

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 837**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0797 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2011 E 11743246 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2606126**

54 Título: **Transformación de células somáticas en células madre neuronales reprogramadas inducidas (IRNSCS)**

30 Prioridad:

19.08.2010 EP 10173455

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

29.08.2016

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CHRISTENSEN, KLAUS;
GRAF, MARTIN;
IACONE, ROBERTO y
JAGASIA, RAVI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 580 837 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

Transformación de células somáticas en células madre neuronales reprogramadas inducidas (IRNSCS)

- 5 La presente solicitud se refiere a un método para transformar células somáticas en Células Madre Neuronales (NSC, acrónimo de *Neural Stem Cells*). Además, la presente solicitud se refiere a un método para transformar fibroblastos humanos, queratinocitos o adipocitos en células madre neuronales basándose en etapas relacionadas de transducción de genes e inducción en medio químicamente definido.
- 10 El dogma de que las células somáticas completamente diferenciadas tienen propiedades absolutamente irreversibles se aceptó en general durante mucho tiempo. Esto empezó a cambiar cuando una serie de experimentos pioneros mostró que los perfiles de expresión de genes silenciosos se pueden reactivar completamente por la fusión de diferentes pares de tipos celulares (Blau, H. M. How fixed is the differentiated state? *Lessons from heterokaryons*. *Trends Genet.* 5, 268-272 (1989)). Más recientemente se demostró que la
- 15 transferencia de núcleos de un tipo de célula somática en un óvulo enucleado podría dar lugar a la reversión completa del perfil de expresión genética de las células somáticas, y a la formación de un estado de célula pluripotente capaz de generar nuevos animales enteros (véase por ejemplo Gurdon, J. B. y Melton, D. A. Nuclear reprogramming in cells. *Science* 322, 1811-1815 (2008)). Yamanaka y colaboradores (Takahashi, K. y Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined
- 20 factors. *Cell* 126, 663-676 (2006)) demostraron que las células somáticas se pueden reprogramar a células madre pluripotentes inducidas (iPSC) por transducción de cuatro factores definidos (Sox2, Oct4, Klf4, c-Myc). Se han reprogramado diferentes tipos de células somáticas incluyendo fibroblastos, adipocitos y queratinocitos a un estado pluripotente de iPSC. Durante los últimos años surgió la pregunta de si algunos tipos de células somáticas específicas se podrían transdiferenciar a un tipo de célula somática completamente diferente, tal como
- 25 una neurona. Wernig y colaboradores abordaron esta cuestión que muestra la transformación directa de fibroblastos de ratón en neuronas funcionales por transducción de tres genes cruciales: Mash1, Brn2 y Myt1l (Wernig *et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 25; 463 (7284): 1035-41 (2010). Sin embargo, las neuronas obtenidas son células postmitóticas que, por definición, no son capaces de proliferar y que no toleran los procedimientos de congelación y descongelación. El documento
- 30 US2010/0021437 desvela un método para generar células madre pluripotentes inducidas a partir de fibroblastos y la inducción de esas células para diferenciarlas en fenotipos neuronales.

Sin embargo, la transformación directa de células somáticas diferenciadas en células madre neuronales no se ha descrito hasta el momento. Las células madre neuronales son células madre multipotentes y se informa que se

35 propagan en condiciones específicas. Estas requieren un medio químicamente definido, por ejemplo, medio N2B27 (N2B27 es una mezcla de DMEM/F12 a 1:1 (Gibco, Paisley, UK) complementado con N2 y B27 (ambos de Gibco)) complementado con FGF (factor 2 de crecimiento de fibroblastos) y EGF (factor de crecimiento epidérmico). Pueden crecer como un cultivo adherente monocapa, por ejemplo, en placa revestida con poliornitina/Lamina o como neuroesferas que flotan en placas de cultivo de células no adherentes. Se ha

40 informado que los dos tipos de cultivos de células madre neuronales (neuroesferas, cultivos adherentes) son completamente interconvertibles. Las células madre neuronales se pueden cultivar indefinidamente y aún permanecen verdaderamente multipotentes. Con respecto a las condiciones especiales, estas se diferencian en los tipos de células que componen el cerebro adulto, incluyendo neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Las células madre neuronales se consideran posibles agentes terapéuticos para el tratamiento de pacientes con

45 enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, apoplejía, y lesión de la médula espinal.

Se sabe que las células madre neuronales se pueden generar *in vitro* a partir de Células Madre Embrionarias (ESC) (Chambers *et al.* *Nature* 27; 3 (2009)) o se pueden aislar directamente de muestras de cerebro (Reynolds BA, Rietze RL (2005) *Nat Methods* 2: 333-336). Sin embargo, estos métodos conocidos hasta ahora tienen muchos inconvenientes importantes ya que o bien plantean una serie de consideraciones éticas altamente

50 sensibles y/o requieren tecnologías complicadas y laboriosas que sufren de serios problemas con la reproducibilidad. Hasta el momento no se ha descrito ningún método en el que las células madre neuronales se puedan derivar de directamente de células somáticas diferenciadas. En principio, las células madre neuronales se podrían obtener a partir de iPSC que se han derivado de las células diferenciadas. Sin embargo, esto podría implicar el cultivo de iPSC. Se ha informado que las iPSC se expanden de forma indefinida, pero las condiciones de cultivo son complicadas y requieren enormes esfuerzos. Además, se ha informado que la derivación de células madre neuronales a partir de células madre pluripotentes fluctúa debido a mecanismos estocásticos. Un

55 obstáculo común de las iPSC y las ESC es que incluso un pequeño número de células no diferenciadas puede dar como resultado la formación de teratomas (tumores de células germinales que comprenden varios tipos de células), que generan contaminaciones graves que no se pueden ignorar. Las células madre somáticas, tales como células madre neuronales no forman teratomas. Por lo tanto sigue existiendo una necesidad de una tecnología de fácil acceso y reproducible para la generación de células madre neuronales. La presente invención proporciona un método para transformar células somáticas directamente en células madre neuronales. El nuevo

60 método alivia la necesidad de obtener células iPS y, por lo tanto elimina el riesgo de formación de teratomas. Tales células sin la capacidad de formar teratomas son útiles y seguras para aplicaciones en medicina

65

regenerativa. Preferentemente, dichas células somáticas son células somáticas de mamífero, más preferentemente células somáticas humanas. Dichas células somáticas humanas se pueden obtener a partir de un individuo sano o de un paciente. Preferentemente, dichas células somáticas son células de fibroblastos, adipocitos o queratinocitos, más preferentemente células de fibroblastos. Dichas células de fibroblastos, adipocitos o queratinocitos se pueden derivar de forma fácil y segura de un paciente o individuo sano, por ejemplo, con métodos no invasivos tales como biopsia de piel o de cabello arrancado. El método de la presente invención permite transformar células somáticas, tales como células de fibroblastos, adipocitos o queratinocitos de individuos sanos o enfermos directamente en células madre neuronales. Estas células madre neuronales específicas de individuos o pacientes sanos se pueden expandir de forma indefinida. El cultivo es fácil y está bien caracterizado. Es posible congelar y descongelar de forma reproducible alícuotas de células madre neuronales específicas de individuos y pacientes. En particular, las derivadas células madre neuronales de paciente representan un modelo *in vitro* de enfermedad relevante para estudiar la patofisiología de enfermedades del SNC. La transformación de células somáticas específicas del paciente directamente en células madre neuronales representa una tecnología de fácil acceso y reproducible para generar BioBancos de células madre neuronales específicas de paciente. Los BioBancos de este tipo tienen gran importancia para enfermedades relacionadas con el SNC, ya que una patología clara se ha descrito en al menos uno de los tres tipos de células generadas a partir de las células madre neuronales: neuronas, oligodendrocitos y astrocitos. Por lo tanto, las células madre neuronales obtenidas con el método que se describe en el presente documento son modelos de enfermedad valiosos para identificar sistemáticamente fármacos eficaces y seguros.

Una diversidad de enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por pérdida de células neuronales. La capacidad de regeneración del cerebro adulto es bastante limitada en respuesta a lesión cerebral y enfermedades neurodegenerativas. Además, con frecuencia las intervenciones farmacológicas se vuelven cada vez menos eficaces a medida que las poblaciones de neuronas susceptibles se pierden de forma progresiva. Las células madre neuronales obtenidas con el método que se describe en el presente documento también se pueden usar en medicina regenerativa para tratar enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA/enfermedad de Lou Gehrig) o lesión de la médula espinal. Con el método innovador que se describe en el presente documento, ahora es posible proporcionar cantidades suficientes de células precursoras neuronales para uso en terapias de trasplante de células. Las células madre neuronales se pueden obtener un obtenidas partir de células somáticas aisladas de un individuo sano o de un paciente. Las células madre neuronales específicas de paciente obtenidas con el método que se describe en el presente documento son una fuente donante nueva y atractiva para terapias de trasplante de células autólogas, anulando de este modo cualquier rechazo inmune debido a la incompatibilidad inmunológica entre paciente y donante. Esta estrategia podría eliminar el requisito de inmunosupresores en terapia de trasplante de células. Por otra parte, la creación de bancos biológicos de células madre neuronales derivadas de individuos sanos con diversos alelos homocigotos para HLA se puede usar como bancos de donantes para el tratamiento de individuos con necesidad. El trasplante heterólogo de células madre neuronales con un tipo de HLA compatible reduce el riesgo de respuestas inmunes no deseadas que podrían conducir al rechazo de las células trasplantadas.

Para conseguir el avance importante de la invención que se describe en el presente documento, fue necesario evitar algunas de las limitaciones de reprogramación existentes, así como combinar la transducción de genes con el uso de una etapa de inducción con un medio específico.

En el presente documento se proporciona un método para transformar células somáticas en Células Madre Neuronales (NSC), comprendiendo dicho método las etapas de:

a) proporcionar células somáticas

b) reprogramar dichas células somáticas en células madre neuronales mediante la introducción de al menos dos genes e

c) inducir la reprogramación con factores de crecimiento y la molécula pequeña;
En una realización más, dicho método comprende adicionalmente

d) incubar el producto de la etapa b) y c) en condiciones adecuadas para proliferación de las células madre neuronales. Por lo general, el producto de la etapa b) y c) se puede identificar fácilmente en un cultivo celular como neuroesferas. Preferentemente, dichas condiciones adecuadas para proliferación de las células madre neuronales comprenden cosechar dichas neuroesferas y expandirlas en un medio químicamente definido. Preferentemente, dicho medio es un medio de expansión y las neuroesferas se cultivan en condiciones de cultivo no adherente. A continuación se describen adicionalmente algunos ejemplos no limitantes de medios de expansión.

La expresión "célula somática", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier célula que forma el cuerpo de un organismo que no es una célula de línea germinal (por ejemplo, espermatozoides y óvulos, las células a partir de las que se generan (gametocitos)) y células madre no diferenciadas. Órganos internos, piel,

huesos, sangre y tejido conector, todos están formados por células somáticas. Las células somáticas preferentes usadas en el método que se describe en el presente documento son células de fibroblastos, adipocitos o queratinocitos y se obtienen preferentemente a partir de biopsia de piel.

5 Preferentemente, las células somáticas usadas para transformación en células madre neuronales son de origen mamífero, lo más preferentemente de origen humano. Dichas células somáticas humanas se pueden obtener a partir de un individuo sano o de un paciente. Preferentemente dichas células somáticas se eligen entre el grupo de células de fibroblastos, adipocitos o queratinocitos. Estas células donantes se pueden obtener fácilmente a partir de cualquier fuente adecuada. En el presente documento, las fuentes preferentes son las que permiten el
10 aislamiento de células donantes sin procedimientos invasivos en el cuerpo humano. En la técnica se conocen bien algunos métodos para aislar células de fibroblastos. Las células de fibroblastos se pueden obtener a partir de cualquier fuente adecuada, por ejemplo de diversos tejidos de órganos o tejidos de piel. Algunos fibroblastos preferentes son fibroblastos de pulmón, fibroblastos de prepucio, y fibroblastos dérmicos de adultos. En una realización especial de la presente invención, dichos fibroblastos humanos se tienen a partir de un paciente, por
15 ejemplo mediante biopsia de piel (por ejemplo Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. George Q. Daley *et al.* Nature 2008; A method for the isolation and serial propagation of keratinocytes, endothelial cells, and fibroblasts from a single punch biopsy of human skin, Normand *et al.* In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 1995). Los adipocitos y los queratinocitos también se pueden derivar fácilmente mediante biopsia de piel o pelo arrancado (Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin
20 or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells, Belmonte *et al.* Nature Protocols 2010) y para el método de la presente invención también son preferentes las células donantes.

Un aspecto preferente de la presente invención es un método para generar células madre neuronales específicas de paciente. Otro aspecto de la presente invención es un método para generar células madre neuronales a partir
25 de células somáticas obtenidas a partir de un individuo sano.

Como se usa en el presente documento, "células madre neuronales" se refiere a un subconjunto de células pluripotentes que expresan algunos marcadores neuronales que incluyen, por ejemplo, nestina. Las células madre neuronales obtenidas con el método que se describe en el presente documento también se denominan
30 "irNSC": células madre neuronales reprogramadas inducidas. Las células madre neuronales se pueden expandir de forma indefinida y se pueden diferenciar en neuronas o células gliales (por ejemplo, astrocitos y oligodendrocitos). La expresión "células madre neuronales específicas de paciente" se refiere a células madre neuronales obtenidas a partir de células somáticas de un paciente y también se denominan células madre neuronales autólogas. "Células madre neuronales obtenidas a partir de un individuo sano", como se usa en el
35 presente documento, se refiere a células madre neuronales obtenidas a partir de células somáticas de un individuo del que no se sospecha que padece ningún trastorno o enfermedad.

Como se usa en el presente documento, el término "reprogramar" se refiere a una o más etapas necesarias para transformar una célula somática en una célula menos diferenciada, por ejemplo, para transformar células de
40 fibroblastos, adipocitos o queratinocitos en células madre neuronales. La reprogramación de una célula somática en una célula madre neuronal se consigue por introducción de al menos dos genes implicados en el mantenimiento de las propiedades de las células madre neuronales. Algunos genes adecuados para la reprogramación de células somáticas en células madre neuronales incluyen, pero no se limitan a, Sox2 (Seq ID No. 1), Brn2 (Seq ID No. 2), Bmi1 (Seq ID No. 3), Mash1 (Seq ID No. 4), Sox11 (Seq ID No. 5), NCam (Seq ID No. 6), Kpna1 (Seq ID No.7), Foxg1 (Seq ID No. 8), Emx2 (Seq ID No.9) y Pax6 (Seq ID No. 10). En una realización preferente, se introducen al menos dos genes, en otra realización preferente se introducen tres genes. Una combinación de genes preferente a introducir en las células somáticas comprende Bmi1 y Sox2. En una realización preferente adicional, esta combinación de al menos dos genes comprende adicionalmente
45 Mash1. En otra realización, esta combinación de al menos dos genes comprende adicionalmente un gen seleccionado entre el grupo que consiste en Mash1, Emx2, Foxg1, Pax6 y Sox11. En una realización más, la combinación de al menos dos genes comprende Bmi1 y Sox2 y Mash1.

