

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 189**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 15/867** (2006.01)

**C12N 15/87** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.1999 PCT/US1999/22007**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.03.2000 WO0017323**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.1999 E 99948396 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 1115841**

54 Título: **Líneas de células madre neurales estables**

30 Prioridad:

**22.09.1998 US 101354 P**

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

**21.10.2016**

73 Titular/es:

**NEURALSTEM, INC. (100.0%)  
20271 Goldenrod Lane, 2nd Floor  
Germantown, Maryland 20876**

72 Inventor/es:

**YANG, RENJI y  
JOHE, KARL, K.**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

ES 2 587 189 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

Líneas de células madre neurales estables

5 1. CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente solicitud describe un procedimiento sistemático y eficiente para el establecimiento de líneas de células madre neurales estables y líneas progenitoras neuronales. Las líneas celulares resultantes proporcionan cultivos robustos, sencillos y reproducibles de neuronas humanas y de otros mamíferos en cantidades masivas comercialmente útiles, manteniendo los cariotipos normales y los fenotipos neuronales normales.

2. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

[0002] Un cerebro fetal en desarrollo contiene todas las células germinales con respecto a las células de un cerebro adulto, así como todos los programas necesarios para orquestarlas hacia la red final de neuronas. En las etapas tempranas del desarrollo, el sistema nervioso está poblado por células germinales a partir de las cuales derivan todas las otras células, principalmente neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, durante las etapas posteriores del desarrollo. Es evidente que este tipo de células germinales que son precursoras del desarrollo normal del cerebro serían ideales para todas las terapias basadas en genes y basadas en células si estas células germinales se pudieran aislar, propagar y diferenciar en tipos de células maduras.

[0003] La utilidad de las células primarias aisladas, tanto para la investigación básica como para la aplicación terapéutica, depende del grado en el que las células aisladas se parecen a las del cerebro. Sólo el número de tipos diferentes de células precursoras neurales que hay en el cerebro en desarrollo es desconocido. Sin embargo, pueden existir varios tipos de células distintas:

un precursor unipotencial a neuronas solamente ("progenitor comprometido neuronal" o "neuroblasto"),

un precursor unipotencial a oligodendrocitos solamente ("oligodendroblasto"),

un precursor unipotencial a astrocitos solamente ("astroblasto"),

un precursor bipotencial que puede convertirse en neuronas o oligodendrocitos, neuronas o astrocitos, y oligodendrocitos o astrocitos, y

un precursor multipotencial que mantiene la capacidad de diferenciarse en cualquiera de los tres tipos de células.

[0004] Las células madre del SNC son células precursoras multipotenciales con la propiedad innata de diferenciarse en todos los tipos de células principales del sistema nervioso central de los mamíferos (SNC), incluyendo neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Los procedimientos para el aislamiento y la diferenciación de las células madre del SNC y la caracterización de tipos de células diferenciadas se han descrito anteriormente en detalle, la patente US 5.753.506 (Johe). Brevemente, las células madre del SNC se expanden en medio definido químicamente libre de suero que contiene factor de crecimiento de fibroblastos básico, bFGF, como el único mitógeno. Las condiciones de cultivo permite poblaciones casi puras de células madre del SNC durante un largo período como un cultivo en masas y como un cultivo clonal.

[0005] La capacidad mitótica de las células madre del SNC, sin embargo, es finita. Con las condiciones de cultivo anteriores, había sido difícil expandir las células madre del SNC más allá de aproximadamente 30 duplicaciones celulares momento, en cuyo punto la mayoría de las células han perdido su capacidad de diferenciación neuronal y se expanden adicionalmente como progenitores gliales más que como células madre multipotenciales. El mecanismo de esta limitación es aún desconocido.

[0006] Se realizó la hipótesis de que las células madre mitóticas del SNC secretan un factor o factores endocrinos que suprimen la entrada en el ciclo celular en la fase G1 de la mitosis. Esto antagonizaría eficazmente las acciones mitogénicas de bFGF e iniciaría la ruta de diferenciación. Por lo tanto, es un mecanismo para la autoregulación de la proliferación de células madre del SNC y, in vivo, para la limitación de la generación de neuronas y glia durante el desarrollo. En concordancia con este mecanismo está la observación de que la alta densidad de células diferencia rápidamente las células madre del SNC, incluso en presencia de bFGF y con independencia del paso del tiempo.

[0007] A pesar de que las 30 duplicaciones celulares producen una expansión de  $10^9$  veces de las células, un procedimiento para una expansión más significativa de las células madre del SNC sería de valor comercial significativo. En el presente documento, se da a conocer que la activación constitutiva de proteína c-myc en células madre del SNC evita su diferenciación espontánea a una alta densidad celular, confiere resistencia a la diferenciación glial, y aumenta la capacidad mitótica más de 60 duplicaciones celulares. Por tanto, este procedimiento produce una expansión de más de  $10^{18}$  veces de células madre del SNC.

## DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0008] La presente solicitud revela un procedimiento para producir líneas celulares estables de células precursoras neurales de mamífero in vitro. El procedimiento comprende las etapas, según la reivindicación 1, en el que las células precursoras neurales no incluyen las células madre embrionarias humanas.

- 5 **[0009]** En una realización preferida del procedimiento, el gen c-myc está fusionado con otros elementos de ADN, donde los otros elementos de ADN comprenden al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en un dominio de unión a ligando para un receptor de estrógeno, un receptor de andrógeno, un receptor de progesterona, un receptor de glucocorticoide, un receptor de hormona tiroidea, un receptor de retinoide y un receptor de ecdisona.
- 10 **[0010]** En otra realización preferida del procedimiento, el medio que contiene el primer mitógeno y el segundo mitógeno comprende además una sustancia química activadora de myc seleccionada del grupo que consiste en  $\beta$ -estradiol, RU38486, dexametasona, hormonas tiroideas, retinoides y ecdisona.
- 15 **[0011]** En una realización más preferida del procedimiento, las células precursoras neurales de mamífero se derivan de un ser humano. En otra realización más preferida del procedimiento, las células precursoras neurales de mamífero se derivan de un cultivo *in vitro* de células madre fetales.
- 20 **[0012]** La presente solicitud también revela una línea celular producida de acuerdo con este procedimiento. En una realización preferida de la línea celular, las células mantienen una capacidad multipotencial de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. En otras realizaciones preferidas de la línea celular, las células mantienen una capacidad bipotencial de diferenciarse en neuronas y astrocitos o en astrocitos y oligodendrocitos.
- 25 **[0013]** En realizaciones más preferidas de la línea celular, las células mantienen una capacidad equipotencial de diferenciarse en neuronas o en astrocitos.
- 30 **[0014]** La presente solicitud también revela un procedimiento para producir líneas celulares clonales estables de células precursoras neurales de mamífero *in vitro*. El procedimiento comprende las etapas de preparar un cultivo de células precursoras neurales, en las que las células precursoras neurales no incluyen células madre embrionarias humanas, en un medio libre de suero; cultivar las células precursoras neurales en presencia de un primer mitógeno, en el que el primero mitógeno se selecciona del grupo que consiste en aFGF, bFGF, EGF, TGF $\alpha$  y combinaciones de los mismos; poner en contacto las células con un agente capaz de ser captado por las células y capaz de expresar un gen c-myc y un marcador seleccionable; cultivar adicionalmente las células en un medio que contiene el primer mitógeno y un segundo mitógeno, en el que el segundo mitógeno es suero; y recoger las células tratadas con c-myc y cocultivarlas con células alimentadoras libres del marcador seleccionable y capaces de soportar la supervivencia de las células tratadas con c-myc en un medio que contiene el primer mitógeno y el segundo mitógeno, con la condición de que el segundo mitógeno es distinto del primer mitógeno.
- 35 **[0015]** En una realización preferida de este procedimiento, el gen c-myc está fusionado con otros elementos de ADN, donde los otros elementos de ADN comprenden al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en un dominio de unión a ligando para un receptor de estrógeno, un receptor de andrógeno, un receptor de progesterona, un receptor de glucocorticoide, un receptor de hormona tiroidea, un receptor de retinoide, y un receptor de ecdisona.
- 40 **[0016]** En otra realización preferida de este procedimiento, el medio que contiene el primer mitógeno y el segundo mitógeno comprende además una sustancia química activador de myc seleccionado del grupo que consiste en  $\beta$ -estradiol, RU38486, dexametasona, hormonas tiroideas, retinoides, y ecdisona.
- 45 **[0017]** En una realización más preferida de este procedimiento, las células precursoras neurales de mamífero se derivan de un ser humano. En otra realización más preferida de este procedimiento, las células precursoras neurales de mamífero se derivan de un cultivo *in vitro* de células madre fetales.
- 50 **[0018]** La presente solicitud también revela una línea celular producida por este procedimiento. En una realización preferida de esta línea celular, las células mantienen una capacidad multipotencial de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. En otras realizaciones preferidas de esta línea celular, las células mantienen una capacidad bipotencial de diferenciarse en neuronas y astrocitos o en astrocitos y oligodendrocitos.
- 55 **[0019]** En realizaciones más preferidas de esta línea celular, las células mantienen una capacidad equipotencial para diferenciarse en neuronas o en astrocitos.
- 60 a) preparar un cultivo de células precursoras neurales en un medio libre de suero;  
 b) cultivar las células precursoras neurales en presencia de un primer mitógeno, en el que dicho primer mitógeno se selecciona del grupo que consiste en aFGF, bFGF, EGF, TGF $\alpha$  y combinaciones de los mismos;  
 c) introducir una construcción de c-myc y un marcador seleccionable en las células, en el que el c-myc incluye un ADNc de c-myc fusionado con ADN para un dominio de unión a ligando de un receptor nuclear seleccionado del grupo que consiste en un receptor de estrógeno, un receptor de andrógeno, un receptor de progesterona, un receptor de glucocorticoide, un receptor de hormona tiroidea, un receptor de retinoide y un receptor de ecdisona;  
 d) expandir las células a través de al menos treinta duplicaciones celulares en un medio que comprende el primer mitógeno y un segundo mitógeno, en el que dicho segundo mitógeno es suero en el que dicho medio que  
 65 comprende el primera mitógeno y el segunda mitógeno comprende además un agente activador de myc capaz de unirse al dominio de unión de ligando;

e) cocultivar células tratadas con c-myc con al menos una célula de alimentación; y f) extraer dicho primer mitógeno, dicho segundo mitógeno y dicho agente activador de myc para iniciar la diferenciación.

5 [0020] En una realización preferida de este procedimiento, el gen c-myc está fusionado con otros elementos de ADN, donde los otros elementos de ADN comprenden al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en un dominio de unión a ligando para un receptor de estrógeno, un receptor de andrógeno, un receptor de progesterona, un receptor de glucocorticoide, un receptor de hormona tiroidea, un receptor de retinoide, y un receptor de ecdisona.

10 [0021] En otra realización preferida de este procedimiento, el medio que contiene el primer mitógeno y el segundo mitógeno comprende además una sustancia química activador de myc seleccionado del grupo que consiste en  $\beta$ -estradiol, RU38486, dexametasona, hormonas tiroideas, retinoides, y ecdisona.

