), una longitud suficiente para permitir la hibridación específica en el caso de ácidos nucleicos o para el reconocimiento específico de un epítipo en el caso de aminoácidos, respectivamente, y son a lo sumo una parte menos de una secuencia de longitud completa. Los fragmentos pueden ser derivados de cualquier parte contigua de una secuencia de ácido nucleico de aminoácidos de elección.  
50

#### V.E. Derivados y análogos

55 **[0161]** Los derivados son secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos formadas a partir de los compuestos nativos ya sea directamente o por modificación o sustitución parcial. Los análogos son secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos que tienen una estructura similar a, pero no idénticos a, el compuesto nativo pero difieren de él con respecto a ciertos componentes o cadenas laterales. Los análogos pueden ser sintéticos o de un origen evolutivo diferente y pueden tener una actividad metabólica similar u opuesta en comparación con el tipo salvaje. Los homólogos son secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos de un gen particular que se derivan de diferentes especies.  
60

**[0162]** Los derivados y análogos pueden ser de longitud completa o que no sean de longitud completa, si el derivado o análogo contiene un ácido nucleico o aminoácido modificado, tal como se describe a continuación. Los derivados o análogos de los ácidos nucleicos o proteínas incluyen moléculas que comprenden regiones que son sustancialmente homólogas a los ácidos nucleicos o proteínas de la materia aquí descrita, en algunas realizaciones, en al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad sobre una secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos de idéntico tamaño o cuando se compara con una secuencia alineada  
65

en la que la alineación se realiza mediante un programa de homología por ordenador conocido en la técnica, o cuyo ácido nucleico codificante es capaz de hibridarse con el complemento de una secuencia que codifica las proteínas mencionadas anteriormente en condiciones rigurosas, moderadamente rigurosas, o poco rigurosas (Ausubel et al, 2002; Ausubel et al. , 2003).

5

#### V.F. Homología

**[0163]** Una "secuencia homóloga de ácido nucleico" o "secuencia homóloga de aminoácidos", o variaciones de las mismas, se refieren a secuencias caracterizadas por una homología a nivel de nucleótidos o de aminoácidos como se indicó anteriormente. Las secuencias de nucleótidos homólogas codifican aquellas secuencias que codifican isoformas de productos génicos de Sonic Hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a. Las isoformas pueden expresarse en diferentes tejidos del mismo organismo como resultado de, por ejemplo, corte y empalme alternativo de ARN. Alternativamente, diferentes genes pueden codificar isoformas. Las secuencias de nucleótidos homólogas incluyen secuencias de nucleótidos que codifican un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a de especies distintas a los seres humanos, incluyendo vertebrados, y por lo tanto pueden incluir, por ejemplo, rana, ratón, rata, conejo, perro, gato, vaca, caballo, pescado, aves y otros organismos (también denominados en este documento como "ortólogos" y sus variantes gramaticales). Las secuencias de nucleótidos homólogas también incluyen, pero no se limitan a, variaciones alélicas y mutaciones de origen natural de las secuencias de nucleótidos establecidas en este documento. Una secuencia de nucleótidos homóloga no incluye, sin embargo, la secuencia de nucleótidos exacta que codifica un producto génico de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a. Las secuencias de ácido nucleico homólogas incluyen aquellas secuencias de ácido nucleico que codifican sustituciones de aminoácidos conservativas (véase más adelante) dentro de un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a, así como un polipéptido que posee una actividad biológica de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a como agente de cebado de linaje.

25

#### V.G. Marcos de lectura abierta

**[0164]** El marco de lectura abierto (ORF) de un producto génico sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a codifica un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a. Un ORF es una secuencia de nucleótidos que tiene un codón de inicio (ATG) y termina con un codón de "parada" (TAA, TAG o TGA). Con respecto a la materia aquí descrita, sin embargo, un ORF puede ser cualquier parte de una secuencia de codificación que comprende o no un codón de iniciación y un codón de parada. Para lograr una secuencia única, los ORF de ejemplo de un sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a codifican al menos 50 aminoácidos.

#### V.H. Polipéptidos

##### V.H.1. Maduros

**[0165]** Un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a puede codificar un polipéptido de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a maduro. Una forma "madura" de un polipéptido o proteína descrita en el presente documento es el producto de un polipéptido natural o forma precursora o proproteína. El polipéptido de origen natural, precursor o proproteína incluye, por ejemplo, el producto génico de longitud completa codificada por el gen correspondiente. Alternativamente, se puede definir como polipéptido, precursor o proproteína codificada por un marco de lectura abierto aquí descrito. La forma "madura" del producto surge, por ejemplo, como resultado de una o más etapas de procesamiento de origen natural, ya que pueden tener lugar dentro de la célula, o la célula huésped, en el que aparece el producto génico. Ejemplos de tales etapas de procesamiento que conducen a una forma "madura" de un polipéptido o proteína incluyen la escisión del residuo de metionina N-terminal codificado por el codón de iniciación de un marco de lectura abierto, o la escisión proteolítica de un péptido señal o secuencia líder.

**[0166]** Por lo tanto, una forma madura derivada de un polipéptido o una proteína precursora que tiene los residuos 1 a N, en donde el residuo 1 es la metionina N-terminal, tendría los residuos 2 al N restantes después de la eliminación de la metionina N-terminal. Como alternativa, una forma madura derivada de un polipéptido o proteína precursora que tiene los residuos 1 a N, en la que se escinde una secuencia señal N-terminal del residuo 1 al residuo M, tendría los residuos del residuo M + 1 hasta al residuo N restantes. Además, tal como se usa en este documento, una forma "madura" de un polipéptido o proteína puede derivar de la modificación post-traducciona diferente a un evento de escisión proteolítica. Tales procesos adicionales incluyen, por ejemplo, glicosilación, miristoilación o fosforilación. En general, un polipéptido o proteína madura pueden resultar de la operación de uno solo de estos procesos, o una combinación de cualquiera de ellos.

##### V.H.2. Activo

**[0167]** Un polipéptido de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a activo o un fragmento de polipéptido de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a activo retiene una actividad biológica y/o una actividad inmunológica similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad de cebado de linaje de un polipéptido de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a de origen natural (tipo salvaje) de la materia aquí descrita, incluyendo formas maduras. Un ensayo biológico particular, tal como el cebado de linaje, con o sin dependencia de la dosis, se puede utilizar para

65

determinar la actividad de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a. Se puede preparar un fragmento de ácido nucleico que codifica una parte biológicamente activa de un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a mediante aislamiento de una parte del gen correspondiente que codifica un polipéptido que tiene una actividad biológica del producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a que expresa la parte codificada del producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a (por ejemplo, por expresión recombinante *in vitro*) y la evaluación de la actividad de cebado de linaje de la parte codificada del producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a. La actividad inmunológica se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un producto génico nativo de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a; la actividad biológica se refiere a una función, inhibidora o estimuladora, causada por un producto génico nativo de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a que excluye la actividad inmunológica.

#### V.I. Variantes de ácido nucleico e hibridación

##### V.I.1. Variantes de polinucleótidos, genes y genes recombinantes

**[0168]** La materia aquí descrita abarca además moléculas de ácido nucleico que difieren de las secuencias de nucleótidos codificadas por los productos génicos de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a descritos en este documento debido a la degeneración del código genético, y por lo tanto codifican los mismos productos génicos de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a.

**[0169]** Además de las secuencias endógenas de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a, pueden existir polimorfismos de secuencia de ADN que cambian las secuencias de aminoácidos de los productos génicos de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a dentro de una población. Por ejemplo, la variación alélica entre individuos puede presentar polimorfismo genético en un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a. Los términos "gen" y "gen recombinante" se refieren a moléculas de ácido nucleico que comprende un marco de lectura abierto (ORF) que codifica un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a, en algunas realizaciones un producto génico de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a de vertebrado. Tales variaciones alélicas naturales pueden resultar habitualmente en una varianza del 1-5% en un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a. La presente descripción describe cualquiera y todas dichas variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes en un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a, que son el resultado de la variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional de un producto génico de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a.

**[0170]** Además, se contemplan los productos génicos de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a de otras especies que tienen una secuencia de nucleótidos que difiere de una secuencia como se describe en la Tabla 1. Las moléculas de ácido nucleico correspondientes a variantes alélicas naturales y homólogos de un ADNc de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a de la materia aquí descrita se pueden aislar basándose en su homología con un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a usando sondas derivadas de ADNc para hibridarse con secuencias homólogas y/u ortólogas de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a en condiciones rigurosas.

**[0171]** La frase "variante de polinucleótido de Sonic hedgehog, nurr-e, pitx3, y/o Imx1a" o "variante de secuencia de ácido nucleico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a" se refieren a moléculas de ácido nucleico que codifican los productos génicos activos de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a que (1) tienen una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 80% con una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico nativo de longitud completa de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a; (2) producto génico nativo de longitud completa de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a que carece del péptido señal; (3) los dominios extracelulares de los productos génicos de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a, con o sin el péptido señal; y/o (4) cualquier otro fragmento de productos génicos de longitud completa de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a. Ordinariamente, una variante de polinucleótido de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a comprende al menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia de ácido nucleico, al menos aproximadamente 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, de identidad de secuencia de ácido nucleico, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de polinucleótido nativo de longitud completa de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a. Dicho ácido nucleico puede codificar productos génicos nativos de longitud completa de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a que carecen del péptido señal, un dominio extracelular de un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a, con o sin la secuencia señal, o cualquier otro fragmento de un producto génico de longitud completa de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a.

**[0172]** En algunas realizaciones, una variante de polipéptido de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a tiene al menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, a menudo al menos aproximadamente 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 450, 600 nucleótidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 900 nucleótidos de longitud, o más.

**[0173]** La frase "porcentaje (%)" de identidad de secuencia de ácido nucleico" con respecto a las secuencias de ácido nucleico que codifican los productos génicos de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o Imx1a identificadas en este documento se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los

nucleótidos en la secuencia de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a de interés después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. La alineación con fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico puede conseguirse de diversas maneras que están dentro de la capacidad en la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan.

[0174] Cuando las secuencias de nucleótidos están alineadas, el porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico de una determinada secuencia de ácido nucleico C con respecto a, con, o contra una secuencia de ácido nucleico determinada D (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de ácido nucleico determinada C que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de ácido nucleico a, con, o contra una determinada secuencia de ácido nucleico D) se puede calcular de la siguiente manera: % de identidad de secuencia de ácido nucleico =  $(W/Z) \times 100$ , donde W es el número de nucleótidos con núcleo evaluados como correspondencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencia o el alineamiento de algoritmo de C y D, y Z es el número total de nucleótidos en D.

[0175] Cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de secuencia de ácido nucleico D, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de C a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D a C. En algunas realizaciones en el que una secuencia de referencia y de prueba se solapan, el porcentaje de identidad continúa sobre toda la longitud de una de las secuencias.

#### V.I.2. Rigurosidad

[0176] Las secuencias homólogas, ortólogas (es decir, ácidos nucleicos que codifican un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a derivado de especies distintas de la humana, por ejemplo), u otras secuencias relacionadas (por ejemplo, parálogos) se pueden obtener mediante hibridación a baja, moderada o alta rigurosidad con toda o una parte de una secuencia de referencia particular que sirve como sonda en una reacción de hibridación de ácido nucleico utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica.

[0177] La especificidad del ADN monocatenario para hibridar fragmentos complementarios se determina por la "rigurosidad" de las condiciones de reacción. La rigurosidad de la hibridación aumenta a medida que la propensión a formar dobles cadenas de ADN disminuye. En las reacciones de hibridación de ácidos nucleicos, la rigurosidad se puede elegir para favorecer hibridaciones específicas (alta rigurosidad), que pueden ser utilizadas para identificar, por ejemplo, clones de longitud completa de una biblioteca. Las hibridaciones menos específicas (rigurosidad moderada o baja) pueden ser utilizadas para identificar moléculas o segmentos de ADN relacionados, pero no exactos, (homólogos, pero no idénticos).

[0178] Las dobles cadenas de ADN se estabilizan mediante: (1) el número de pares de bases complementarias; (2) el tipo de pares de bases; (3) concentración de sal (fuerza iónica) de la mezcla de reacción; (4) la temperatura de la reacción; y (5) la presencia de ciertos disolventes orgánicos, tales como formamida, que disminuye la estabilidad de la doble cadena de ADN. En general, cuanto más larga es la sonda, más alta es la temperatura requerida para una hibridación apropiada. Una estrategia común es variar la temperatura: temperaturas relativas más altas resultan en condiciones de reacción más rigurosas. La selección de la modificación de diferentes condiciones de rigurosidad basada en el resultado deseado de una reacción de hibridación se entendería por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Tijssen, 1993; Sambrook y Russell, 2001; Ausubel et al. 2002; y Ausubel et al., 2003.

#### V.I.2 (a) Alta rigurosidad

[0179] Las frases "condiciones de hibridación altamente rigurosas" y "alta rigurosidad" se refieren en general a condiciones bajo las cuales una sonda se hibrida a su subsecuencia diana, habitualmente en una mezcla compleja de ácido nucleico, pero no a otras secuencias. Las condiciones altamente rigurosas dependen de la secuencia y pueden ser diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Generalmente, las condiciones altamente rigurosas se seleccionan para que sean de aproximadamente 5 a 10°C más baja que el punto de fusión térmico ( $T_m$ ) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definido. Las condiciones de baja rigurosidad se seleccionan generalmente para que sean aproximadamente 15-30°C por debajo de la  $T_m$ . La  $T_m$  es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH, y concentración de ácido nucleico definidos) a la que 50% de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio (ya que las secuencias diana están presentes en exceso, a  $T_m$ , 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas son aquellas en las que la concentración de sal es, en algunas realizaciones, menor de aproximadamente 1,0 M de iones sodio, en algunas realizaciones, de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de iones de sodio (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, mayor de 50 nucleótidos). Las condiciones altamente rigurosas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Para una hibridación selectiva o específica, una señal positiva es, en algunas realizaciones, al menos dos veces el fondo, y, en algunas

realizaciones, al menos 10 veces la hibridación de fondo. Los ejemplos de condiciones altamente rigurosas comprenden: (1) baja fuerza iónica y altas temperaturas de lavado (por ejemplo, cloruro de sodio 15 mM, citrato de sodio 1,5 mM, dodecilsulfato de sodio al 0,1% a 50°); (2) un agente desnaturante durante la hibridación (por ejemplo, formamida al 50% (v/v), albúmina de suero bovino al 0,1%, Ficoll al 0,1%, polivinilpirrolidona al 0,1%, tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 6,5; cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°); o (3) formamida al 50%. Los lavados habitualmente también comprenden 5 x SSC (0,75 M 10 NaCl, 75 mM citrato de sodio), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0,1%, y sulfato de dextrano al 10% a 42° con lavados a 42° en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y formamida al 50% a 55°, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°. En algunas realizaciones, las condiciones son tales que las secuencias de al menos aproximadamente 65%, 70%, 75%, 85 %, 90%, 95%, 98%, o 99% homólogas entre sí permanecen habitualmente hibridadas entre sí. Estas condiciones se presentan como ejemplos y no pretenden ser limitativos.

V.I.2. (b) Rigurosidad moderada

**[0180]** Las frases "condiciones moderadamente rigurosas" y "rigurosidad moderada" se refieren a condiciones de hibridación y/o soluciones de lavado que son menos rigurosas que las condiciones altamente rigurosas de manera que un polinucleótido que puede hibridarse a una o más secuencias diana que difieren en sus secuencias de nucleótidos de aquellas a las que se hibridaría en condiciones altamente rigurosas. Una reducción en la rigurosidad de "alta" a "moderada" se puede lograr mediante la reducción de la temperatura y/o el aumento de la concentración de catión monovalente presente en las soluciones de hibridación y/o lavado. Una condición de rigurosidad moderada de ejemplo comprende la hibridación en 6 x SSC, 5 x solución de Denhardt, SDS al 0,5%, y ADN de esperma de salmón desnaturado 100 mg/ml a 55°C, seguido de uno o más lavados en 1 x SSC, SDS al 0,1% a 37°C. La temperatura, fuerza iónica, etc., se pueden ajustar para acomodar factores experimentales, tales como la longitud de la sonda. Otras condiciones de rigurosidad moderada se describen en Tijssen, 1993; Sambrook y Russell, 2001; Ausubel et al., 2002; y Ausubel et al., 2003.

