

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 036**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2010 PCT/JP2010/063953**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.02.2011 WO11019092**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2010 E 10808270 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2464723**

54 Título: **Método para inducir la diferenciación de células madre pluripotentes en células precursoras neurales**

30 Prioridad:

12.08.2009 US 272055 P
30.04.2010 US 282970 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.11.2016

73 Titular/es:

KYOTO UNIVERSITY (100.0%)
36-1 Yoshida-honmachi Sakyo-ku
Kyoto-shi, Kyoto 606-8501, JP

72 Inventor/es:

TAKAHASHI, JUN y
MORIZANE, ASUKA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 590 036 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para inducir la diferenciación de células madre pluripotentes en células precursoras neurales

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para inducir la diferenciación de células madre pluripotentes en células precursoras neurales.

10 También se describen en el presente documento células precursoras neurales inducidas preparadas por el método anterior.

Técnica anterior

15 Se ha informado de células que tienen pluripotencia, tales como células madre embrionarias (células ES) y células madre pluripotentes inducidas (células iPS), en las que las células iPS pueden obtenerse introduciendo un gen(es) específico(s) de célula no diferenciada en células somáticas de animales (documentos USP5.843.780 o WO 2007/069666). Por lo tanto, se ha prestado atención a métodos terapéuticos que comprenden trasplantar células neurales, que se obtienen por diferenciación de células madre pluripotentes, métodos que pueden servir de métodos
 20 alternativos para tratar enfermedades neurodegenerativas o lesiones nerviosas. Se han desarrollado los siguientes métodos como métodos para inducir la diferenciación de células ES dentro de células neurales: (1) un método para inducir la diferenciación produciendo la formación de cuerpos embrioides en medio libre de suero (método SFEB) (Watanabe K, et al. Nat Neurosci. 8: 288-96, 2005); (2) un método para inducir la diferenciación cultivando células ES sobre células del estroma (método SDIA) (Kawasaki H, et al. Neuron. 28: 31-40, 2000); y (3) un método para
 25 añadir un fármaco sobre Matrigel y entonces cultivar (Chambers SM, et al. Nat Biotechnol. 27: 275-80, 2009).

Sin embargo, hay algunos problemas de que las células no diferenciadas siguen después de la inducción de la diferenciación por estos métodos, y, por ejemplo, el uso de citocinas en estos métodos produce un coste muy alto. Por consiguiente, se han desarrollado muchos compuestos de molécula pequeña como sustituciones de citocina (documento WO 2008/033408), pero sigue siendo desconocido qué compuestos de molécula pequeña inducen
 30 diferenciación altamente eficiente dentro de las células neurales.

Sumario de la invención

35 Es un objetivo de la presente invención proporcionar un método altamente eficiente para inducir la diferenciación de células madre pluripotentes en células precursoras neurales usando un compuesto de molécula pequeña.

La presente invención se caracteriza como sigue.

40 (1) Un método de inducción de la diferenciación de una célula madre pluripotente dentro de una célula precursora neural, que comprende cultivar la célula madre pluripotente en presencia de un inhibidor de BMP de molécula pequeña y un inhibidor de la familia TGFβ de molécula pequeña, en el que el inhibidor de BMP de molécula pequeña es dorsomorfina o LDN-193189, en el que el inhibidor de la familia TGFβ de molécula pequeña es SB431542 o A-83-01, en el que la concentración de LDN-193189 es superior a 50 nM.

45 (2) El método según (1), en el que el cultivo se realiza con formación de un cuerpo embrioides en condición sin suero.
 (3) El método según (1) o (2), en el que el cultivo se realiza sobre una placa de recubrimiento Matrigel™ sin usar células nodrizas.

(4) El método según uno cualquiera de (1) a (3), en el que la célula madre pluripotente es una célula madre pluripotente inducida.

50 Según el método anterior de la presente invención, las células precursoras neurales inducidas pueden prepararse altamente eficientemente permitiendo que la combinación de un inhibidor de BMP de molécula pequeña y un inhibidor de la familia TGFβ de molécula pequeña co-exista en un medio de inducción de la diferenciación, en el que el inhibidor de BMP de molécula pequeña es dorsomorfina o LDN-193189, en el que el inhibidor de la familia TGFβ de molécula pequeña es SB431542 o A-83-01, en el que la concentración de LDN-193189 es superior a 50 nM.
 55

Breve descripción de los dibujos

60 La Fig. 1 muestra imágenes microscópicas de contraste de fase (a-c), imágenes de inmunotinción (d-f) obtenidas usando anticuerpo anti-nestina, imágenes de inmunotinción (g-i) obtenidas usando anticuerpo anti-Oct3/4, e imágenes de inmunotinción (j-1) obtenidas usando DAPI, en el día 14 después de la inducción de la diferenciación.

La Fig. 2 muestra imágenes de inmunotinción obtenidas usando anticuerpo anti-Pax6 (verde) y anticuerpo anti-Nanog (rojo), e imágenes de inmunotinción obtenidas usando anticuerpo anti-PSA-NCAM (verde) y anticuerpo anti-SSEA3 (rojo), en el día 14 después de la inducción de la diferenciación.
 65

La Fig. 3 muestra una imagen de inmunotinción obtenida usando anticuerpo anti-TH (tirosina hidroxilasa) (verde) y anticuerpo anti-TuJ1 (rojo) en el día 21 después de la inducción de la diferenciación.

La Fig. 4 muestra: A, número total de colonias existentes por pocillo en el día 14 después de la inducción de la diferenciación en todas las líneas celulares (KhES-1, KhES-2, KhES-3, G1, G4, B6 y B7: n = 4 para cada línea celular) (n = 28); y B, las relaciones (%) de colonias que contienen células neurales (positivas para nestina) con respecto a colonias que contienen células no diferenciadas (positivas para Oct3/4) existentes por pocillo en el día 14 después de la inducción de la diferenciación en todas las líneas celulares (KhES-1, KhES-2, KhES-3, G1, G4, B6 y B7: n = 4 para cada línea celular) (n = 28). Cuando al menos una célula positiva podría confirmarse dentro de una colonia, tal colonia se contó como una colonia positiva.