15 [0022] En una realización más preferida de este procedimiento, las células precursoras neurales de mamífero se derivan de un ser humano. En otra realización más preferida de este procedimiento, las células precursoras neurales de mamífero se derivan de un cultivo *in vitro* de células madre embrionarias pluripotentes.

20 [0023] La presente solicitud también revela una línea celular producida por este procedimiento. Las células de esta línea celular mantienen una capacidad multipotencial de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos o mantienen una capacidad bipotencial de diferenciarse en neuronas y astrocitos o en astrocitos y oligodendrocitos.

[0024] Alternativamente, las células de esta línea celular mantienen una capacidad equipotencial de diferenciarse en neuronas o en astrocitos.

## 25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

### [0025]

30 **Figura 1.** Disposición de plásmido de retrovirus pMycER. Se ligó un fragmento EcoR1 linealizado que contiene el gen c-myc humano fusionado con el dominio de unión a ligando del gen receptor de estrógeno humano (Eiler et al, 1989, Nature 340: 60-68) en dirección 3' de la LTR5' del plásmido de expresión retroviral pLXSN (Clontech). La construcción final contiene también un marcador seleccionable, el gen de resistencia a neomicina, Neo<sup>r</sup>, bajo el promotor de SV40, P<sub>SV40</sub>.

35 **Figura 2.** Capacidad de crecimiento de células madre del SNC humanas modificadas por MycER. Con el fin de medir la tasa y la capacidad de crecimiento, se expandió de manera continua un grupo de líneas de células madre del SNC humanas modificadas por MycER (HK 18.2) derivadas de tejido cortical fetal humano de 18 semanas en cultivo durante aproximadamente 80 días. En cada pase (círculo relleno), se recogieron las células, se contaron y se volvió a sembrar una fracción en placas nuevas. Este proceso se repitió durante 12 pases. Dividiendo el aumento del número de células de la densidad de siembra inicial hasta el momento de la recogida por la duración del cultivo por pase, se estimó el tiempo de duplicación aproximada (triángulo vacío). La línea de puntos a través del gráfico representa el tiempo de duplicación promedio durante todo el periodo de cultivo. La expansión acumulada de las células se calculó multiplicando los múltiplos del aumento del número de células en cada pase y se expresó como "No. de veces la expansión acumulada" sobre el número inicial de células en el día 0. El número inicial de células de partida en el día 0 fue de  $5,0 \times 10^6$  células.

45 **Figura 3.** Estabilidad de la diferenciación neuronal de las células madre del SNC humanas modificadas por MycER.  
**A.** Células madre del SNC no modificadas diferenciadas e inmunoteñidas con anticuerpos anti-MAP2ab;  
**B.** Células madre del SNC no modificadas diferenciadas e inmunoteñidas con anticuerpos anti-TH;  
**C.** Células corticales humanas modificadas por MycER en el pase 4, diferenciadas e inmunoteñidas con el anticuerpo anti-MAP2ab vistas a bajo aumento;  
**D.** Células corticales humanas modificadas por MycER en el pase 4, diferenciadas e inmunoteñidas con el anticuerpo anti-MAP2ab vistas a gran aumento;  
 50 **E.** Células corticales humanas modificadas por MycER en el pase 4, diferenciadas e inmunoteñidas con el anticuerpo anti-TH vistas a bajo aumento;  
**F.** Células corticales humanas modificadas por MycER en el pase 4, diferenciadas e inmunoteñidas con el anticuerpo anti-TH vistas a gran aumento;  
 55 **G.** Células corticales humanas modificadas por MycER en el pase 4, diferenciadas e inmunoteñidas con el anticuerpo anti-GABA vistas a bajo aumento;  
**H.** Células corticales humanas modificadas por MycER en el pase 4, diferenciadas e inmunoteñidas con el anticuerpo anti-GABA vistas a gran aumento;  
 60 **I.** Células corticales humanas modificadas por MycER en el pase 9, diferenciadas e inmunoteñidas con el anticuerpo anti-MAP2ab vistas a bajo aumento;  
**D.** Células corticales humanas modificadas por MycER en el pase 9, diferenciadas e inmunoteñidas con el anticuerpo anti-MAP2ab vistas a gran aumento;  
**E.** Células corticales humanas modificadas por MycER en el pase 9, diferenciadas e inmunoteñidas con el anticuerpo anti-TH vistas a bajo aumento;  
 65 **F.** Células corticales humanas modificadas por MycER en el pase 9, diferenciadas e inmunoteñidas con el anticuerpo anti-TH vistas a gran aumento;

**Figura 4.** Estabilidad de la diferenciación neuronal. Se diferenciaron líneas de células corticales humanas modificadas por MycER en el pase 4 y en el pase 11. Se cuantificó el número de neuronas inmunotefidas para proteínas MAP2ab o TH y se indicaron sus proporciones sobre las células totales.

**Figura 5.** Células progenitoras neuronales modificadas por MycER

**A.** Células progenitoras estriatales de rata modificadas por MycER inmunotefidas con el anticuerpo anti-tau;

**B.** Morfología y disposición de células progenitoras neuronales tau+/TuJ1-, inmunotefidas con anticuerpo anti-tau;

**C.** Morfología y disposición de células progenitoras neuronales tau+/TuJ1+, inmunotefidas con anticuerpo anti-tau; y

**D.** Morfología y disposición de células progenitoras neuronales tau+/TuJ1+ de **C**, inmunotefidas con el anticuerpo anti-TuJ1.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA

**[0026]** Las células neurales en cultivo son muy plásticas. Incluso una breve exposición a condiciones de cultivo subóptimas, tales como suero, puede tener efectos a largo plazo sutiles, pero importantes, en el fenotipo de las células. Sin embargo, casi todos los cultivos neurales descritos emplean suero como la fuente primaria de mitógeno. Los presentes inventores y otros han demostrado que, con el fin de preservar la potencial diferenciación intrínseca de las células madre y otras células, es crítico reducir la exposición de las células a suero y que los factores de crecimiento bien definidos, en particular bFGF y/o factor de crecimiento epidérmico, EGF, en un medio libre de suero, pueden proliferar una variedad de diferentes tipos de células en un solo cultivo (Johe, Patente de Estados Unidos 5.753.506; Weiss et al, Patente de Estados Unidos 5.851.832).

**[0027]** En ausencia de un marcador molecular particular para cada uno de los tipos de células, el aislamiento de potencialmente miles de tipos de células neurales distintas que pueden existir en un único cultivo no había sido posible. En los trabajos anteriores, los presentes inventores han descrito los procedimientos y composiciones de poblaciones de células madre del SNC diferentes que dan lugar a una variedad de diferentes neuronas en cultivo. Aquí, se describe un procedimiento reproducible y eficiente mediante la utilización de la sobreexpresión del gen c-myc para estabilizar los potenciales de diferenciación de las células neurales y para aislar líneas celulares clonales estables.

**[0028]** Con el pase continuo, las células madre del SNC pierden gradualmente su capacidad de diferenciarse en neuronas, convirtiéndose así en células progenitoras gliales. Las condiciones que aceleran este proceso incluyen alta densidad celular durante la proliferación, mala unión de las células en la superficie recubierta de la matriz extracelular, y exposición a factores promotores de glia, tales como CNTF (factor neurotrófico ciliar), LIF (factor inhibidor de la leucemia), BMP (factores morfogénicos óseos) y suero. A fin de superar esta inestabilidad de la capacidad de diferenciación neuronal de las células madre del SNC, los presentes inventores han introducido en las células un proto-oncogén celular, c-myc, cuya actividad puede ser regulada por la presencia o ausencia de una molécula extracelular,  $\beta$ -estradiol.

**[0029]** Las células madre del SNC humanas y de rata que albergan el gen de fusión se cultivaron en presencia continua de mitógenos y  $\beta$ -estradiol en el medio de cultivo. El crecimiento de las células fue significativamente más robusto, mostrando mayor tasa mitótica, resistencia a la diferenciación espontánea, y una estabilidad general mucho mayor durante la expansión. Las células no mostraron signos de transformación neoplásica o patrón de crecimiento o morfología anómalos. Tras la extracción de los mitógenos y  $\beta$ -estradiol, las células iniciaron la diferenciación rápidamente y dieron lugar a morfologías heterogéneas características de las neuronas y glía. La diferenciación neuronal fue eficiente, mostrando patrones de expresión molecular, localización de proteínas específicas de neuronas, y morfologías y comportamientos celulares esencialmente indistinguibles de las células madre del SNC no modificadas parentales.

**[0030]** La población neuronal consistía en varios fenotipos de neurotransmisores, incluyendo el fenotipo dopaminérgico positivo en tirosina hidroxilasa en el 10-20% de las neuronas. Dicha capacidad de diferenciación neuronal fue estable a través de más de 60 duplicaciones celulares dando lugar a un incremento de al menos  $1 \times 10^{18}$  veces en el número de neuronas y células gliales derivadas de las células madre. Por lo tanto, la modificación genética y el procedimiento de cultivo de células madre descritos aquí permiten el aislamiento estable de un número prácticamente ilimitado de células madre del SNC de todas las regiones del cerebro de los mamíferos en desarrollo, ocasionando cada clon de célula madre del SNC subtipos neuronales potencialmente distintos en número ilimitado. El resultado, entonces, es una biblioteca de neuronas de mamíferos, incluyendo humanos, con repertorios genéticos/moleculares distintos que representan los diversos fenotipos celulares de los cerebros maduros.

## Ejemplos

### Construcción de retrovirus que expresa receptores de estrógeno-c-Myc

**[0031]** Se linealizó un vector retroviral que contenía el gen de resistencia a neomicina bajo el promotor SV40 con EcoRI y se ligó con el fragmento EcoEI del ADN que codifica un gen de fusión de ADNc de c-myc humano y ADNc del receptor de estrógeno humano (Eiler et al. 1989, Nature 340: 60-68). El gen de fusión se colocó bajo la

regulación de la secuencia de repetición terminal larga (LTR) MMLV. La disposición general del vector retroviral final, pMycER, se muestra en la Figura 1.

#### Generación de una línea celular productora

5 **[0032]** Para establecer una línea celular que produce de forma estable el retrovirus MycER, se transfectó una línea celular de empaquetamiento anfotrópico con el plásmido pMycER. Se seleccionaron los clones estables con G418 (1 mg/ml, Life Technology Inc., MD) durante 4 semanas. Se cribaron veinte clones para la producción de título elevado frente a células Hela de acuerdo con el procedimiento estándar. Se seleccionó una línea celular, MycER.10, con un título retroviral de  $10^5$  pfu/ml según se mide por la infección de las células madre estriatales de rata para experimentos posteriores.