V.I.2 (c) Baja rigurosidad

**[0181]** Tal como se usa en el presente documento, las frases "condiciones rigurosas bajas" y "baja rigurosidad" se refieren a condiciones de hibridación y/o soluciones de lavado que son menos rigurosas que las condiciones moderadamente rigurosas de manera que un polinucleótido que puede hibridarse con una o más secuencias diana que difieren en sus secuencias de nucleótidos hasta un mayor grado de aquellas a las que se hibridaría en condiciones moderadamente rigurosas. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación de rigurosidad baja es la hibridación en 6 x SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,2%, ADN de esperma de salmón desnaturado 100 mg/ml, y sulfato de dextrano al 10% (peso/volumen) a 40°C, seguido de uno o más lavados en 2 x SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), EDTA 5 mM, y SDS al 0,1% a 50°C. Otras condiciones de baja rigurosidad, tales como las de hibridaciones entre especies, se describen en Tijssen, 1993; Sambrook y Russell, 2001; Ausubel et al., 2002; y Ausubel et al., 2003.

V.J. Polipéptidos

**[0182]** En algunas realizaciones, la materia aquí descrita se refiere a polipéptidos aislados de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a, y partes, derivados, fragmentos, análogos, homólogos, y ortólogos biológicamente activos de de los mismos. También se proporcionan en el presente documento fragmentos de polipéptido adecuados para su uso como inmunógenos para generar anticuerpos anti-Sonic Hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a. En algunas realizaciones, un polipéptido nativo de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a se pueden aislar de células o fuentes de tejido mediante un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteínas convencionales. En algunas realizaciones, los polipéptidos Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a se producen mediante técnicas de ADN recombinante. Alternativamente a la expresión recombinante, los polipéptidos de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a pueden sintetizarse químicamente usando técnicas de síntesis de péptidos estándar.

**[0183]** Un polipéptido sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a incluye la secuencia de aminoácidos de un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a. La materia aquí descrita también incluye una proteína mutante o variante, en la que cualquiera de sus residuos puede cambiarse de los correspondientes residuos encontrados para cada gen, a la vez que todavía codifica una proteína que mantiene sus actividades biológicas y funciones fisiológicas de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a como un agente de cebado de linaje, o un fragmento funcional del mismo.

**[0184]** En general, una variante de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a que conserva una función del tipo de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a similar como agente de cebado de linaje e incluye cualquier variante en la que los residuos en una posición particular en la secuencia han sido sustituidos por otros aminoácidos, e incluye además la posibilidad de insertar un residuo o residuos adicionales entre dos residuos de la proteína parental, así como la posibilidad de suprimir uno o más residuos de la secuencia parental. En circunstancias favorables, la sustitución es una sustitución conservativa tal como se ha definido anteriormente.

5 **[0185]** Además de variantes alélicas naturales de productos génicos de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a, los cambios de aminoácidos se pueden introducir de forma recombinante en un polipéptido por mutagénesis de las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de los productos génicos de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a. En algunas realizaciones, los cambios de aminoácidos se diseñan para no alterar sensiblemente las actividades biológicas de los polipéptidos mutados de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a en comparación con los polipéptidos de origen natural (por ejemplo, de tipo salvaje) polipéptidos. Por ejemplo, las sustituciones de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos "no esenciales" se pueden realizar en las secuencias de genes correspondientes. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede ser alterado con respecto a la secuencia de tipo salvaje de los productos génicos de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a sin alterar su actividad biológica como agente de cebado de linaje, mientras se requiere un residuo de aminoácido "esencial" para dicha actividad biológica.

15 **[0186]** Por ejemplo, los residuos de aminoácidos que se conservan entre los genes ortólogos de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a de diferentes especies se predice que son particularmente no susceptibles de alteración. Sin embargo, puede ser posible introducir sustituciones conservadoras de aminoácidos en estos aminoácidos. Los ejemplos de sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 2 a continuación. Las sustituciones conservadoras mediante las cuales un aminoácido de una clase es reemplazado por otro aminoácido del mismo tipo se encuentra dentro del alcance de la materia aquí descrita, siempre que la sustitución no altere indeseablemente la actividad biológica del polipéptido modificado como agente de cebado de linaje .

Tabla 2

Sustituciones conservadoras de aminoácidos	
Residuo original	Sustituciones de ejemplo
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro, Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina (Nor)
Leu (L)	Nor, Ile, Val, Met, Ala, Ile, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Phe, Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Leu, Nor

25 **[0187]** Las sustituciones no conservativas que afectan (1) la estructura del esqueleto del polipéptido, tal como una conformación de lámina β o hélice α; (2) la carga; (3) hidrofobicidad o hidrofiliidad; o (4) el volumen de la cadena lateral del sitio diana, pueden modificar la función y/o la identidad inmunológica del polipéptido sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a. Los residuos se pueden dividir en grupos basados en propiedades comunes de la cadena lateral como se indica en la Tabla 3. En algunas realizaciones, las sustituciones pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Las sustituciones en base a las clases enumeradas en la Tabla 3 se pueden introducir en algunas realizaciones en los sitios de sustitución conservadora, y/o en algunas realizaciones en sitios no conservados.

Tabla 3

35

Clases de aminoácidos	
Clases	aminoácidos de ejemplo
hidrófobos	Nor, Met, Ala, Val, Leu, Ile
neutros/hidrófilos	Cys, Ser, Thr
ácidos	Asp, Glu
básicos	Asn, Gln, His, Lys, Arg
conformación de cadena alterada	Gly, Pro

aromáticos

Trp, Tyr, Phe

[0188] Las variantes de polipéptidos que comprenden una o más sustituciones pueden producirse utilizando procedimientos que son conocidos en la técnica, tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al sitio), barrido de alanina, y mutagénesis PCR. La mutagénesis dirigida al sitio (Carter, 1986; Zoller y Smith, 1987), mutagénesis de casete, mutagénesis de selección por restricción (Wells et al, 1985), u otras técnicas conocidas se pueden realizar en una secuencia de ácido nucleico aislada para producir, por ejemplo, variantes de ácidos nucleicos de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, 2001; Ausubel et al, 2002; Ausubel et al, 2003).

[0189] Una variante de molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de proteína, donde la variante de proteína comprende una secuencia de aminoácidos que en algunas realizaciones es de al menos aproximadamente 45%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 50%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 55%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 60%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 65%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 70%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 75%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 80 %, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 85%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 90%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 95%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 96%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 97%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 98%, y en algunas realizaciones al menos aproximadamente 99% idéntica a un producto génico de origen natural de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3 y/o lmx1a.

[0190] Por tanto, la frase "variante de polipéptido sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a" se refiere a un polipéptido activo de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a que tiene al menos: (1) aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de polipéptido nativo de longitud completa de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a; (2) una secuencia de polipéptido de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a que carece del péptido señal; (3) un dominio extracelular de un polipéptido de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a, con o sin el péptido señal; o (4) cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido de longitud completa de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a. Por ejemplo, las variantes de polipéptido de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a incluyen polipéptidos de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a en los que uno o más residuos de aminoácidos se agregan o eliminan en los extremos N- o C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Una variante de polipéptido de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a puede tener en algunas realizaciones al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 81% de identidad de secuencia de aminoácidos, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% de identidad de secuencia de aminoácidos, y en algunas realizaciones al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia nativa de longitud completa del polipéptido de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a. Una variante de polipéptido de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a puede tener una secuencia que carece del péptido señal, un dominio extracelular de un polipéptido de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a, con o sin el péptido señal, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido de longitud completa de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a. Ordinariamente, las variantes de polipéptido de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a tienen al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, a menudo al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, o 300 aminoácidos de longitud, o más.

[0191] "Porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos" se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos que son idénticos con los residuos de aminoácidos en una secuencia de polipéptido de referencia de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a en una secuencia candidata cuando se alinean las dos secuencias. Para determinar el porcentaje de identidad de aminoácidos, las secuencias se alinean y si es necesario, se introducen huecos para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia; las sustituciones conservadoras no se consideran como parte de la identidad de secuencia. Los procedimientos de alineación de secuencias de aminoácidos para determinar el porcentaje de identidad son conocidos por los expertos en la técnica. A menudo se utiliza software informático a disposición del público, tal como BLAST, BLAST2, ALIGN2 o Megalign (DNASTAR) para alinear secuencias de péptidos. Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan.

[0192] Cuando las secuencias de aminoácidos se alinean, el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B) se puede calcular como: % de identidad de secuencia de aminoácidos =  $(X/Y) \times 100$ , donde X es el número de residuos de evaluados como correspondencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencia o el alineamiento de algoritmo de A y B, e Y es el número total de nucleótidos en B.

[0193] Cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de



aminoácidos de B a A. En algunas realizaciones en las que una secuencia de referencia y de prueba se solapan, el porcentaje de identidad continúa sobre toda la longitud de una de las secuencias.

**[0194]** Un polipéptido, proteína o fragmento biológicamente activo "aislado" o "purificado" se separa y/o recupera de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes incluyen materiales que habitualmente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros materiales proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, el polipéptido se purifica hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna. Para ser sustancialmente aislada, las preparaciones tienen en algunas realizaciones menos del 30%, en algunas realizaciones menos del 20%, en algunas realizaciones menos del 10%, y en algunas realizaciones menos del 5% en peso seco de material contaminante no-Olig2, HB9, Ngn2, Sox10, o Nkx2.2. Un Olig2, HB9, Ngn2, Sox10, o Nkx2.2 producido de forma recombinante, aislado, o una parte biológicamente activa está, en algunas realizaciones, sustancialmente libre de medio de cultivo. Es decir, el medio de cultivo representa en algunas realizaciones menos del 20%, en algunas realizaciones menos de aproximadamente el 10%, y en algunas realizaciones menos de aproximadamente el 5% del volumen de la preparación de Olig2, HB9, Ngn2, Sox10, o Nkx2.2. Ejemplos de contaminantes incluyen restos celulares, medios de cultivo, y las sustancias utilizadas y producidas durante la síntesis *in vitro* de un Olig2, HB9, Ngn2, Sox10, o Nkx2.2.

**[0195]** Las partes biológicamente activas de un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente homólogas a o derivadas de las secuencias de aminoácidos de un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a (o una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha parte) que incluyen menos aminoácidos que un producto génico de longitud completa de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a, y exhiben al menos una actividad de un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a, tal como su actividad como agente de cebado de linaje. Las partes biológicamente activas pueden comprender un dominio o motivo con al menos una actividad de un producto génico activo de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a. Una parte biológicamente activa de un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 100, o más residuos de aminoácidos de longitud. Otras partes biológicamente activas, en las que se eliminan otras regiones de la proteína, se pueden preparar por técnicas recombinantes y evaluarse para una o más de las actividades funcionales de un Olig2, HB9, Ngn2, Sox10, o NKX2.2 nativo.

**[0196]** La frase "variante de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a" también se refiere, en algunas realizaciones a un producto génico biológicamente activo de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a que tiene al menos: (1) una identidad de aproximadamente el 80% de secuencia de aminoácidos con una secuencia nativa de longitud completa de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a; (2) una secuencia de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a que carece del péptido señal; (3) un dominio extracelular de un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a, con o sin el péptido señal; o (4) cualquier otro fragmento de una secuencia de longitud total de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a. Por ejemplo, las variantes de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a incluyen un Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a en los que uno o más residuos de aminoácidos se agregan o eliminan en los extremos N- o C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Una variante de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a puede tener una secuencia que carece del péptido señal, un dominio extracelular de un producto génico de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a, con o sin el péptido señal, o cualquier otro fragmento de una secuencia de longitud completa de sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a. Ordinariamente, las variantes de polipéptido de Sonic hedgehog, nurr-1, pitx3, y/o lmx1a tienen al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, a menudo al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, o 300 aminoácidos de longitud, o más.

#### EJEMPLOS

**[0197]** Los siguientes ejemplos proporcionan realizaciones ilustrativas. A la luz de la presente descripción y el nivel general de habilidad en la técnica, los expertos entenderán que los siguientes Ejemplos pretenden ser solamente de ejemplo y que numerosos cambios, modificaciones y alteraciones se pueden emplear sin apartarse del alcance de la materia aquí descrita.

#### Materiales y procedimientos empleados en los EJEMPLOS

**[0198]** Cultivo celular. Las dos líneas progenitoras derivada de epitelio olfativo específicas de dos pacientes utilizadas en este estudio se obtuvieron de epitelio olfativo adulto recogido de una mujer de 42 años de edad, y un varón de 20 años de edad, a través de la biopsia endoscópica (Roisen et al., 2001; Winstead et al., 2005). Las células se cultivaron como células formadoras de neuroesferas (NSFC) tal como se describió previamente (Zhang et al, 2004; Winstead et al., 2005). Las NSFC se descongelaron de solución madre congelada que se mantuvo en nitrógeno líquido y se cultivó en medio esencial mínimo (MEM) con suero bovino fetal (FBS) al 10% inactivado por calor (GIBCO, Grand Island, NY) durante una semana. Las NSFC se adaptaron a la ausencia de suero a través de la dilución en serie de suero cada día durante 4 días hasta que las células se cultivaron finalmente en DFBNM (DMEM/F12 suplementado con B27 al 1% y N<sub>2</sub> al 0,5% y 100 µg/ml de gentamicina (GIBCO, Grand Island, NY; Zhang et al, 2004). Se realizaron experimentos independientes paralelos en ambas líneas de NSFC específicas para

el paciente. Dado que se consiguieron resultados equivalentes, se han presentado los datos de una sola línea.

**[0199] Construcción de plásmidos de expresión.** El ADNc de nurr1 de ratón se clonó en el vector de expresión pLNCX2 (Clontech) entre ClaI. Del mismo modo, el ADNc de pitx3 de rata y de Imx1a de ratón se insertaron en el vector pLNCX2 entre ClaI. Para el vector de coexpresión de nurr1 y pitx3, el ADNc de nurr1 se clonó en pIRES (Clontech) entre XbaI y Sall, y pitx3 se insertó entre EcoRI. Los vectores de expresión pLNCX2 y pIRES sirvieron como controles. Todos los vectores de expresión se verificaron mediante secuenciación de ADN extenso.

**[0200] Transfección y selección.** Todas las construcciones de plásmidos se introdujeron en las NSFC mediante transfección liposomal. Las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio en placas de seis pocillos ( $5 \times 10^4$  células por pocillo de 35 mm) en DFBNM sin antibióticos 1 día antes de la transfección. Las NSFC fueron transfectadas con cada plásmido (4  $\mu$ g/pocillo) durante 24 horas de acuerdo con el protocolo del fabricante (LIPOFECTAMINE® 2000, Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos de América). Un día después de la transfección, las células se alimentaron con FBS al 10% en MEM y se seleccionaron con G418 (400  $\mu$ g/ml; Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos de América). La presión de selección se mantuvo durante hasta 4 meses para asegurar una población de células transfectadas de forma estable purificadas. Se aplicaron inmunocitoquímica y análisis de transferencia western para detectar varios marcadores neuronales dopaminérgicos. Después de una selección de 4 meses, las NSFC transfectadas se congelaron en nitrógeno líquido durante 4-6 meses adicionales de almacenamiento. Después de la extracción del almacenamiento criogénico y la recuperación de varios días en MEM con FBS al 10% a 37°C, la restricción de linaje dopaminérgico se sondeó con inmunocitoquímica y análisis de transferencia Western.

**[0201] Tratamiento morfogénico.** Las NSFC se trataron con Shh, en presencia o ausencia de RA (1  $\mu$ M) y/o FN (5  $\mu$ M; Zhang et al., 2004). Se aplicó Shh altamente purificado (amablemente proporcionado en virtud de un acuerdo de transferencia de material con Curis y Wyeth, Inc.) a NSFC y se comparó con una muestra de control disponible comercialmente obtenida de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, Missouri, Estados Unidos de América) para determinar el grado en que la purificación de Shh puede efectuar la expresión de la tirosina hidroxilasa (TH). Las NSFC se sembraron en cubreobjetos de vidrio en placas de seis pocillos ( $5 \times 10^4$  células/pocillo de 35 mm) en DFBNM y se trató con un medio que contenía varias concentraciones y combinaciones de RA, FN, y Shh durante 7 días (atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y temperatura de 37°C). El tratamiento con Shh incluyó varias concentraciones de 0,25 mg/ml ("Shh0.25"), 0,1 mg/ml ("Shh.1"), 0,05 mg/ml ("Shh0.05"), 0,025 mg/ml ("Shh0.025") en presencia o ausencia de ácido retinoico 1  $\mu$ M RA ("RA1") y/o forskolina, 5  $\mu$ M FN ("FN5"). Después del tratamiento, la expresión de TH se determinó en 1-7 días *in vitro* (DIV) mediante análisis inmunocitoquímico. Una vez se determinó el entorno optimizado para la inducción de neuronas dopaminérgicas, se aplicó el medio que contenía la combinación optimizada para NSFC transfectadas de forma estable.