La Fig. 5 muestra las relaciones de colonias que contienen células neurales (positivas para nestina) con respecto a colonias que contienen células no diferenciadas (positivas para Oct3/4) existentes por pocillo en el día 14 después de la inducción de la diferenciación de cada línea celular ES (KhES-1(A), KhES-2(B) o KhES-3(C)).

La Fig. 6 muestra las relaciones de colonias que contienen células neurales (positivas para nestina) con respecto a colonias que contienen células no diferenciadas (positivas para Oct3/4) existentes por pocillo en el día 14 después de la inducción de la diferenciación de cada línea celular iPS (G1 (A), G4 (B), B6 (C) o B7 (D)).

La Fig. 7 muestra niveles de expresión de ARNm en células ES no diferenciadas (KhES-1, KhES-2 y KhES-3) o células iPS (G1, G4, B6 y B7) como se mide por PCR en tiempo real con respecto a Nodal (A), BMP2 (B), BMP4 (C) y BMP7 (D).

La Fig. 8 es una gráfica que muestra contenidos de células positivas para PSA-NCAM (verde) y positivas para SSEA4 (rojo) de cada línea celular en el día 14 después de la inducción de la diferenciación solo sobre células PA6 sin usar dorsomorfina y SB431542.

La Fig. 9 muestra gráficos de FACS que muestran distribuciones de células que expresan (o positivas para) SSEA4 (A y C) y células que expresan PSA-NCAM- (B y D) en grupos de control (A y B) preparadas induciendo la diferenciación de KhES1 solo mediante el cultivo sobre células PA6 y en grupos (C y D) preparados induciendo la diferenciación sobre células PA6 mediante la adición de dorsomorfina y SB431542 al medio. Con respecto a los valores presentados en el presente documento, los superiores muestran las tasas (%) de células que expresan cada marcador en células derivadas de KhES1 ("en células diana"), y los inferiores muestran las tasas (%) de células que expresan cada marcador en todas las células existentes dentro de placas que contienen células derivadas de KhES1 y células PA6 ("en células totales"). La Fig. 9E es una gráfica que muestra el número de células derivadas de células ES (barras negras), células positivas para PSA-NCAM derivadas de células ES (barras blancas) y células positivas para SSEA4 (barras sombreadas) obtenidas por placa en el grupo de control (KhES1 cont) y en el grupo de inducción de la diferenciación (KhES1+D&SB) para los que se usaron dorsomorfina y SB431542. El número de células se calculó por las siguientes fórmulas.

(Número de células derivadas de células ES) = (Recuento de células total en la placa) – (Número de células nodrizas en la placa)

(Número de células positivas para PSA-NCAM derivadas de células ES) = (Recuento de células total en la placa) x (Tasa de células positivas para PSA-NCAM en todas las células que existen en la placa)

(Número de células positivas para SSEA4 derivadas de células ES) = (Recuento de células total en la placa) x (Tasa de células positivas para SSEA4 en todas las células que existen en la placa)

Las Figs. 9F y 9G muestran ejemplos de distribución característica para las células PA6 y células derivadas de ES (F: células PA6 solas y G: células PA6 y KhES1 (cultivadas en ausencia de dorsomorfina y SB431542)).

La Fig. 10A es una gráfica que muestra el porcentaje de células positivas para PSA-NCAM en el día 14 después de la inducción de la diferenciación de células iPS (G4) formando un cuerpo embriode a partir de las células iPS sin células nodrizas, seguido de cultivar las células en un medio complementado con dorsomorfina y SB431542. Aquí, la curva roja indica el resultado de un control negativo en el que ningún anticuerpo estaba presente y la curva azul indica el resultado de células teñidas con un anticuerpo anti-PSA-NCAM. Por tanto, la Fig. 10B es imágenes de inmunotinción para nestina (verde) y Pax6 (rojo) para las que se indujo la diferenciación por el método anterior.

La Fig. 11 muestra imágenes microscópicas de contraste de fase en el día 14 después de la inducción de la diferenciación de células iPS (G4) cultivando las células iPS sin células nodrizas por el método de Matrigel en un medio complementado con cada uno de los siguientes fármacos. En esta figura, "N" indica la adición de Noggin, "S" indica la adición de SB431542, "NS" indica la adición de Noggin y SB431542, "C" indica la adición de DMSO de control, "D" indica la adición de dorsomorfina, "DS" indica la adición de dorsomorfina y SB431542, "LDN" indica la adición de LDN-193189, y "LDN+S" indica la adición de LDN-193189 y SB431542.