#### Infección de células madre del SNC de rata y humanas

15 **[0033]** Se prepararon células madre del SNC de rata y humano de acuerdo con el procedimiento previamente descrito (patente de Estados Unidos 5.753.506). Las células del pase 1 se sembraron a  $0,5 \times 10^6$  células por placa de 100 mm y se cultivaron durante tres días adicionales en medio N2 libre de suero más bFGF 10 ng/ml. Las células MycER.10 se cultivaron en DMEM/suero bovino fetal al 10% hasta un 50-75% de confluencia, se lavaron posteriormente tres veces con DMEM, y se incubaron durante 4-16 horas en un medio de recogida de retrovirus (IFM). IFM consistía en los componentes N2 estándar (insulina humana recombinante 25 mg/l, apotransferrina humana 100 mg/l, progesterona, putrescina, selenito de sodio) en DMEM más bFGF 10 ng/ml y fibronectina de plasma humano (hFN) 1  $\mu$ g/ml. IFM que contiene el retrovirus se clarificó mediante dos centrifugaciones a 1400 rpm y 3000 rpm. El sobrenadante se mezcló con N2 fresco en una proporción 1:1 con bFGF y hFN frescos a concentraciones finales de 10 ng/ml y 1  $\mu$ g/ml, respectivamente, y se aplicaron al cultivo de células madre del SNC con una confluencia del 50-75%. El período de infección fue habitualmente de 6 horas. Las células madre del SNC humanas se infectaron 1-3 veces durante un período de 2-3 días para compensar su lenta tasa mitótica. Posteriormente, las células se enjuagaron tres veces con una solución salina equilibrada de Hank (HBSS) libre de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , se pasaron, y se expandieron adicionalmente en N2 más de bFGF 10 ng/ml.

#### Selección de células madre del SNC que expresan MycER

30 **[0034]** Se pasaron células madre del SNC con la incorporación estable del retrovirus MycER 1-2 días después de la infección, se volvieron a sembrar a  $0,5 \times 10^6$  células por placa de 100 mm, y se seleccionaron a partir de 2 días después de la infección con 0,1-0,2 mg/ml G418, pH 7,4. El medio de crecimiento completo óptimo (IGM) estaba compuesto de DMEM/F12 (1:1), insulina humana recombinante 25 mg/l, apotransferrina humana 100 mg/l, progesterona, putrescina, selenito de sodio, bFGF 10 ng/ml,  $\beta$ -estradiol 0,2  $\mu$ M, G418 0,1 mg/ml y EGF 10 ng/ml o suero bovino fetal al 1%. Se añadió diariamente bFGF fresco (10 ng/ml, concentración final) y se cambió el medio una vez cada dos días. Las células se pasaron a aproximadamente un 50-75% de confluencia enjuagando tres veces con HBSS y tratamiento con tripsina (1 vez). La actividad de la tripsina se detuvo añadiendo inhibidor de tripsina de soja (1 mg/ml de concentración final).

#### Aislamiento de clones

45 **[0035]** Al final del tratamiento con G418 durante 14 días, las células se pasaron y se volvieron a sembrar aproximadamente 200-1000 células por placa de 100 mm. Dentro de las 24 horas después del sembrado, se marcaron las células individuales bien aisladas con círculos de 3 mm en la parte inferior de la placa de cultivo. A veces, el medio de cultivo completo se mezcló con un volumen igual de medio acondicionado por las mismas células a una densidad celular elevada para mejorar la supervivencia celular. Se recogieron los clones marcados con la ayuda de anillos de clonación y mediante tratamiento con tripsina. Los clones individuales se expandieron como el cultivo en masa y se almacenaron congelados.

50 **[0036]** Casi todos los clones generados de esta manera finalmente adoptaron morfología glial y no de diferenciaban en neuronas, a pesar de que las condiciones de cultivo son idénticas a las del cultivo de alta densidad. Por lo tanto, era evidente que las células modificadas por MycER en presencia de suero requerían una densidad celular relativamente elevada con el fin de mantener sus potenciales de diferenciación nativos y sobrevivir. Por lo tanto, la densidad celular se mantuvo en el intervalo de  $0,5 \times 10^6$  a  $1,0 \times 10^6$  células por placa de 100 mm mediante el complemento de la densidad clonal de células que expresan MycER con células madre primarias no modificadas. Mediante el mantenimiento de la selección de antibióticos durante 5-8 días con G418 0,1 mg/ml, la población de células de alimentación murió gradualmente mientras se permitía que la densidad celular local de células MycER resistentes a G418 aumentara gradualmente a fin de mantener su crecimiento óptimo. La selección de antibióticos se mantuvo durante la expansión posterior para asegurar que todas las células restantes fueran células modificadas por MycER.

65 **[0037]** Además de las células madre neurales, las células gliales inmaduras y los astrocitos maduros de origen humano y de rata fueron eficaces. Los fibroblastos también fueron útiles, pero más difíciles de manipular debido a su velocidad de proliferación rápida y su alta tolerancia a G418. Las neuronas también pueden ser útiles, pero su

naturaleza postmitótica las hizo mucho más resistentes a G418. Los fibroblastos no mitóticos y otras células no neurales que habían sido irradiadas con rayos gamma o tratadas con inhibidores de la mitosis, tales como arabinósido C o mitomicina, también puede ser eficaces en el apoyo a las células neurales modificadas por c-myc.

### 5 Diferenciación y caracterización de las células madre del SNC mitóticamente mejoradas

[0038] Las células madre del SNC que expresan de forma estable MycER se diferenciaron mediante el sembrado en placas de las células a 100.000 células/cm<sup>2</sup> o mayor densidad celular y la sustitución del medio de crecimiento por N2 sin bFGF, sin suero, y sin  $\beta$ -estradiol. Típicamente, se dejó que las células se diferenciaron durante 6-30 días antes del análisis inmunohistoquímico.

#### Resultados

##### 1. Búsqueda de factores adicionales que mejoran la capacidad de mitosis de células madre del SNC

[0039] El tiempo de duplicación de las células madre del SNC humanas en medio N2 con bFGF como el único mitógeno es de aproximadamente 60 horas, que es notablemente más lento que las 24 horas para las células madre del SNC de rata en condiciones de cultivo idénticas. Esto puede ser debido a una diferencia de especies en ciertas propiedades autónomas de las células, tales como una diferencia en la velocidad de replicación del ADN o en otras fases mitóticas, G1 o G2, del ciclo celular. Los presentes inventores investigaron otros factores para acelerar la tasa mitótica de las células madre del SNC humanas.

[0040] Muchos factores de crecimiento humanos recombinantes purificados se ensayaron para la capacidad de mejorar la actividad mitogénica de bFGF. La tasa mitótica de las células madre del SNC humanas se evaluó mediante la medición de la proporción de las células que han incorporado la etiqueta mitótica, bromodesoxiuridina (BrdU), durante un período de 24 horas. Cada factor de crecimiento se suministró diariamente al cultivo, además de bFGF. Sólo la combinación de bFGF + EGF y bFGF + TGF $\alpha$  (factor de crecimiento transformante-alfa) aceleró más allá de la tasa mitótica inducida por bFGF de las células madre del SNC humanas. En ambas condiciones, el tiempo de duplicación de las células se incrementó 1,5 veces a 40 horas sobre el bFGF solo. La combinación de bFGF y suero bovino fetal al 1% o al 10% también aceleró la velocidad de incorporación de BrdU de la tasa mitótica inducida por bFGF de las células madre del SNC hasta una velocidad similar.

##### 2. Resistencia de las células madre del SNC contra la diferenciación espontánea

[0041] Aunque EGF, TGF $\alpha$ , FBS al 1% o FBS al 10% más bFGF aumentaban la tasa mitótica de las células madre del SNC humanas, incluso en estas condiciones, las células madre del SNC eran susceptibles a la diferenciación espontánea a la densidad celular cercana a la confluencia y también eran propensas a la deriva hacia estados progenitoras gliales con múltiples pases. Con el fin de proporcionar capacidad mitótica mejorada y mayor estabilidad a la capacidad de diferenciación neuronal de las células madre del SNC, los presentes inventores construyeron un vector retroviral que expresa una proteína de fusión de c-myc humano y genes del receptor de estrógeno humanos bajo la repetición terminal larga MMLV (Figura 1).

[0042] Las células madre del SNC de mamíferos divisoras fueron infectadas por el retrovirus anfotrópico con alta eficiencia y las células resultantes se seleccionaron por su resistencia al tratamiento con G418. La actividad transcripcional de c-myc en la proteína de fusión (MycER) estaba regulada por la presencia o ausencia del ligando de receptor de estrógeno,  $\beta$ -estradiol, en el medio de cultivo. Además, la actividad del promotor de la repetición terminal larga se apaga durante la diferenciación de células madre del SNC en neuronas, eliminando eficazmente la transcripción de MycER. La combinación de la extracción de mitógenos, la ausencia de  $\beta$ -estradiol, y la actividad de transcripción limitada de LTR dio lugar a una diferenciación constitutiva eficiente de células madre del SNC de una manera indistinguible de las células parentales no modificadas.

[0043] Las células madre del SNC de varias regiones y etapas de desarrollo de cerebros fetales humanos se infectaron en el pase 1 con el retrovirus que expresa MycER. Las células infectadas se seleccionaron por la resistencia a G418 y se expandieron en medio N2B (N2 sin rojo fenol) que contenía bFGF, EGF 10 ng/ml o FBS al 1%, y  $\beta$ -estradiol. La expresión de MycER por sí sola no causó un cambio significativo en la tasa mitótica de las células; sin embargo, la adición de EGF y/o FBS aumentó significativamente la tasa mitótica y mejoró la estabilidad general del cultivo. Las células proliferaron de forma robusta, mantuvieron morfologías estables durante muchos pases sucesivos, y mantuvieron su multipotencialidad sin diferenciación espontánea incluso a una densidad celular casi confluyente. Tras la sustitución del medio de crecimiento por N2B sin ningún mitógeno y sin  $\beta$ -estradiol, las células madre se diferenciaron rápidamente para dar lugar a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

##### 3. Capacidad de expansión de las líneas de células madre del SNC mitóticamente mejoradas

[0044] Para determinar el alcance de la capacidad mitótica y de diferenciación de la línea de células madre humanas del SNC modificadas por MycER, las células se expandieron de forma continua durante 80 días en cultivo y a través

de 12 pases desde el evento infección. Durante este período, se midió el rendimiento celular en cada pase para cuantificar el aumento aritmético real en el número de células y para determinar la estabilidad de la tasa mitótica con el tiempo (Figura 2). En general, las células experimentaron aproximadamente 54 duplicaciones que dieron lugar a un aumento de  $10^{15}$  veces el número de células. El tiempo de duplicación de las células era notablemente constante a aproximadamente 40 horas por mitosis, que es invariable de la de las células madre del SNC primarias parentales humanas (Figura 2).

**[0045]** La misma preparación de células madre del SNC humanas también se sometió a la infección por retrovirus MycER y se cultivó en bFGF solo o en bFGF y EGF. En bFGF solo como mitógeno, las células madre del SNC que expresan MycER mostraron una mayor capacidad mitótica sobre las células no modificadas, pero sin embargo mostraron una capacidad proliferativa mucho menor que en bFGF + FBS al 1%. Como con las células parentales no modificadas, las células MycER también retuvieron un tiempo de duplicación de 60 horas en bFGF solo. Por otro lado, en bFGF + EGF, las células madre que expresan MycER mostraron una mayor tasa mitótica, una mayor capacidad mitótica, una mayor estabilidad de la capacidad de diferenciación neuronal, y eran resistentes a la diferenciación espontánea bastante similar a la condición de bFGF + FBS al 1%. En ausencia de la expresión de MycER, las mismas tres condiciones produjeron un patrón similar de crecimiento, pero con menos estabilidad. Significativamente, la condición de bFGF + BFS al 1%, aunque daba lugar a un crecimiento celular más eficiente, inevitablemente condujo a la pérdida de la capacidad de diferenciación neuronal. Esto demuestra que la función de c-myc constitutiva en estas células es sutil: proporciona una multipotencialidad más estable y una mayor capacidad mitótica, pero no una manifiesta independencia de mitógenos o transformación.