**[0202] Inmunocitoquímica.** Las NSFC ( $5 \times 10^4$  células/pocillo) se sembraron en cubreobjetos de vidrio redondos de 22 mm en placas de seis pocillos de 35 mm (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos de América) y se incubaron a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>/95% de aire durante 24 horas y se trataron con RA, FN, y Shh o se transfectaron y seleccionaron durante diferentes períodos de tiempo antes de la fijación para inmunofluorescencia. Se aplicó diclorhidrato de 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI; 1:1000, 2 mg/ml, Molecular Probes, Eugene, Oregon, Estados Unidos de América) en cultivo durante 30 min a 37°C para la tinción nuclear vital. Los portaobjetos se enjuagaron con tampón de citoesqueleto (CB) dos veces y se fijaron en paraformaldehído al 3% en CB (10 minutos). Se aplicó Triton X-100 al 0,2% (10 minutos; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri, Estados Unidos de América) en TBS y las células se incubaron (1 hora) en BSA al 3% en TBS. Se aplicaron anticuerpos primarios durante la noche (4°C). Después de 30 minutos de lavado (10 minutos cada uno, 3 veces) en TBS, se incubaron las células con anticuerpos secundarios: IgG anti-conejo de cabra conjugado a rojo Texas, IgG anti-ratón de cabra conjugado a rojo Texas, IgG anti-ratón de cabra conjugado a Cy2 y/o IgG anti-conejo de cabra conjugado a Cy2 (todos diluidos 1:600; Cy2, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, Estados Unidos de América; Texas Red, Molecular Probes, Eugene, Oregon, Estados Unidos de América). Los cubreobjetos se enjuagaron en TBS durante 30 minutos (10 minutos cada uno, 3 veces) y se montaron sobre los portaobjetos. Los portaobjetos fueron examinados con microscopía confocal. Todos los experimentos se repitieron un mínimo de dos veces para asegurar la especificidad y la fiabilidad de la tinción; sólo se ha presentado un conjunto de datos, ya que se obtuvieron resultados similares.

**[0203] Análisis de transferencia Western.** Se utilizó el análisis de transferencia Western para examinar a fondo y confirmar los resultados obtenidos con la inmunofluorescencia. Las proteínas de NSFC cultivadas en DFBNM sin transfección, NSFC transfectadas con vectores de control, así como NSFC transfectadas con los vectores más cada combinación de factores de transcripciones (pLNCX2-pitx3, pLNCX2-nurr1, pLNCX2-Imx1a, pIRES-pitx3-nurr1), seleccionados en todos los grupos, se recogieron en tampón de lisis celular (Sigma Aldrich Co., St. Louis, Missouri, Estados Unidos de América). Después de 15 minutos de incubación en hielo, las muestras se centrifugaron durante 30 minutos (4°C) y se determinó la concentración de proteína de cada sobrenadante. Las muestras de proteínas (20  $\mu$ g/pocillo) se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10%, junto con proteínas marcadoras de tamaño molecular estandarizado en un carril adyacente y se transfirieron del gel a papel de nitrocelulosa. La unión no específica se bloqueó (1 hora) con leche en polvo desnatada al 5% en tampón TBS-Tween (TBST). Las

transferencias se incubaron (4°C durante la noche) en anticuerpos primarios (anti-TH, MAB; anti-actina, MAB). Se utilizó TBST tres veces durante 10 minutos en las transferencias. Las transferencias lavadas se incubaron (1 hora, temperatura ambiente) en IgG monoclonal anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (1:2000). Se utilizaron reactivos de detección de transferencia Western ECL (Amersham Biosciences, una división de GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, Nueva Jersey, Estados Unidos de América) para identificar anticuerpos unidos. La densitometría de las bandas de proteínas se llevó a cabo sobre una película de quimioluminiscencia de alto rendimiento (Amersham Biosciences). Los datos fueron analizados utilizando los programas de software Image-J suministrados por el NIH.

5 [0204] Ensayo de la dopamina. Las NSFC transfectadas de manera estable se sembraron en matraces (25 cm<sup>2</sup>, Corning) a 105 por matraz antes de adaptarse a la ausencia de suero por medio de dilución en serie de suero cada día durante 4 días hasta que las células se cultivaron finalmente en DFBNM, que se recogió diariamente después de eliminar totalmente el suero del medio. A continuación, DFBNM recogido de cada línea de SNCF restringida se concentró a 1/50 del volumen, respectivamente, mediante filtros centrífugos (Amicon Ultra-15; Millipore, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos de América). Las NSFC diferenciadas se recogieron a continuación y se lisaron (tampón de lisis, Sigma). La expresión de la dopamina se analizó cuantitativamente en el medio concentrado, así como en los lisados celulares con un kit de inmunoensayo enzimático de dopamina (Dopamine EIA, Immunobiological Laboratories, Inc., Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos de América), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

10 [0205] Procedimientos quirúrgicos generales. Se emplearon ratas hembras Sprague Dawley (250 a 300 g cada una). Veinticuatro horas antes de la cirugía, los animales se pesaron y se asignaron números de identificación. En el día de la cirugía, los animales se anestesiaron utilizando 37,7 mg de ketamina y 5 mg de xilazina por kilogramo, con 0,1 ml/100 g inyectado i.p. Después de la anestesia (30 minutos antes de la lesión), se inyectaron 25 mg/kg de desipramina (0,1 ml/100 g de una solución madre de 25 mg/ml) por vía intramuscular en cada ratón para proteger las neuronas noradrenérgicas de la toxicidad de 6-OHDA. También se administraron 50 mg/kg de pargilina (0,1 ml/100 g de una solución madre de 50 mg/ml) por vía intramuscular a cada ratón para inhibir la monoamino oxidasa endógena.

15 [0206] Lesión unilateral con 6-OHDA. Para cada rata, se afeitó el pelo y se preparó la piel con solución de BETADINE® en el sitio quirúrgico. La cabeza de la rata se colocó en un dispositivo de sujeción estereotáctico de tres puntos (barra de incisión fijada -3,9 mm por debajo de la línea interaural), se abrió el cuero cabelludo, se perforó un pequeño agujero de en el cráneo con un taladro dental, y se cortó la duramadre.

20 [0207] Se emplearon dos modelos de lesión con 6-ODHA. El primero fue un modelo de haz medial del cerebro anterior (MFB). Para este modelo, se inyectaron 4 µl de 6-OHDA recién preparado (5 mg/ml disuelto en 0,2 mg/ml de ácido ascórbico en solución salina al 0,9%, mantenido en la oscuridad hasta su uso) en cada rata en una posición definida como (- 4,4 mm anterior, +1,2 mm lateral, +7,8 mm ventral a bregma).

25 [0208] El segundo modelo era un modelo estriado. Se inyectaron 2 µl de 6-OHDA recién preparado en 3,0 mg/ml en cada uno de 3 puntos definidos como (+0,4 mm, +3,0 mm, 5,0 mm; -0,4 mm, +4,2 mm, 5,0 mm; y -1.3 mm, +4,5 mm, 5,0 mm) utilizando una aguja G#31 a una velocidad de 1 µl/min. La aguja se dejó en el lugar durante cuatro minutos para evitar el reflujo y a continuación se extrajo lentamente. El orificio de trepanación se rellenó con una pieza de espuma de gel y se cerró el cuero cabelludo.

30 [0209] En ausencia de un trasplante, la administración de anfetamina para ratas lesionadas dio lugar a animales lesionados unilateralmente que giran hacia el lado lesionado.

35 [0210] El antibiótico general de penicilina (100.000 unidades/kg) se administró por vía intramuscular a cada animal. Cada animal también recibió un analgésico postoperatorio (buprenorfina, 0,02 mg/kg, por vía intramuscular). También se administraron 5-10 ml de solución salina (SC) al 0,9% para contrarrestar cualquier pérdida de fluido/sangre.

40 [0211] Cirugía de trasplante de células. Se colocó cada rata bajo anestesia como se describe anteriormente, se colocaron en el soporte estereotáctica, se reabrió el cuero cabelludo, se perforó un nuevo orificio de trépano y se administraron 10.000-50.000 NSFC en 5 µl en el cuerpo estriado en 2 puntos (+0,5 mm, +2,5 mm, 4,5/5,5 mm) con una jeringa Hamilton ajustada con una aguja de jeringa G#31. Una vez más, la aguja se dejó en el lugar durante cuatro minutos y a continuación se extrajo. El cuero cabelludo se cerró. Cada procedimiento quirúrgico duró no más de 60 minutos. Las coordenadas estereotácticas eran de Paxinos y Watson, 1998. El cuidado general de la post-operación fue igual que el anterior, y todas las ratas recibieron ciclosporina (10 mg/kg, i.m.) cada dos días para la inmunosupresión durante al menos 16 semanas.

#### EJEMPLO 1

45 Transfección de células progenitoras derivadas de epitelio olfativo (NSFC) para lograr restricción de linaje dopaminérgico

**[0212]** Las NSFC humanas se obtuvieron a partir de soluciones madre previamente congeladas con un número bajo de pases (3-5) y se mantuvieron en medio MEM10 durante su período de recuperación. Estas células mitóticamente activas se dividieron cada 18-20 horas, lo que normalmente requiere el pase tres veces por semana. La naturaleza heterogénea de la población de NSFC antes de la transfección se determinó mediante inmunocitoquímica. No se observó reactividad para pitx3, nurr1, lmx1a o el precursor de la dopamina, TH, con las NSFC pretransfectadas. Se utilizaron pases bajos (pases 4-8) de NSFC de 2 líneas celulares diferentes específicas para cada paciente en experimentos de transfección paralelos. Para examinar la expresión fenotípica de NSFC después de la transfección y selección, se evaluaron los cultivos representativos, así como sus respectivos controles pretransfección. Las NSFC no transfectadas o las transfectadas con LIPOFECTAMINE® solo murieron en menos de 1 semana después de la selección con 400 µg/ml de G418 (GIBCO, Grand Island, NY). En cambio, el 30% de las células transfectadas (con los genes en cuestión y los vectores de control) sobrevivieron bajo la presión de selección. La transfección con vectores de control, genes individuales, o pitx3-nurr1 combinados no dio lugar a cambios morfológicos en comparación con las NSFC pretratadas típicas. Sin embargo, las NSFC transfectadas se dividieron más lentamente, con un nuevo tiempo de duplicación de tres a cuatro días, lo que requería una pauta de alimentación de sólo dos veces por semana y el pase requerido cada 9-10 días. El análisis de inmunofluorescencia de las poblaciones transfectadas demostró que las NSFC fueron transfectadas de forma estable y expresaron TH.

**[0213]** Las NSFC derivadas del epitelio olfativo humano fueron transfectadas mediante pIRES-pitx3-nurr1 para restringirlas hacia las neuronas DA. El vector solo se utilizó como control. Para obtener una población purificada de células restringidas la población transfectada se mantuvo en G418 (GIBCO, 400 µg/ml) para la selección. Aunque sólo varias semanas de selección produjeron poblaciones relativamente puras, se empleó un intervalo de cuatro meses para asegurar la estabilidad y pureza. Las NSFC permanecieron positivas a TH después de la transfección de pIRES-pitx3-Nurr1, mientras que la transfección de vectores de control no mostró cambios fenotípicos, lo que demuestra que las NSFC se pueden restringir hacia neuronas dopaminérgicas (véase la figura 1).

**[0214]** Las NSFC fueron transfectadas con pLNCX2-nurr1, pLNCX2-pitx3, pLNCX2-lmx1a o el vector solo como control. Las células transfectadas se expusieron a G418 para la selección durante períodos de hasta 4 meses. Las NSFC eran positivas en TH después de la transfección de pLNCX2-nurr1 y pLNCX2-pitx3, mientras que la transfección de vectores de control no dio lugar a cambios fenotípicos. Por lo tanto, se pueden emplear pLNCX2-nurr1 o pLNCX2-pitx3 para limitar el linaje de las NSFC hacia neuronas dopaminérgicas. En cambio, las NSFC transfectadas con pLNCX2-lmx1a permanecieron no reactivas para TH, aunque positivas de myc, lo que demuestra la incorporación exitosa del plásmido (véase la figura 1).

**[0215]** Se empleó el análisis de transferencia Western para confirmar cuantitativamente los estudios inmunocitoquímicos de las poblaciones de NSFC transfectadas. Se analizaron las siguientes líneas transfectadas para la expresión de TH: las NSFC transfectadas con pIRES-pitx3-nurr1, pLNCX2-nurr1, pLNCX2-pitx3, o pLNCX2-lmx1a se analizaron para la expresión de TH, y se determinó que todas eran positivas en TH. Esto indicó que estas células tenían el potencial de producir dopamina. Por el contrario, las poblaciones de NSFC transfectadas con los vectores de control (pIRES y pLNCX2) no mostraron expresión de TH. La beta-actina, una proteína que se expresa ampliamente en todas las células de mamíferos y aves se utilizó como proteína de referencia para la comparación de la expresión de TH por las distintas líneas (Tian et al., 1999). Se aplicó Imagen-J para el análisis de datos. Cada curva de las figuras 2B a 2M exhibe la densidad de las bandas que se muestran en el gel de western (véase la figura 2A). Se midió el área bajo cada curva. El histograma de la distribución de frecuencias en la figura 2N presenta la proporción de TH con respecto a la expresión de actina en cada línea celular. Las NSFC transfectadas con pIRES-pitx3-nurr1 mostraron la proporción más alta de la expresión de TH con respecto a ACTINA, mientras que las células transfectadas con el vector de control (pLNCX2 o pIRES) tenía la menor tinción de TH (véase las Figuras 2B-2N). Estos resultados demostraron que los factores de transcripción individuales tenían capacidades únicas para la promoción de la restricción dopaminérgica de NSFC.

## EJEMPLO 2

### NSFC transfectadas permanecen restringidas al linaje dopaminérgico después de la extracción del almacenamiento criogénico

**[0216]** Después de una selección 4 meses, las células restringidas a linaje dopaminérgico se congelaron en nitrógeno líquido durante 4-6 meses adicionales. Después de la extracción del almacenamiento criogénico y recuperación de varios días en MEM10 a 37°C, casi todas las poblaciones de NSFC sobrevivieron bajo la presión de selección de 400 µg/ml de G418, lo que demuestra que estas células fueron transfectadas de forma estable y retuvieron su potencial para el almacenamiento a largo plazo y la aplicación clínica. La inmunocitoquímica y análisis de transferencia Western se aplicaron a estas poblaciones previamente almacenadas para examinar su expresión de TH. Las NSFC transfectadas con pLNCX2-pitx3, pLNCX2-nurr1, y pIRES-pitx3-nurr1 permanecieron sanas y positivas de TH bajo la presión de selección, mientras que la línea transfectada pLNCX2-lmx1a no (véase la figura 3).

## EJEMPLO 3

NSFC restringidas de linaje produjeron y liberaron dopamina

[0217] Después de la extracción del almacenamiento criogénico, se detectó la producción de dopamina en las líneas de NSFC que fueron transfectadas de forma estable con los genes en cuestión, mientras que las células transfectadas con vectores de control y las NSFC no transfectadas no produjeron dopamina. El nivel de dopamina de cada muestra se dividió a continuación por la concentración de proteína en cada línea de NSFC específica para calcular la eficacia de la producción de dopamina. Entre todas las 4 líneas transfectadas, las NSFC transfectadas con pIRES-pitx3-nurr1 mostraron la formación de dopamina más eficiente (véase la figura 4A). El medio agotado se recogió 4 días después de cultivar las NSFC de linaje restringido. A continuación, este medio se concentró a 1/50 de volumen, respectivamente, y se aplicó dopamina E.I.A. para detectar la liberación de dopamina (niveles extracelulares). Los datos se calcularon de la misma manera que el análisis de la dopamina intracelular. Se detectaron niveles más bajos de dopamina en los medios concentrados en comparación con el análisis correspondiente de la lisis celular. El nivel más alto de la liberación de dopamina se detectó a partir de NSFC transfectadas con pIRES-pitx3-nurr1 en comparación con las otras líneas celulares restringidas (véase la figura 4B).