- 5 La Fig. 12 muestra el número de células existentes por pocillo en el día 14 después de la adición de cada uno de los siguientes fármacos y lo mismo antes de la adición de cada fármaco. En esta figura, Día 0 indica “antes de la adición de un fármaco”, “Cont” indica un grupo de control al que se añadió DMSO, “N” indica un grupo al que se añadió Noggin, “NS” indica un grupo al que se añadieron Noggin y SB431542, “D” indica un grupo al que se añadió dorsomorfina, “S” indica un grupo al que se añadió SB431542, “DS” indica un grupo al que se añadieron dorsomorfina y SB431542, “L10S” indica un grupo al que se añadieron LDN-193189 y SB431542 10 nM, “L50S” indica un grupo al que se añadieron LDN-193189 y SB431542 50 nM, y “L100S” indica un grupo al que se añadieron LDN-193189 y SB431542 100 nM.
- 10 La Fig. 13 muestra imágenes de inmunotinción obtenidas usando anticuerpo anti-Pax6 (verde) y anticuerpo anti-Nanog (rojo) e imágenes de inmunotinción obtenidas usando DAPI (azul) en el día 14 después de inducir la diferenciación de células iPS (G4) cultivando las células sin células nodrizas por el método de Matrigel. En la Fig. 13, “SB” indica SB431542 y “LDN” indica LDN-193189.
- 15 La Fig. 14 muestra imágenes microscópicas de contraste de fase (A) e imágenes de inmunotinción (B) obtenidas usando anticuerpo anti-nestina (verde) y DAPI (azul) en el día 14 después de la inducción de la diferenciación. La diferenciación se indujo co-cultivando una línea de células ES (Kh-ES5) con células PA6 según el método SDIA, luego cultivando las células en un medio complementado con LDN-193189 y SB431542 5-500 nM.
- 20 La Fig. 15 muestra imágenes de inmunotinción obtenidas usando DAPI (azul) y anticuerpo anti-nestina (verde) (A) o anticuerpo anti-Pax6 (verde) (B) en el día 14 después de la inducción de la diferenciación co-cultivando línea de células ES (Kh-ES1 o Kh-ES4) con células PA6 según el método SDIA y luego cultivando las células en un medio complementado con LDN-193189 y SB431542 5-500 nM.
- 25 La Fig. 16 muestra el resultado de PCR cuantitativa con respecto a Nanog (A), Pax6 (B) y Sox1 (C) en las células diferenciadas inducidas cultivando células iPS humanas (404C2) con el método libre de nodrizas. El resultado muestra el valor logarítmico relativo para el valor de células sin tratar. “A” a “F” indica las siguientes condiciones: “A” es DFK5% antiguo que contiene dorsomorfina 2 μ M y SB431542 10 μ M; “B” es GMK8% antiguo que contiene LDN913189 100 nM y A-83-01 0,5 μ M; “C” es DFK5% que contiene dorsomorfina 2 μ M y SB431542 10 μ M; “D” es GMK8% que contiene LDN913189 100 nM y A-83-01 0,5 μ M; “E” es GMK8% que contiene LDN913189 100 nM y SB431542 10 μ M; y “F” es GMK8% que contiene LDN913189 100 nM y A-83-01 0,5 μ M + PD0325901 0,5 μ M.
- 30

La Fig. 17 muestra gráficos de FACS que muestran la utilización 2D de Oct3/4 (A), células que expresan PSA-NCAM (B), células que expresan Tuj-1 (C) y la utilización 2D de SSEA1 y SSEA4 (D) con respecto a las células diferenciadas cultivando células iPS (404C2) usando el método libre de nodrizas bajo la condición de GMK8% que contiene LDN913189 100 nM y A-83-01 0,5 μ M.

35

Modos para llevar a cabo la invención

40 La presente invención se describirá en detalle del siguiente modo.

La presente invención se refiere a un método de inducción de la diferenciación de una célula madre pluripotente en una célula precursora neural, que comprende cultivar la célula madre pluripotente, como se ha descrito anteriormente.

45

<Células madre pluripotentes>

Las células madre pluripotentes que pueden usarse en la presente invención son células madre que tienen la pluripotencia que es una capacidad para diferenciar las células madre en todas las células derivadas del ectodermo, mesodermo y endodermo existentes en un cuerpo vivo, y la potencia de proliferación. Ejemplos de tales células madre incluyen, pero no se limitan a, células madre embrionarias (ES), células madre embrionarias derivadas de clon de embrión (ntES: ES de transferencia nuclear) obtenidas mediante trasplante nuclear, células madre germinales de la línea masculina (“células GS”), células germinativas embrionarias (“células EG”) y células madre pluripotentes inducidas (iPS). Las células madre pluripotentes preferibles son células ES, células ntES y células iPS.

50

55

(A) Células madre embrionarias

Las células ES son células madre que tienen pluripotencia y potencia de proliferación basada en la auto-replicación, que se establece a partir de masas de células internas de embriones tempranos (por ejemplo, blastocistos) de mamíferos tales como seres humanos y ratones.

60

Las células ES son células madre derivadas de embrión de las masas de células internas de los blastocistos que son embriones después del estadio de mórula en el estadio de 8 células del óvulo fecundado. Las células ES tienen concretamente, pluripotencia, que es la capacidad para diferenciar dentro de cualquier célula que compone un cuerpo adulto, y la existencia de potencia de proliferación basada en la auto-replicación. Las células ES fueron descubiertas en ratones en 1981 (M. J. Evans y M. H. Kaufman (1981), Nature 292: 154-156) y entonces las líneas

65

de células ES se establecieron para primates tales como seres humanos y monos (J. A. Thomson et al. (1999), *Science* 282: 1145-1147; J.A. Thomson et al. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92: 7844-7848; J. A. Thomson et al. (1996), *Biol. Reprod.*, 55: 254-259; J. A. Thomson y V. S. Marshall (1998), *Curr. Top. Dev. Biol.*, 38: 133-165).

5 Para referencia solo, las células ES pueden establecerse eliminando masas de células internas de blastocistos de óvulos fecundados de un animal diana, cultivando las masas de células internas sobre fibroblastos como células nodrizas. Por tanto, el mantenimiento de las células por subcultivo puede realizarse usando un medio complementado con una sustancia tal como un factor inhibidor de la leucemia (LIF) o un factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Métodos para el establecimiento y el mantenimiento de células ES humanas y de mono
10 se describen en H. Suemori et al. (2006), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345: 926-932; M. Ueno et al. (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103: 9554-9559; H. Suemori et al. (2001), *Dev. Dyn.*, 222:273-279; H. (Kawasaki et al. (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99: 1580-1585, etc.

15 Como medio para la preparación de células ES se usa, por ejemplo, un medio DMEM/F-12 complementado con 2-mercaptoetanol 0,1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, L-glutamato 2 mM, 20 % de KSR y 4 ng/ml de β -FGF. Las células ES humanas pueden mantenerse usando el medio bajo atmósfera húmeda (5 % de CO₂) a 37 °C. Por tanto, las células ES requieren subcultivo cada 4 a 5 días. En este momento, el subcultivo puede realizarse usando, por ejemplo, 0,25 % de tripsina y 0,1 mg/ml de colagenasa IV en PBS que contiene CaCl₂ 1 mM y 20 % de KSR.