**[0046]** Estos efectos del c-myc constitutivamente activo también podrían extenderse a las células madre del SNC de todas las regiones de los cerebros fetales humanos y de rata.

#### 4. Diferenciación neuronal de células madre del SNC mejoradas con MycER

**[0047]** Las células madre del SNC mejoradas con MycER se diferenciaron mediante la extracción de los mitógenos y  $\beta$ -estradiol del medio y sin la adición de factores exógenos. La divergencia de morfologías neuronales y gliales comenzó a suceder en menos de dos días. Al tercer día, las morfologías neuronales eran claramente distinguibles. Las neuronas siguieron madurando en neuronas completamente funcionales durante las próximas 3-5 semanas.

**[0048]** Los cultivos diferenciados de las células madre del SNC humanas mejoradas con MycER en diferentes pases se analizaron por inmunohistoquímica con una variedad de diferentes anticuerpos específicos del tipo celular. A los 10 días de diferenciación, aproximadamente el 50% de las células totales expresaron las proteínas MAP2c, tau, y tubulina IIIb, todas marcadores relativamente tempranos de la diferenciación neuronal. Aproximadamente el 20-30% de las células totales expresaron los marcadores maduros de las neuronas, las proteínas MAP2a y MAP2B. Varios anticuerpos contra neurofilamentos revelaron una proporción similar de neuronas. De las neuronas, aproximadamente el 70% eran GABA-positivo. Una proporción similar de neuronas también era calretinina-positivo. Aproximadamente el 10-20% de las neuronas expresaba tirosina hidroxilasa (TH), la enzima biosintética clave para la dopamina. Todas las neuronas inmunopositivas eran de morfologías neuronales típicas y no coexpresaban el marcador glial, GFAP. De este modo, las líneas celulares mejoradas con MycER se diferencian para generar una proporción elevada de neuronas que muestran diversos fenotipos de neurotransmisores.

**[0049]** Las proporciones y fenotipos de neurotransmisores de las neuronas eran estables a través de muchos pases sucesivos (Figura 3A-L). A través de 54 duplicaciones de células madre, no hubo degradación de la capacidad de diferenciación neuronal tanto en la proporción de neuronas como en los diversos fenotipos de neurotransmisores generados.

#### 5. Líneas de células madre específicas de región

**[0050]** La condición de cultivo libre de suero utilizada para el aislamiento de células madre neurales permitió una herencia estable de las identidades regionales y sus fenotipos de neurotransmisores relacionados a través de múltiples divisiones celulares. Esto implica que las células madre en el cultivo, a pesar de que son uniformes en su capacidad de diferenciarse en neuronas y células gliales, pueden ser muy diversas. Por lo tanto, si cada célula madre en el comienzo del cultivo pudiera inmortalizarse en su estado nativo y si este procedimiento fuera eficiente para muestrear miles de células madre en una sola placa, entonces los diversos fenotipos neuronales podrían "capturarse" permanentemente en forma de líneas celulares.

**[0051]** La modificación genética de las células madre neurales con c-myc dio lugar a un sistema de cultivo celular robusto, altamente reproducible y estable. El proceso de modificación en sí es bastante eficiente, produciendo de 5.000 a 50.000 clones independientes por infección por retrovirus durante un proceso de dos días. Esto podría escalarse fácilmente mediante el aumento de las partículas de retrovirus o el aumento del número de la densidad de células diana, si es necesario.

**[0052]** Con el fin de determinar si la sobreexpresión de c-myc tiene un impacto en la capacidad de diferenciación de los fenotipos de neurotransmisores, se modificaron células madre de muchas regiones diferentes de los cerebros

fetales de rata y humano por el retrovirus MycER. Estas regiones incluían la corteza, septo, hipocampo, mesencéfalo, rombencéfalo, cuerpo estriado y médula espinal. Se examinaron múltiples ejemplos de cultivos de la zona cortical, mesencéfalo y médula espinal de varias edades gestacionales diferentes para evaluar la reproducibilidad del procedimiento. En todos los casos, los grupos de clones independientes resultantes generan proporciones altamente reproducibles de neuronas con respecto a células gliales. Como era de esperar, las morfologías, perfiles antigénicos de las neuronas y sus proporciones relativas también eran distintos de las líneas celulares de una región frente a otra.

**[0053]** Por lo tanto, como ejemplo de referencia, cuando se examinaron varios grupos de líneas celulares de tejidos del mesencéfalo de fetos humanos de 8 semanas, aproximadamente el 0,1% del total de células eran neuronas dopaminérgicas consistentemente TH-positivas, que también es la proporción que se encuentra en los cultivos de células madre no modificados (las células precursoras neurales de la invención no se originan de células embrionarias humanas). El análisis clonal reveló que la expresión de TH se restringió clonalmente. Es decir, la mayoría de los clones no contenían neuronas que expresaban TH. De las que lo hicieron, la proporción era variable de un clon a otro. También se examinaron varios grupos de líneas celulares de tejidos corticales de fetos humanos de 17 a 20 semanas de vida. Curiosamente, todas las líneas corticales dieron lugar a un aumento significativo de las neuronas TH-positivas en comparación con las células madre sin modificar. La proporción de neuronas TH-positivas fue del 2-4% de las células totales. Posteriormente, el análisis clonal reveló un patrón similar en la distribución de las neuronas TH-positivas. La mayoría no tenía ninguna, mientras que las que generan TH estaban presentes en proporciones variables. Este patrón también se había observado con clones de células madre sin modificar de varias regiones diferentes y con varios marcadores antigénicos diferentes.

**[0054]** Como ejemplo de referencia, también se establecieron líneas celulares de médula espinal de fetos de 6 a 10 semanas de vida (las células precursoras neurales de la invención no se originan de células embrionarias humanas). El patrón de diferenciación neuronal fue el mismo que en otras regiones, aunque sus características de morfología y crecimiento de células madre eran distintos.

**[0055]** Por lo tanto, la modificación genética de las células madre neurales con c-myc no altera sus capacidades de diferenciación intrínseca. En todas las líneas celulares a través de extensos períodos de cultivo continuo, no se observó ninguna evidencia de formación de tumor u otra transformación anormal. Tras el análisis del cariotipo de un grupo de líneas de células corticales humanas en el paso 14, se observó un patrón cromosómico diploide normal sin reordenamiento aberrante. De este modo, la regulación de la capacidad mitótica por c-myc, que es un gen celular normalmente presente en todas las células eucariotas y un conocido regulador clave de la maquinaria del ciclo celular, no es oncogénico y proporciona ventajas significativas sobre otros procedimientos que utilizan oncogenes virales, tales como v-myc o antígeno T SV40 grande.

## 6. Otros tipos de células

**[0056]** La modificación genética con c-myc se puede realizar en cualquier momento durante el período de cultivo. Dado que la expresión de c-myc en sí no es mitogénica, es decir, no transformante, una condición de cultivo que promueve la proliferación de una población precursora neural particular es un requisito previo. Los factores de crecimiento purificados, tales como aFGF (factor de crecimiento fibroblástico ácido), bFGF, EFG y TGF $\alpha$ , pueden proliferar una variedad de diferentes tipos de células neuronales. Aunque la mayor parte de las descripciones anteriores eran en células madre del SNC multipotentes como población predominante, se observaron varios tipos de células diferentes durante el análisis clonal.

**[0057]** Una población significativa era una población de clones progenitores bipotenciales que, después de la diferenciación, daba lugar a neuronas y astrocitos con aparente ausencia de oligodendrocitos. Estos progenitores bipotenciales eran bastante similares a las células madre multipotenciales en su morfología durante el crecimiento. El patrón de diferenciación era también similar dando lugar a aproximadamente un 50% de neuronas y un 50% de astrocitos. Por lo tanto, la diferencia de definición clave entre las dos poblaciones es la ausencia de oligodendrocitos en cultivos diferenciados.

**[0058]** Una segunda población de células derivadas de la modificación con c-myc de cultivos neurales primarios era una población de clones progenitores neuronales unipotenciales que consistían sólo en neuronas. Estos clones progenitores neuronales eran de tamaño más pequeño y asumían morfologías neuronales inmaduras y distintas durante la proliferación y expresaban proteínas tau y/o beta-tubulina III. Se proporcionan ejemplos en la Figura 5. Se observaron dos tipos distintos de células (Figura 5A). Un tipo eran células de cuerpo pequeño con un único proceso muy corto que se ramificaba del cuerpo celular, que crecían en grupos apretados. Estas células eran inmunorreactivas con el anticuerpo anti-tau, pero no con el anticuerpo anti-tubulina IIIb durante la división (Figura 5B). El otro tipo de células eran células con neuritas distintivamente alargadas sin una gran ramificación, que crecieron en un patrón más pequeño y más disperso, sugiriendo una mayor capacidad migratoria. A diferencia del primer tipo, también eran inmunorreactivas con el anticuerpo anti-tau y el anticuerpo anti-tubulina IIIb (figuras 5C y 5D, respectivamente). Muchas veces, se observó que los segundos tipos de células estaban próximas o estaban entremezcladas con el primer tipo de células, lo que sugiere que se trata de dos fases de progenitores neuronales comprometidos en un único linaje continuo, siendo el estado tau+/TuJ1+ el estado más maduro.

[0059] Una tercera población de células derivadas de cultivo de células neurales modificadas por c-myc era una población de clones que consistían únicamente de células gliales. La mayoría de estos clones eran astrocitos con pocos o ningún oligodendrocito.

[0060] Estos resultados indican que muchos linajes de células precursoras neurales responden de manera similar a la sobreexpresión de c-myc. Además de los cultivos neurales primarios preparados a partir de tejidos del sistema nervioso de mamíferos, los recientes avances en cultivos de células madre embrionarias indican que diversas células precursoras neurales se forman in vitro durante la diferenciación de células madre embrionarias totipotenciales o pluripotenciales y las líneas celulares se mantienen en cultivo durante mucho tiempo (Renoncourt et al., Mech Dev (1998) 78, 185; Svendsen et al, Trends Neurosci (1999) 22, 357; Brustle et al, Science (1999) 285, 754.). Estos cultivos pueden generar células precursoras neurales de anidación positiva, que a continuación pueden transferirse a un medio libre de suero y posteriormente expandirse con bFGF y/o EGF durante poco tiempo. La expansión en masa a largo plazo no ha sido factible debido a que la formación de células precursoras neurales iniciales es ineficiente. Sin embargo, mediante la utilización del procedimiento de modificación genética con el gen c-myc descrito en el presente documento, las células precursoras neurales transitorias pueden convertirse en líneas celulares estables.