La expresión "introducción de genes", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier método que conduzca a la expresión estable de dicho gen en una célula somática. Dichos genes se introducen en células
55 somáticas con métodos conocidos en la técnica, ya sea mediante la administración en la célula a través de vectores de reprogramación o mediante la activación de dichos genes a través de moléculas pequeñas. Algunos ejemplos de vectores de reprogramación son retrovirus, lentivirus, adenovirus, plásmidos y transposones. En el presente documento, es preferente el uso de un lentivirus para la administración de dichos genes. Algunos ejemplos de moléculas pequeñas adecuadas para la activación fuerte de dichos genes son inhibidores de
60 Metilación del ADN, inhibidores de la histona desacetilasa, ergolínicos (por ejemplo, etilamida del ácido lisérgico), flavonas (por ejemplo 7' hidroxiflavona), paulonas (por ejemplo Kenpaulona) (Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4 PNAS 2009 106 (22) 8912-8917), agonistas de canales de tipo L (por ejemplo BIX01294), BayK8644 y 5' azacitidina (Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic Fibroblasts by Oct4 and Klf4 with Small-Molecule Compounds Yan Shi *et al.* Cell Stem Cell – 6 de noviembre de 2008 (Vol. 3, Apartado 5, pp. 568-574)). Para inducción satisfactoria de la reprogramación, las células somáticas se cultivan en un medio adecuado complementado con factores de
65

crecimiento y una molécula pequeña. Como se usa en el presente documento, la expresión "factor de crecimiento" se refiere a un polipéptido biológicamente activo que causa proliferación celular, e incluye tanto factores de crecimiento como sus análogos. Estos incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento transformante, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblastos ácido y básico y factor de angiogénesis, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factores de crecimiento insulínico y de tipo insulínico que incluyen somatomedinas, mixoma y factores de crecimiento derivados de virus Vaccinia. Algunos factores de crecimiento preferentes usados en el presente documento son BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro), FGF2 (factor 2 de crecimiento de fibroblastos) y EGF (factor de crecimiento epidérmico). Los factores de crecimiento se pueden usar solos o en combinación por parejas, o lo más preferentemente, los tres factores se usan en conjunto. Además, los fibroblastos se cultivan en presencia de al menos una molécula pequeña. La expresión "molécula pequeña", o "compuesto pequeño", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula orgánica o inorgánica ya sea sintetizada o encontrada en la naturaleza, que tiene por lo general un peso molecular inferior a 10.000 gramos por mol, opcionalmente inferior a 5.000 gramos por mol, y opcionalmente inferior a 2.000 gramos por mol. En una realización preferente, dicha molécula pequeña comprende un inhibidor de la familia de serina/treonina quinasa que forman bucles superenrollados asociados con Rho (ROCK) de proteína quinasa. Algunos ejemplos no limitantes de inhibidores de ROCK comprenden Fasudilo (1-(5-Isoquinolinsulfonil)homopiperazina), Tiazovivina (N-Bencil-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida), Y27632 (diclorhidrato de (+)-(R)-trans-4-(1-aminoetil)-N-(4-piridil)ciclohexanocarboxamida) y compuesto 324 similar al Balanol (N-((3R,4R)-4-[4-(2-Fluoro-6-hidroxi-3-metoxibenzoil)-benzoilamino]-azepan-3-il)-4-hidroxi-3,5-dimetil-benzamida). También se desvelan moléculas pequeñas seleccionadas entre un inhibidor de una o más de las quinasa AMPK (proteína quinasa activada por AMP, subunidad no catalítica beta 1; símbolo oficial: PRKAB1), CHK2 (homólogo de punto de control de CHK2 (*S. pombe*), símbolo oficial: CHEK2), MSK1 (proteína S6 quinasa ribosómica, 90 kDa, polipéptido 5; símbolo oficial: RPS6KA5), PKA (proteína quinasa, dependiente de cAMP, catalítica, alfa; símbolo oficial: PRKACA), PKGα (proteína quinasa, dependiente de cGMP, tipo I; símbolo oficial: PRKG1) y SGK1 (quinasa 1 regulada por suero/glicocorticoide, símbolo oficial: SGK1).

Un "medio adecuado para inducción de la reprogramación", también representado como "medio de inducción", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier medio químicamente definido útil para inducción de la reprogramación de las células somáticas. En el presente documento, es preferente un medio sin suero complementado con insulina, transferrina y progesterona. Algunos medios preferentes usados en el presente documento contienen 10-50 µg/ml de insulina, 10-100 µg/ml de transferrina y 10-50 nM de progesterona. Algunos ejemplos de medios sin suero adecuados para inducción de la reprogramación son el medio N2B27 (N2B27 es una mezcla de DMEM/F12 a 1:1 (Gibco, Paisley, UK) complementado con N2 y B27 (ambos de Gibco)), medio N3 (formado por DMEM/F12 (Gibco, Paisley, UK), 25 µg/ml de insulina, 50 µg/ml de transferrina, selenito sódico 30 nM, progesterona 20 nM (Sigma), putrescina 100 nM (Sigma)), o medio de proliferación de NS-A NeuroCult® (Stemcell Technologies). En el presente documento, el más preferente es un medio sin suero como se ha descrito anteriormente que está complementado adicionalmente con FGF2, EGF, BDNF y un inhibidor de ROCK. Preferentemente, dicho inhibidor de ROCK comprende Fasudilo o el compuesto 324 similar al Balanol. En una realización preferente con el medio está complementado con 10-50 ng/ml de FGF2, 10-50 ng/ml de EGF, 1-20 ng/ml de BDNF y Fasudilo 1-50 µM o el compuesto 324 similar al Balanol 1-10 µM. Después de introducir al menos dos genes, las células somáticas a reprogramar se cultivan preferentemente en dicho medio de inducción durante al menos 1 día, preferentemente de 1 a 7 días, lo más preferentemente de 2 a 3 días.

En una realización las células somáticas de la etapa a) se tratan previamente con un inhibidor de Histona Desacetilasa (HDAC). "Tratar previo" o "tratamiento previo" como se usa en el presente documento se refiere a incubación de las células somáticas en un medio adecuado complementado con dicho inhibidor de HDAC de 4 a 60 horas, preferentemente 48 horas. Los inhibidores de HDAC útiles en el presente documento se seleccionan entre el grupo que comprende butirato sódico (ácido butanoico, sal sódica) Tricostatina A (TSA, 7-[4-(dimetilamino)fenil]-N-hidroxi-4,6-dimetil-7-oxohepta-2,4-dienamida) y Ácido Valproico (ácido 2-propilpentanoico). En una realización las células somáticas de la etapa a) se tratan previamente con Ácido Valproico. En otra realización las células somáticas de la etapa a) se tratan previamente con Ácido Valproico durante 48 horas.

Para propagar la proliferación de las células madre neuronales como cultivos de neuroesferas, las células madre neuronales inducidas se cultivan en un medio de expansión que comprende un medio sin suero complementado con insulina, transferrina y progesterona y factores de crecimiento como se ha descrito anteriormente. Preferentemente dichos factores de crecimiento comprenden FGF2, BDNF y EGF. En otra realización dicho medio de expansión comprende adicionalmente uno o más complementos seleccionados entre el grupo que consiste en Heparina, Ácido Ascórbico, SHH (Hedgehog Sónica Humana Recombinante), FGF8 (Isoforma FGF8a Humana Recombinante), DLL4 (DLL4 Humana Recombinante), Jagged1 (Quimera de Fc de Jagged 1 Humana Recombinante), Fasudilo y compuesto 324 similar al Balanol.

La divulgación también se refiere a métodos en los que las células madre neuronales obtenidas con el método que se describe en el presente documento en una etapa siguiente se estimulan para diferenciación por omisión

de al menos uno de los factores de crecimiento del medio de reprogramación. Preferentemente dichos factores de crecimiento a retirar comprenden EGF y FGF.

En otra realización preferente de la invención, se usa un gen marcador para facilitar la identificación sistemática y cuantificación de las células madre neuronales reprogramadas de forma satisfactoria. Por ejemplo, un gen que codifica una proteína marcadora fluorescente se introduce en las células somáticas diana mediante transducción de lentivirus. Algunos ejemplos de proteínas portadoras fluorescentes son GFP, YFP, EGFP o DsRed. Preferentemente, dicho gen marcador está unido de forma operativa a un promotor de nestina. La nestina se expresa de forma específica en células madre neuronales, por lo tanto, el gen marcador bajo el control de un promotor de nestina permite una identificación sistemática e identificación rápidas de las células madre neuronales reprogramadas inducidas. A partir de ese momento, esas células se identifican sistemáticamente para identificar una célula que presente el fenotipo deseado, es decir, neuroesferas. Las neuroesferas con un tamaño superior a 20 µm, preferentemente superior a 50 µm, se seleccionan y se cosechan para expansión adicional.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una población de células madre neuronales producidas con cualquiera de los métodos mencionados anteriormente. Preferentemente, la población de células madre neuronales es específica del paciente, es decir, se deriva de células somáticas obtenidas a partir de individuos enfermos. En otra realización dicha población de células madre se obtiene a partir de un individuo sano. Las células madre neuronales se pueden expandir de forma indefinida. El cultivo es fácil y está bien caracterizado. Es posible congelar y descongelar alícuotas de células madre neuronales de manera reproducible. Las células madre neuronales derivadas de paciente representan un modelo *in vitro* relevante de enfermedad para estudiar la patofisiología de enfermedades del SNC. La transformación de células somáticas específicas de paciente directamente en células madre neuronales representa una tecnología fácilmente accesible y reproducible para generar BioBancos de células madre neuronales específicas de paciente. Por lo tanto, en un aspecto preferente adicional de la invención, se concibe un BioBanco que comprende células madre neuronales específicas de paciente. También se desvela un BioBanco que comprende diferentes poblaciones de células madre neuronales obtenidas a partir de individuos sanos y se genera. El término "BioBanco" como se usa en el presente documento, se refiere a una biblioteca de muestras biológicas tomadas de diferentes individuos o especies. La colección de muestra de ensayo archivada y datos asociados está destinada a fines de investigación con el objetivo de abordar enfermedades neuronales similares a las enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA/enfermedad de Lou Gehrig) apoplejía, y lesión de la médula espinal o para terapia de dichas enfermedades neurológicas.

También se desvela el uso de células madre neuronales obtenidas con este método. En una realización preferente, las células madre neuronales obtenidos con este método se usan como un modelo *in vitro* para estudiar la patofisiología de enfermedades del SNC. Por ejemplo, las células madre neuronales obtenidas con el método de la invención se pueden sacar idéntica sistemáticamente compuestos que revierten, inhiben o previenen enfermedades neurológicas. Además se pueden usar para identificación sistemática de compuestos que revierten, inhiben o previenen efectos secundarios neuronales de medicamentos, por ejemplo medicamentos para diabetes. Preferentemente, dichas células madre neuronales obtenidas con el método de la invención que se describen en el presente documento se derivan de sujetos enfermos.

La divulgación también se refiere a una composición terapéutica que contiene células producidas por cualquiera de los métodos mencionados anteriormente o que contiene cualquiera de las poblaciones celulares mencionadas anteriormente. Preferentemente, las composiciones terapéuticas comprenden adicionalmente una solución fisiológicamente compatible que incluye, por ejemplo, fluido cerebroespinal artificial o solución salina tamponada con fosfato. Dicha composición terapéutica se puede usar para tratar, prevenir o estabilizar una enfermedad neurológica tal como, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, o ELS, enfermedades de almacenamiento lisosomal, esclerosis múltiple, o una lesión de la médula espinal. Por ejemplo, las células de fibroblastos, queratinocitos o adipocitos se pueden obtener mediante biopsia de piel del individuo con necesidad de tratamiento o de un individuo sano y reprogramar a células madre neuronales con el método de la invención. En una realización de la invención las células madre neuronales se cosechan y se introducen en el individuo para tratar la afección. En otra realización dichas células madre neuronales se cultivan en condiciones adecuadas para diferenciación en neuronas, oligodendrocitos o astrocitos antes de su introducción en el individuo, y se pueden usar para reemplazarlo ayudar a la función normal del tejido enfermo o dañado. La gran ventaja de la presente invención es que proporciona un suministro esencialmente ilimitado de células neuronales a las especies de paciente o células madre neuronales compatibles de individuos sanos con el mismo tipo de HLA adecuado para trasplante. El uso de células autólogas y/o compatible en terapia celular ofrece una ventaja principal con respecto al uso de células no autólogas, que probablemente van a experimentar rechazo inmunológico. Por el contrario, es poco probable que las células autólogas provoquen respuestas inmunológicas significativas.

También se desvela el uso de biobancos de células madre neuronales a la terapia de enfermedades neurológicas. Los biobancos comprenden preferentemente células madre neuronales obtenidas a partir de

pacientes o individuos sanos con varios tipos de HLA. El trasplante de las células obtenidas a partir de un donante sano a un individuo con necesidad de tratamiento con un tipo de HLA compatible evita el problema significativo de reacciones de rechazo asociadas normalmente con trasplantes de células heterólogas. De forma convencional, el rechazo se previene o se reduce mediante la administración de agentes inmunosupresores o fármacos anti rechazo tales como ciclosporina. Sin embargo, los fármacos de este tipo tienen algunos efectos secundarios significativamente adversos, por ejemplo, inmunosupresión, propiedades carcinogénicas, toxicidad renal así como que son muy caros. La presente invención debería eliminar, o al menos reducir en gran medida, la necesidad de fármacos anti-rechazo, tales como ciclosporina, Imulan, FK-506, glucocorticoides, y rapamicina, y derivados de los mismos.