20 Las células ES pueden seleccionarse generalmente por el método de PCR en tiempo real usando la expresión de un gen marcador (por ejemplo, fosfatasa alcalina, Oct-3/4 y Nanog) como indicador. En particular, las células ES humanas pueden seleccionarse usando la expresión de un gen marcador (por ejemplo, OCT-3/4, NANOG, o ECAD) como índice (E. Kroon et al. (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26: 443-452). Para referencia solo, líneas de células ES humanas, tales como KhES-1, KhES-2, KhES-3, KhES-4 y KhES-5, están disponibles en el Institute for Frontier
25 Medical Sciences, Universidad de Kioto (Kioto, Japón).

(B) Células madre de la línea germinal masculina

30 Las células madre de la línea germinal masculina son células madre pluripotentes derivadas de testículo, que sirven de orígenes para la espermatogénesis. Las células pueden inducirse para diferenciarse en diversas líneas de células como en el caso de células ES. Por ejemplo, las células son capaces de producir ratones quiméricos cuando se trasplantan en blastocistos de ratón (M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) *Biol. Reprod.*, 69:612-616; K. Shinohara et al. (2004), *Cell*, 119:1001-1012). Las células son auto-replicables en un medio que contiene un factor neurotrófico derivado de la línea de células de la glía (GDNF). Además, mediante la repetición de subcultivo de las células bajo
35 condiciones de cultivo similares a aquellas para las células ES, pueden obtenerse células madre de la línea germinal masculina (Masanori Takebayashi et al., (2008), *Experimental Medicine*, Vol. 26, No. 5 (Suppl.), pp. 41-46, YODOSHA (Tokio, Japón)).

(C) Células germinativas embrionarias

40 Se establecen células germinativas embrionarias a partir de células germinativas primordiales en el periodo prenatal, que tienen pluripotencia similar a la de las células ES. Las células germinativas embrionarias pueden establecerse cultivando células germinativas primordiales en presencia de una sustancia tal como LIF, bFGF y un factor de célula madre (Y. Matsui et al. (1992), *Cell*, 70: 841-847; J.L. Resnick et al. (1992), *Nature*, 359: 550-551).

(D) Células madre pluripotentes inducidas

45 Pueden prepararse células madre pluripotentes inducidas (iPS) introduciendo un factor(es) de reprogramación específico(s) en forma de ADN o proteína en células somáticas. Tales células iPS son células madre artificiales de células somáticas, que tienen propiedades casi equivalentes a aquellas de células ES, tales como pluripotencia y potencia de proliferación basada en la auto-replicación (K. Takahashi y S. Yamanaka (2006) *Cell*, 126: 663-676; K. Takahashi et al. (2007), *Cell*, 131: 861-872; J. Yu et al. (2007), *Science*, 318: 1917-1920; Nakagawa, M. et al., *Nat. Biotechnol.* 26: 101-106 (2008); publicación internacional WO 2007/069666). Un factor de reprogramación puede ser
50 un gen que se expresa específicamente en células ES o un gen o un producto génico del mismo que desempeña una función importante en el mantenimiento de la no diferenciación de células ES. Ejemplos de tales factores de reprogramación incluyen, pero no están particularmente limitados a, combinaciones de: OCT3/4, SOX2 y KLF4; OCT3/4, KLF4 y C-MYC; OCT3/4, SOX2, KLF4 y C-MYC; OCT3/4 y SOX2; OCT3/4, SOX2 y NANOG; OCT3/4, SOX2 y LIN28; y OCT3/4 y KLF4.

60 Estos factores en forma de proteína pueden introducirse en células somáticas por técnicas tales como lipofección, unión con un péptido permeable a la membrana celular y microinyección. Alternativamente, estos factores en forma de ADN también pueden introducirse en células somáticas por técnicas tales como técnicas usando vectores tales como un virus, un plásmido y un cromosoma artificial, lipofección, técnicas usando liposomas y microinyección. Ejemplos de un vector viral incluyen un vector retroviral, un vector lentiviral (*Cell*, 126, pp. 663-676, 2006; *Cell*, 131, pp. 861-872, 2007; *Science*, 318, pp. 1917-1920, 2007), un vector adenoviral (*Science*, 322, 945-949, 2008) y un vector viral adeno-asociado, y un vector del virus de Sendai. Por tanto, ejemplos de un vector de cromosoma
65

artificial incluyen vectores de un cromosoma artificial humano (HAC), de un cromosoma artificial de levadura (YAC) y de un cromosoma artificial bacteriano (BAC, PAC). Como plásmidos pueden usarse plásmidos para las células de mamífero (Science, 322: 949-953, 2008). Un vector puede comprender secuencias reguladoras tales como un promotor, un potenciador, una secuencia de unión al ribosoma, un terminador y un sitio de poliadenilación, de manera que puedan expresarse los factores de reprogramación nuclear. Un vector puede comprender además, si fuera necesario, una secuencia de marcador de selección tal como un gen de resistencia a fármaco (por ejemplo, gen de resistencia a kanamicina, gen de resistencia a ampicilina, o gen de resistencia a puromicina), un gen de timidina cinasa y un gen de toxina diftérica, una secuencia de gen indicador tal como una proteína verde fluorescente (GFP), β -glucuronidasa (GUS), o FLAG. Por tanto, el vector puede tener secuencias LoxP, que se localizan en cada extremo de un gen que codifica un factor de reprogramación o un gen que codifica un factor de reprogramación que se une a un promotor después de la introducción en células somáticas, con el fin de suprimir el gen.