[0061] Los precursores neuronales que incluyen células madre neurales multipotenciales pueden aislarse de cerebros de adultos y pueden cultivarse en condiciones libres de suero. Sin embargo, este proceso es ineficiente, dando como resultado sólo un pequeño número de células proliferativas. Sin embargo, con la transferencia del gen c-myc tal como se describe en el presente documento, se pueden establecer líneas celulares estables a partir de dicho pequeño número de células obtenidas de biopsias de tejido neural.

[0062] c-myc está implicado en muchos procesos celulares diferentes, tal como apoptosis, además de la regulación del ciclo celular. c-myc se ha utilizado anteriormente para transformar las células de origen no neural. Sin embargo, estos estudios previos se realizaron con líneas celulares ya estables, tales como líneas de células de fibroblastos 3T3 y para producir el estado neoplásico de las líneas celulares, que habían sido seleccionadas en base a aberraciones cromosómicas espontáneas que conferían independencia de mitógeno. Otros estudios trataron de utilizar un proceso de immortalización para activar las neuronas post-mitóticas para volver a entrar en el ciclo celular.

[0063] Las células madre del SNC ya son mitóticas y ya se han establecido las condiciones de cultivo mitogénico para una expansión a largo plazo de hasta 30 duplicaciones celulares. Por lo tanto, nuestro objetivo ha sido el de incrementar la capacidad de expansión más allá de las 30 duplicaciones celulares por lo menos hasta el comienzo de la senescencia que se cree que ocurre entre 60 y 80 ciclos celulares. Sesenta duplicaciones celulares representan un aumento  $1 \times 10^{18}$  veces en el número de células, que es lo suficientemente grande para el cribado de un millón de bibliotecas químicas, consistiendo cada una en 500.000 compuestos, o lo suficientemente grande como para proporcionar terapias celulares para 50 mil millones de pacientes de Parkinson. El concepto clave ha sido encontrar una modificación "suave" de las células a fin de no perturbar su capacidad de diferenciación neuronal intrínseca, a la vez que se proporciona una capacidad de crecimiento mejorada bajo las condiciones de cultivo establecidas para las células madre primarias del SNC.

[0064] El aumento de la concentración de proteína c-myc activa conduce a la generación de líneas de células madre humanas del SNC estables. Este efecto no se produce por la desregulación manifiesta de parámetros mitóticos y de diferenciación del ciclo celular, sino proporcionando resistencia a factores autocrinos y paracrinos que inducen la restricción de la multipotencialidad hacia un estado progenitor glial. La consecuencia no es una transformación oncogénica de las células, sino más bien una estabilización del crecimiento de las células. Por lo tanto, las señales endógenas que desencadenan la diferenciación, tales como las presentes en la densidad de células confluentes, siguen siendo eficaces. La división celular es todavía dependiente del suministro de mitógenos exógenos adecuados, tales como bFGF y/o EGF y/o suero. La diferenciación de las líneas de células madre para madurar neuronas funcionales es tan eficiente al final de las 60 duplicaciones celulares como en las células primarias no modificadas. Una variedad de fenotipos neurotransmisores y sus proporciones relativas se mantienen a lo largo de la expansión.

[0065] La actividad de c-myc en estos ejemplos se controlaba mediante la construcción de una proteína quimérica de c-myc fusionada a un fragmento de proteína del receptor de estrógeno (Eiler et al., Nature (1988) 340, 60). El papel previsto del estrógeno es proporcionar un control sobre la cantidad de c-myc funcionalmente activa inducida en la célula. La porción de receptor de estrógeno de la proteína quimérica se activa cuando se une con un agonista o antagonista permeable a las células, tal como  $\beta$ -estradiol o tamoxifeno.

[0066] La mayoría de los miembros de la superfamilia de receptores nucleares actúan de manera similar en que los ligandos permeables a las células se difunden a través de la bicapa de plasma y se unen a su receptor que después se transporta al núcleo como un complejo e induce una variedad de eventos relacionados con la transcripción. El dominio de unión a ligando de estas proteínas de receptores nucleares y sus ligandos puede sustituir el receptor de estrógeno y  $\beta$ -estradiol con el fin de regular las funciones del resto de proteína c-myc fusionado. Ejemplos de tales receptores nucleares son receptor de glucocorticoides, receptor de progesterona, receptores de andrógenos,

receptor de la vitamina D, receptores de hormona de la tiroides, receptores de ácido retinoico, y receptor de la ecdisona. Cada uno de estos receptores puede activarse intracelularmente mediante la adición al medio de cultivo de sus ligandos apropiados. Los ejemplos de los ligandos son hormonas esteroides, tales como glucocorticoide o dexametasona, hormonas tiroideas, retinoides, tales como ácidos retinoico, vitamina D, y la hormona de muda de insectos, ecdisona, así como sus análogos sintéticos diseñados para actuar sobre los receptores respectivos. Todos estos compuestos son moléculas pequeñas, hidrófobas que pueden atravesar la membrana celular una vez se han suministrado extracelularmente.

**[0067]** Algunos sistemas de receptor-ligando son más adecuados que otros para el propósito de regular la c-myc sobreexpresada. Por ejemplo, con el propósito de trasplantar células modificadas con c-myc en tejidos como tratamiento de una enfermedad, sería deseable que la proteína quimérica receptora de c-myc no respondiera a ligandos fisiológicos endógenos. El receptor de estrógeno de c-myc descrito aquí tiene la desventaja de que un nivel potencialmente alto de estrógeno presente en pacientes de sexo femenino puede tener efectos inesperados en las células. En otro ejemplo, los ligandos usados para controlar la actividad de c-myc en el cultivo pueden tener sus propios efectos no relacionados en los receptores endógenos. Por lo tanto, un sistema de receptor-ligando ideal es aquel en el que el grupo receptor de la proteína de fusión no reconoce el ligando endógeno y en el que el ligando es un compuesto sintético que no tiene ningún efecto adverso sobre las células. Uno de dichos sistemas potenciales es el receptor de progesterona humano y su ligando antagonista, RU38486. Se ha establecido que el fragmento de unión a ligando del receptor de progesterona humano no responde al ligando endógeno, la progesterona, pero es sensiblemente activado por un análogo sintético de progesterona, RU38486, mientras que RU38486 no activa el receptor de progesterona de longitud completa endógeno (Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91, 8180).

**[0068]** De este modo, un sistema de expresión de c-myc mejorado para producir líneas celulares estables sería para construir un plásmido en el que el gen c-myc humano se fusiona con el dominio de unión a ligando del receptor de progesterona humano con la supresión C-terminal de 12 aminoácidos, para cortar el ADN fusionado (c-mycPR), ligado al plásmido retroviral, pLXSN, en dirección 3' del LTR 5', y para generar los retrovirus intactos que expresan la proteína quimérica, c-myc-receptor de progesterona (mycPR).

**[0069]** Las utilidades comerciales de las células madre del SNC mitóticamente mejoradas son: el trasplante de células de las neuronas dopaminérgicas TH-positivas para tratar la enfermedad de Parkinson; sustrato para el cribado de potenciales compuestos farmacológicos; una fuente reproducible de niveles de genes y proteínas de las células influenciadas por un agente específico o protocolo diseñado para representar/imitar un proceso patológico; una fuente reproducible de nuevos genes y proteínas; una fuente reproducible de las neuronas y células gliales para el diseño de tejidos tridimensionales y prótesis neural; un vehículo de liberación de compuestos de moléculas grandes potencialmente terapéuticas, tal como NGF, para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer; y la población de partida para derivar posteriormente in vitro en diversas poblaciones progenitoras neuronales comprometida, tales como células neuronales proliferativas que expresan TH.

**[0070]** Aunque la presente invención se ha descrito en conexión con lo que actualmente se considera que son las realizaciones más prácticas y preferidas, debe entenderse que la invención no está limitada a las realizaciones descritas, sino que por el contrario, pretende cubrir diversas modificaciones y disposiciones equivalentes incluidas dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por lo tanto, debe entenderse que se pueden realizar variaciones en la presente invención sin apartarse de los aspectos novedosos de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para producir líneas celulares estables de células precursoras neurales de mamífero *in vitro*, que comprende las etapas de:
- 5 a) preparar un cultivo de células precursoras neurales en un medio libre de suero;  
b) cultivar las células precursoras neurales en presencia de un primer mitógeno, en el que dicho primer mitógeno se selecciona del grupo que consiste en aFGF, bFGF, EGF, TGF $\alpha$  y combinaciones de los mismos;  
c) poner en contacto las células con un agente capaz de ser captado por las células y capaz de expresar un gen c-myc,
- 10 en el que el gen c-myc está fusionado con otros elementos de ADN que comprenden ADN para al menos un dominio de unión a ligando de un receptor nuclear; y  
d) cultivar adicionalmente las células a través de al menos treinta duplicaciones celulares en un medio que comprende el primer mitógeno y un segundo mitógeno antes de la diferenciación de las células,  
en el que dicho segundo mitógeno es suero,
- 15 en el que dicho medio comprende el primer mitógeno y el segundo mitógeno comprende además un agente activador de myc capaz de unirse al dominio de unión a ligando,  
en el que las células precursoras neurales no se originan de células embrionarias humanas.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que las células precursoras neurales derivan de un cultivo *in vitro* de células madre fetales.
- 20 3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que las células mantienen una capacidad multipotencial para diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.
- 25 4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que las células mantienen una capacidad bipotencial para diferenciarse en neuronas y astrocitos.
5. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que las células mantienen una capacidad bipotencial para diferenciarse en astrocitos y oligodendrocitos.
- 30 6. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el agente activador de myc se selecciona del grupo que consiste en  $\beta$ -estradiol, RU38486, dexametasona, hormonas tiroideas, retinoides y ecdisona.
- 35 7. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que las líneas celulares son líneas celulares clonales.
8. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que las células mantienen una capacidad unipotencial para diferenciarse en neuronas.
- 40 9. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que las células mantienen una capacidad unipotencial para diferenciarse en astrocitos.
- 45 10. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la etapa c) comprende introducir una construcción de c-myc en las células, en el que la construcción de c-myc incluye un ADNc de c-myc fusionado con ADN para un dominio de unión a ligando de un receptor nuclear seleccionado del grupo que consiste en un receptor de estrógeno, un receptor de andrógeno, un receptor de progesterona, un receptor de glucocorticoide, un receptor de hormona tiroidea, un receptor de retinoide y un receptor de ecdisona.
- 50