## EJEMPLO 4

Efecto de los morfógenos en la expresión de tirosina hidroxilasa y formación y liberación de dopamina

[0218] Las NSFC se cultivaron en DFBNM junto con RA (1  $\mu$ M), FN (5  $\mu$ M), y una de dos fuentes diferentes (purezas) de Shh durante 1-7 días. La expresión de TH fue mayor en las células que fueron tratadas con Shh altamente purificado que el producto comercial obtenido de SIGMA cuando ambos se aplicaron durante el mismo período de tiempo. Ambos tratamientos dieron lugar a una mayor expresión que en los cultivados únicamente en DFBNM. Estos estudios sugieren que Shh aumenta la expresión de TH y que la pureza (cantidad) de Shh es un determinante importante de la expresión de TH (véase la Figura 5).

[0219] Las NSFC tratadas con FN5 RA1 y Shh altamente purificado expresó aparentemente reactividad intensa de TH (véase la Figura 5C en comparación con el control en la figura 5A o Sigma Shh en la figura 5B). Por lo tanto, se redujo la concentración de Shh para determinar la concentración más baja de Shh que podrían conducir a las NSFC hacia neuronas dopaminérgicas. A diferencia de la respuesta cuando se aplicó un alto nivel de Shh, la reducción de Shh a 0,025 mg/ml aplicados con RA (1  $\mu$ M) y FN (5  $\mu$ M) no produjo una respuesta inmediata. Las NSFC se volvieron positivas en TH sólo después de 18 horas de tratamiento con Shh altamente purificado; sin embargo, estaban sanas y mantuvieron la expresión de TH durante períodos más largos. La aplicación de RA y FN promovió una expresión aún mayor de TH (véase la figura 6A). Por lo tanto, la condición óptima para restringir el linaje de las NSFC a neuronas dopaminérgicas se determinó que era DFBNM suplementado con RA1 FN5Shh0.025 (véase la figura 6B).

[0220] Las NSFC transfectadas de manera estable fueron tratados con un cóctel de RA1/FN5/Shh0.025 para determinar si la combinación de la modificación genética y el tratamiento morfogénico aumentaría los niveles intracelulares e intercelulares de dopamina. El medio agotado se recogió 4 días después del tratamiento morfogénico y se concentró hasta un volumen de 1/50. También se recogieron las NSFC tratadas de linaje restringido. La dopamina E.I.A. se aplicó a la muestra la lisis celular y el medio concentrado. La eficacia en la formación de la dopamina se calculó como se describe anteriormente. Las NSFC transfectadas con pIRES-pitx3-nurr1 fueron la población más eficiente con respecto a la formación de dopamina y la liberación después del tratamiento morfogénico (véase la Figura 4). En comparación con los niveles intracelulares e intercelulares de dopamina en las NSFC de linaje restringido en ausencia de morfógenos, la expresión dopaminérgica mejoró en gran medida en las NSFC transfectadas de forma estable en presencia de la combinación de Shh, RA, y FN (véase la figura 4). Estos estudios sugieren que el tratamiento morfogénico juega un papel importante en la formación de la y la liberación de dopamina en las NSFC de linaje restringido.

## EJEMPLO 5

Estudios de comportamiento en ratas después de la lesión con 6-OHDA lesiones con y sin trasplante de NSFC

[0221] La 6-hidroxidopamina (6-OHDA) es una neurotoxina que se ha utilizado para desarrollar ciertos modelos animales in vivo de la enfermedad de Parkinson (véase, por ejemplo, Deumens et al, 2002; Lancu et al, 2005; Metz et al., 2005). Generalmente, la 6-OHDA se introduce en una o más regiones de los cerebros de las ratas, y después de que haya pasado el tiempo suficiente para que la toxina dañe a las neuronas en las proximidades del sitio de administración, se llevan a cabo una o más pruebas de comportamiento para determinar qué efecto, si lo hay, presentaba el medicamento sobre los animales. En aquellos casos en los que alguna forma de terapia ha sido incluida para contrarrestar los efectos de la toxina, se pueden hacer comparaciones con los animales que no recibieron la terapia para evaluar la eficacia de la terapia.

[0222] A tal fin, se diseñaron una serie de pruebas de comportamiento con el fin de evaluar la capacidad de las NSFC trasplantadas para mitigar los daños producidos en el cerebro de rata por las lesiones con 6-OHDA.

[0223] En la primera serie de pruebas de comportamiento, se realizó una prueba de rotación inducida por fármacos. Las ratas se lesionaron con 6-OHDA como se describió anteriormente, y tres semanas después de administrar la toxina, los animales fueron analizados mediante el análisis de comportamiento de rotación inducido por Anfetamina (Anderson y Caldwell, 2007). Las ratas fueron inyectadas con una Anfetamina (3,0 mg/ml; Catálogo No. A5880, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri, Estados Unidos de América), dosis a 3,0 mg/kg (0,1 ml/100 g de rata; i.p.). Se contaron el número de giros durante 90 minutos (registro por separado cada 15 minutos) después de 15 minutos de la inyección de fármacos. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

[0224] Para los animales injertados, se inyectaron 25.000 células aisladas, cultivadas y transfectadas con pIRES-pitx3-nurr1 como se describe en el presente documento en el lugar deseado por animal. Las células fueron aisladas de una donante (41 años de edad). Las células se congelaron en nitrógeno líquido durante al menos tres meses después de la transfección. Las células se descongelaron y se llevaron a través de varios pases para asegurar que ningún protector DMSO estaba presente antes de realizar el injerto. Las células también se sometieron a pases inicialmente en suero al 10% y se llevaron a través de la reducción de serie para reducir el suero a menos del 0,5% antes de injerto.

[0225] Seis semanas después del injerto y nueve semanas después de la lesión, más del 30% de los animales injertados, ya sea en el haz medial del cerebro anterior (MFB) o el cuerpo estriado exhibieron una recuperación mejorada del comportamiento en un ensayo de rotación en comparación con los déficits motores observados en los controles tratados sólo con medio. La población injertada permaneció intacta y positiva de TH durante un mínimo de tres meses in vivo. Los resultados se representan en la Figura 9.

Tabla 4

Rotaciones inducidas por fármaco de ratas lesionadas con 6-OHDA					
Modelo	Grupo	Tiempo después de la inyección de células			
		0 semanas (línea base)	3 semanas	6 semanas	10 semanas
MFB	Control (n = 8)	843 ± 350	1099 ± 203	1217 ± 371	1300 ± 230
	Células (n = 13)	906 ± 374	1053 ± 434	1079 ± 467	1068 ± 386
	No mejorado (n = 9)	896 ± 410	1195 ± 386	1305 ± 329	1140 ± 340
	Mejorado (n = 4; 30,8%)	926 ± 332	736 ± 403	572 ± 298	655 ± 78
Estriado	Control (n = 7)	881 ± 454	1259 ± 376	1308 ± 388	1238 ± 334
	Células (n = 13)	938 ± 398	1122 ± 284	1157 ± 453	1120 ± 487
	No mejorado (n = 9)	989 ± 383	1207 ± 267	1305 ± 351	1385 ± 313
	Mejorado (n = 4; 30,8%)	821 ± 464	932 ± 250	723 ± 361	530 ± 119

[0226] Las ratas lesionadas con 6-OHDA también se prueban en ensayos de comportamiento adicionales. Una de estas pruebas es una prueba Esquinas (Miljan et al., 2009), en la que las ratas se colocan en una esquina de ángulo recto de una caja enjaulada con las patas delanteras levantadas del piso de la caja. Se registra la dirección en la que la rata se vuelve a salir de la esquina se registra, y la prueba se repite ocho veces para cada rata. Las ratas normales (es decir, sin lesión y sin trasplante de células) no muestran ninguna preferencia significativa entre giros a la izquierda y derecha.

[0227] Una tercera prueba conductual empleada es una prueba de asimetría con uso de extremidades (cilindro). En esta prueba, las ratas se colocan en un cilindro de vidrio transparente (por ejemplo, un cilindro de 30 cm de alto por 22 cm de diámetro). Se registra el número de contactos con la pared realizados por las patas delanteras (izquierda, derecha o ambas) durante 5 minutos o 5 veces las traseras. Las ratas normales utilizan simétricamente las patas delanteras izquierda y derecha.

[0228] Una cuarta prueba es una prueba pasos de ajuste lateral (Olsson et al., 1995). Las ratas se mantuvieron por el experimentador con una mano agarrando las extremidades traseras y la otra una extremidad anterior. La pata sin fijar toca la superficie de la mesa ligeramente rugosa y se mueve lentamente hacia el lateral (0,9 m durante 5 segundos). Se cuenta el número de pasos ajustados en la dirección de derecha en ambas extremidades anteriores. La prueba se repitió dos veces.

[0229] Las ratas lesionadas con 6-OHDA que recibieron NSCF trasplantadas se desarrollan mejor en una o más de estas pruebas que ratas lesionadas con 6-OHDA que no recibieron NSFC trasplantadas.

EJEMPLO 6

Expresión de neurotrofinas en NSFC transfectadas

[0230] La expresión de las neurotrofinas BDNF, NT3, y CNTF se detectó en NSFC no transfectadas. Las líneas transfectadas descritas anteriormente se examinaron para determinar si la restricción de linaje a las neuronas DA altera la síntesis de estas neurotrofinas. Como se muestra en la figura 8, no se observaron diferencias significativas en los niveles intracelulares de neurotrofinas entre NSFC transfectadas y no transfectadas, lo que indica que la transfección no alteraba la síntesis de neurotrofinas.

Discusión de los EJEMPLOS

[0231] El epitelio olfativo humano adulto contiene una población de células progenitoras que reemplazan los componentes olfativos dañados o perdidos durante toda la vida, y es muy probable que otros animales (por ejemplo, mamíferos) tengan una población de células similar. Se han desarrollado procedimientos para aislar y expandir estas células progenitoras derivadas de epitelio. Cuando se cultivan *in vitro*, estos progenitores producen células formadoras de neuroesferas (NSFC) que tienen el potencial de diferenciarse a lo largo de varios linajes neuronales en respuesta a señales morfogénicas.

[0232] En el presente documento se describe estudios dirigidos a optimizar las condiciones para la diferenciación de estas células en neuronas dopaminérgicas y para determinar si estas células restringidas se pueden utilizar para la terapia celular en un modelo *in vivo* de enfermedad neurológica (por ejemplo, la enfermedad de Parkinson). Las NSFC se cultivaron en medio definido y se trataron con Sonic hedgehog (Shh), un factor de regulación aguas arriba para la formación de neuronas dopaminérgicas, en presencia o ausencia de agentes conocidos por actuar o sospechosos de actuar como promotores de crecimiento durante la neurogénesis del SNC: ácido retinoico (RA) y/o forskolina (FN). Los factores de transcripción, *nurr1*, *pitx3* y *Imx1a*, que promueven el desarrollo neuronal dopaminérgico en ratones y/o pollos embrionarios, se emplearon para modular la restricción de linaje de SNCF.

[0233] Se transfectaron cuatro vectores de expresión, pIRES-pitx3-nurr1, pLNCX2-pitx3, pLNCX2-nurr1 y pLNCX2-*Imx1a* en las NSFC. Se aplicó G418 para seleccionar poblaciones transfectadas de forma estable. La expresión de los factores de transcripción y el precursor de dopamina tirosina hidroxilasa (TH) se detectó en las líneas celulares transfectadas incluso después de un período de selección de 4 meses. El inmunoensayo enzimático de dopamina (EIA) se utilizó para detectar la producción de dopamina por cada una de las líneas. Estos resultados sugieren que los progenitores derivados del epitelio olfativo transfectados se pueden restringir hacia un linaje dopaminérgico. Los efectos de la modificación genética combinada con la exposición a Shh, RA y FN condujeron a mejorar aún más la expresión dopaminérgica estable a largo plazo. En estas condiciones, se detectó dopamina intracelularmente, así como en el medio agotado concentrado después del cultivo con las líneas celulares específicos, lo que indica que los progenitores produjeron y liberaron dopamina.

[0234] La enfermedad de Parkinson (EP), que se caracteriza por una extensa pérdida de neuronas dopaminérgicas (DA) en una región del cerebro medio llamada sustancia negra (SN), sigue siendo una de las principales causas de discapacidades neurológicas crónicas. Los esfuerzos recientes para tratar la EP han comenzado a considerar la terapia de reemplazo celular. Inicialmente, se empleó el trasplante neural de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas fetales ventrales (VM), produciendo un resultado positivo que fue acompañado con disquinesia en algunos pacientes. La búsqueda de una fuente más ideal de las neuronas dopaminérgicas está en curso.

[0235] Las células madre con su capacidad ilimitada para la auto-renovación y la capacidad de madurar en una variedad de tipos celulares ofrecen un potencial para la terapia de reemplazo celular. El epitelio olfativo es una fuente de progenitores neurales que se pueden recoger endoscópicamente de un paciente de EP sin cirugía invasiva perjudicial, y por lo tanto se pueden utilizar para proporcionar progenitores autólogos para el trasplante. Una fuente autóloga proporciona histocompatibilidad total y evita la necesidad de inmunosupresión.

[0236] Por lo tanto, el uso de progenitores derivados del epitelio olfativo, incluyendo, pero no limitado a progenitores derivados de epitelio olfativo humano y/o humano adulto como una posible terapia celular para la EP tiene varias ventajas únicas: estas células pueden recogerse sin cirugía muy invasiva, proporcionan una población autóloga que no requeriría agentes inmunosupresores; eliminan la búsqueda y el tiempo requerido para encontrar tejido histocompatible disponible, y evitan las preocupaciones éticas asociadas con los tejidos de embriones humanos. Los resultados descritos en este documento indicaban que la expresión de genes específicos y tratamiento morfogénico pueden mejorar significativamente la restricción de linaje de células progenitoras derivadas de epitelio olfativo humano hacia neuronas dopaminérgicas.

[0237] También se describe en este documento el descubrimiento de que la sobreexpresión de *pitx3* o *nurr1* promovía la expresión de fabricante del marcador TH de neuronas DA *in vitro*. Las líneas de NSFC que fueron transfectadas de manera estable con *pitx3* o *nurr1* se mantuvieron sanas y positivas de TH después de 6 meses de almacenamiento criogénico en nitrógeno líquido.

[0238] Además, se evaluó también la detección directa de la producción de dopamina. Los lisados de NSFC transfectadas con *pitx3* o *nurr1* eran dopaminérgicos tal como se determina por análisis EIA de dopamina. Si bien no

se desea estar ligado por ninguna teoría particular de operación, estos resultados indicaban que los factores de transcripción, pitx3 y nurr1, pueden participar en la producción de dopamina en progenitores derivados de epitelio olfativo humano adulto, potencialmente mediante la colaboración en la inducción de una mayor eficacia de la producción de dopamina en la maduración de neuronas DA en el cerebro medio.

**[0239]** Los estudios descritos en este documento demostraron que la transfección simultánea de pitx3 y nurr1 en las NSFC produjo mayores niveles de expresión de TH y producción de dopamina que la transfección de cualquiera de estos genes por sí solos. Se evaluó el efecto de la transfección sobre el nivel del precursor (TH) y los niveles intracelular y extracelular finales de dopamina para confirmar y comparar la eficacia de las diferentes líneas de NSFC transfectadas.

**[0240]** Tal como se describe en el presente documento, pitx3 y nurr1 indujeron cooperativamente la maduración de las neuronas DA. Esto demostró la viabilidad de la modificación genética de los progenitores derivados de epitelio olfativo humano adulto para promover la generación de neuronas DA y se apoyó la noción de que la coexpresión de pitx3 y nurr1 puede mejorar la restricción de linaje de células progenitoras humanas hacia neuronas dopaminérgicas, que pueden entonces emplearse en paradigmas de reemplazo celular para el tratamiento de EP, entre otras aplicaciones.