Para aumentar una eficiencia de inducción tras la reprogramación, además de los factores anteriores, pueden usarse inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC) [por ejemplo, inhibidores de molécula pequeña tales como ácido valproico (VPA) (Nat. Biotechnol., 26 (7): 795-797 (2008)), tricostatina A, butirato sódico, MC 1293 y M344; ARNip y ARNhp contra HDAC (por ejemplo, inhibidores de la expresión de ácidos nucleicos tales como HDAC1 siRNA Smartpool™ (Millipore) y HuSH 29mer shRNA Constructs contra HDAC1 (OriGene)), inhibidores de ADN metiltransferasa (por ejemplo, 5'-azacitidina) (Nat. Biotechnol., 26 (7): 795-797 (2008)), inhibidores de la histona metiltransferasa G9a [por ejemplo, inhibidores de molécula pequeña tales como BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008)) e inhibidores de la expresión de ácidos nucleicos tales como ARNip y shRNA contra G9a (por ejemplo, ARNip de G9a (humano) (Santa Cruz Biotechnology)], agonistas de calcio de los canales L (por ejemplo, Bayk8644) (Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008)), inhibidores de p53 (por ejemplo, ARNip y ARNhp contra p53 (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008)), UTF1 (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008)), señalización de Wnt (por ejemplo, Wnt3a soluble) (Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008)), 2i/LIF ("2i" indica un señalización de proteína cinasa activada por mitógeno e inhibidor de la sintasa cinasa-3 de glucógeno, PloS Biology, 6 (10), 2237-2247 (2008)), miARN tal como miR-291-3p, miR-294 y miR-295 (R.L. Judson et al., Nat. Biotech., 27:459-461) (2009), inhibidores de ALK5 (por ejemplo, SB431542), y similares.

Ejemplos de un medio de cultivo para la inducción de células iPS incluyen (1) medio DMEM, DMEM/F12 o DME que contienen 10 %-15 % de FBS (estos medios pueden contener adicionalmente apropiadamente LIF, penicilina/estreptomicina, puromicina, L-glutamina, aminoácidos no esenciales, β -mercaptoetanol, y similares) y (2) un medio que contiene bFGF o SCF para el cultivo de células ES, tal como un medio para el cultivo de células ES de ratón (por ejemplo, un medio TX-WES, Tromb-X) o un medio para el cultivo de células ES de primate (por ejemplo, un medio para el cultivo de células ES de primate (humano y mono), ReproCELL, Kioto, Japón).

Un ejemplo de métodos de cultivo es el siguiente. Se ponen en contacto células somáticas con factores de reprogramación (ADN o proteína) sobre un medio DMEM o DMEM/F12 que contiene 10 % de FBS a 37 °C en presencia de 5 % de CO₂ y entonces se cultivan durante aproximadamente 4 a 7 días. Posteriormente, las células se vuelven a sembrar sobre células nodrizas (por ejemplo, células STO o células SNL tratadas con mitomicina C). Aproximadamente 10 días después del contacto entre las células somáticas y los factores de reprogramación, las células se cultivan en un medio que contiene bFGF para el cultivo de células ES de primate. Aproximadamente 30-45 días o más después del contacto, pueden formarse colonias similares a células iPS.

Alternativamente, pueden cultivarse células sobre células nodrizas (por ejemplo, células STO o células SNL tratadas con mitomicina C) a 37 °C en presencia de 5 % de CO₂ en un medio DMEM que contiene 10 % de FBS (el medio puede contener adicionalmente opcionalmente LIF, penicilina/estreptomicina, puromicina, L-glutamina, aminoácidos no esenciales, β -mercaptoetanol, y similares.). Después de aproximadamente 25 a aproximadamente 30 días o más, pueden formarse colonias similares a ES.

Además, también pueden cultivarse células bajo condiciones hipóxicas en las que la concentración de oxígeno es 5 %-10 % para aumentar la eficiencia de la inducción de células iPS (documento WO 2010/013845).

Durante el cultivo anterior, se realiza intercambio de medio con medio fresco una vez al día a partir del día 2 después del inicio del cultivo. Además, el número de células somáticas que va a usarse para la reprogramación nuclear no está limitado, pero oscila de aproximadamente 5×10^3 a aproximadamente 5×10^6 células por placa de cultivo (100 cm²).

Cuando un gen tal como un gen de resistencia a fármaco se usa como gen marcador, las células que expresan el gen marcador pueden seleccionarse cultivando células en un medio (un medio de selección) que contiene el fármaco relevante. Cuando un gen marcador es un gen de proteína fluorescente, las células que expresan el gen marcador pueden detectarse mediante observación bajo microscopía de fluorescencia. Cuando un gen marcador es un gen de enzima luminiscente, las células que expresan el gen marcador pueden detectarse mediante la adición de un sustrato luminiscente. Cuando un gen marcador es un gen de enzima, las células que expresan el gen marcador pueden detectarse mediante la adición de un sustrato cromogénico.

El término “célula somática”, como se usa en el presente documento, se refiere a todas las células de animales que excluyen células de la línea germinal tales como óvulos, ovocitos y espermatozoides, células totipotentes y células ES (preferentemente, células de mamíferos que incluyen seres humanos). Ejemplos de células somáticas incluyen, pero no se limitan a, células somáticas de fetos, células somáticas de neonatos, y células somáticas sanas o patógenas maduras. Ejemplos de las mismas también incluyen células cultivadas primarias, células de pases y células de líneas celulares establecidas. Ejemplos de las mismas incluyen adicionalmente células madre de tejido y células precursoras de tejido. Ejemplos específicos de células somáticas incluyen, pero no se limitan a, (1) células madre de tejido (células madre somáticas) tales como células madre neurales, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimatosas y células madre de pulpa dental, (2) células precursoras de tejido, y (3) células diferenciadas tales como linfocitos, células epiteliales, células endoteliales, células de músculo, fibroblastos (por ejemplo, células de la piel), células pilosas, hepatocitos, células de la mucosa gástrica, enterocitos, esplenocitos, células pancreáticas (por ejemplo, células exocrinas pancreáticas), células cerebrales, neumocitos, células renales y células de la piel.