Figura 1

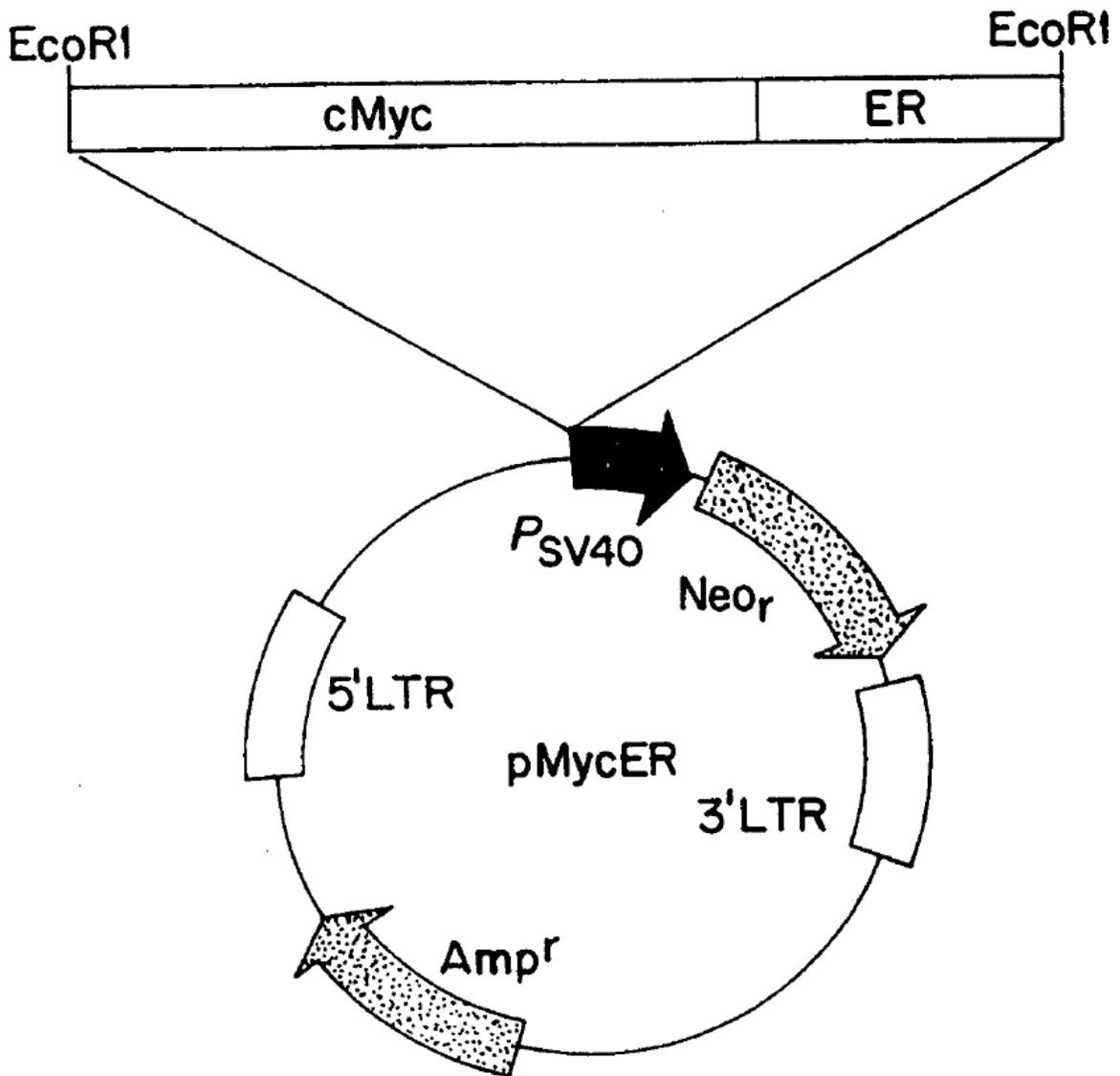
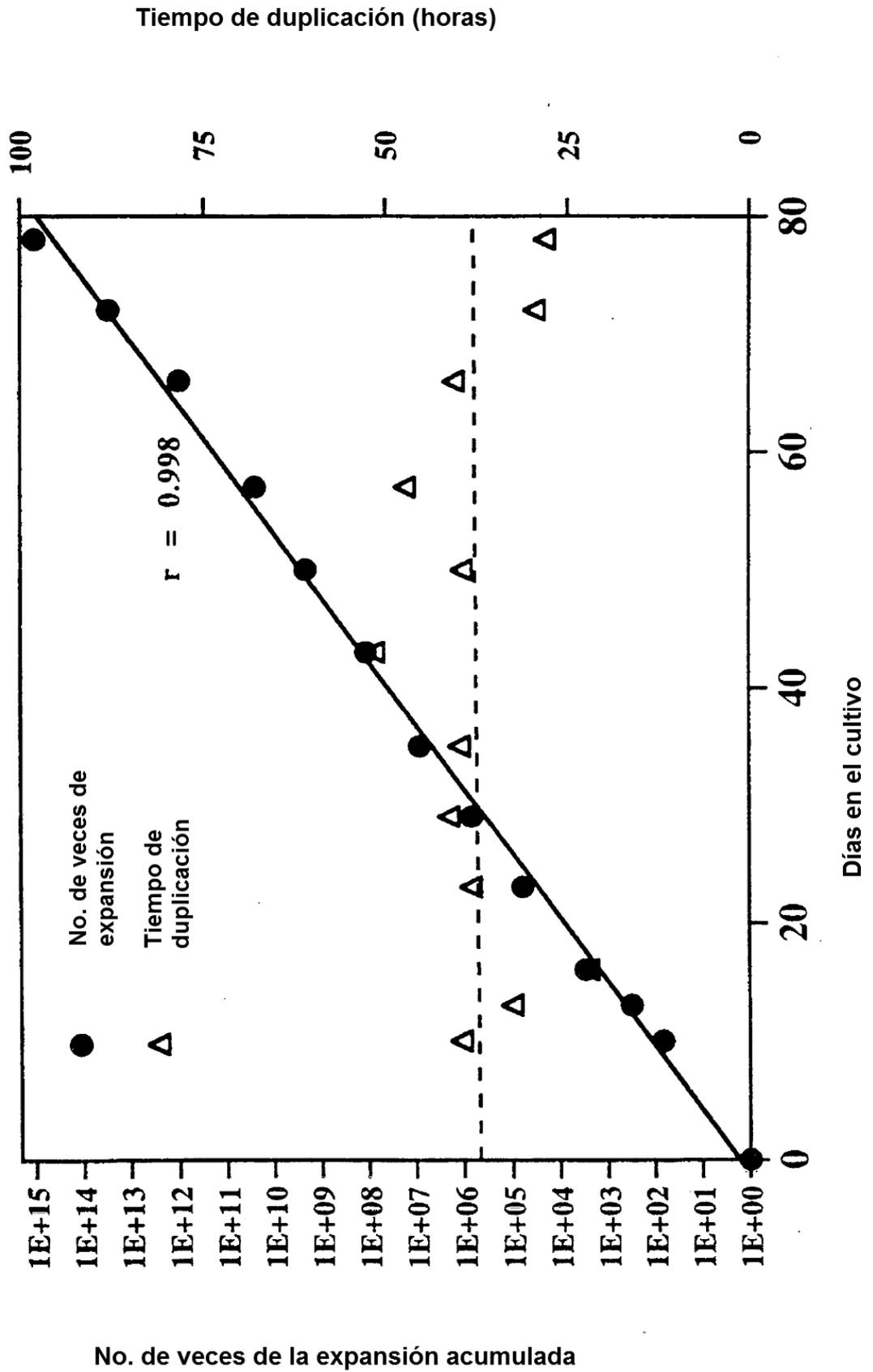
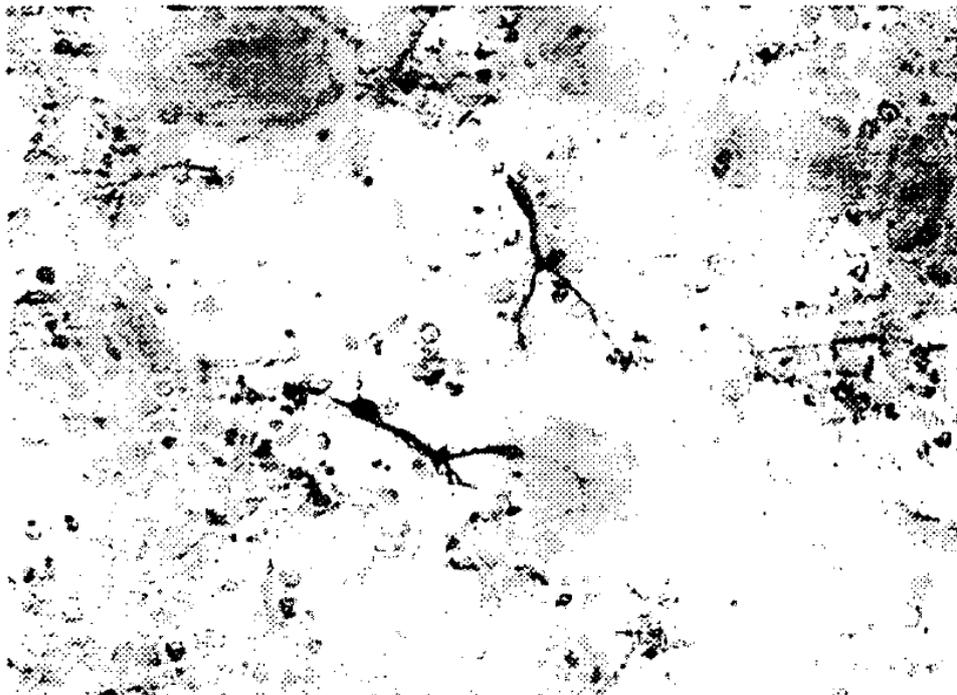