**[0241]** El tratamiento con morfógenos aumenta los niveles intracelulares y extracelulares de dopamina. Como se describe en este documento, se aplicó una combinación de Shh muy purificado, RA, y FN a las NSFC de linaje restringido. El nivel intracelular de la dopamina se incrementó significativamente mediante este tratamiento. Además, después de un tratamiento de 4 días de RA1FN5Shh, los niveles de dopamina en el medio condicionado agotado mejoraron de forma significativa, lo que indica que los morfógenos promovieron la liberación de dopamina, que es de interés para estudios de trasplante en NSFC de linaje restringido en un modelo de EP. Entre las 4 líneas de NSFC restringidas de linaje, las células transfectadas con pIRES-pitx3-nurr1 produjeron y liberaron los niveles más elevados de dopamina en presencia de Shh, RA y FN. Este resultado es consistente con el análisis de las células de linaje restringido en ausencia de tratamiento con los morfógenos.

**[0242]** Estos datos apoyan aún más la conclusión de que las NSFC transfectadas con pIRES-pitx3-nurr1 son la línea más eficiente en los estudios de producción de dopamina hasta la fecha, y por lo tanto son candidatos probables para el injerto en un modelo animal de enfermedad de Parkinson. La distribución local de los morfógenos Shh, RA, y FN in situ debe influir en las NSFC injertadas y puede soportar su diferenciación, la supervivencia y la producción de dopamina después de un trasplante. El nivel más alto de liberación de dopamina después del tratamiento con Shh, RA, y FN sugiere un papel en la terapia celular para la EP, ya que demuestra la capacidad potencial de las NSFC para responder a los factores dirigidos a sitio. Los resultados de los presentes estudios que utilizan la transfección y los morfógenos de este modo apoyan el potencial de progenitores neurales como terapia celular en el tratamiento de la EP, entre otros trastornos.

**[0243]** Mejora en modelo animal de Parkinson. Tal como se describe en este documento, los animales injertados con NSFC transfectadas con pIRES-pitx3-nurr1 mostraron una mejoría en el modelo de comportamiento rotacional inducido por 6-OHDA/anfetamina, que ha sido empleado como un modelo animal de enfermedad de Parkinson. El injerto de NSFC transfectadas dio como resultado que más del 30% de los animales injertados en el haz medial del cerebro anterior (MFB) o en el cuerpo estriado muestran mejora en este modelo de EP, apoyando el injerto de NSFC en sujetos con EP la mejora de sus síntomas.

**[0244]** Supervivencia a largo plazo de las NSFC injertadas. También se examinaron los animales injertados con NSFC para la supervivencia a largo plazo de las NSFC injertadas. Tal como se describe en el presente documento, las NSFC injertadas permanecieron intactas y positivas de TH para un mínimo de tres meses in vivo. Esto indica que las NSFC injertadas pueden sobrevivir después del injerto a largo plazo, lo que podría ser beneficioso en el tratamiento de sujetos con trastornos neurológicos, ya que el injerto de NSFC a largo plazo reduciría o eliminaría la necesidad de realizar múltiples injertos.

**[0245]** En este documento se proporcionan líneas de NSFC que pueden tener utilidad terapéutica en las estrategias para el tratamiento de pacientes con trastornos neurológicos, incluyendo, pero no limitado a, EP. La viabilidad y estabilidad in vivo son de interés, especialmente teniendo en cuenta la posibilidad de que con el tiempo la población injertada pueda morir y haya que sustituirlo. Por lo tanto, como se describe en el presente documento, se llevaron a cabo experimentos para determinar la estabilidad y viabilidad de soluciones madre congeladas de células transfectadas. Las NSFC sobrevivieron bajo la presión de selección después de la extracción de almacenamiento criogénico y mantuvieron su capacidad de expresar TH, así como de producir y liberar dopamina, lo que destaca el potencial único de estos progenitores para servir como una fuente de células autólogas para las estrategias basadas en células para el tratamiento a largo plazo de la enfermedad de Parkinson y otros trastornos neurológicos.

#### REFERENCIAS

**[0246]** Las referencias que figuran a continuación, así como todas las referencias citadas en la memoria, incluyendo patentes, solicitudes de patentes, artículos de revistas, y todas las entradas de base de datos (por ejemplo,



GenBank® Nos. de acceso, incluyendo cualquier anotación que se presenta en la base de datos de GenBank® que esté asociada con las secuencias descritas) explican, proporcionan una base para, o enseñar metodología, técnicas y/o composiciones empleadas en el presente documento.

- 5 Anderson & Caldwell (2007) *Neurobiol Dis.* 27: 133-140.  
 Ausubel et al (2002 ) *Short Protocols in Molecular Biology*, quinta ed. Wiley, Nueva York, NY, Estados Unidos de América.  
 Ausubel et al. (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wylie & Sons, Inc., Nueva York, NY, Estados Unidos de América
- 10 Borlongan (2000) 9: 2319-2330.  
 Brederlau et al (2006) *Stem Cells.* 24: 1433-1440  
 Carter (1986) *Biochem J* 237: 1-7.  
 Daadi (2002) *Procedimientos MOLBIOL* 198: 265- 271.  
 Deumens et al (2002) *Exp Neurol* 175: 303-317
- 15 Doss et al (2004) *J Cell Mol Med* 8: 465-473  
 Dubois et al. (1990) *J Biol Chem.* 265: 2797-2803  
 Freed et al. (2001) *N Engl J Med* 344: 710-719  
 Freeman et al. (1995) *Ann Neurol.* 38: 379-388  
 Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- 20 Harlow y Lane (1999) *Using antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.  
 Hornykiewicz (1973a) *Br Med Bull* 29: 172- 178.  
 Hornykiewicz (1973b) *Fed Proc.* 32: 183-190
- 25 Lancu et al. (2005) *Behav Brain Res* 162: 1-10  
 Lang & Lozano (1998) *N Engl J Med* 339: 1044-1053  
 Li et al. (1997) *Science* 277: 2000-2002  
 Lindvall et al. (1988) *Lancet* 2: 1483-1484  
 Lindvall et al. (1992) *Ann Neurol* 31: 155- 165.
- 30 Lindvall et al. (2004) *Nat Med* 10 Suppl: S42-50  
 Madrazo et al. (1988) *N Engl J Med* 318: 51  
 Marshall et al. (2006) *Histol Histopathol.* 21: 633-643  
 Méndez et al. (2005) *Brain* 128: 1498-1510  
 Metz et al. (2005) *Eur J Neurol.* 22: 735-744
- 35 Milijan et al. (2009) *Stem Cells Devel.* 18: 307-320  
 Olanow et al. (2003) *Ann Neurol.* 54: 403-414  
 Olsson et al. (1995) *J Neurosci* 15: 3.863-3875  
 Othman et al. (2005a) *Biotech Histochem.* 80: 177-188  
 Othman et al. (2005b) *Biotech Histochem* 80: 189-200
- 40 Paxinos y Watson (1998) *The Rat Brain (Cuarta edición)*, Academic Press, New York, New York, Estados Unidos de América  
 Publicación de la Solicitud de Patente Internacional PCT N° WO 2003/064601; WO 2008/027848.  
 Redmond et al. (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 12175-12180  
 Roisen et al. (2001) *Brain Res* 890: 11-22
- 45 Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York  
 Schade y Hlinak (1996) *ALTEX* 13: 5 -9  
 Snyder y Olanow (2005) *Curr Opin Neurol.* 18: 376-385  
 Sonntag et al. (2005) *Brain Res Mol Brain Res* 134: 34-51
- 50 Stahel (2006) *Newron Pharmaceut Ann Rep* 2006.  
 Tian et al. (1999) *J Mol Cell Cardiol* 31: 751- 760.  
 Tijssen (ed.) (1993) *Laboratory Techniques in Biochemists and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I Theory and Nucleic Acid Reparatión*, Elsevier Press, Nueva York, Nueva York, Estados Unidos de América
- 55 Patentes de Estados Unidos Nos. 5.648.235; 5.660.827; 5.733.876; 5.753.230; 5.762.918; 5.766.591; 5.776.427.  
 Wells et al. (1985) *Gen* 34: 315-23  
 Winstead et al. (2005) *Am J Rhinol.* 19: 83-90  
 Woodlee et al. (2008) *Exp Neurol* 211: 511-517  
 Zhang et al. (2004) *Exp Neurol* 186: 112-123
- 60 Zhang et al. (2006) *Brain Res* 1073-1074: 109-119  
 Zhou et al. (1990) *Mol Cell Biol.* 10: 4529-4539  
 Zoller y Smith (1987) *Meth Enzymol* 154: 329-50.

65 **[0247]** Se entenderá que se pueden modificar diversos detalles de la materia aquí descrita sin apartarse del alcance de la materia aquí descrita. Además, la descripción anterior es para fines ilustrativos únicamente, y no para fines limitativos.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento *in vitro* para producir una neurona dopaminérgica recombinante, comprendiendo el procedimiento:
  - (a) proporcionar células madre derivadas de epitelio olfativo adulto; y
  - (b) introducir uno o más transgenes en las células madre derivadas de epitelio olfativo adulto, en el que dicho uno o más transgenes codifican una combinación de un polipéptido nurr-1 y un polipéptido pitx3; mediante el cual se produce una neurona dopaminérgica recombinante.
2. Procedimiento *in vitro*, según la reivindicación 1, en el que dicho uno o más transgenes codifican una combinación de un polipéptido nurr-1, un polipéptido pitx3 y un polipéptido lmx1a.
3. Procedimiento *in vitro*, según la reivindicación 1 ó 2, en el que la combinación de polipéptidos es codificada por un único transgén.
4. Procedimiento *in vitro*, según la reivindicación 1 ó 2, en el que la combinación de polipéptidos es codificada por más de un transgén.
5. Procedimiento *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la célula madre derivada de epitelio olfativo adulto es de un cadáver.
6. Procedimiento *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la célula madre derivada de epitelio olfativo adulto se ha obtenido de un donante vivo.
7. Procedimiento *in vitro*, según la reivindicación 6, en el que el donante vivo es un sujeto que tiene un trastorno neurológico.
8. Procedimiento *in vitro*, según la reivindicación 7, en el que el trastorno neurológico es la enfermedad de Parkinson.
9. Procedimiento *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células madre derivadas de epitelio olfativo adulto son células madre derivadas de epitelio olfativo adulto humano y en el que al menos uno del polipéptido nurr-1, el polipéptido pitx3, el polipéptido lmx1a, o la combinación de los mismos, son de una especie diferente al ser humano.
10. Procedimiento *in vitro*, según la reivindicación 9, en el que el polipéptido pitx3 es un polipéptido pitx de rata.
11. Procedimiento *in vitro*, según la reivindicación 9, en el que el polipéptido lmx1a es un polipéptido lmx1a de ratón; o el polipéptido nurr-1 es un polipéptido nurr-1 de ratón.
12. Procedimiento *in vitro*, según la reivindicación 9, que comprende además cultivar las células madre derivadas de epitelio olfativo adulto antes, durante y/o después de la etapa de introducción, en medio que comprende un polipéptido Sonic hedgehog (Shh) o un fragmento biológicamente activo del mismo, ácido retinoico (RA) o un fragmento biológicamente activo del mismo, forskolina (FN) o un fragmento biológicamente activo del mismo, o cualquier combinación de los mismos, en condiciones suficientes para inducir la diferenciación neuronal en las células madre derivadas de epitelio olfativo adulto.
13. Procedimiento *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la neurona dopaminérgica recombinante es para el trasplante en un sujeto que tiene un trastorno neurológico.
14. Procedimiento *in vitro*, según la reivindicación 13, en el que el trastorno neurológico es la enfermedad de Parkinson.
15. Procedimiento *in vitro*, según la reivindicación 13, en el que, después del trasplante, la neurona dopaminérgica recombinante induce el crecimiento y/o la regeneración de una o más neuronas endógenas en el sujeto.