Con respecto a los métodos terapéuticos de la invención, no se pretende que la administración de células madre neuronales a un mamífero se limite a un modo de administración, dosificación o frecuencia de dosificación en particular; la presente invención contempla todos los módulos de administración, incluyendo intramuscular, intravenosa, intraarticular, intralesional, subcutánea, o cualquier otra vía suficiente para proporcionar una dosis adecuada para prevenir o tratar una enfermedad. Las células madre neuronales se pueden administrar al mamífero en una sola dosis o en múltiples dosis. Cuando se administran múltiples dosis, las dos y se pueden separar entre sí, por ejemplo, entre una semana, un mes, un año, o diez años. También se puede administrar uno o más factores de crecimiento, hormonas, interleuquinas, citoquinas, películas pequeñas u otras células antes, durante o después de la administración de las células para sesgarlas adicionalmente hacia un tipo de célula en particular.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Representación esquemática del método para transformar fibroblastos humanos en irNSC. Día 0: los fibroblastos humanos se tratan con tripsina y se transfección en un volumen pequeño con una combinación de genes y el indicador de GFP de nestina usando el medio de inducción (N2B27 con FGF, 30 ng/ml de EGF; 20 ng/ml de BDNF; Fasudilo 10 μ M, 4 μ g/ml de Polybrene). Los fibroblastos se siembran en una placa de cultivo tisular normal a una concentración de 10000 - 30000 células/cm². Día 1: Cambiar el medio con medio de inducción recién preparado. Las células irNSC positivas para GFP / nestina (GFP+) comenzaron a aparecer con una frecuencia muy baja (~50 irNSC GFP+ de 100000). Día 2: El número de las irNSC GFP+ aumentó y comenzaron a moverse en conjunto formando grupos de células. Día 3: Los grupos de células se organizan en una estructura esferoide transparente que se despegar y comienza a flotar como una neuroesfera de GFP+. Se hizo el recuento de las neuroesferas con un tamaño superior a 20 μ m y se cosecharon para expansión adicional.

Figura 2: Representación esquemática del lentivirus indicador de GFP de nestina humana. La proteína fluorescente copGFP y el marcador seleccionable de zeocina se exploraron bajo el control de expresión de un fragmento potenciador de 1,8 kb a partir del intrón 2 de nestina humana unido a un promotor de CMV mínimo.

Figura 3: irNSC el día 1 del método de inducción de la reprogramación. Panel superior: fibroblastos de pulmón fetal sin transformar humano IMR90 (contraste de fase). Panel inferior: generación de células irNSC GFP+ (contraste de fase y canal de GFP).

Figura 4: irNSC el día 2 del método de inducción de la reprogramación. Las células tienden a migrar cercanas y juntas y comienzan a formar una estructura esferoide con un núcleo de irNSC GFP+ (contraste de fase y canal de GFP).

Figura 5: irNSCs el día 3 del método de inducción de la reprogramación. Las estructuras esferoides formadas el día 2 ahora aparecen completamente maduras como neuroesferas que flotan en el medio. Las neuroesferas tienen una dimensión que varía de 20 - 100 μ m de diámetro con una densidad elevada de células. Las irNSC se etiquetan con la expresión de GFP de nestina y se pueden identificar en casi todas las neuroesferas, aunque no todas las neuroesferas tienen la misma proporción de irNSC GFP+ (contraste de fase y canal de GFP).

Figura 6: Número de neuroesferas generadas con diferentes combinaciones de genes.

Figura 7: Neuroesferas unidas después de transducción con Sox2 - Bmi1. Las neuroesferas unidas muestran una morfología característica de células bipolares alargadas. Panel inferior: aumento más elevado de las neuroesferas de irNSC GFP+.

Figura 8: Células diferenciadas después de 1 semana de retirada de EGF y FGF. Las irNSC después de retirada de los factores de crecimiento proliferativo se dan lugar a células con protuberancias muy finas con tinción positiva para el marcador neuronal tuj 1.

Figura 9: Generación de un lote de neuroesferas de irNSC a la expansión y caracterización. Se trataron con tripsina 3,6 millones de fibroblastos humanos IMR90 y se infectaron en un pequeño volumen con: Sox2, Bmi1, indicador de GFP de nestina usando el medio de inducción (N2B27 con FGF, 30 ng/ml de EGF 20 ng/ml de BDNF) complementado con Fasudilo 10 μ M y 4 μ g/ml de Polybrene. Desde el Día 4 al Día 8: Las neuroesferas

GFP+ con un tamaño superior a 50 μm se cosecharon y se usaron adicionalmente para expansión. La mitad de las neuroesferas se expandieron usando el medio de expansión (N2B27 con FGF, 30 ng/ml de EGF 20 ng/ml de BDNF) con Fasudilo y la otra mitad sin Fasudilo. Día 15: Las neuroesferas cultivadas en el medio de expansión con Fasudilo tienen una morfología mejor y bordes claros y nítidos (una evidencia de neuroesferas bien formadas, panel B); sin Fasudilo, las neuroesferas tienen bordes borrosos (panel A).

Figura 10: Caracterización de inmunocitoquímica de neuroesferas de irNSC para la expresión de los marcadores de NSC, Sox2 y Nestina. Día 15, las neuroesferas de irNSC expandidas con Fasudilo se sembraron en placas revestidas con PO/Lam y después de 48 h se tiñeron a la expresión de Sox2 y Nestina. Las neuroesferas de irNSC se unieron y las irNSC se propagaron desde las esferas. Las irNSC tienen una morfología de NSC habitual y eran positivas para Sox2 y Nestina. Panel A: Canales de fusión e individuales de DAPI, Sox2, Nestina; aumento 20x; Panel B: Canales de fusión de DAPI, Sox2, Nestina; aumento 10x.

Figura 11: Comparación de la estimulación con Fasudilo con respecto al compuesto 324 similar al Balanol para generar neuroesferas de irNSC. Los fibroblastos humanos IMR90 se trataron con tripsina y se infectaron en un volumen pequeño con: Sox2, Bmi1, indicador de GFP de nestina usando el medio de inducción (Kit de Proliferación de NS-A NeuroCult® (Humano, StemCells Technologies) con FGF, 20 ng/ml de EGF BDNF; 2 $\mu\text{g/ml}$ de Heparina; 4 $\mu\text{g/ml}$ de Polybrene) complementado con Fasudilo 10 μM (gráfico sombreado) o compuesto 324 similar al Balanol 2 μM (gráfico de color negro). Los fibroblastos se siembran en una placa de cultivo tisular normal a una concentración de 10000 - 30000 células/ cm^2 . Día 1: Cambiar el medio con medio de inducción recién preparado. Día 4: Se hizo el recuento de las neuroesferas GFP+ con un tamaño superior a 50 μm . El compuesto 324 pequeño similar al Balanol aumentaba la eficacia de la generación de neuroesferas aproximadamente dos veces (1,9) y tiene una mejor reproducibilidad (STDEV, n = 3).

Figura 12: El tratamiento previo de fibroblastos humanos con Ácido Valproico (VPA) aumenta el rendimiento de las neuroesferas de irNSC GFP+. Los fibroblastos humanos IMR90 se trataron previamente durante 48 horas con o sin el inhibidor de HDAC, Ácido Valproico (ácido 2-propil-pentanoico, sal monosódica) (1 mM) antes de infección con: Sox2, Bmi1, indicador de GFP de nestina. Medio de inducción (Kit de Proliferación de NS-A NeuroCult® (Humano, StemCells Technologies) con FGF, 20 ng/ml de BDNF de EGF; 2 $\mu\text{g/ml}$ de Heparina; compuesto 324 similar al Balanol 2 μM). Día 7: Se hizo el recuento de las neuroesferas GFP+ con un tamaño superior a 50 μm (Panel A) y se indica el índice medio de irNSC GFP+ por neuroesfera (Panel B). Fotografías representativas de las neuroesferas de irNSC generadas con el tratamiento previo con VPA (Panel C). El tratamiento previo con VPA no influye de forma significativa en el número de neuroesferas el día 7; aunque el tratamiento con VPA aumentaba el número (2,1 veces) de irNSC GFP+ (STDEV, n = 3).

Figura 13: Definición de una combinación mínima de genes en combinación con Sox2 y Bmi1 para inducción eficaz de neuroesferas de irNSC. Los fibroblastos humanos IMR90 se trataron previamente durante 48 horas con VPA (1 mM) antes de infección con: Sox2, Bmi1, indicador de GFP de nestina más diferentes genes candidatos para dirigir su sinergia. Medio de inducción: Kit de Proliferación de NS-A NeuroCult® (Humano, StemCells Technologies) con FGF, 20 ng/ml de BDNF de EGF; 2 $\mu\text{g/ml}$ de Heparina y compuesto 324 similar al Balanol 2 μM . Cuantificación el Día 7 de neuroesferas de irNSC con un tamaño superior a 50 μm . Mash1, Emx2, Foxg1, Pax6 y Sox11 tienen sinergia con Bmi1 y Sox2 para generar neuroesferas de irNSC.

Figura 14: Generación de neuroesferas de irNSC a partir de fibroblastos dérmicos humanos de adulto (HDFa). Los fibroblastos dérmicos humanos de adulto nos proporciona GIBCO (Número de Cat.: C-013-5C). Los fibroblastos dérmicos humanos de adulto se trataron con tripsina y se infectaron en un pequeño volumen con: Sox2, Bmi1, indicador de GFP de nestina usando el medio de inducción (Kit de Proliferación de NS-A NeuroCult® (Humano, StemCells Technologies) con FGF, 20 ng/ml de BDNF de EGF; 2 $\mu\text{g/ml}$ de Heparina) complementado con Fasudilo 10 μM . Día 8: Se detectan neuroesferas de irNSC (fotografías representativas con un aumento de 2,5 y 10X).

Figura 15: Expansión de neuroesferas de irNSC usando una combinación de Ácido Ascórbico, Hedgehog Sónica (Shh), Jagged1, DLL4 y FGF8 para obtener un cultivo de monocapa de las irNSC GFP+. Los fibroblastos humanos IMR90 se infectaron con: Sox2, Bmi1, Mash1 e indicador de GFP de nestina usando el medio de inducción (Kit de Proliferación de NS-A NeuroCult® (Humano, StemCells Technologies) con FGF, 20 ng/ml de BDNF de EGF; 2 $\mu\text{g/ml}$ de Heparina; compuesto 324 similar al Balanol 2 μM). Día 7: Las neuroesferas con un tamaño superior a 50 μm se cosecharon y se expandieron adicionalmente con el medio de expansión (Kit de Proliferación de NS-A NeuroCult® (Humano, StemCells Technologies) con FGF, 20 ng/ml de BDNF de EGF; 2 $\mu\text{g/ml}$ de Heparina; compuesto 324 similar al Balanol 2 μM ; Ácido Ascórbico 0,2 mM, 500 ng/ml de SHH (Hedgehog Sónica Humana Recombinante, Número de Catálogo: 1845SH), 100 ng/ml de FGF8 (Isoforma FGF8a Humana Recombinante, Número de Catálogo: 4745F8), 500 ng/ml de DLL4 (DLL4 Humana Recombinante, Número de Catálogo: 1506D4), 500 ng/ml de Jagged1 (Quimera de Fc de Jagged 1 Humana Recombinante, Número de Catálogo: 1277JG), medio acondicionado a 1/10 de las NSC derivadas de hESC cultivadas durante dos días en Kit de Proliferación de NS-A NeuroCult® (Humano, StemCells Technologies) con FGF, 20 ng/ml de BDNF de EGF; 2 $\mu\text{g/ml}$ de Heparina. Fotografías representativas para las neuroesferas de irNSC el día 14 expandidas con el medio de expansión informado anteriormente (Panel A). Las neuroesferas

tienen bordes definidos y es posible observar la protuberancia de espinas de las neuroesferas (Panel B, zoom ampliado). El día 21, las neuroesferas de irNSC expandidas se disocian y se sembraron en placas revestidas con PO/Lam para obtener un cultivo de monocapa homogéneo de las irNSC GFP+ (Panel C, contraste de fase y canal de GFP de la monocapa de las irNSC después de 4 días en cultivo en la monocapa).

5
 10
 15
 20
 25

Figura 16: Caracterización de inmunocitoquímica de neuroesferas de irNSC para la expresión de los marcadores de NSC, Nestina y el marcador neuronal temprano Tuj1. El día 21, las neuroesferas de irNSC generadas como se describe en la Figura 15 se disociaron y se sembraron en condiciones de auto-renovación de NSC (Kit de Proliferación de NS-A NeuroCult® (Humano, StemCells Technologies) con FGF, 20 ng/ml de BDNF de EGF; 2 µg/ml de Heparina) para someter a ensayo la expresión del marcador de Nestina (Panel A después de 48 h, todas las células son Nestina+ y Tuj1-) o se sembraron en diferentes condiciones (Kit de diferenciación de NS-A NeuroCult® (Humano, StemCells Technologies) con 20 ng/ml de BDNF) y se tiñeron para Tuj1 y Nestina el día 7 (Panel B, todas las células son Tuj1+ y pocas células son Nestina+).

15 Ejemplos

El método se puede ilustrar por referencia a la Figura 1 en el presente documento, que representa un método de acuerdo con la invención que se usa para transformar fibroblastos humanos en células madre neuronales (NSC). En este método, los fibroblastos humanos se trataron con tripsina el día 0, se hizo recuento y se determinó su viabilidad. A continuación, se volvieron a suspender entre $1,0 \times 10^5$ - $3,0 \times 10^5$ en el medio de inducción y la combinación de genes se administró en forma de lentivirus. En el medio de inducción, se añadió Polybrene (bromuro de hexadimetrina) para aumentar la eficacia de la transducción de los lentivirus. La infección se realizó durante 15 minutos en un tubo Eppendorf. En combinación con los genes, se usó un indicador de GFP de Nestina humana. La nestina es un marcador bien conocido expresado de forma específica en las NSC. En el indicador de nestina, la proteína fluorescente GFP está bajo la expresión del promotor de nestina humana (Figura 2), por lo tanto, permite una identificación sistemática fácil para células madre neuronales reprogramadas inducidas (irNSC) GFP+.

30
 35
 40

Las células infectadas se sembraron en placas de cultivo tisular usando una concentración de 10000 - 30000 células/cm² en el volumen apropiado de medio de inducción. El día 1, el medio de inducción total se renovó, fue posible identificar algunas irNSC GFP+ (Figura 3) con un cambio de morfología evidente en comparación con los fibroblastos humanos. Las irNSC GFP+ adquieren una morfología bipolar y alargada con un citoplasma más condensado, habitual en las NSC. Además, las irNSCs se cultivan en un cultivo monocapa empaquetado que se parece a la interacción de célula a célula habitual adquirida en los cultivos de NSC tradicionales para activar la señal pro-proliferativa de la ruta de Notch. El día 2, las irNSC GFP+ estaban en un estado más maduro y comenzaron a formar grupos de células muy empaquetadas. Estos grupos de irNSC comenzaban a formar una estructura esferoide con un núcleo denso que contenía irNSC GFP+ (Figura 4). El día 3, las estructuras esferoides estaban completamente formadas y comenzaron a separarse de la placa de cultivo tisular que flota como neuroesferas en el medio. Las neuroesferas tienen una dimensión de aproximadamente 20-100 µm con bordes claros y un núcleo con una densidad de células elevada, en el que es posible identificar las irNSC GFP+ (Figura 5).