(E) Células ES derivadas de clon de embrión obtenidas por trasplante nuclear

Para referencia solo, células ES de transferencia nuclear (nt) son células ES derivadas de clon de embrión preparadas por técnicas de trasplante nuclear, que tienen casi las mismas propiedades que aquellas de células ES derivadas de óvulos fecundados (T. Wakayama et al. (2001), *Science*, 292: 740-743; S. Wakayama et al. (2005), *Biol. Reprod.*, 72: 932-936; J. Byrne et al. (2007), *Nature*, 450: 497-502). Específicamente, las células ES establecidas a partir de las masas de células internas de un blastocisto derivado de clon de embrión obtenidas por sustitución del núcleo de un óvulo no fecundado con el núcleo de una célula somática son células ntES (ES de transferencia nuclear). Para la preparación de células ntES se usan la técnica de trasplante nuclear (J. B. Cibelli et al. (1998), *Nature Biotechnol.*, 16: 642-646) y la técnica de preparación de células ES (véase anteriormente) en combinación (Kiyoka Wakayama et al., (2008), *Experimental Medicine*, Vol. 26, No. 5 (Suppl.), pp. 47-52). Mediante el trasplante nuclear, el núcleo de una célula somática se inyecta dentro de un óvulo no fecundado de mamífero enucleado, seguido de varias horas de cultivo, de manera que pueda realizarse la reprogramación.

<Inhibidor de BMP de molécula pequeña>

Un inhibidor de BMP de molécula pequeña es un inhibidor de molécula pequeña que participa en la inhibición de la señalización de BMP que está mediada por la unión de BMP (proteína morfogenética ósea) al receptor de BMP (tipo I o tipo II), pero se diferencia de un inhibidor de proteína tal como Noggin, cordinina, follistatina, o similares, que es un inhibidor natural. Como se usa en el presente documento, el término “molécula pequeña” significa una molécula orgánica o inorgánica y este término no incluye macromoléculas grandes, tales como proteínas grandes (por ejemplo, proteínas con pesos moleculares superiores a 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, o 10.000), ácidos nucleicos grandes (por ejemplo, ácidos nucleicos con pesos moleculares de más de 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000 o 10.000), o polisacáridos grandes (por ejemplo, polisacáridos con pesos moleculares de más de 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000 o 10.000). Este inhibidor debe tener efectos de inducción de la diferenciación de células madre pluripotentes en células precursoras neurales. Ejemplos de un inhibidor de BMP de molécula pequeña que tiene tales propiedades incluye un compuesto que inhibe BMP2, BMP4, BMP6 o BMP7 capaz de activar un factor de transcripción SMAD1, SMAD5 o SMAD8, tal como dorsomorfina (es decir, 6-[4-(2-piperidin-1-il-etoxi)fenil]-3-piridin-4-il-pirazolo[1,5-a]pirimidina) y un derivado de la misma (P. B. Yu et al. (2007), *Circulation*, 116: II_60; P.B. Yu et al. (2008), *Nat. Chem. Biol.*, 4: 33-41; J. Hao et al. (2008), *PLoS ONE* (www.plozone.org), 3(8): e2904). La dorsomorfina está comercialmente disponible, por ejemplo, de Sigma-Aldrich. La dorsomorfina tiene actividad biológica para inhibir la señalización de BMP anterior inhibiendo la unión de BMP a un receptor de BMP. Además de ellos, ejemplos de un inhibidor de cinasas de receptor tipo I de BMP incluyen LDN-193189 (es decir, 4-(6-(4-(piperazin-1-il)fenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)quinolina) y un derivado del mismo (Yu PB et al. *Nat Med*, 14: 1363-9, 2008). LDN-193189 está comercialmente disponible de, por ejemplo, Stemgent.

<Inhibidor de la familia TGFβ de molécula pequeña>

Según la presente invención, la eficiencia de inducción de la diferenciación de células madre pluripotentes en células precursoras neurales puede mejorarse significativamente combinando el inhibidor de BMP de molécula pequeña con un inhibidor de la familia TGFβ de molécula pequeña (factor de crecimiento transformante P), en el que el inhibidor de BMP de molécula pequeña es dorsomorfina o LDN-193189, en el que el inhibidor de la familia TGFβ de molécula pequeña es SB431542 o A-83-01, en el que la concentración de LDN-193189 es superior a 50 nM.

El término “inhibidor de la familia TGFβ de molécula pequeña”, como se usa en el presente documento, se refiere a un inhibidor de molécula pequeña que interfiere con la señalización de la familia TGFβ.

Los miembros de la familia TGFβ regulan el proceso celular y el proceso de desarrollo tal como la mitosis, diferenciación celular, formación de patrones embrionarios y organogénesis. Por ejemplo, la señalización de TGFβ se lleva a cabo mediante un complejo de receptor heteromérico de receptor de serina-treonina cinasa tipo I y tipo II. Este complejo activa el proceso de señalización de Smad aguas abajo. Específicamente, cuando TGFβ se une al complejo de receptor, el receptor de TGFβ-tipo II fosforila el receptor de TGFβ-tipo I y entonces el receptor de TGFβ-tipo I fosforila Smad mediado por receptor (R-Smad), de manera que se inicia la respuesta aguas abajo. R-Smad

activado y Smad4 forman un complejo multimérico, de manera que R-Smad activado se transfiere al núcleo y entonces se induce la regulación transcripcional de un gen diana.

5 Cuando se inhibe tal señalización de la familia TGF β , se induce la diferenciación de células madre pluripotentes en células precursoras neurales. Además, cuando se inhibe la señalización de BMP anterior, además de esta inhibición, no solo la tasa de inducción de células precursoras neurales disminuye, sino que también la tasa residual de células no diferenciadas (es decir, células madre pluripotentes) disminuye más, así, aumenta la tasa de conversión en células precursoras neurales.