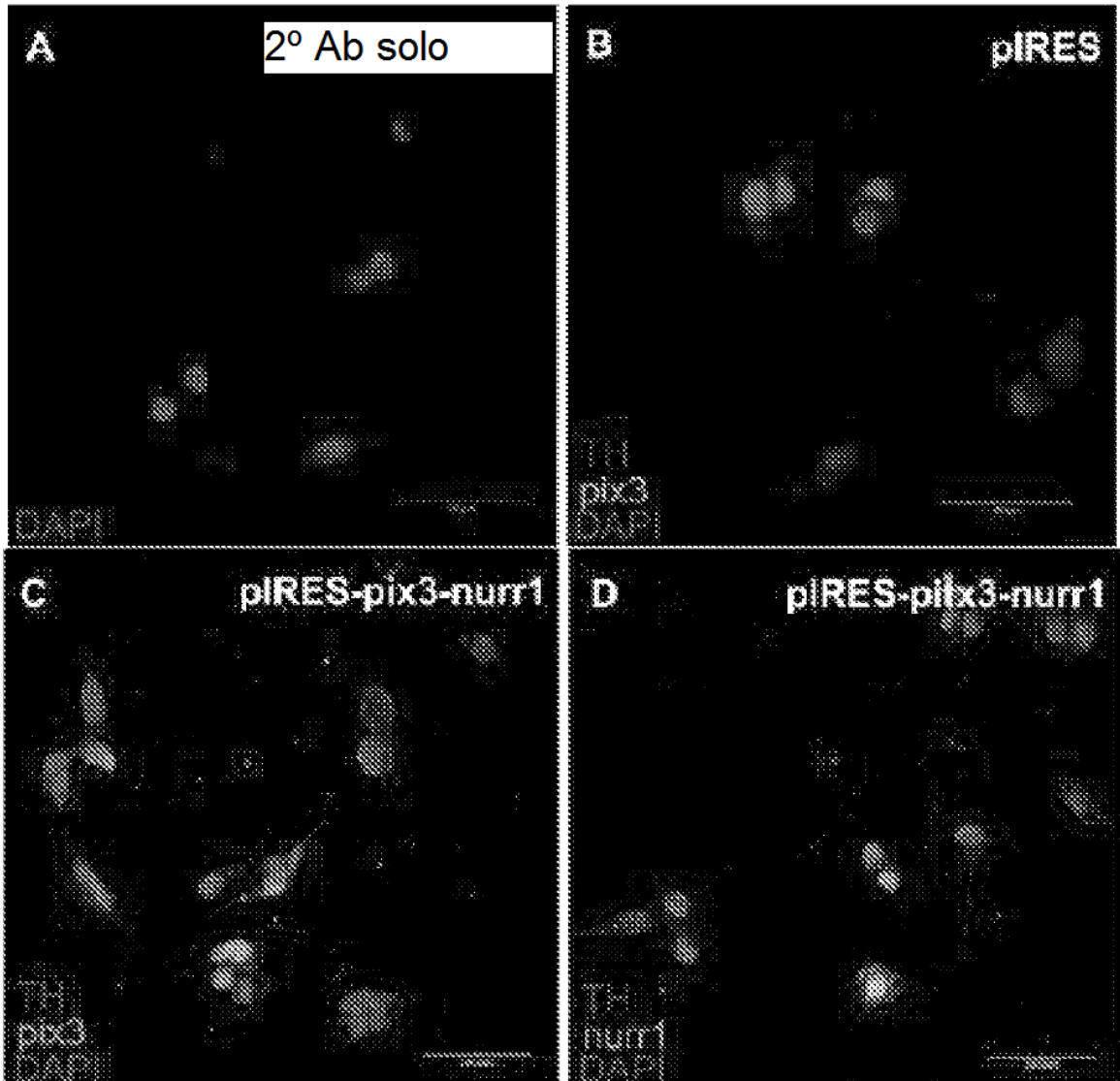


FIGURA 1

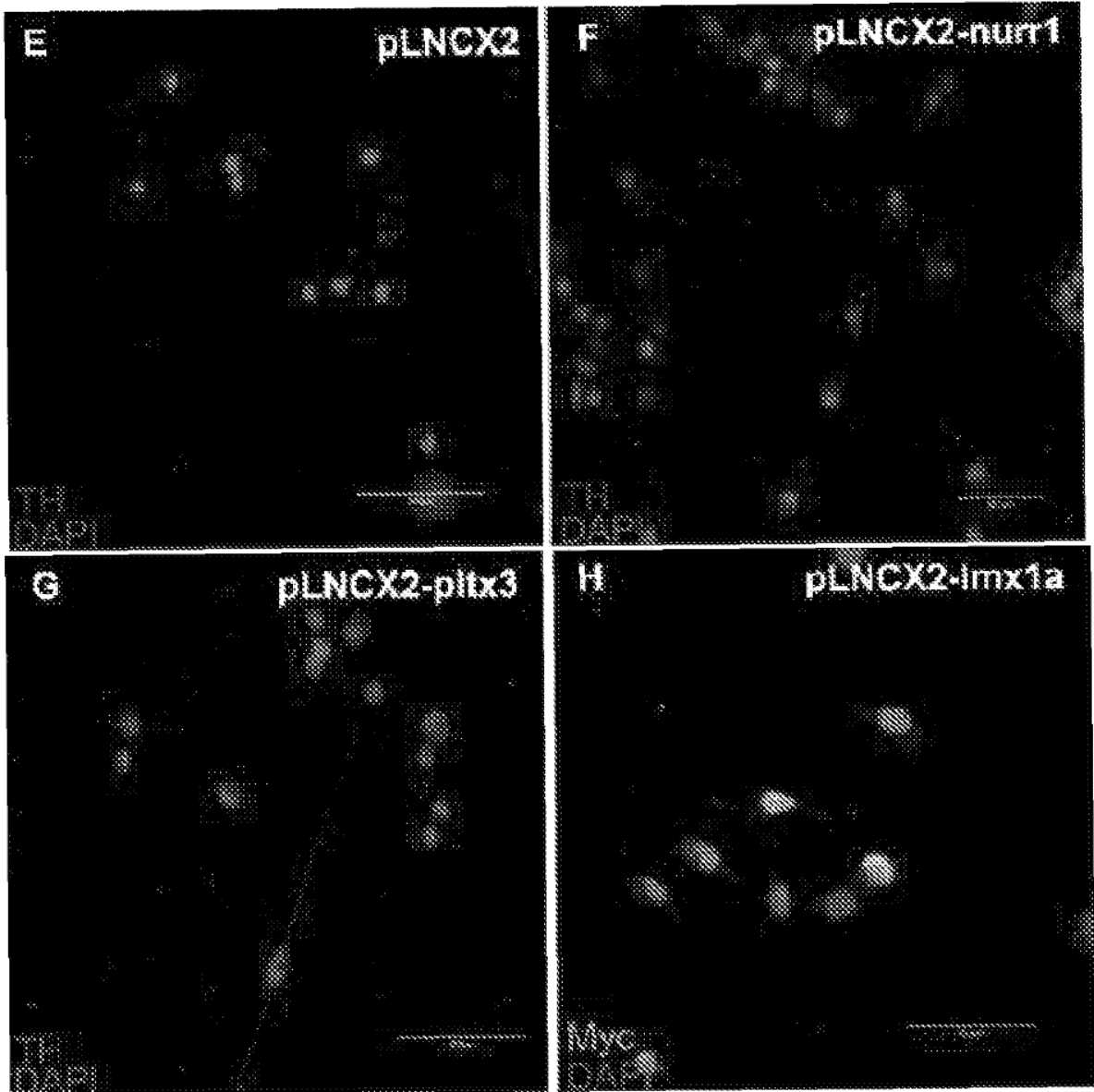


FIGURA 1 (continuación)

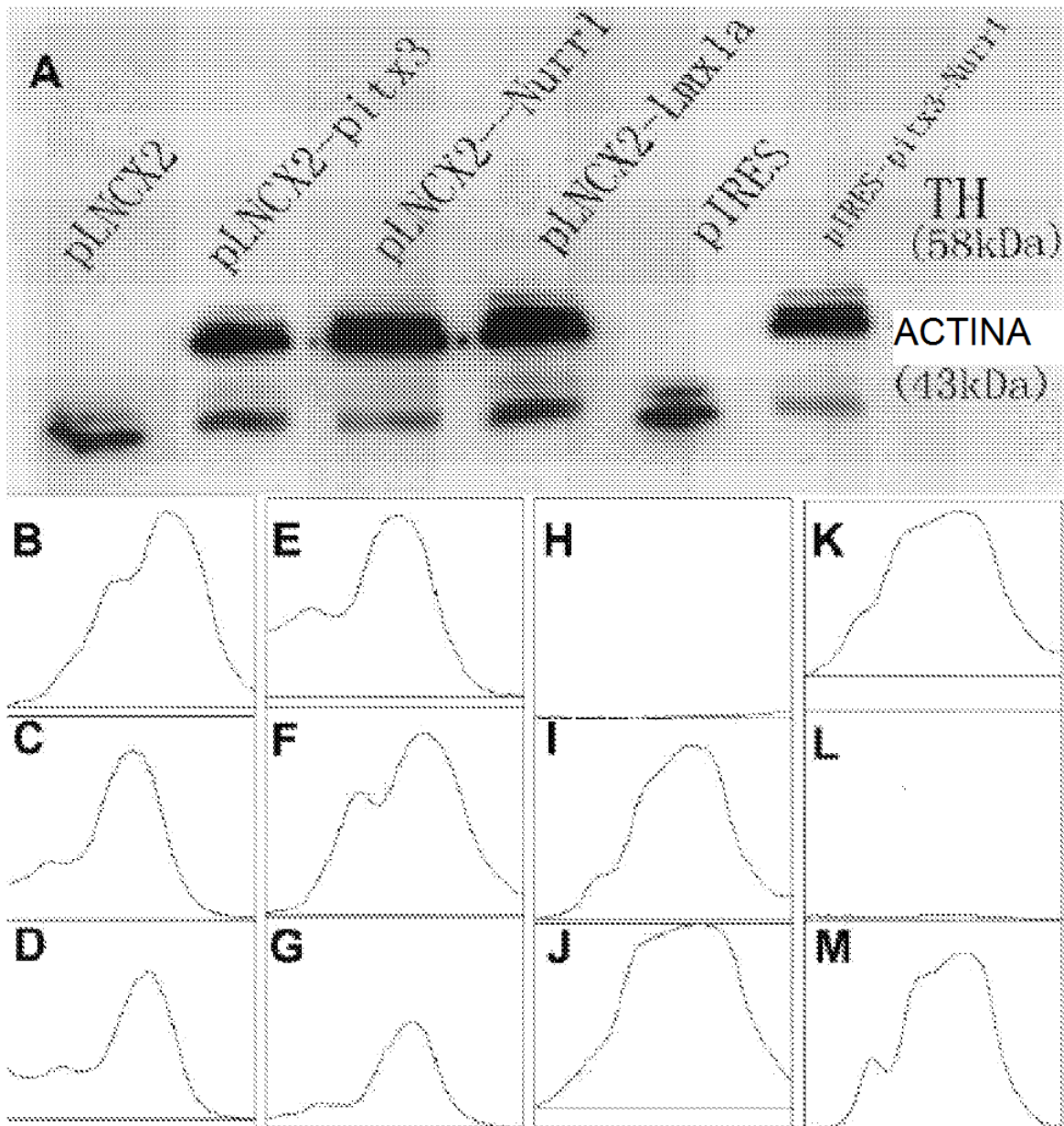


FIGURA 2

**N**

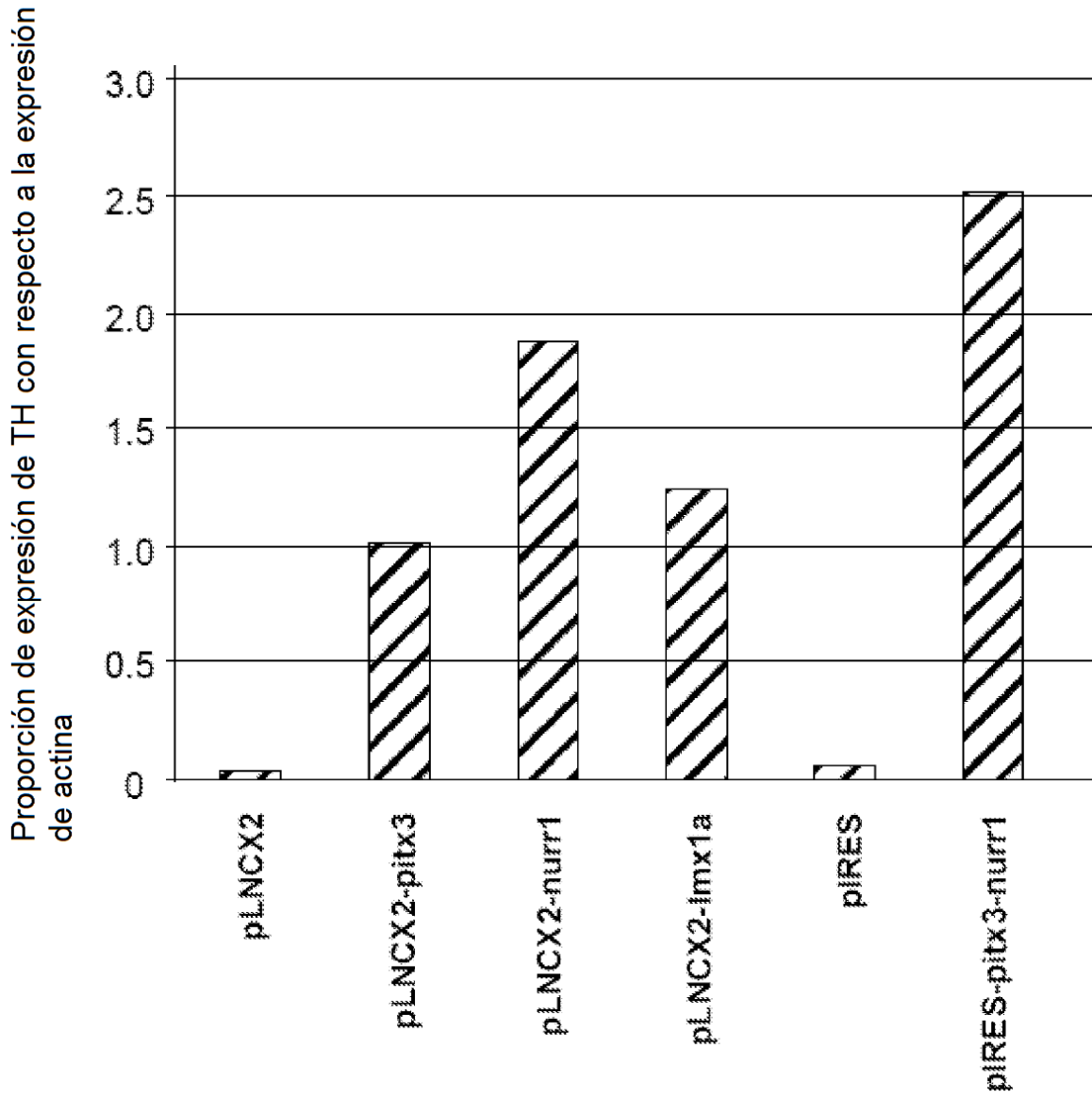


FIGURA 2(continuación)