45
 50
 55

Para conseguir el avance de la invención, fue necesario usar una combinación de genes específica. El siguiente listado de genes implicados en el mantenimiento de la propiedad de las NSC *in vivo* e *in vitro* se recuperó del conocimiento de la bibliografía: Sox2 (factor de transcripción de Sox y marcador importante para NSC), Brn2 (proteína del dominio POU conocida por unirse a proteínas Sox. Unión informada de Sox2 y Brn2 en el promotor de nestina. Los ratones Brn2 KO presentan alteración del desarrollo del SNC), Bmi1 (proteína implicada en la regulación del ciclo celular, informada por qué aumenta expresión de los inhibidores p21 y p27 del complejo ciclinaE/cdk2. La inhibición de ciclinaE/cdk2 determina la pérdida del control de la proteína de retinoblastoma en el ciclo celular que da como resultado un ciclo celular rápido durante el estado de autorrenovación de las NSC), Mash1 (se describe que es un regulador importante para la proliferación de precursores neuronales *in vivo*), Sox11 (proteína Sox de la que se informa que se expresa en SGZ *in vivo*), NCAM (marcador de NSC en Citometría de Flujo y expresado en diferentes regiones del SNC), Kpna1 (más conocido como importina alfa5 responsable junto con la importina beta del transporte nuclear de proteína en tejidos derivados del ectodermo).

60
 65

Todos los genes se clonaron como ADNc en plásmidos de lentivirus, y posteriormente se empaquetaron en lentivirus. Las partículas empaquetadas con lentivirus para Sox2, Bmi1, Mash1, Sox11, NCAM, Kpna1, indicador de GFP de nestina se transdujeron directamente en fibroblastos humanos. Se sometieron a ensayo diferentes combinaciones de genes en el método que se ha descrito anteriormente. El día 3 fue posible evaluar el éxito de la producción de las irNSC mediante recuento de las neuroesferas generadas. Solamente se tuvieron en cuenta las neuroesferas con un tamaño superior a 50 µm.

Como se representa en la Figura 6, la transducción del lentivirus indicador de nestina sin adición de Fasudilo al medio de inducción no reprogramó los fibroblastos humanos en las irNSC. Con la adición de Fasudilo al medio de inducción, se informó la generación de neuroesferas (de aproximadamente 50 µm) y de tamaño menor (aproximadamente 20 µm, sin recuento).

Neuroesferas generadas con el método innovador de los inventores usando la combinación de genes: Sox2 - Bmi1 se recogieron el día 3 y se expandieron durante un periodo adicional de 14 días. La expansión de las neuroesferas de irNSC fue una etapa crítica. Las neuroesferas se cultivaron usando el medio N2B27 complementado con FGF, EGF, BDNF en placas no adherentes ultra-bajas especiales (Corning). Para conseguir una población homogénea de neuroesferas de las irNSC GFP+, se aplicó un procedimiento de limpieza cada 2-3 días. Durante 14 días de expansión, algunas neuroesferas con baja densidad de las irNSC GFP+ no pudieron proliferar de forma adecuada, lo más probablemente debido a una contaminación por fibroblastos no transformados. Este tipo de neuroesferas contaminadas se desmoronaron en células individuales que era necesario retirar. El día 14, las neuroesferas se sometieron a ensayo para: unión en placas revestidas con poliornitina/laminina y generación de células similares a las neuronas. Para la unión, se sembraron 20-40 neuroesferas/cm² en placas revestidas con poli-ornitina/laminina en el medio de expansión complementado simplemente durante el primer día con Fasudilo 10 µM, para a aumentar la unión y la propagación celular. El día 1 de cultivo era posible mostrar la unión y propagación de las neuroesferas (Figura 7). En el centro de las neuroesferas en propagación, los inventores identificaron las irNSC GFP+ con una morfología de NSC habitual. Las neuroesferas se cultivaron durante un periodo adicional de tres días y a continuación solamente se añadió BDNF al N2B27 (Condiciones de diferenciación neuronal). Después de la retirada de EGF y FGF, las irNSC cambiaron de morfología. Se hicieron más alargadas y comenzaron a formar protuberancias celulares similares a las de las neuritas. El día 7 de las condiciones de diferenciación, las células se fijaron y se tiñeron para el marcador neuronal tuj1 (Figura 8).

Las neuroesferas expandidas con Fasudilo tenían una morfología mejor y bordes claros y nítidos (una evidencia de neuroesferas bien formadas, Figura 9, panel B); sin Fasudilo las neuroesferas tienen bordes borrosos (Figura 9, panel A). Las irNSC tienen una morfología de NSC habitual y eran positivas para Sox2 y Nestina (Figura 10).

La Figura 11 muestra que el compuesto 324 similar al Balanol inhibidor de la quinasa Rock aumenta el rendimiento de neuroesferas GFP+.

Estas evidencias muestran que el método era capaz de transformar fibroblastos humanos en irNSC basándose en etapas relacionadas de transducción de genes (las mejores combinaciones: Sox2-Bmi1, Sox2-Bmi1-Mash1, Sox2-Bmi1-Sox11, Sox2-Bmi1-Emx2, Sox2-Bmi1-Foxg1 y Sox2-Bmi1-Pax6, véase también la Figura 13) e inducción en medio químicamente definido.

Para aumentar el rendimiento de las irNSC, los fibroblastos humanos se trataron previamente con o sin el inhibidor de HDAC Ácido Valproico (VPA, ácido 2-propil-pentanoico, sal monosódica). Hacia este punto, los fibroblastos humanos se incubaron en DMEM/F12 complementado con FBS al 10 % y L-glutamina complementada con VPA 1 mM antes de infección (Figura 12).

La Figura 14 muestra la generación de Neuroesferas de irNSC de fibroblastos dérmicos humanos de adulto (HDFa).

La Figura 15 muestran la expansión de Neuroesferas de irNSC usando una combinación de Ácido Ascórbico, Hedgehog Sónica (Shh), Jagged1, DLL4 y FGF8. La Figura 16 muestra la caracterización de inmunocitoquímica de Neuroesferas de irNSC para la expresión de los marcadores de las NSC, Nestina y el marcador neuronal temprano Tuj 1.

Materiales y Métodos

Cultivo celular:

Medio de Inducción: N2B27 (N2B27 es una mezcla de DMEM/F12 a 1:1 (Gibco, Paisley, UK) complementado con N2 y B27 (ambos de Gibco) complementado con 30 ng/ml de EGF humano (Peprotech), 30 ng/ml de FGF2 humano (Peprotech), 20 ng/ml de BDNF humano (Roche) y Fasudilo (Calbiochem) 10 µM o el compuesto 324 similar al Balanol, (N-((3R,4R)-4-[4-(2-Fluoro-6-hidroxi-3-metoxi-benzoil)-benzoilamino]-azepan-3-il)-4-hidroxi-3,5-dimetil-benzamida) 2 µM.

Medio de Expansión: N2B27 complementado con 30 ng/ml de EGF humano (Peprotech), 30 ng/ml de FGF2 humano (Peprotech), 20 ng/ml de BDNF humano (Roche), o

Kit de Proliferación de NS-A NeuroCult® (Humano, StemCells Technologies) con FGF, 20 ng/ml de BDNF de EGF; 2 µg/ml de Heparina; compuesto 324 similar al Balanol 2 µM; Ácido Ascórbico 0,2 mM, 500 ng/ml de SHH (Hedgehog Sónica Humana Recombinante, Número de Catálogo: 1845SH), 100 ng/ml de FGF8 (Isoforma FGF8a Humana Recombinante, Número de Catálogo: 4745F8), 500 ng/ml de DLL4 (DLL4 Humana Recombinante, Número de Catálogo: 1506D4), 500 ng/ml de Jagged1 (Quimera de Fc de Jagged 1 Humana Recombinante, Número de Catálogo: 1277JG).

Medio de Diferenciación: 20 ng/ml de N2B27 complementado con human BDNF (Roche), 2 µg/ml de Laminina (Invitrogen).

5 Fibroblastos humanos: fibroblastos de pulmón fetal IMR90 (Núm. de Lot. de la ATCC 580229699) o fibroblastos dérmicos humanos de adulto (GIBCO, Número de Cat.: C-013-5C).

10 Lentivirus: Las partículas de lentivirus empaquetadas previamente, listas para usarse obtuvieron en Sigma (Lentivirus humano Sox2 Stemgent Reprogramming, n.º de Catálogo ST070012), Genecopeia (Partículas Lentivirales de Bmi1 de humano Lentifact, n.º de Catálogo LP-B0015-Lv105; Partículas Lentivirales de Sox11 Lentifact, n.º de Catálogo LP-MO425-LV105; Partículas Lentivirales de Mash1 Lentifact, n.º de Catálogo LP-Z0740-LV105; Partículas Lentivirales de Kpna1 humano Lentifact, n.º de Catálogo LP-U1286-Lv105; Partículas Lentivirales de Ncam1 Lentifact, n.º de Catálogo LP-Z2645-Lv105) y SBI Systems Biosciences (Indicador de GFP de Nestina: Virus Indicador Transcripcional pGreenZeo™ - hNestina, SR10035VA-1).

15 Títulos de $1,45 \times 10^5/\mu\text{l}$ de NestinaGFP, $4,3 \times 10^5/\mu\text{l}$ de BMI1, $1,07 \times 10^4/\mu\text{l}$ de Sox2, $3,2 \times 10^6/\mu\text{l}$ de Sox11, $4,7 \times 10^6/\mu\text{l}$ de Mash1, $3,3 \times 10^4/\mu\text{l}$ de Ncam, $1,8 \times 10^5/\mu\text{l}$ de Kpna1.

Protocolos

20 1. Generación de las irNSC:

25 - 200.000 IMR90 fibroblastos humanos infectados con los lentivirus para combinación de genes diferentes (multiplicidad de infección (M.O.I.) usada para cada lentivirus individual 30) y el lentivirus GFP de nestina indicador (M.O.I. usada 10) en un Eppendorf con 300 µl de medio de inducción con 4 µg/ml de Polybrene (bromuro de hexadimetrina, Sigma).

- Incubar a temperatura ambiente durante 15 min.

30 - Sembrar los 300 µl en 1,7 ml de medio de inducción en un pocillo de una placa de 6 pocillos tratada con tejido

- Día 1, renovar los 2 ml de de medio de inducción/cada pocillo

35 - Día 3, cosechar las neuroesferas recogiendo con cuidado los 2 ml con las esferas flotantes

- Expandir las neuroesferas

2. Expansión de las neuroesferas:

40 - Recoger el medio con las neuroesferas flotantes en tubos de 15 ml de 3 pocillos de una placa de 6 pocillos

- Dejar que las esferas sedimenten durante 10 min

45 - Retirar el sobrenadante con mucho cuidado (las células individuales no sedimentaran y se aspiran con el sobrenadante)

- Volver a suspender las esferas en un medio de expansión a un volumen final de 4 ml

50 - Sembrar en una placa B6 de adherencia ultra baja (Corning)

- Incubar 2-3 días

- Repetir el procedimiento de expansión cada 2-3 días hasta el día 14 desde la generación de las irNSC

55

3. Diferenciación de neuroesferas:

60 - Día 14 generación de las irNSC y después del procedimiento de expansión seleccionar las neuroesferas redondas en estereo microscopio con bordes claros y ricos en las irNSC GFP+

- Sembrar 40 esperasen una placa de 24 pocillos revestida previamente con poli-ornitina/laminina usando el medio de expansión con adición de Fasudilo 10 µM o compuesto 324 similar al Balanol 2 µM.

- El día después renovar el medio de expansión sin Fasudilo / compuesto 324 similar al Balanol 2 µM.

65 - Incubar durante tres días

ES 2 580 837 T3

- Retirar el medio de expansión y añadir medio de diferenciación
 - Renovar el medio de diferenciación después de 3 - 4 días
- 5
- Incubar durante 3 - 4 días
 - Fijar las células con PFA al 4 % y realizar inmunotinciones
- 10
- Protocolo de tinción de Neuroesferas de irNSC: El día 15, las neuroesferas se tiñeron para caracterización con los siguientes anticuerpos: Nestina de Ratón y Sox2 O/N de Conejo y a continuación el anti-mouse 488 secundario y 555 anti-conejo durante una hora.
- Anticuerpos primarios:
- 15
- Nestina de Ratón, monoclonal, dilución a 1/500 (MAB5326 Millipore)
- Sox2 de Conejo, policlonal, dilución a 1/500 (AB5603MI Millipore)
- Anticuerpos secundarios:
- 20
- Alexa fluor 488, IgG, dilución a 1/1000, Cabra anti ratón (A11029 Invitrogen)
- Alexa fluor 555, IgG dilución a 1/1000, Cabra anti conejo (A21429 Invitrogen)
- 25
- LISTADO DE SECUENCIAS
- <110> F. Hoffmann - La Roche AG
- 30
- <120> Transformación de células somáticas en células madre neuronales reprogramadas inducidas (irNSCs)
- <130> 26845 WO
- 35
- <150> EP10173455.6
- <151> 19-08-2010
- <160> 10
- 40
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 954
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- 45
- <400> 1

ES 2 580 837 T3

atgtacaaca tgatggagac ggagctgaag cgcgcgggcc cgcagcaaac ttcggggggc 60
 ggcggcggca actccaccgc ggcggcggcc ggcggcaacc agaaaaacag cccggaccgc 120
 gtcaagcggc ccatgaatgc cttcatggtg tggccccgcg ggcagcggcg caagatggcc 180
 caggagaacc ccaagatgca caactcggag atcagcaagc gcctgggccc cgagtggaaa 240
 cttttgtcgg agacggagaa gcggccggtc atcagcagag ctaagcggct gcgagcgtg 300
 cacatgaagg agcaccgcga ttataaatac cggccccggc ggaaaaccaa gacgctcatg 360
 aagaaggata agtacacgct gcccggcggg ctgctggccc cggcgggcaa tagcatggcg 420
 agcggggctg gggcgggccc cggcctgggc gcgggctga accagcgcac ggacagttac 480
 gcgcacatga acggctggag caacggcagc tacagcatga tgcaggacca gctgggctac 540
 ccgcagcacc cgggcctcaa tgcgcacggc gcagcgcaga tgcagcccat gcaccgctac 600
 gacgtgagcg ccctgcagta caactccatg accagctcgc agacctacat gaacggctcg 660
 cccacctaca gcatgtccta ctgcgagcag ggcaaccctg gcatggctct tggctccatg 720
 ggttcgggtg tcaagtccga ggccagctcc agccccctg tggttacctc ttcctcccac 780
 tccagggcgc cctgccaggc cggggacctc cgggacatga tcagcatgta tctcccggc 840
 gccgaggtgc cggaaaccgc cgcaccagc agacttcaca tgtcccagca ctaccagagc 900
 ggcccgggtg ccggcacggc cattaacggc aactgcccc tctcacacat gtga 954