Figura 2

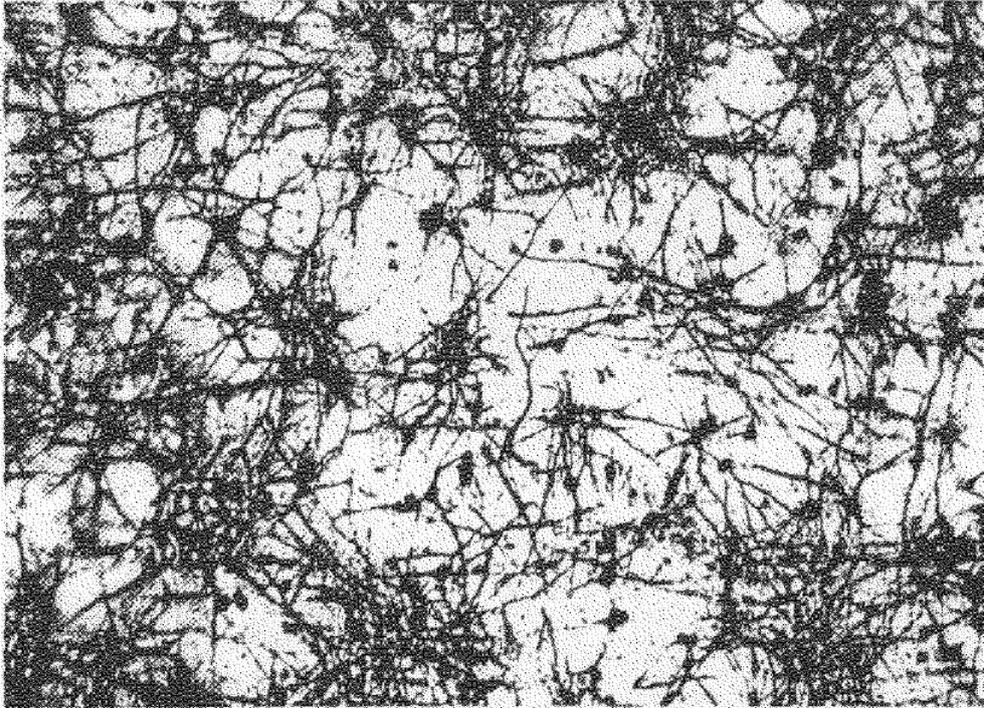


**Figura 3A**



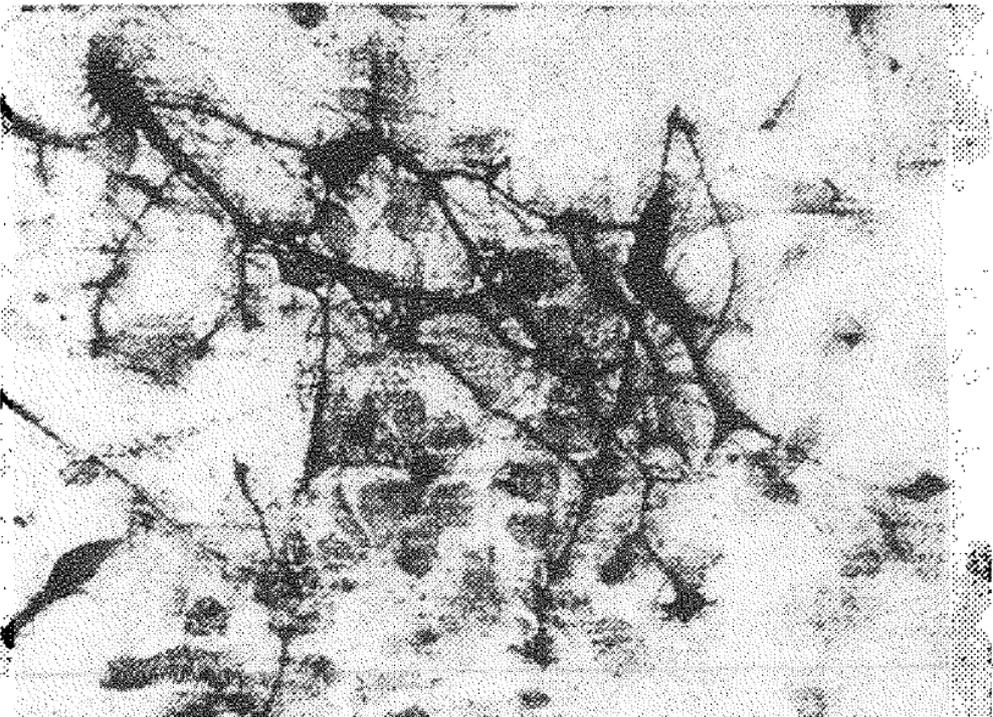
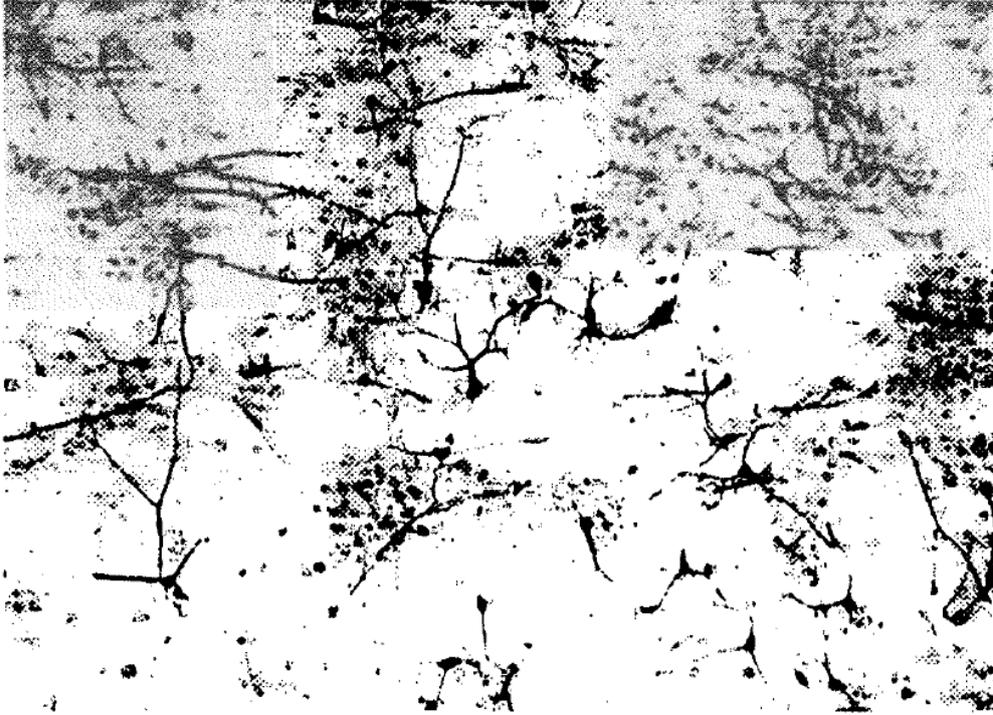
**Figura 3B**

**Figura 3C**



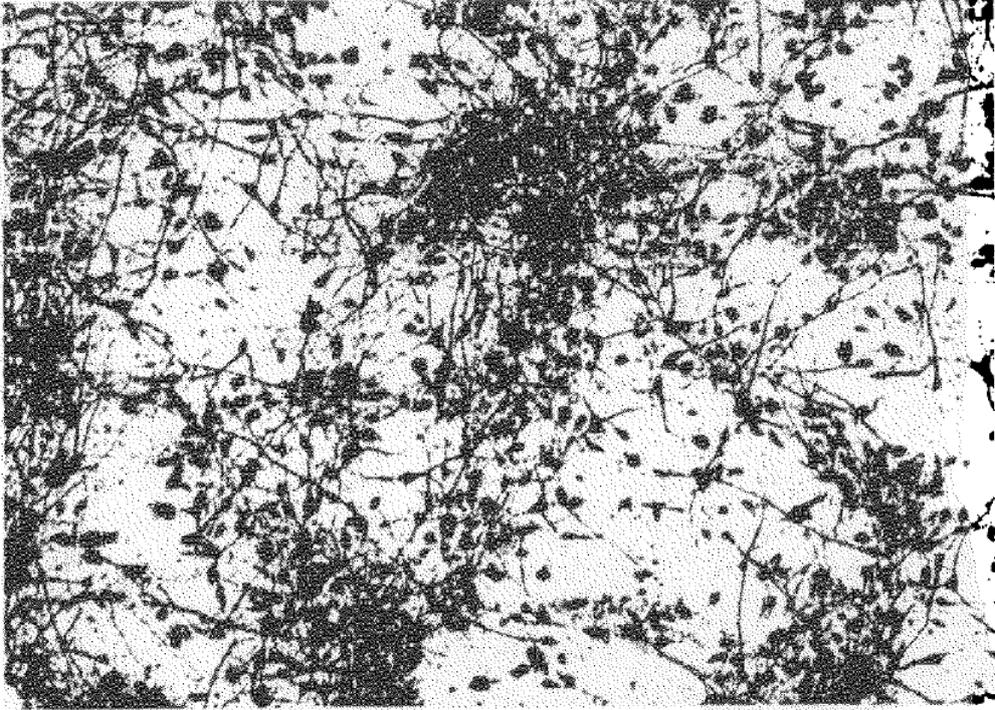
**Figura 3D**

**Figura 3E**



**Figura 3F**

**Figura 3G**



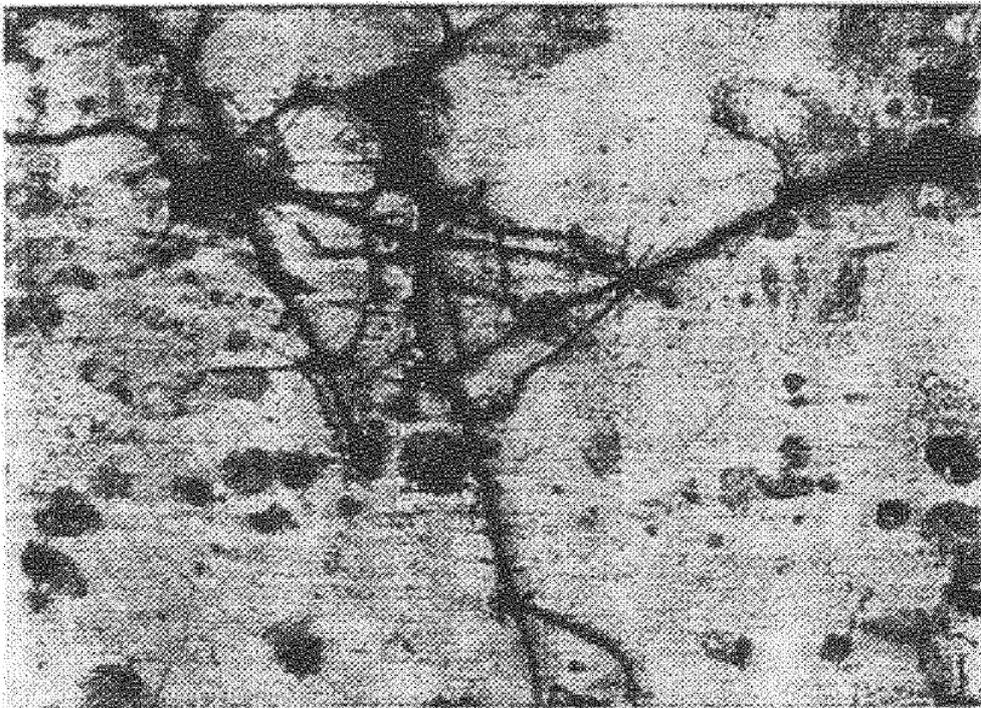
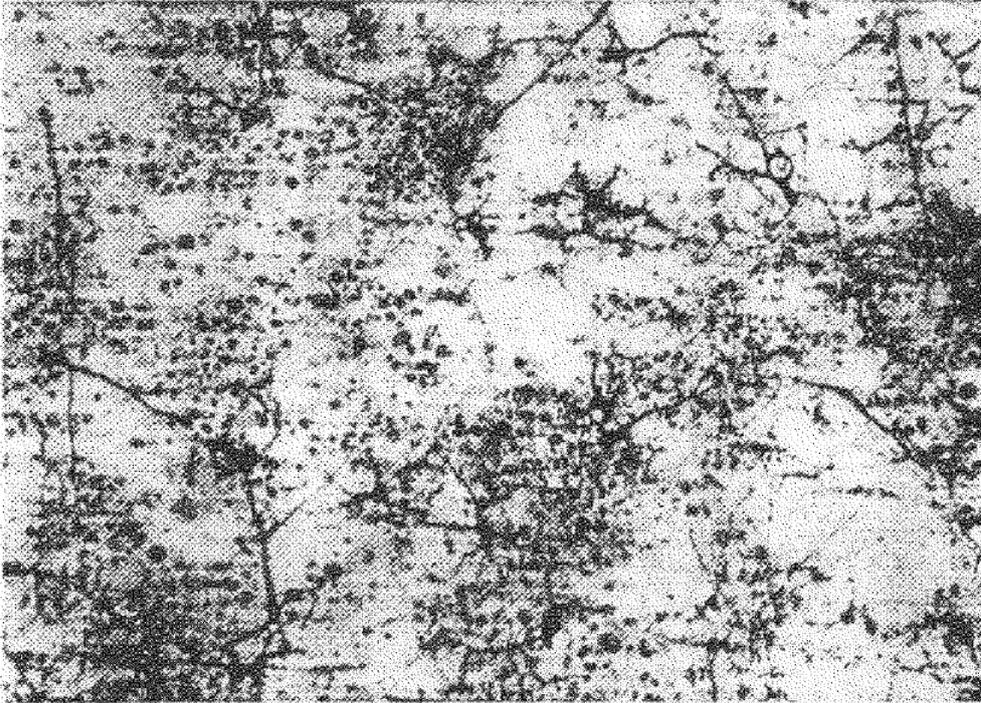
**Figura 3H**