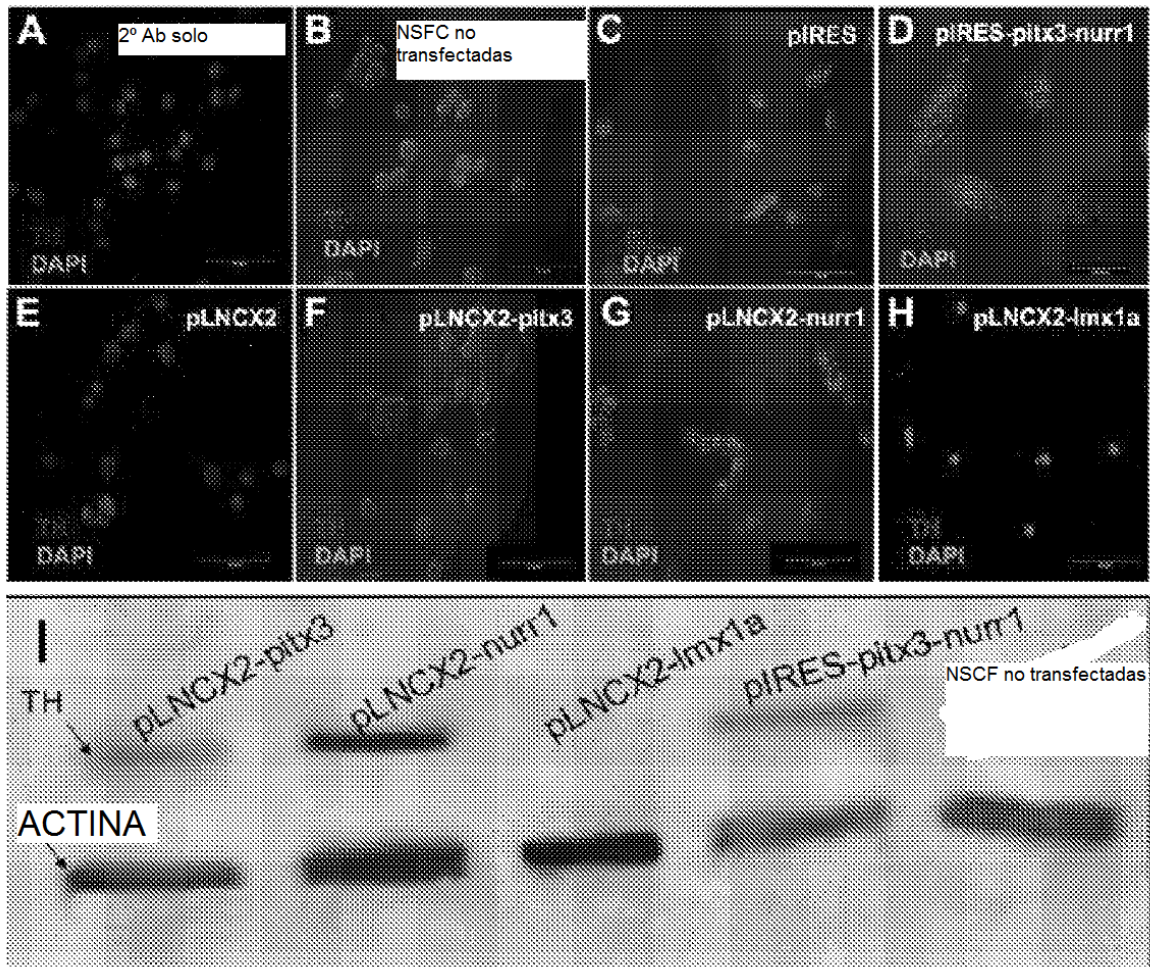


FIGURA 3

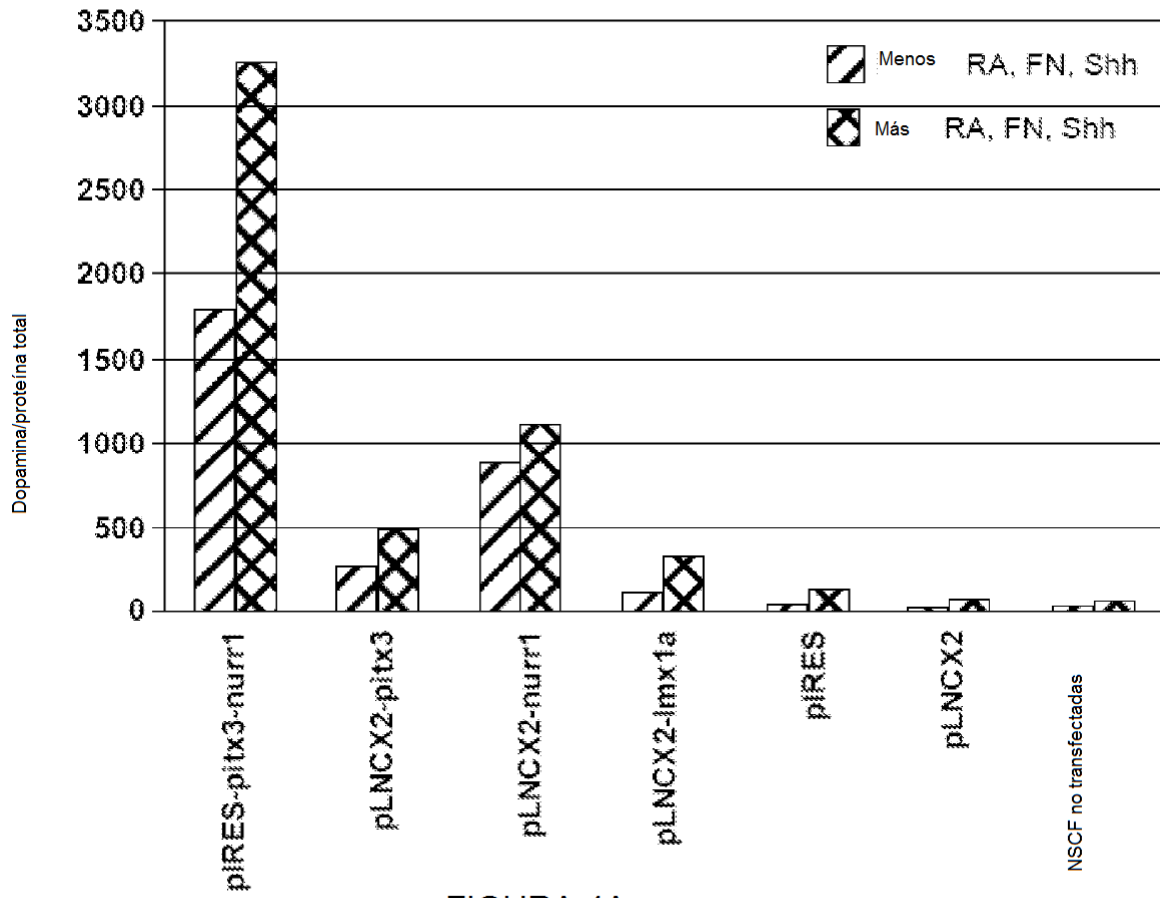


FIGURA 4A



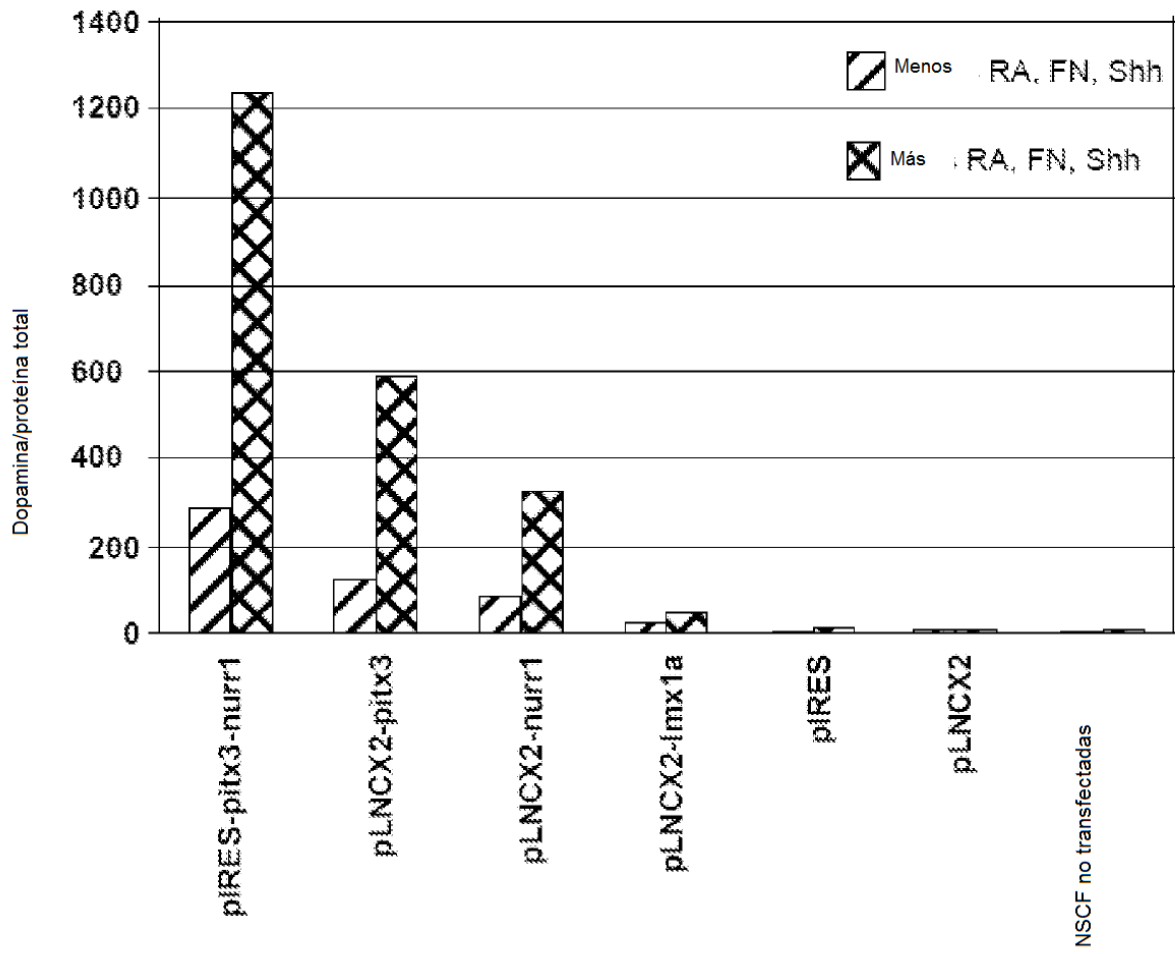
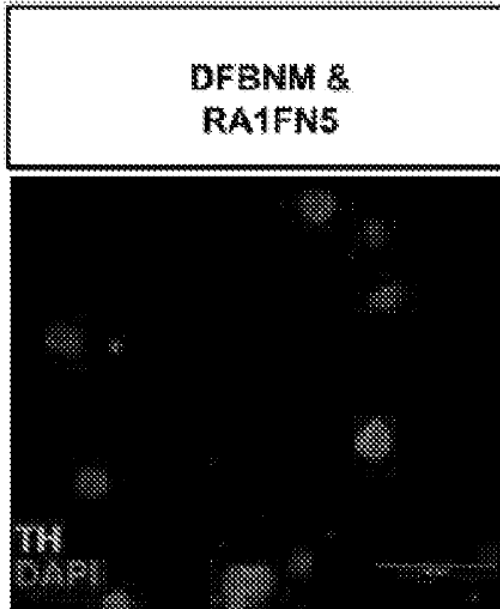
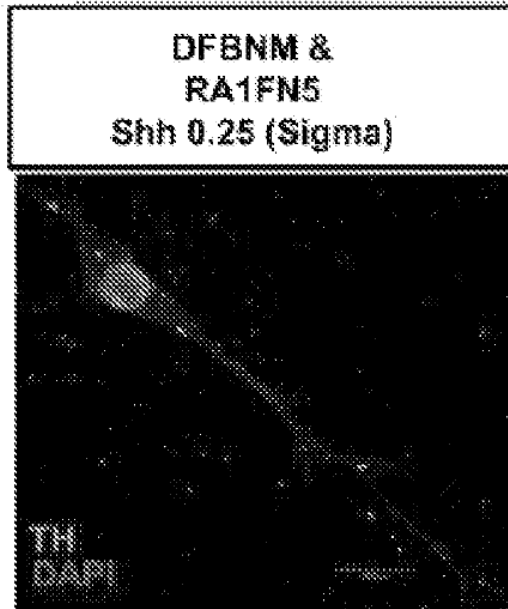


FIGURA 4B

**A**



**B**



**C**

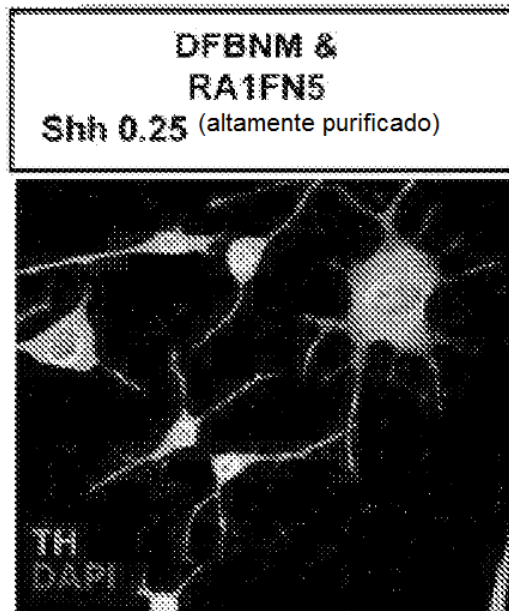


FIGURA 5

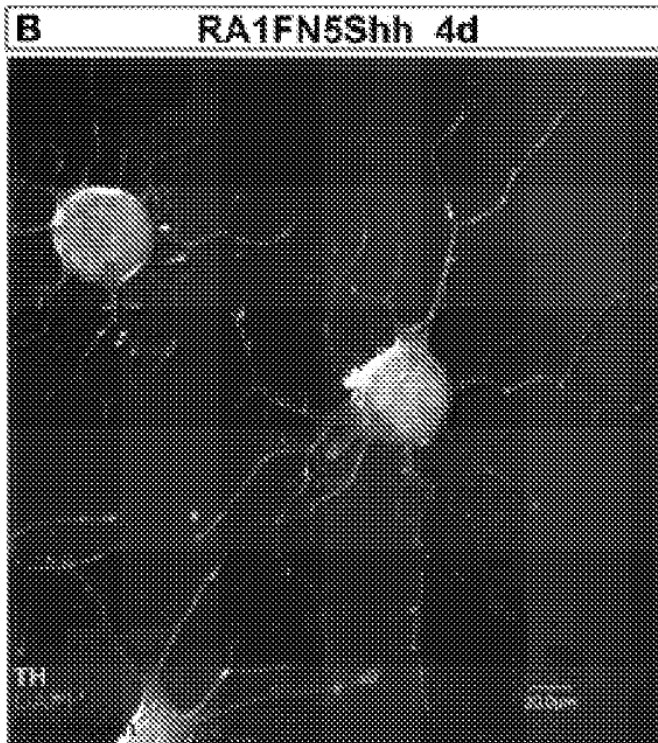
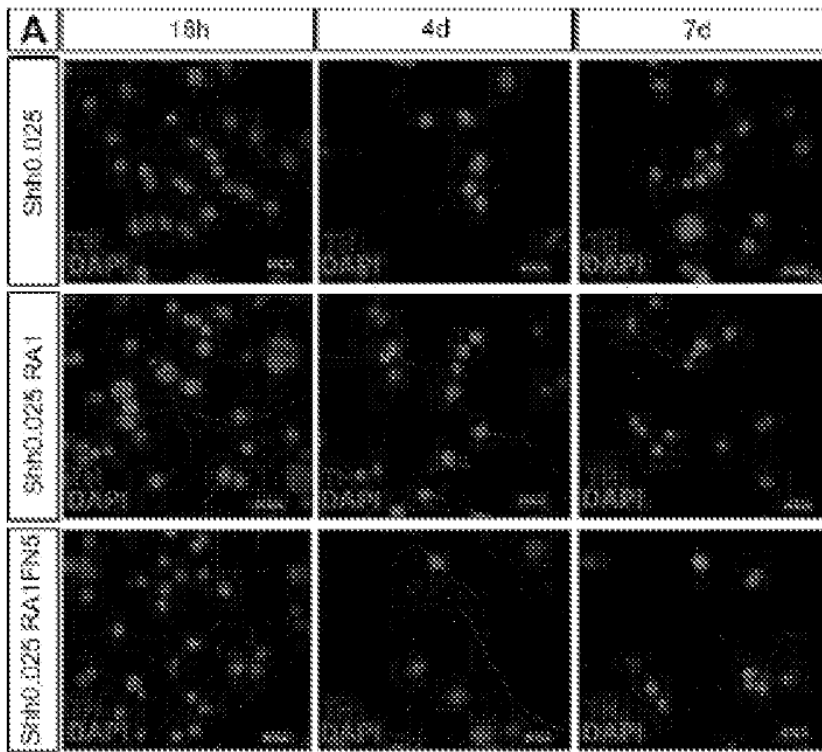