<210> 2
 <211> 1332
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400>2

atggcgaccg cagcgtctaa ccactacagc ctgctcacct ccagcgcctc catcgtgcac 60
 gccgagccgc ccggcggcat gcagcagggc gcggggggct accgcgaagc gcagagcctg 120

10

ES 2 580 837 T3

gtgcagggcg actacggcgc tctgcagagc aacggacacc cgctcagcca cgctcaccag	180
tggatcaccg cgctgtccca cggcggcggc ggcgggggcg gtggcggcgg cggggggggc	240
gggggcggcg gcgggggcgg cggcgacggc tccccgtggt ccaccagccc cctgggocag	300
coggacatca agccctcggg ggtggtgcag caggcgggoc ggggagacga gctgcacggg	360
ccaggcggccc tgcagcagca gcatcagcag cagcaacagc aacagcagca gcaacagcag	420
caacagcagc agcagcagca gcaacagcgg ccgccgcata tgggtcacca cgccgctaac	480
caccaccccg gacccggggc atggcggagc gcggcggctg cagcgcacct cccaccctcc	540
atgggagcgt ccaacggcgg cttgctctac tcgcagccca gcttcacggg gaacggcatg	600
ctgggcggcg gcgggcagcc ggcgggtctg caccaccacg gcctgcgga cgcgcacgac	660
gagccacacc atgccgacca ccaccgcac ccgcactcgc acccacaacca gcagccggcg	720
ccccgcggc ccccgaggg tccgcctggc caccaggcg cgcaccaaga cccgcactcg	780
gacgaggaca cgcgcacctc ggacgacctg gagcagttcg ccaagcagtt caagcagcgg	840
cggatcaaac tgggatttac ccaagcggac gtggggctgg ctctgggcac cctgtatggc	900
aacgtgttct cgcagaccac catctgcagg tttgagggcc tgcagctgag cttcaagaac	960
atgtgcaagc tgaagccttt gttgaacaag tggttggagg aggggactc gtctcgggc	1020
agccccacga gcatagacaa gatcgcagcg caagggcgca agcggaaaaa gcggacctcc	1080
atcgaggtga gcgtcaaggg ggctctggag agccatttcc tcaaatgcc caagccctcg	1140
gcccaggaga tcacctccct cgcggacagc ttacagctgg agaaggaggt ggtgagagtt	1200
tggttttgta acaggagaca gaaagagaaa aggatgacct ctcccggagg gactctgccg	1260
ggcggcggag atgtgtacgg ggggagtagg gacactccac cacaccacgg ggtgcagacg	1320
cccgccaggt ga	1332

<210> 3
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

5

ES 2 580 837 T3

atgcatcgaa caacgagaat caagatcact gagctaaatc cccacctgat gtgtgtgctt 60
 tgtggagggt acttcattga tgccacaacc ataatagaat gtctacattc cttctgtaaa 120
 acgtgtattg ttcgttacct ggagaccagc aagtattgtc ctatttgtga tgtccaagtt 180
 cacaagacca gaccactact gaatataagc tcagataaaa ctctccaaga tattgtatac 240
 aaattagttc cagggtcttt caaaaatgaa atgaagagaa gaagggattt ttatgcagct 300
 catccttctg ctgatgctgc caatggctct aatgaagata gaggagaggt tgcagatgaa 360
 gataagagaa ttataactga tgatgagata ataagcttat ccattgaatt ctttgaccag 420
 aacagattgg atcggaaagt aaacaaagac aaagagaaat ctaaggagga ggtgaatgat 480

 aaaagatact tacgatgcc agcagcaatg actgtgatgc acttaagaaa gtttctcaga 540
 agtaaaatgg acatacctaa tactttccag attgatgtca tgtatgagga ggaaccttta 600
 aaggattatt atacactaat ggatattgcc tacatttata cctggagaag gaatqgtcca 660
 cttccattga aatacagagt tcgacctact tgtaaaagaa tgaagatcag tcaccagaga 720
 gatggactga caaatgctgg agaactggaa agtgactctg ggagtgacaa ggccaacagc 780
 ccagcaggag gtattccctc cacctcttct tgtttgccta gccccagtac tccagtgcag 840
 tctcctcctc cacagtttcc tcacatttcc agtactatga atggaaccag caacagcccc 900
 agcggtaacc accaatcttc ttttgccaat agacctcgaa aatcatcagt aatgggtca 960
 tcagcaactt cttctggtg a 981

5 <210> 4
 <211> 711
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

atggaaagct ctgccaagat ggagagcggc ggcgccggcc agcagcccca gccgcagccc 60
 cagcagccct tcctgcggcc cgcagcctgt ttctttgcca cggccgcagc cgcggcggcc 120
 gcagccgccc cagcggcagc gcagagcggc cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 180
 cagcagggc cgcagctgag accggcggcc gacggccagc cctcaggggg cggtcacaag 240
 tcagcggcca agcaagtcaa gcgacagcgc tcgtcttcgc ccgaactgat gcgctgcaaa 300
 cgccggctca acttcagcgg ctttggttac agcctgccgc agcagcagcc ggccgccgtg 360
 gcgcgcccga acgagcggga gcgcaaccgc gtcaagttgg tcaacctggg ctttgccacc 420
 cttcgggagc acgtcccca cggcggcggc aacaagaaga tgagtaaggt ggagacactg 480
 cgctcggcgg tcgagtacat ccgcgcgctg cagcagctgc tggacgagca tgacgcggtg 540
 agcggccgct tccaggcagg cgtcctgtcg cccaccatct cccccaacta ctccaacgac 600
 ttgaaactca tggccggctc gccggtctca tcctactcgt cggacgaggg ctcttacgac 660
 ccgctcagcc ccgaggagca ggagcttctc gacttcacca actggttctg a 711

10

ES 2 580 837 T3

<210> 5
 <211> 1325
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400>5

```

atggtgcagc aggcggagag cttggaagcg gagagcaacc tgccccggga ggcgctggac      60
acggaggagg gcgaattcat ggcttgagc ccggtggccc tggacgagag cgaccagac      120
tggtgcaaga cggcgtcggg ccacatcaag cggccgatga acgcgttcat ggtatggtcc      180
aagatcgaac gcaggaagat catggagcag tctccggaca tgcacaacgc cgagatctcc      240
aagaggctgg gcaagcgtg gaaaatgctg aaggacagcg agaagatccc gttcatccgg      300
gaggcggagc ggctgcggct caagcacatg gccgactacc ccgactaaa gtaccggccc      360
cggaaaaagc ccaaaatgga ccctcggcc aagcccagcg ccagccagag cccagagaag      420
agcgcggccg gcggcggcgg cgggagcgcg ggcggaggcg cgggcggtgc caagacctcc      480
aagggctcca gcaagaaatg cggcaagctc aaggcccccg cggccgaggg cgccaaggcg      540
ggcgcgggca aggcggccca gtccggggac tacgggggcg cgggcgacga ctacgtgctg      600
ggcagcctgc gcgtgagcgg ctccggcggc ggcggcgcgg gcaagacggt caagtgcgtg      660
tttctggatg aggacgacga cgacgacgac gacgacgacg agctgcagct gcagatcaaa      720
caggagcccg acgaggagga cgaggaacca ccgcaccagc agctcctgca gccgcggggg      780
cagcagccgt cgcagctgct gagacgctac aacgtcgcca aagtgcccgc cagccctacg      840
ctgagcagct cggcggagtc ccccgagggg gcgagcctct acgacgaggt gcgggcccggc      900
gcgacctcgg gcgccggggg cggcagccgc ctctactaca gttcaagaa catcaccaag      960
cagcaccgcg ccgcgctcgc gcagcccgcg ctgtcgcccg cgtcctcgcg ctccggtgtec     1020
acctcctcgt ccagcagcag cggcagcagc agcggcagca gggcgagga cggcagcagc     1080
ctgatgttcg acctgagctt gaatttctct caaagcgcgc acagcgccag cgagcagcag     1140
ctggggggcg gcgcggcggc cgggaacctg tccctgtcgc tgggtggataa ggatttggat     1200
tcgttcagcg agggcagcct gggctcccac ttcgagttcc ccgactactg cacgccggag     1260
ctgagcgaga tgatcgggg ggactggctg gaggcgaact tctccgacct ggtgttcaca     1320
tattg                                                                                   1325
    
```

10

<210> 6
 <211> 2547
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 6

ES 2 580 837 T3

atgctgcaaa ctaaggatct catctggact ttgtttttcc tgggaactgc agtttctctg	60
caggtggata ttgttccag ccagggggag atcagcgttg gagagtccaa attcttctta	120
tgccaaagtgg caggagatgc caaagataaa gacatctcct ggttctcccc caatggagaa	180
aagctcacco caaaccagca gcggatctca gtggtgtgga atgatgatto ctctccacc	240
ctcacatct ataacgcaa catcgacgac gccggcattt acaagtgtgt ggttacaggc	300
gaggatggca gtgagtcaga ggccaccgtc aacgtgaaga tctttcagaa gctcatgttc	360
aagaatgcgc caaccccaca ggagttccgg gagggggaag atgccgtgat tgtgtgtgat	420
gtggtcagct cctcccacc aaccatcatc tggaacaca aaggccgaga tgtcatcctg	480
aaaaaagatg tccgattcat agtcctgtcc aacaactacc tgcagatccg gggcatcaag	540
aaaacagatg agggcactta togctgtgag ggcagaatcc tggcacgggg ggagatcaac	600
ttcaaggaca ttcaggatcat tgtgaatgtg ccacctacca tccaggccag gcagaatatt	660

ES 2 580 837 T3

gtgaatgcca cgcaccaact cggccagtcc gtcaccctgg tgtgcatgc cgaaggcttc 720
 ccagagccca ccatgagctg gacaaaggat ggggaacaga tagagcaaga ggaagacgat 780
 gagaagtaca tcttcagcga cgatagtcc cagctgacca tcaaaaagggt ggataagaac 840
 gacgaggctg agtacatctg cattgctgag aacaaggctg gcgagcagga tgcgaccatc 900
 cacctcaaag tctttgcaaa acccaaaatc acatatgtag agaaccagac tgccatggaa 960
 ttagaggagc aggtcactct tacctgtgaa gcctccggag accccattcc ctccatcacc 1020
 tggaggactt ctaccoggaa catcagcagc gaagaaaaga ctctggatgg gcacatggtg 1080
 gtgctgtagc atgcccgtgt gtcgtcgtg accctgaaga gcatccagta cactgatgcc 1140
 ggagagtaca tctgcaccgc cagcaacacc atcggccagg actcccagtc catgtacctt 1200
 gaagtgcaat atgccccaaa gctacagggc cctgtggctg tgtacacttg ggaggggaac 1260
 caggtgaaca tcacctgcga ggtatttgcc tatcccagtg ccacgatctc atggtttcgg 1320
 gatggccagc tgctgccaag ctccaattac agcaatatca agatctacaa cccccctct 1380
 gccagctatc tggagggtgac ccagactct gagaatgatt ttgggaacta caactgtact 1440
 gcagtgaacc gcattgggca ggagtccctg gaattcatcc ttgttcaagc agacaccccc 1500
 tcttcacat ccacgacca ggtggagcca tactccagca cagcccaggt gcagtttgat 1560
 gaaccagagg ccacaggtgg ggtgcccac ctcaataca aagctgagtg gagagcagtt 1620
 ggtgaagaag tatggcattc caagtggat gatgccaagg aagccagcat ggagggcatc 1680
 gtcaccatcg tgggcctgaa gcccgaaaca acgtacgccg taaggctggc ggcgctcaat 1740
 ggcaaagggc tgggtgagat cagcgcggcc tccgagttca agacgcagcc agtccaaggg 1800
 gaaccagtg cacctaagct cgaagggcag atgggagagg atggaaactc tattaaagtg 1860
 aacctgatca agcaggatga cggcggctcc cccatcagac actatctggt caggtaccga 1920
 gcgctctcct ccgagtggaa accagagatc aggtcccgt ctggcagtga ccacgtcatg 1980
 ctgaagtccc tggactggaa tgctgagtat gaggctacg tgggtgctga gaaccagcaa 2040
 ggaaaatcca agcggctca ttttgtgttc aggacctcg cccagcccac agccatccca 2100
 gccaacggca gcccacctc aggcctgagc accggggcca tcgtgggcat cctcatcgtc 2160
 atcttcgtcc tgctcctggt ggttgtggac atcacctgct acttctgaa caagtgtggc 2220
 ctggtcatgt gcattgagg caacctgtgt ggaaaagccg ggcccggggc caagggcaag 2280
 gacatggagg agggcaaggc cgccttctcg aaagatgagt ccaaggagcc catcgtggag 2340
 gttcgaacgg aggaggagag gaccccaaac catgatggag ggaaacacac agagcccaac 2400
 gagaccacgc cactgacgga gcccgagaag ggcccgtag aagcaaagcc agagtgccag 2460
 gagacagaaa cgaagccagc gccagccgaa gtcaagacgg tccccaatga cgccacacag 2520
 acaaaggaga acgagagcaa agcatga 2547

- <210> 7
- <211> 1617
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 7

ES 2 580 837 T3

atgaccaccc caggaaaaga gaactttcgc ctgaaaagtt acaagaacaa atctctgaat 60
cccgatgaga tgcgcaggag gagggaggaa gaaggactgc agttacgaaa gcagaaaaga 120
gaagagcagt tattcaagcg gaaaaatggt gctacagcag aagaagaaac agaagaagaa 180
gttatgtcag atggaggctt tcatgaggct cagattagta acatggagat ggcaccaggt 240
ggtgtcatca cttctgacat gattgaaatg atatttcca aaagcccaga gcaacagctt 300
tcagcaacac agaaattcag gaagctgctt tcaaaagaac ctaacctcc tattgatgaa 360
gttatcagca caccaggagt agtggccagg tttgtggagt tcctcaaacg aaaagagaat 420
tgtacactgc agtttgaatc agcttgggta ctgacaaata ttgcttcagg aaattctctt 480
cagacccgaa ttgtgattca ggcaggagct gtgccatct tcatagagtt gctcagctca 540
gagtttgaag atgtccagga acaggcagtc tgggctcttg gcaacattgc tggagatagt 600
accatgtgca gggactatgt cttagactgc aatatccttc cccctctttt gcagttattt 660
tcaaagcaaa accgcctgac catgaccggg aatgcagtat gggctttgtc taatctctgt 720
agagggaaaa gtccacctcc agaatttgca aaggtttctc catgtctgaa tgtgctttcc 780
tggttgctgt ttgtcagtgca cactgatgta ctggctgatg cctgctgggc cctctcatat 840
ctatcagatg gacccaatga taaaattcaa gcggtcatcg atgcgggagt atgtaggaga 900
cttgtggaac tgctgatgca taatgattat aaagtggttt ctctgcttt gcgagctgtg 960
ggaaacattg tcacagggga tgatattcag acacaggtaa ttctgaattg ctgagctctg 1020
cagagtttat tgcatttgcg gagtagccca aaggaatcta tcaaaaagga agcatggtgg 1080
acgatatcta atattacagc tggaaatagg gcacagatcc agactgtgat agatgccaac 1140
attttcccag ccctcattag tattttacaa actgctgaat ttcggacaag aaaagaagca 1200
gcttgggcca tcacaaatgc aacttctgga ggatcagctg aacagatcaa gtacctagta 1260
gaactgggtt gtatcaagcc gctctgtgat ctctcacgg tcatggactc taagattgta 1320
caggttggcc taaatggctt ggaaaatata ctgaggcttg gagaacagga agccaaaagg 1380
aatggcactg gcattaaccc ttactgtgct ttgattgaag aagcttatgg tctggataaa 1440
attgagttct tacagagtca tgaaaaccag gagatctacc aaaaggcctt tgatcttatt 1500
gagcattact tcgggaccga agatgaagac agcagcattg caccacaggt tgaccttaac 1560
cagcagcagt acatcttcca acagtgtgag gctcctatgg aaggtttcca gctttga 1617