10 <Células nodrizas>

En la presente invención, las células nodrizas no son siempre requeridas, pero las células nodrizas pueden estar presentes. Ejemplos de células nodrizas incluyen fibroblastos embrionarios y células del estroma. Ejemplos de fibroblastos embrionarios incluyen células MEF (fibroblastos embrionarios de ratón), STO células (línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón) y SNL (subclones de células STO; por ejemplo, células SNL 76/7). Por tanto, ejemplos de células del estroma incluyen células PA6 (línea celular del estroma de ratón (RIKEN BRC Cell Bank (Japón)), células MS-5 (Exp Hematol. 17: 145-53 (1989)) y células OP9 (Science. 265: 1098-1101 (1994)). El método SDIA comprende cocultivar células ES con células del estroma, y particularmente con células PA6, para realizar la diferenciación casi selectiva en células precursoras neurales. Según la presente invención, incluso en ausencia de células nodrizas, la diferenciación selectiva en células precursoras neurales puede inducirse haciendo la combinación anterior del inhibidor de BMP de molécula pequeña y el inhibidor de la familia TGF β de molécula pequeña, presente en un medio de inducción de la diferenciación. El uso de células nodrizas, además de tales condiciones de cultivo, puede mejorar adicionalmente la eficiencia de diferenciación en células precursoras neurales.

25 Sin embargo, si es así, cuando el trasplante de células precursoras neurales, o células neurales o de la glía que se diferencian de las mismas, en un mamífero tal como un ser humano se tiene en consideración, huelga decir que el uso de células que son heterogéneas para los donantes debe evitarse a un grado tan grande como sea posible.

30 <Inducción de la diferenciación de células precursoras neurales>

(A) Medio de diferenciación

Puede prepararse medio usado para cultivar células de animales como medio basal. Ejemplos de tal medio basal incluyen medio IMDM, medio 199, medio esencial mínimo de Eagle (EMEM), medio α MEM, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio Ham's F12, medio RPMI 1640, medio de Fischer, Glasgow MEM, y mezclas de los mismos. El medio puede contener suero o puede estar libre de suero.

40 El medio puede contener adicionalmente, si fuera necesario, uno o más sustitutos del suero, tales como albúmina, transferrina, sustitución de suero Knockout (KSR) (sustituto del suero para FBS tras el cultivo de células ES), ácido graso, insulina, un precursor de colágeno, oligoelementos, 2-mercaptoetanol, 3'-tioglicerol, suplemento de B27 y suplemento de N2, además de una o más sustancias tales como lípidos, aminoácidos, aminoácidos no esenciales, vitaminas, factores de crecimiento, citocinas, antibióticos, antioxidantes, piruvato, un agente de tamponamiento y sales inorgánicas.

45 El medio también puede contener el inhibidor de BMP de molécula pequeña anterior y/u opcionalmente el inhibidor de la familia TGF β de molécula pequeña anterior. El medio puede contener adicionalmente un sobrenadante de cultivo de las células nodrizas anteriores. El medio puede adicionalmente cualquiera de los inhibidores de ERK (cinasa regulada por la señal extracelular).

50 Un ejemplo del medio de diferenciación es medio mixto DMEM/Ham's F12 que contiene 5 % de sustitución de suero Knockout (KSR), L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales y 2-mercaptoetanol 1 μ M (2-ME) o MEM de Glasgow que contiene 8 % de KSR, piruvato de 2ME 1 μ M y aminoácidos no esenciales, como se describe en los ejemplos mostrados más adelante.

55 (B) Método de inducción de la diferenciación

Según la presente invención, tras la inducción de la diferenciación de células pluripotentes tales como células ES o células iPS en células precursoras neurales, tales células se preparan y luego se cultivan usando los métodos descritos en los documentos anteriores. Cuando las células ES humanas o células iPS humanas se cultivan, preferentemente puede usarse un medio para las células ES de primate (ReproCELL (Kioto, Japón)).

60 La inducción de la diferenciación de células madre pluripotentes en células precursoras neurales puede realizarse en tanto presencia como ausencia de células nodrizas usando los medios de diferenciación anteriormente descritos. Cuando las células nodrizas están presentes, como tales células, pueden usarse los MEF anteriormente ejemplificados (fibroblastos embrionarios de ratón), células STO (línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón), células PA6 (línea celular del estroma de ratón (RIKEN BRC Cell Bank (Japón)), células SNL (subclones de células

STO; por ejemplo, células SNL 76/7), y similares. Para células nodrizas, el tratamiento con mitomicina C se realiza generalmente para detener la proliferación celular.

Inmediatamente antes e inmediatamente después de la inducción de la diferenciación, preferentemente, se añade un inhibidor de ROCK (cinasa de bobina en espiral asociada a p160-Rho) a un medio que contiene células madre pluripotentes cultivadas. El inhibidor de ROCK es una sustancia que presenta efectos muy fuertes de supresión de la muerte celular tras la dispersión de las células. Por ejemplo, Y-27632, fasudil (HA-1077), o similares, se conocen como un inhibidor de ROCK tal (K. Watanabe et al., Nat. Biotech., 25: 681-686 (2007)). La concentración de un inhibidor oscila de, pero no se limita a, aproximadamente 50 nM a aproximadamente 10 µM por placa de cultivo.

La densidad de células madre pluripotentes en un medio oscila preferentemente de aproximadamente $5,0 \times 10^4$ a aproximadamente $1,0 \times 10^7$ células, pero puede encontrarse fuera de tal intervalo.

Ejemplos de cultivo incluyen cultivo tridimensional bajo condiciones no de adhesión, tales como cultivo en suspensión (por ejemplo, cultivo en dispersión y cultivo de agregación-suspensión), cultivo bidimensional bajo condiciones de adhesión, tales como cultivo en placa, y cultivos continuamente combinados que constituyen un cultivo tridimensional y luego un cultivo bidimensional. Cuando la diferenciación se induce en presencia de células nodrizas, puede emplearse cultivo bidimensional. Por otra parte, en ausencia de células nodrizas, puede emplearse cultivo tridimensional.

En el caso de una estufa de incubación de células adhesivas, con el fin de mejorar las propiedades de adhesión con células, la superficie de la estufa de incubación puede recubrirse con una sustancia de soporte de células, tal como colágeno, gelatina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, laminina, fibronectina o Matrigel™ (Becton, Dickinson and Company).