FIGURA 6

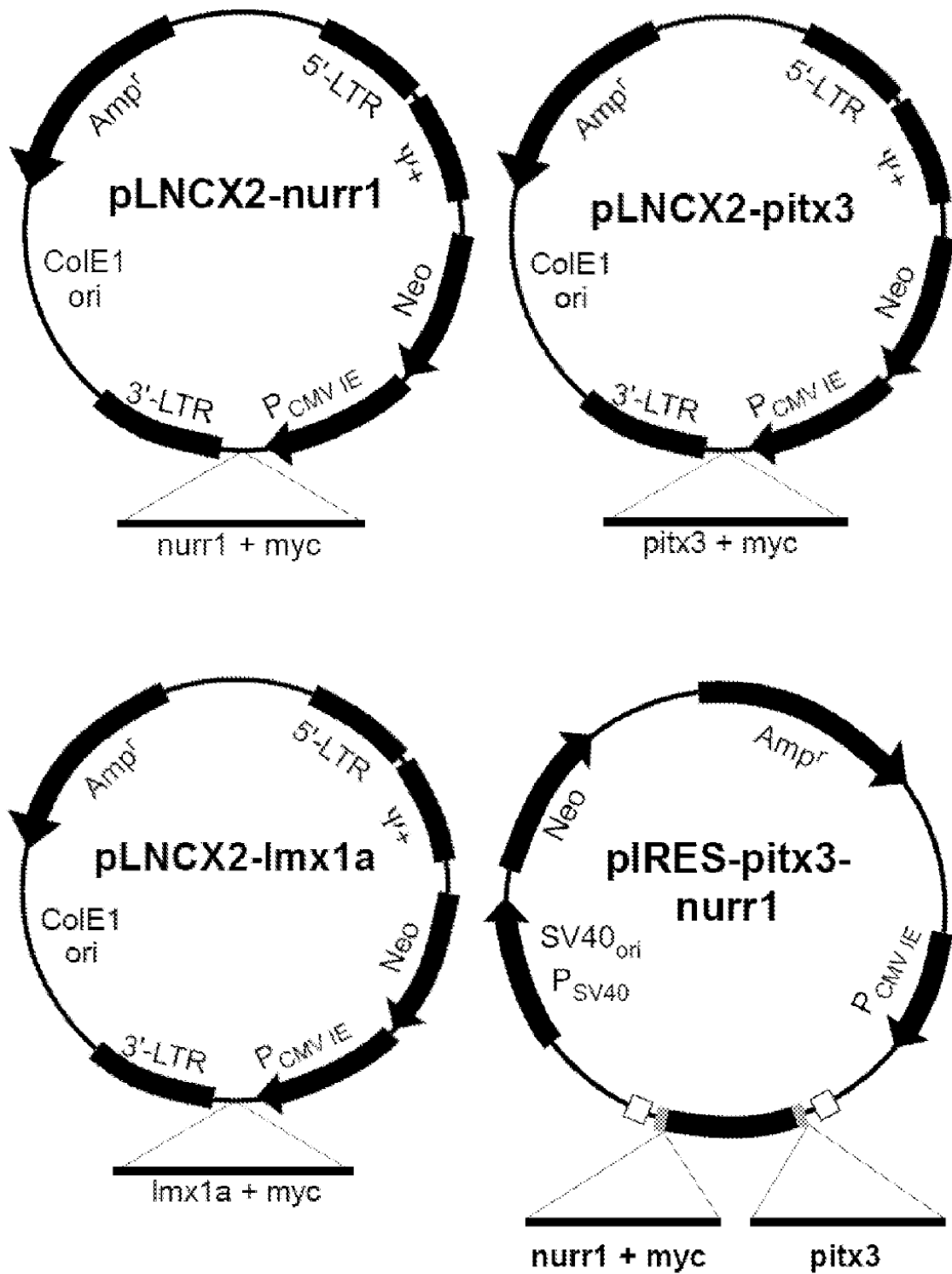


FIGURA 7

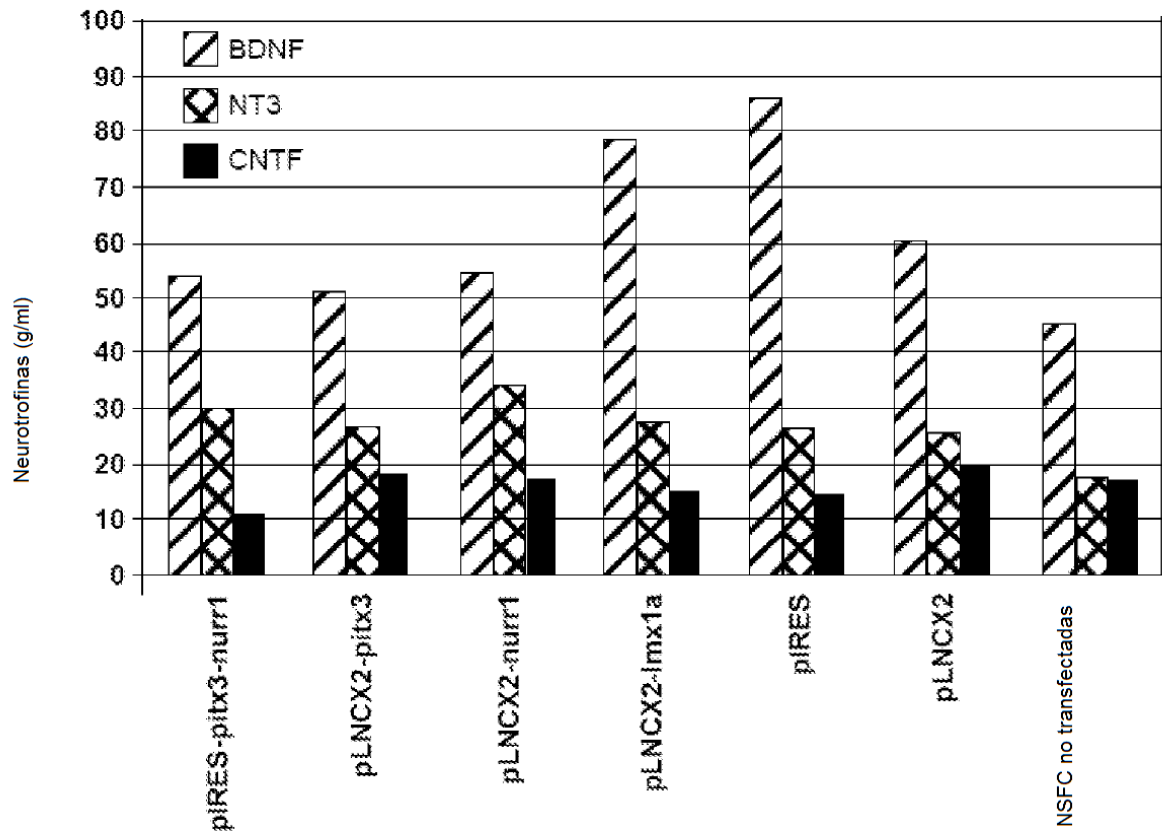
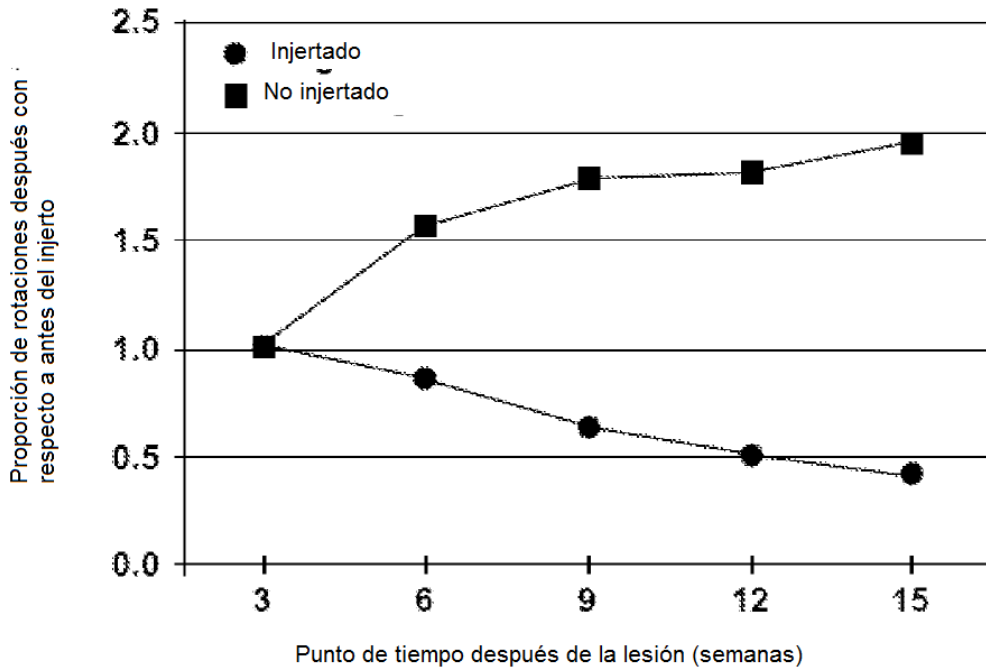


FIGURA 8

**A**

ANÁLISIS DE PRUEBA ROTACIONAL PARA EL MODELO DE ESTRIADO



**B**

ANÁLISIS DE PRUEBA ROTACIONAL PARA EL MODELO DE MFB

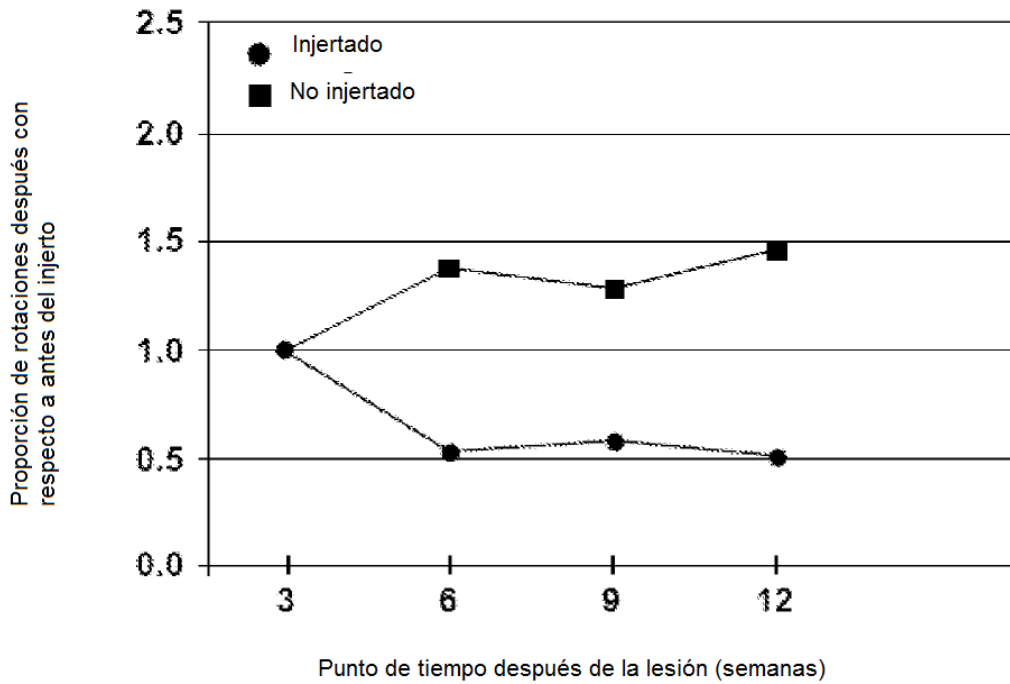


FIGURA 9

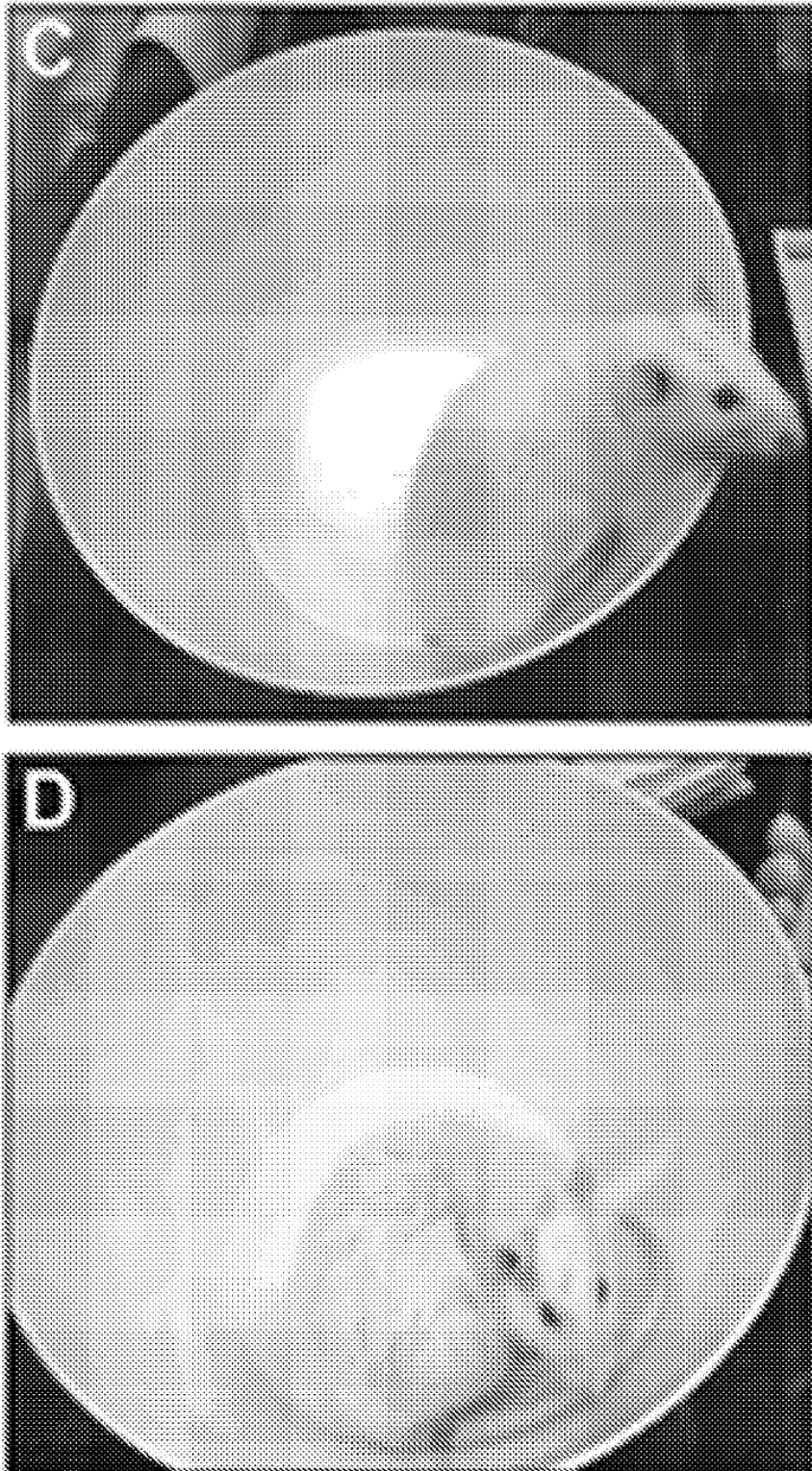


FIGURA 9 (continuación)

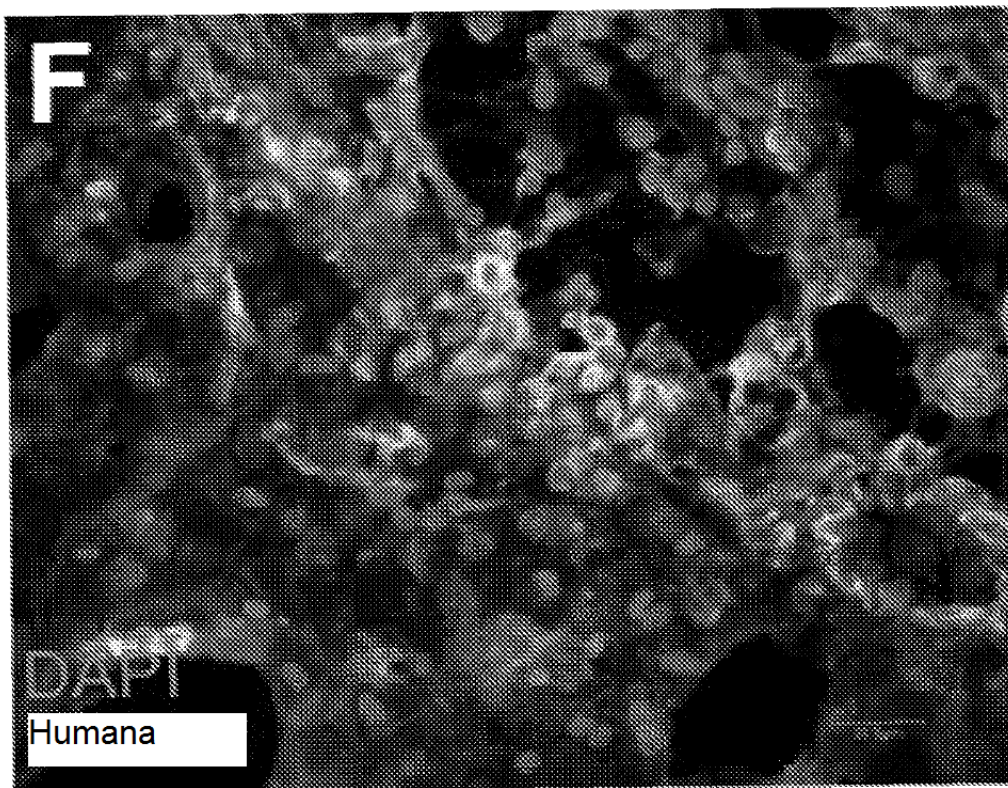
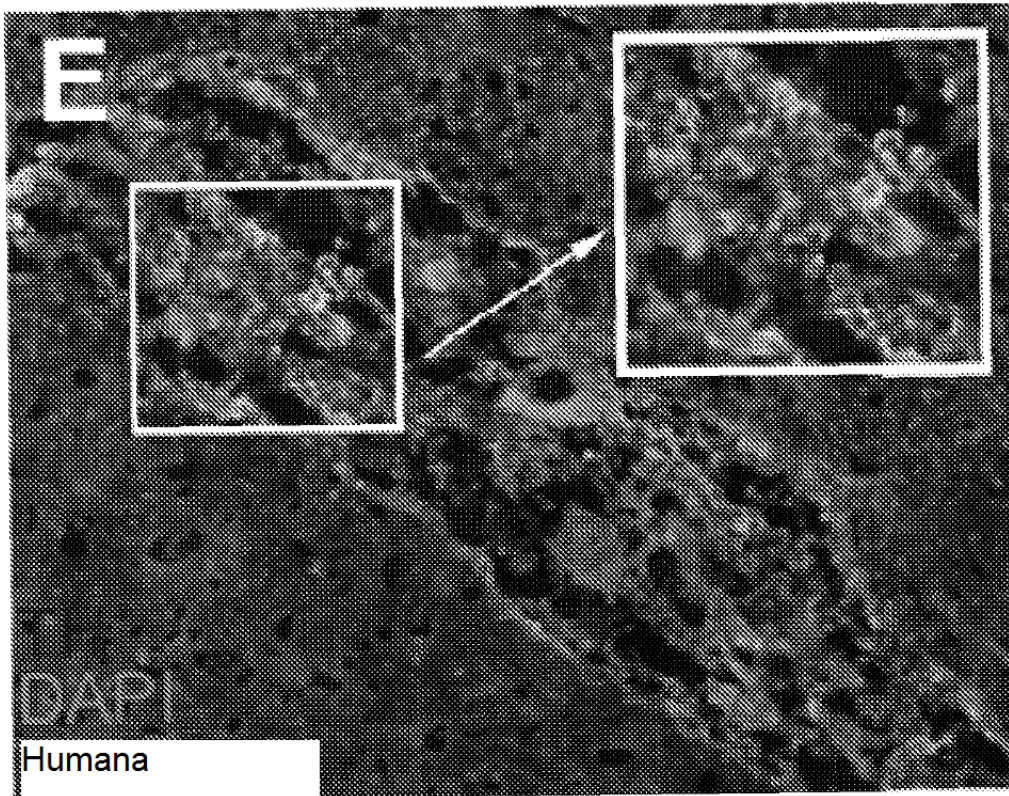


FIGURa 9 (continuación)