<210> 8
<211> 1470
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

5

ES 2 580 837 T3

atgctggaca tgggagatag gaaagaggtg aaaatgatcc ccaagtcctc gttcagcadc 60
aacagcctgg tgcccagagg ggtccagaac gacaaccacc acgcgagcca cggccaccac 120
aacagccacc acccccagca ccaccaccac caccaccacc atcaccacca cccgcgcgcg 180
cccgccccgc aaccgcgcgc gccgcgcgag cagcagcagc cgcgcgcgcg gccgccccgc 240
gcaccgcagc cccccagac gcggggcgcc cgggcgcgcg acgacgacaa gggccccag 300
cagctgctgc tcccgcgcgc gccaccgcca ccaccggcgc cgcacctgga cggggctaaa 360
gcggacgggc tgggcggcaa gggcgagccg ggcgcgggc cgggggagct ggcccccgtc 420
gggcgcgagc agaaggagaa gggcgccggc gccggggggg aggagaagaa gggggcgggc 480
gagggcggca aggacgggga ggggggcaag gagggcgaga agaagaacgg caagtacgag 540
aagccgcctg tcagctacaa cgcgctcadc atgatggcca tccggcagag ccccagagaag 600
cggctcacgc tcaacggcat ctacgagttc atcatgaaga acttccctta ctaccgcgag 660
aacaagcagg gctggcagaa ctccatcgc cacaatctgt ccctcaacaa gtgcttcgtg 720
aaggtgcgcg gccactacga cgaccgcggc aagggcaact actggatgct ggaccgcctc 780
agcgacgagc tgttcatcgg cggcaccacg ggcaagctgc ggcgcgcctc caccacctcg 840
cgggccaagc tggcctcaa gcgcgggtgc gcctcacct ccaccggcct caccttcag 900
gaccgcgcgc gctccctcta ctggccatg tcgcccctcc tgtccctgca ccacccccgc 960
gccagcagca ctttgagtta caacggcacc acgtcggcct accccagcca ccccatgccc 1020
tacagctccg tgttgactca gaactcgtg ggcaacaacc actccttctc caccgccaac 1080
ggcctgagcg tggaccggct ggtcaacggg gagatcccgt acgccacgca ccacctcacg 1140
gccgcgcgcg tagccgcctc ggtgcctgc ggctgtcgg tgccctgctc tgggacctac 1200
tccctcaacc cctgctccgt caacctgctc gcgggcccaga ccagttactt tttccccac 1260
gtcccgcacc cgtcaatgac ttgcgagagc agcacgtcca tgagcgccag ggcgcgctcc 1320
tctccacgt cgcgcgagc ccctcgacc ctgcccgtg agtctttaag accctctttg 1380
ccaagtthta cgacgggact gtctggggga ctgtctgatt atttcacaca tcaaatcag 1440
gggtctcttt ccaacccttt aatacattaa 1470

<210> 9
<211> 2908
<212> ADN

5

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

10

cgggcgcgcg aggagcaggt gagctgggag cgaggggcca aggcgcggag aagcccggcc 60
gcccggtggg cggcagaagg ctacgcccag gcggcggcgc cgactccgtt ccaactctcg 120
cccggatcca gccctccggg ttcccaggcg ctcaacctcc tctgacgcac tttaaagagt 180

ES 2 580 837 T3

ctccccctt ccacctcagg gcgagtaata gcgaccaatc atcaagccat ttaccaggct 240
 tcggaggaag ctgtttatgt gatccccgca ctaattaggc tcatgaacta acaaatcggt 300
 tgcacaactt gtgaagaagc gaacacttcc atggattgtc cttggactta gggcgccctg 360
 cccgcctttt gcagaggaga aaaaactttt tttttttttt gcctcccccg agaactttcc 420
 ccccttctcc tccctgcctc taactccgat cccccacgc catctcgcca aaaaaaaaaa 480
 aaaaaaaaaa aaagaaaaa aaagaaaaa aaagaaaaa aattaccca atccacgcct 540
 gcaaattctt ctggaaggat tttccccct ctcttcaggt tgggcgctt tgggtcaaga 600
 ttctcgggat cctcggctt gcctctccct ctccctccc cctccttcc ttttctctt 660
 ccttctctt ctctctctc ttccttccc ccacccccac cccacccca aacaaacgag 720
 tccccaatc tcgtccgtcc tcgccgcggg cagcgggcgg cggaggcagc gtgcggcgg 780
 cgccaggagc tgggagccca gggcgccgc tcctcggcgc agcatgttcc agccggcgc 840
 caagcgtgc ttcaccatcg agtcgctggt ggccaaggac agtcccctgc ccgcctcgcg 900
 ctccgaggac cccatccgtc ccgcggcact cagctacgt aactccagcc ccataaatcc 960
 gttctcaac ggttccact cggccgcgc cgcgcgcgc ggtagggcg tctactcaa 1020
 ccggacttg gtgttcgcc aggcggtct gcacccgcc aaccgcgcg tgcagtgca 1080
 cccggtgcc cgcgcgcag ccctggcgc ccacccccta cctcctcgc actcgccaca 1140
 cccctattc gcctcgcagc agcgggatcc gtccacctc taccctggc tcatccaccg 1200
 ctaccgatat ctgggtcatc gcttcaagg gaacgacact agccccgaga gtttctttt 1260
 gcacaacgcg ctggcccga agcccaagc gatccgaacc gccttctccc cgtcccagct 1320
 tctaaggctg gaacacgcct ttgagaaga tcactacgt gtgggcgcg aaaggaagca 1380
 gctggcacac agcctcagcc tcacggaaac tcaggtaaaa gtatggttcc agaaccgaag 1440
 aacaaagtcc aaaaggcaga agctggagga agaaggctca gattcgcaac aaaagaaaa 1500
 agggacgcac catattaacc ggtggagaat cgcaccaag caggcgagtc cggaggaaat 1560
 agacgtgacc tcagatgatt aaaaacata acctaaccac acagaaacgg acaacatgga 1620
 gcaaaagaga cagggagag tggagaagga aaaaacccta caaaacaaa acaaacgcga 1680
 tacacgttca ccgagaaag gagagggaat cggagggagc agcggaatgc ggcgaagact 1740
 ctggacagcg agggcacag gtcccaaacc gagccgcgc caagatggca gaggatggag 1800
 gctccttcat caacaagcga ccctcgtcta aagaggcagc tgagtgagag acacagagag 1860
 aaggagaaag agggaggag agagagaaag agagagaaag agagagagag agagagagag 1920
 agaaagctga acgtgcactc tgacaaggg agctgtcaat caaacaccaa accggggaga 1980
 caagatgatt ggcaggtatt ccgtttatca cagtccactt aaaaaatgat gatgatgata 2040
 aaaaccacga cccaaccag cacaggactt tttgtttt tgcactcgc tgtgttccc 2100

ES 2 580 837 T3

ccccatcttt aaaataaatt agtaataaaa aacaaaaatt ccatatctag ccccatccca 2160
 cacctgtttc aaatccttga aatgcatgta gcagttgttg ggcgatggt gtttaaagac 2220
 cgaaaatgaa ttgtaatttt ctttctcttt taaagacagg ttctgtgtgc tttttatttt 2280
 gatTTTTTTT cccaagaaat gtgcagtctg taaacacttt ttgatacctt ctgatgtcaa 2340
 agtgattgtg oaagctaaat gaagtaggct cagcgatagt ggtcctctta cagagaaaacg 2400
 gggagcagga cgacgggggg gctgggggtg gcgggggagg gtgccacaaa aaagaatcag 2460
 gacttgtact gggaaaaaaa cccctaaatt aattatattt ctggacatt ccctttccta 2520
 acatcctgag gcttaaaacc ctgatgcaaa cttctccttt cagtggttgg agaaattggc 2580
 cgagttcaac cattcaactgc aatgcotatt ccaaacttta aatctatcta ttgcaaaacc 2640
 tgaaggactg tagttagcgg ggatgatgtt aagtgtggcc aagcgcacgg cggcaagttt 2700
 tcaagcactg agtttctatt ccaagatcat agacttacta aagagagtga caaatgcttc 2760
 cttaatgtct tctataccag aatgtaaata tttttgtgtt ttgtgtaat ttgttagaat 2820
 tctaacacac tatatacttc caagaagtat gtcaatgtca atatTTTgtc aataaagatt 2880
 tatcaatatg ccctcaaaaa aaaaaaaaa 2908

<210> 10
 <211> 2191
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 10

gcgacgaaag agaggatgcc tcttaaaggc agaagacttt aactaggggc gggcgagcag 60
 atgtgtgaga tcttctattc aaagagtgga catatagccc agttttcaga gccacgtatt 120
 cgagccccgt gggatccgga ggctgccaac cagctccagc atgcagaaca gtcacagcgg 180
 agtgaatcag cttggtgggtg tctttgtcaa cggcgggcca ctgccggact ccacccggca 240
 gaagatcgta gagctagctc acagcggggc cgggccgtgc gacatttccc gaattctgca 300
 ggtgtccaac ggatgtgtga gtaaaattct gggcaggtat tacgagactg gctccatcag 360
 acccagggca atcggaggca gtaagccaag agtggcgact ccagaagttg taagcaaaat 420
 agcccagtat aaacgggagt gcccgccat ctttgcttgg gaaatccgag acagattact 480
 ctccgagggg gtctgtacca acgacaatat acccagtgtg tcatcaataa acagagttct 540
 tcgcaacctg gctagcgaag agcaacagat gggcgcagac ggcatgtatg ataaactaag 600
 gatgctgaac ggacagaccg gaagctgggg caccgcctt gggttggtatc ccgggacgtc 660
 agtaccaggg caaccacgc aagacggctg ccagcaacag gaaggacagg gagaaaacac 720
 caactccatc agctccaatg gagaagactc ggatgaggct caaatgcggc tgcagctgaa 780
 gcggaagctg cagagaaata gaacatcttt taccagagg cagattgagg ctctggagaa 840
 agagtttgag aggaccatt atccagatgt gtttgcccgg gaaagactag cagccaaaat 900

10

ES 2 580 837 T3

agatctacct gaagcaagga tacaggtgtg gttttctaac cgaagggcca agtggagaag	960
agaagaaaaa ctgaggaacc agagaagaca ggccagcaac accccgagtc acatccctat	1020
cagcagcagt ttcagtacca gtgtctacca gccaatcca cagcccacca cacctgtctc	1080
ctcctttaca tcgggttcca tgttgggccc cacagacacc gccctcacca acacgtacag	1140
tgctttgccg ccgatgccca gcttcacat ggcaaataac ctgcctatgc aacccccagt	1200
ccccagtcag acctcctcgt actcctgcat gctgcccacc agccctcag tgaatggggc	1260
gagttatgat acctacaccc ctccgcacat gcaaacacac atgaacagtc agcccatggg	1320
cacctcggga accacttcaa caggactcat ttcacctgga gtgtcagttc ccgtccaagt	1380
tccccgaagt gaacctgaca tgtctcagta ctggcctcga ttacagtaaa gagagagaaa	1440
gagagagaat gtgatcgaga gggggattgt gttcactcag ccaatgacta tgtggacaca	1500
gcgggtgggt attcaggaaa gaaagagaaa tggctgtag aagcacttca ctttacaact	1560
gtgtcctata ctggagcccc ggaatggact agaaaccagg acctttgcgt acagaaggca	1620
cggtatcagt tggacaacat cttcattttg gtatccaaac ttttattcat tttggtgtat	1680
tatttgtaaa tgggcatttg tatgttataa tgaagaaaag aacaacacag gctgttggat	1740
cttggatctg tgttggctca tgtggttgtt taaaggaaac catgatcgac aagatttgcc	1800
atggatttaa gagttttatc aagatatatc gaatacttct acccatctgt tcatagttta	1860
tggactgatg ttccaagttt gtatcattcc tttgcatata attaaacatg gaacaacata	1920
cactagatat atgtaaaaa tatctgttgg tttttccaaa ggttgttaac agataaagtt	1980
tatgtgcaaa aaagggtaag atatgaattc gaggagaagt tgatagctaa aaggtagagt	2040
gtgtcttoga tataatccaa tttgttttat gtcaaatgt aagtatttgt cttccctaga	2100
aatcctcaga atgatttcta taataaagtt aatttcattt atatttgaaa aaaaaaaaaa	2160
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a	2191

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para producir Células Madre Neuronales (NCS), que comprende:
- 5 a) proporcionar células somáticas de mamífero seleccionadas entre el grupo de fibroblastos, queratinocitos y adipocitos; y
b) reprogramar dichas células somáticas en NSC por introducción, en las células somáticas, de al menos dos genes seleccionados entre el grupo de Bmi1 y Sox2 y cultivar las células somáticas en un medio que comprende factores de crecimiento seleccionados entre el grupo de FGF2, EGF y BDNF y un inhibidor de ROCK de molécula pequeña.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente
- c) incubar el producto de la etapa b) en condiciones adecuadas para proliferación de las NSC.
- 15 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que las células somáticas de mamífero de la etapa a) son células humanas.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los factores de crecimiento y la molécula pequeña de la etapa b) son complementos de un medio químicamente definido.
- 20 5. El método de la reivindicación 4, en el que el medio químicamente definido es un medio sin suero complementado con insulina, transferrina y progesterona.
- 25 6. El método de la reivindicación 1 a 5, en el que los al menos dos genes de la etapa b) comprenden adicionalmente al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en Mash1, Sox11, Emx2, Foxg1 y Pax6.
- 30 7. El método de la reivindicación 6, en el que el al menos un gen adicional de la etapa b) es Mash1.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el inhibidor de ROCK se selecciona entre el grupo que consiste en 1-(5-Isoquinolinsulfonil)homopiperazina, N-Bencil-2-(pirimidin-4-ilamino)tiazol-4-carboxamida, diclorhidrato de (+)-(R)-*trans*-4-(1-aminoetil)-N-(4-piridil)ciclohexanocarboxamida y N-((3R,4R)-4-[4-(2-Fluoro-6-hidroxi-3-metoxi-benzoil)-benzoilamino]-azepan-3-il)-4-hidroxi-3,5-dimetil-benzamida.
- 35 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que las células somáticas se tratan previamente con un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC).
- 40 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que los al menos dos genes que comprenden Bmi1 y Sox2 se administran a las células somáticas con un lentivirus.