**Figura 3I**



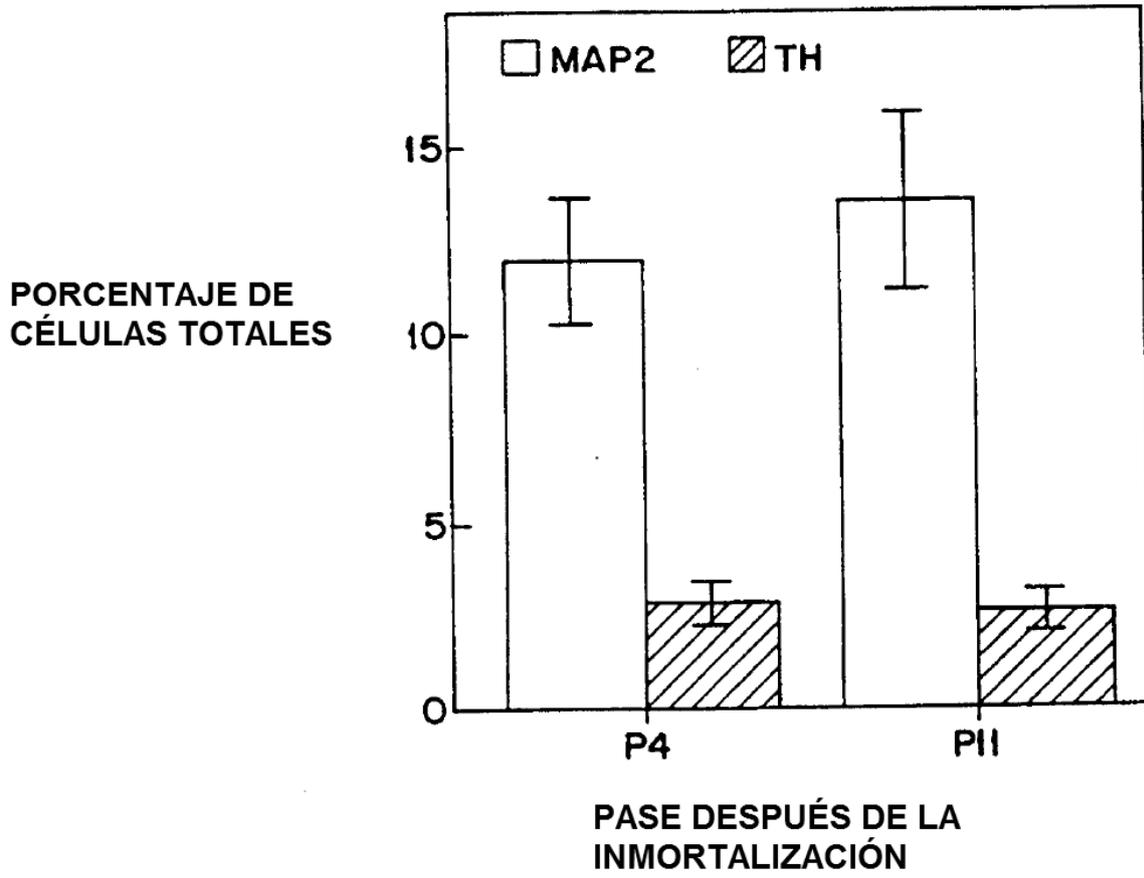
**Figura 3J**

**Figura 3K**

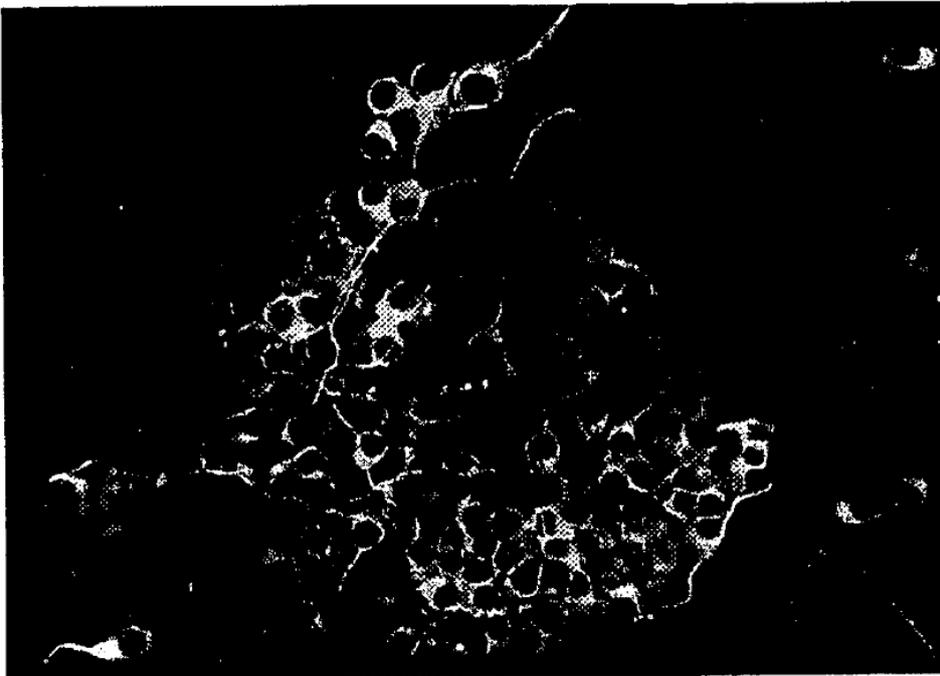
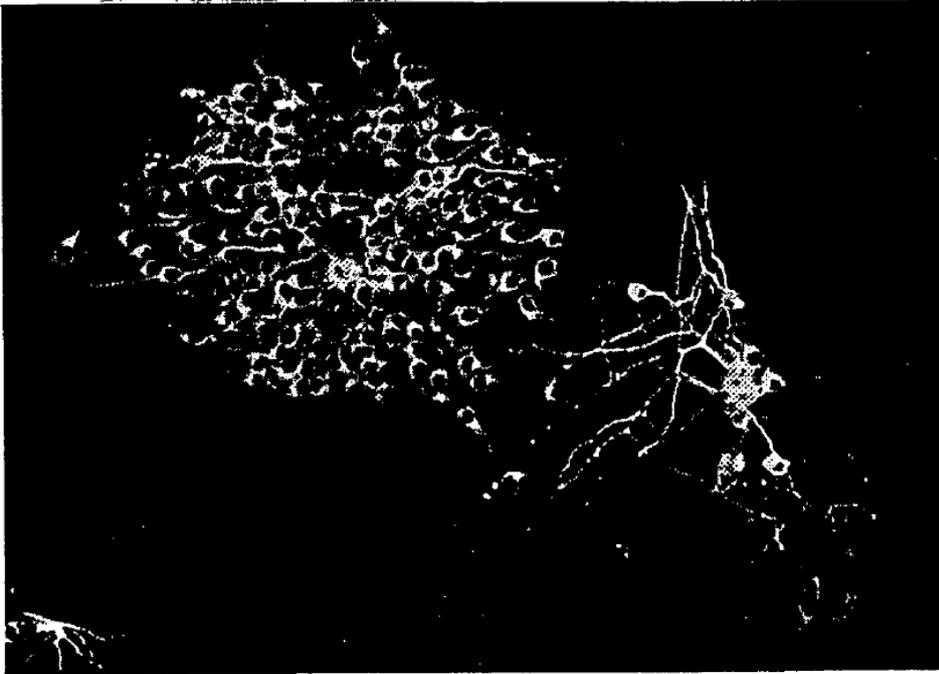


**Figura 3L**

Figura 4

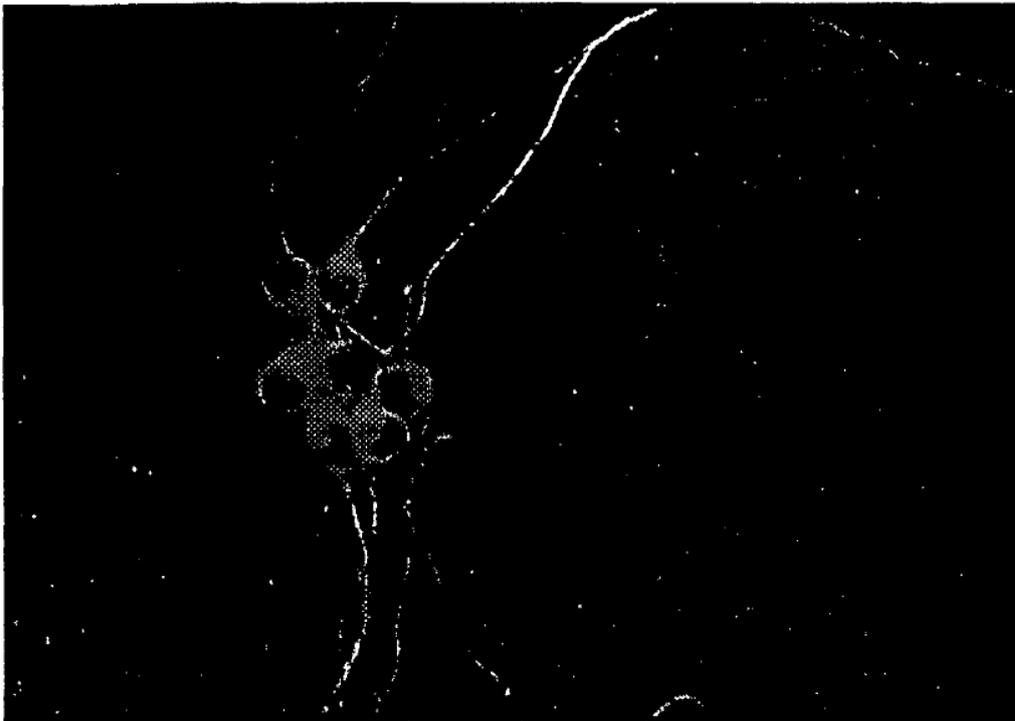


**Figura 5A**



**Figura 5B**

**Figura 5C**



**Figura 5D**