Fig. 1

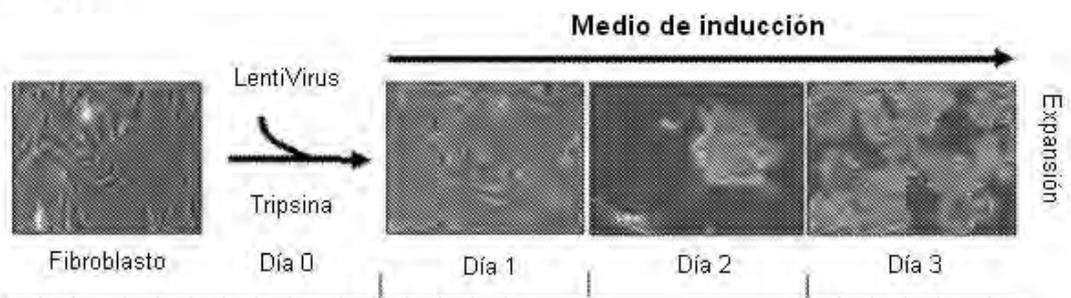


Fig. 2

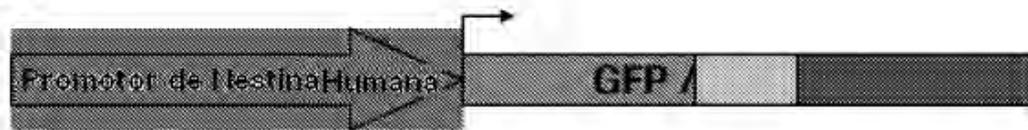
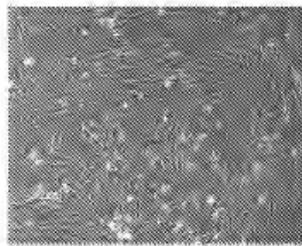
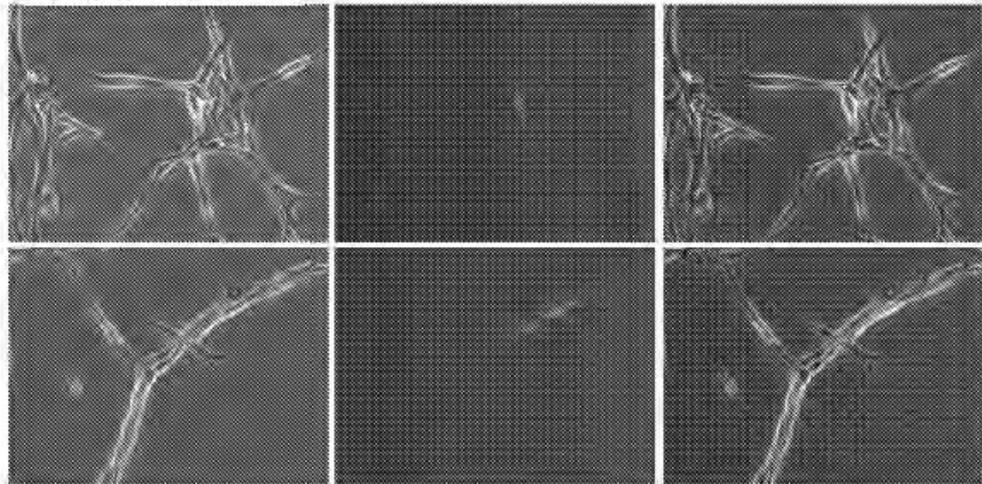


Fig. 3



Fibroblasto humano 10X



Contraste de fase 20X

Canal verde 20X

Fusión 20X

Fig. 4

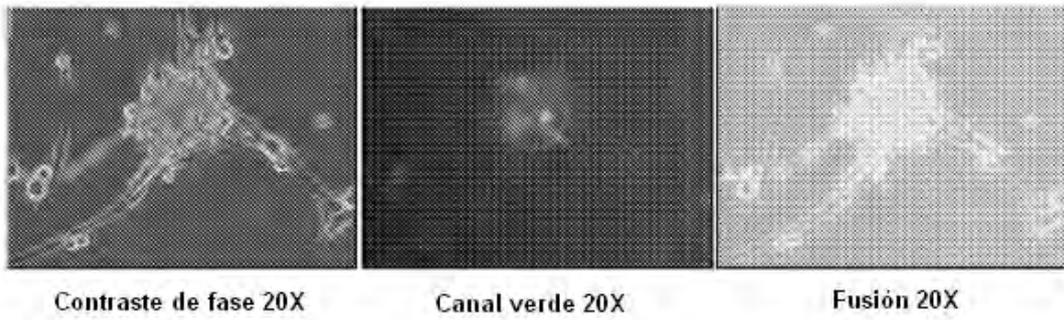


Fig. 5

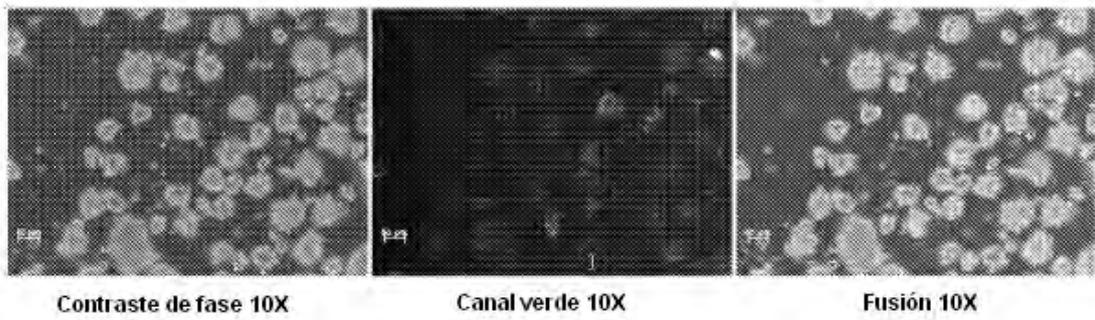


Fig. 6

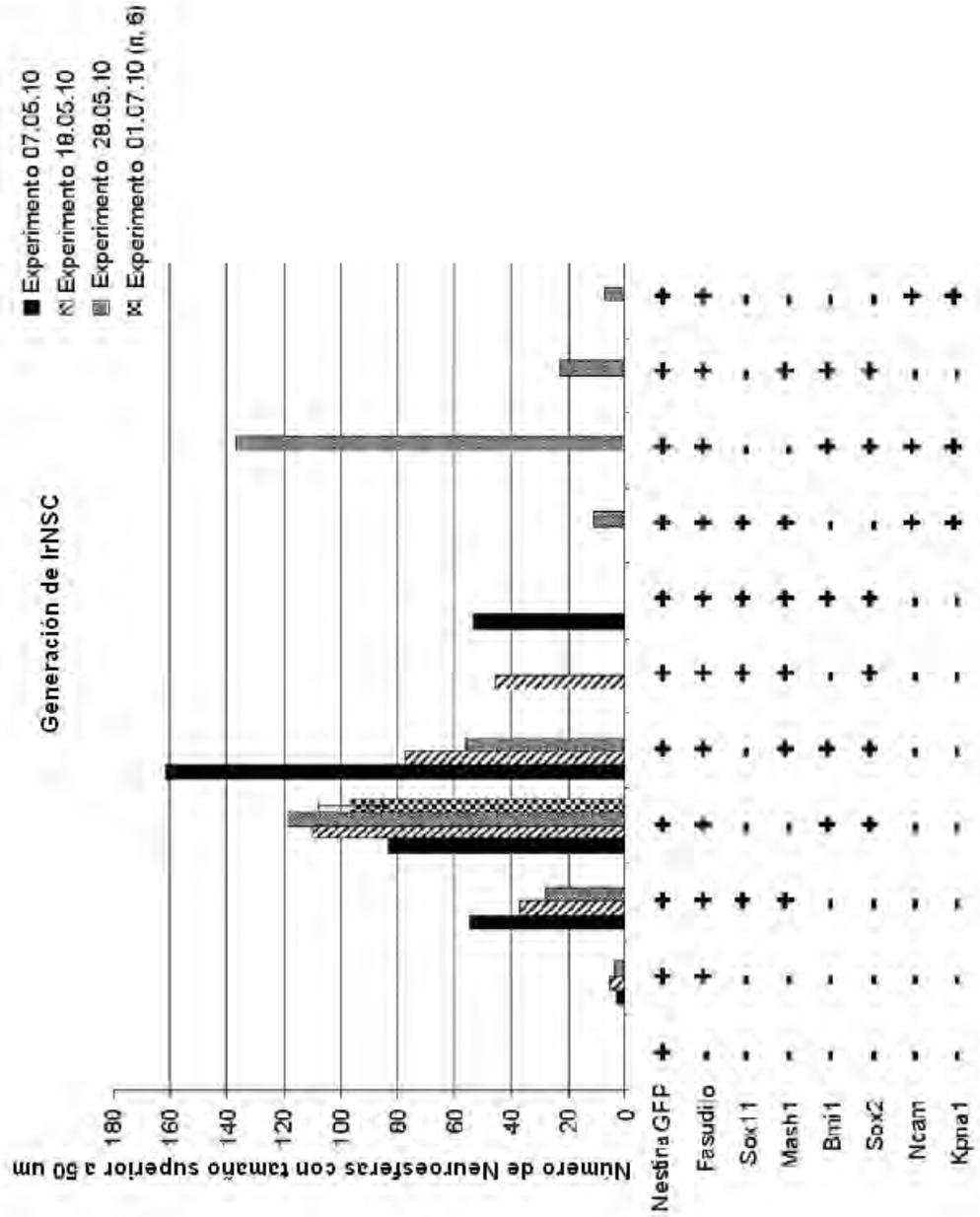


Fig. 7

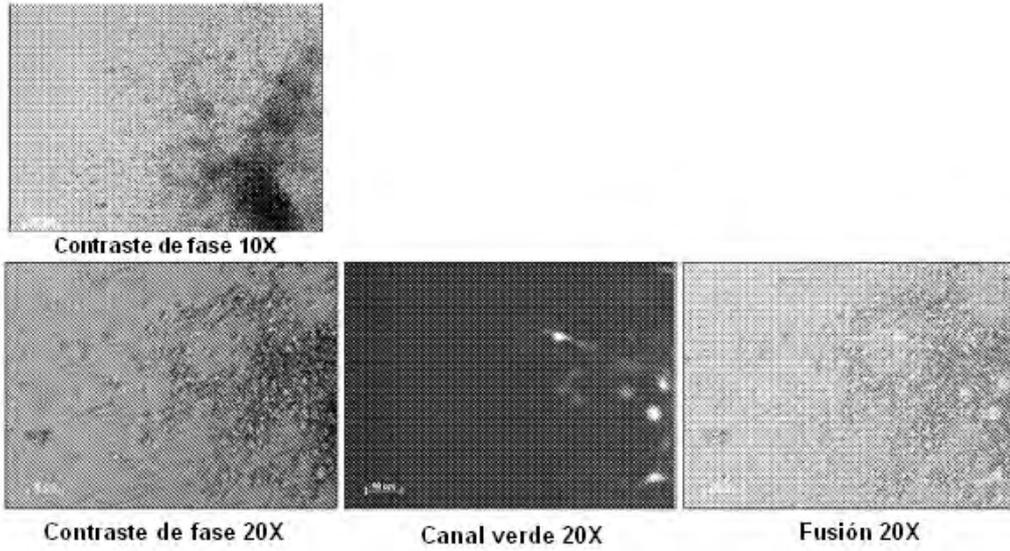


Fig. 8

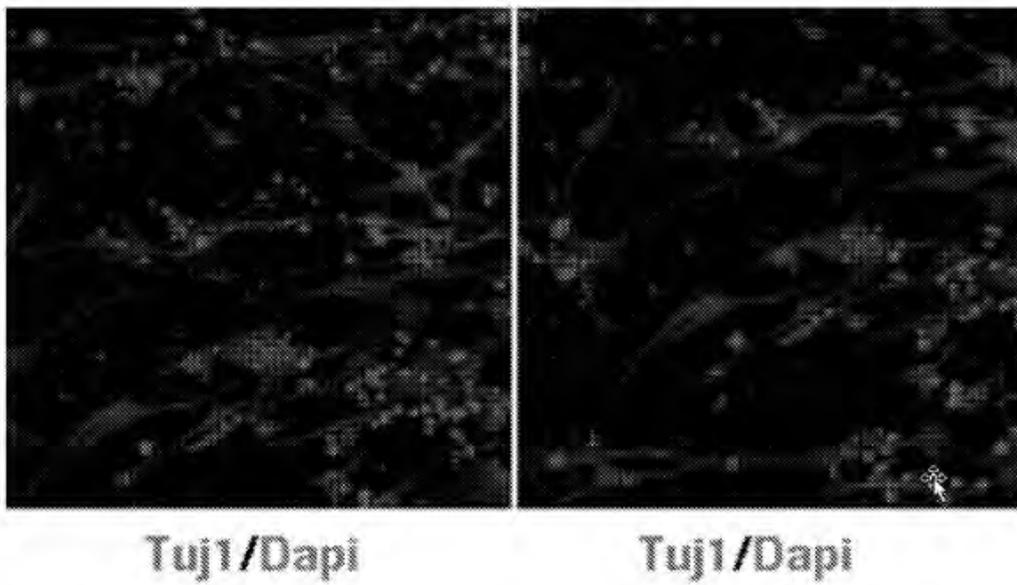


Fig. 9

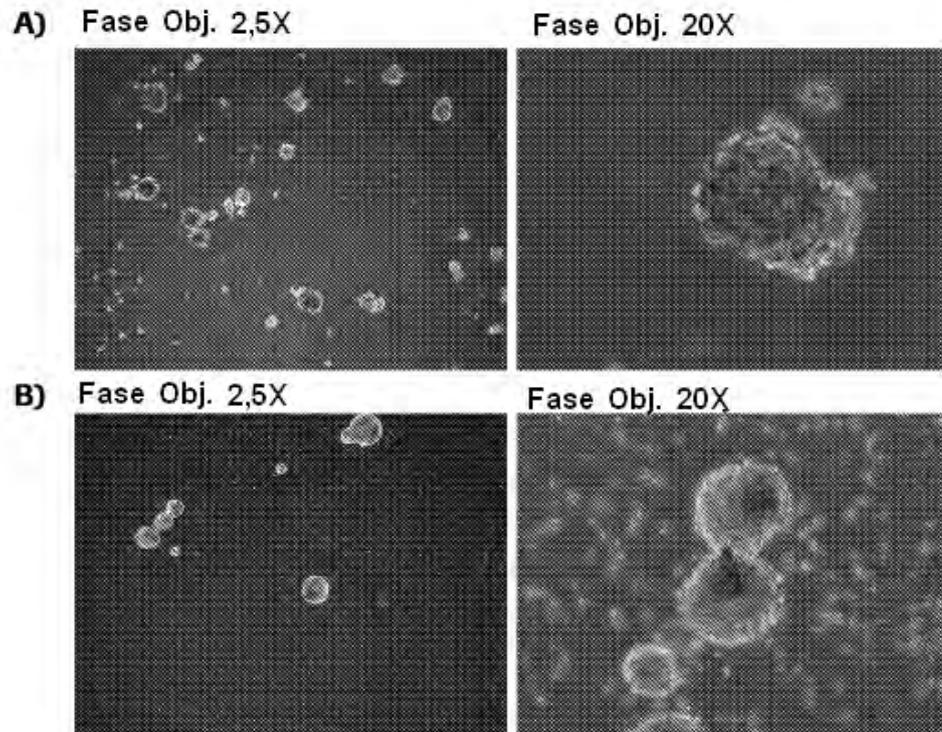


Fig. 10

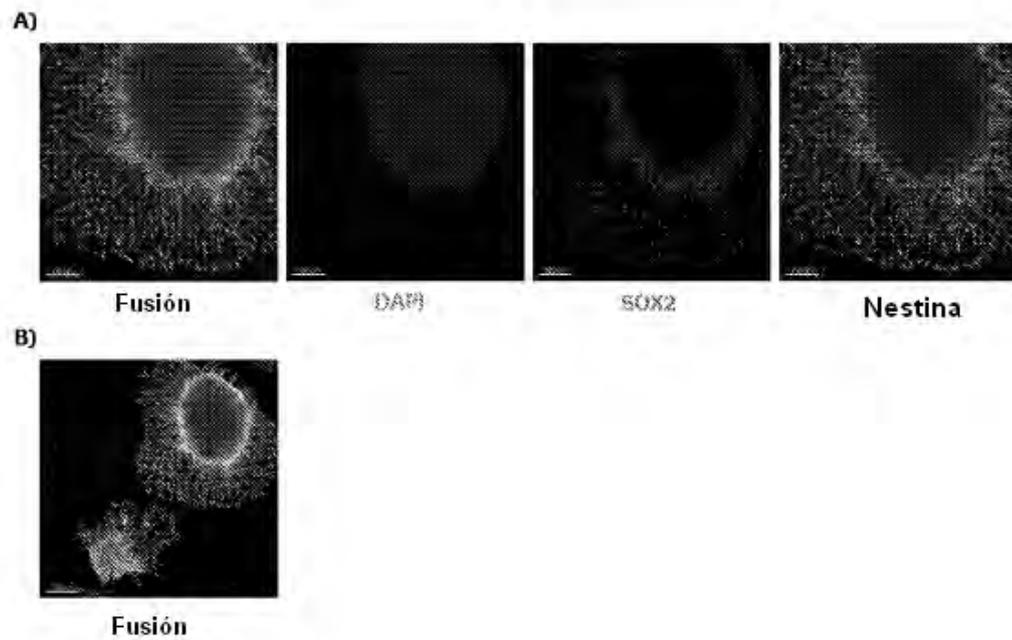


Fig. 11

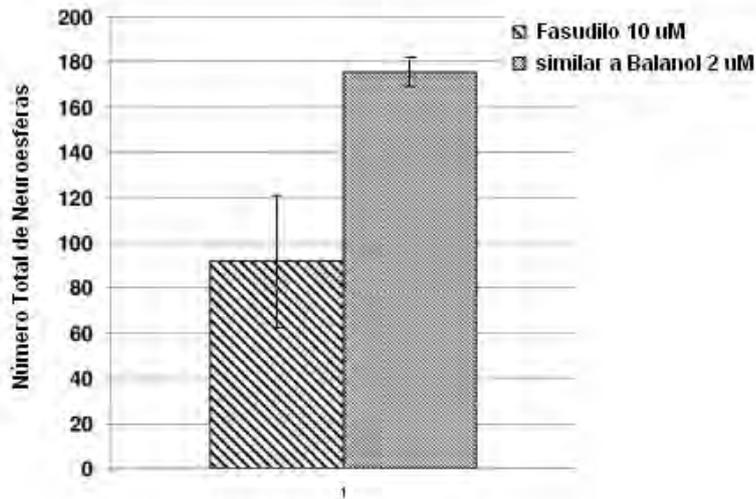


Fig. 12

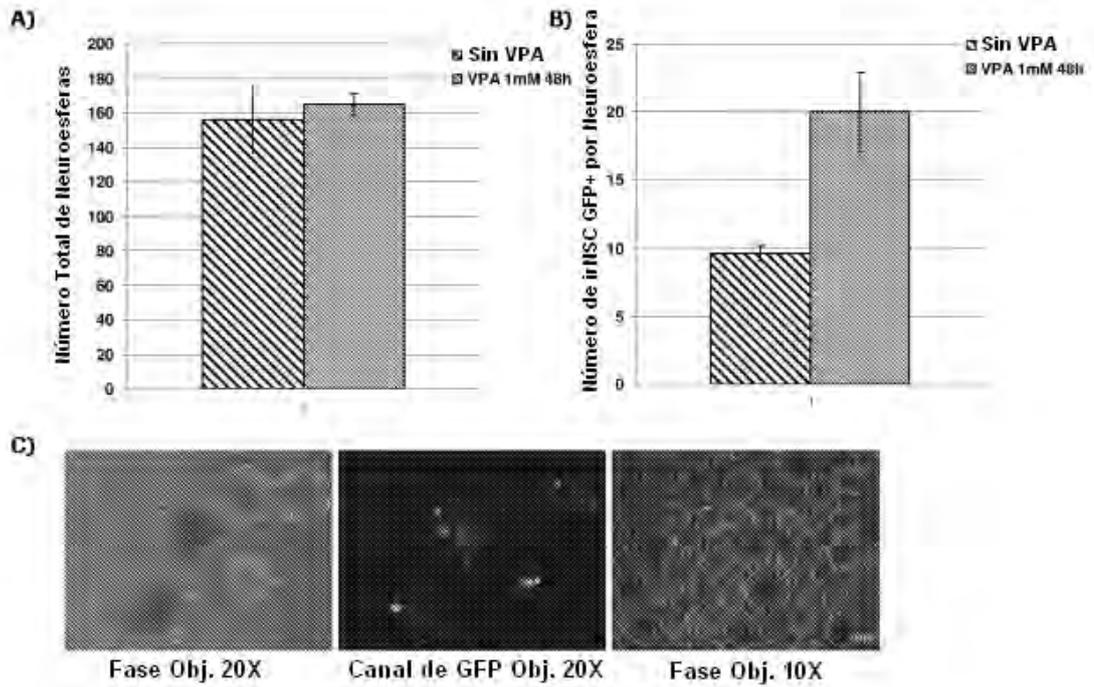


Fig. 13

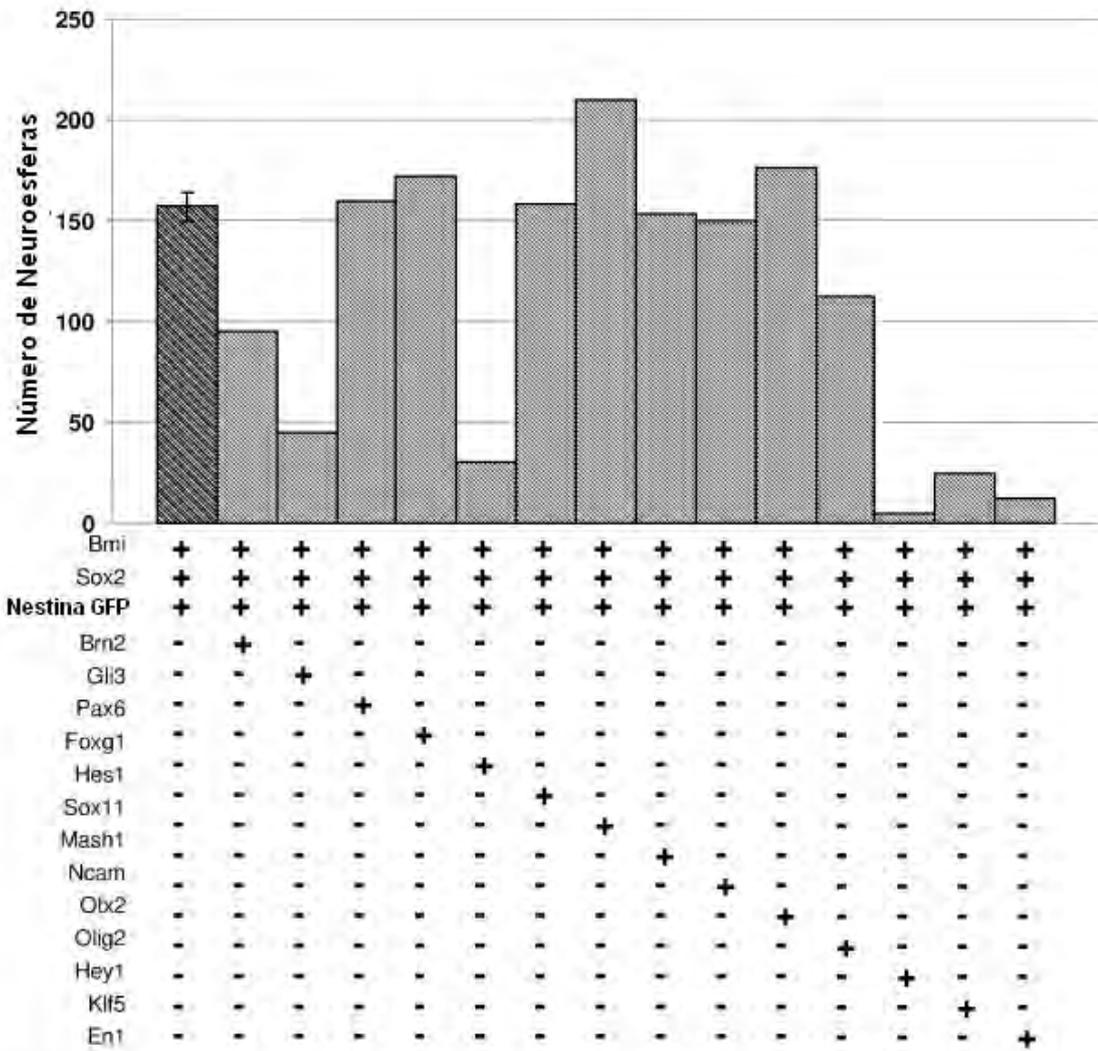


Fig. 14

A) Fase Obj. 2,5X

Fase Obj. 10X

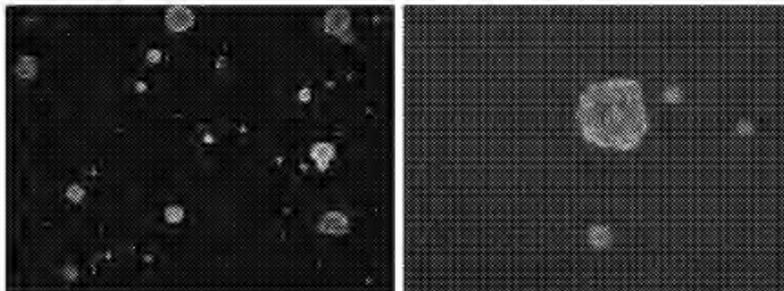


Fig. 15

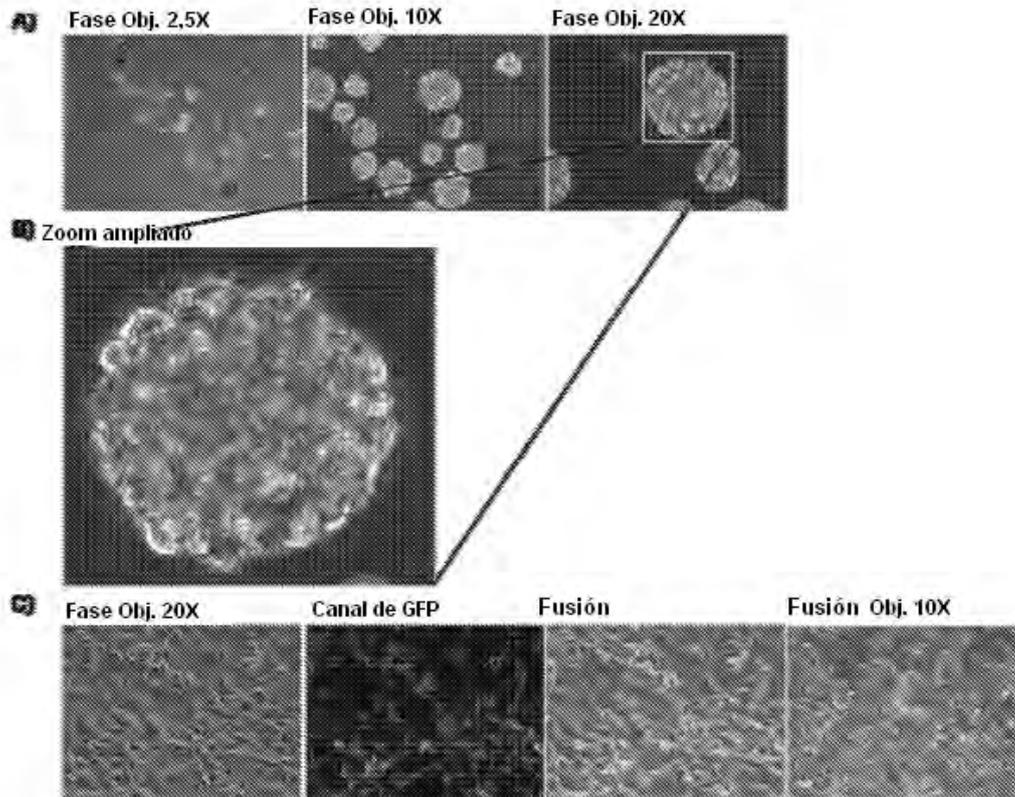


Fig. 16