En el cultivo en dispersión, las células madre pluripotentes se cultivan en un estado suspenso en un medio líquido. Por tanto, las masas de células madre pluripotentes (o cuerpos embrioides) se forman por el cultivo de agregación-suspensión. Posteriormente, puede inducirse la diferenciación de las masas de células (o cuerpos embrioides) en células de interés. Para el cultivo de agregación-suspensión puede usarse, por ejemplo, el método del cultivo de cuerpos embrioides (Keller et al., Curr. Opin. Cell Biol. 7, 862-869 (1995)) o el método SFEB (por ejemplo, Watanabe et al., Nature Neuroscience 8, 288-296 (2005); documento WO 2005/123902). El método preferible es el cultivo de cuerpos embrioides en un medio sin suero como el método SFEB.

En el cultivo de adhesión puede usarse, por ejemplo, el método de Matrigel (Chambers SM, et al. Nat Biotechnol. 27: 485, 2009) o el método SDIA (Kawasaki H, et al. Neuron. 28:31-40, 2000 o Kawasaki H, et al. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 99: 1580-5, 2002).

Con respecto a las condiciones de cultivo, pueden usarse los medios anteriormente mencionados y la temperatura para el cultivo no se limita a los siguientes ejemplos, pero oscila de aproximadamente 30 °C a 40 °C, preferentemente aproximadamente 37 °C. El cultivo se realiza bajo una atmósfera de aire que contiene CO₂, en la que la concentración de CO₂ oscila preferentemente de aproximadamente el 2 % al 5 %. El tiempo para el cultivo o el programa para el cultivo oscilan, por ejemplo, de 7 días a 21 días, más preferentemente 14 días bajo inducción de las condiciones de diferenciación.

Con respecto a los métodos y condiciones específicos para la inducción de la diferenciación, véanse los ejemplos facilitados más adelante.

<Células precursoras neurales inducidas>

En el presente documento se describen células precursoras neurales inducidas preparadas por el método de inducción de la diferenciación como se ha descrito anteriormente.

Ejemplos de células precursoras neurales que pueden obtenerse por el método de la presente invención incluyen células precursoras de todas las células neurales, tales como células neurales en el sistema nervioso central, células neurales en el sistema nervioso periférico, neuronas motoras, células neurales en el sistema de órganos sensoriales, y células neurales en el nervio autónomo.

Las células precursoras neurales pueden identificarse usando marcadores de expresión tales como, por ejemplo, marcadores de expresión para el neuroectodermo primitivo o células madre neurales (por ejemplo, una molécula de adhesión a célula neural (NCAM), NCAM polisialilado, A2B5 (expresado en células neurales de fetos o neonatos), proteínas de filamentos intermedios (nestina, vimentina, o similares), y un factor de transcripción (Pax-6), marcadores neuronales de dopamina (por ejemplo, tirosina hidroxilasa (TH)), y marcadores neurales (por ejemplo, TuJ1).

Después de la preparación, las células precursoras neurales pueden trasplantarse directamente en un cuerpo vivo o pueden diferenciarse completamente o parcialmente dentro de células neurales o células de la glía (incluyendo astrocitos y oligodendrocitos) y entonces trasplantarse en un cuerpo vivo.

<Uso en el cribado de un agente terapéutico para enfermedad neurológica>

Las células precursoras neurales inducidas descritas en el presente documento también pueden usarse para cribar compuestos para tratar enfermedades neurológicas (por ejemplo, compuestos farmacéuticos, disolventes, moléculas pequeñas, péptidos, o polinucleótidos). Por ejemplo, un compuesto farmacéutico candidato solo o el mismo combinado con otro fármaco se añaden a células precursoras neurales inducidas o células neurales más maduras que las células precursoras, y entonces puede realizarse la evaluación basándose en cambios morfológicos o funcionales de las células. La evaluación puede realizarse midiendo una cantidad de dopamina producida a partir de las células como un ejemplo de un cambio funcional. Aquí, las células precursoras neurales inducidas son: preferentemente células que presentan un fenotipo similar al de una enfermedad neurológica que va a tratarse; y particularmente preferentemente células madre pluripotentes inducidas preparadas a partir de células somáticas afectadas por enfermedades neurológicas, o células precursoras neurales inducidas preparadas induciendo la diferenciación de células ntES en las que se han trasplantado los núcleos de células somáticas afectadas por la enfermedad.

<Aplicación a medicina regenerativa>

Las células precursoras neurales inducidas descritas en el presente documento pueden usarse eficazmente en el campo de la medicina regenerativa para la normalización de un tejido del sistema nervioso dañado. Por tanto, las células precursoras neurales inducidas pueden usarse como células para tratar enfermedades asociadas a daños de cualquier célula en el sistema nervioso.

Ejemplos de tales enfermedades incluyen enfermedad cerebral isquémica (por ejemplo, accidente cerebrovascular), traumatismos cerebrales, lesiones espinales, enfermedades neurológicas motoras, enfermedades neurodegenerativas, retinitis pigmentosa, degeneración macular senil, sordera parcial del oído interno, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, degeneración espinocerebelosa, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, epilepsia y esquizofrenia.

Por tanto, cuando las células se usan para terapia, la pureza de las células debe aumentarse deseablemente. Ejemplos de tal purificación incluyen un método para la selección de células de interés, por ejemplo, citometría de flujo, y un tratamiento de células en un medio que contiene un agente antineoplásico. La citometría de flujo se realiza aplicando partículas de célula en un flujo de líquido muy delgado a una tasa alta, irradiando con un haz de láser, y luego midiendo la luz tal como la fluorescencia (cuando las células están marcadas fluorescentes de antemano) o luz dispersada emitida de las partículas. Cuando se proporciona un citómetro, las células de interés pueden seleccionarse y separarse. Las células pueden estar marcadas fluorescentes usando un anticuerpo (marcado fluorescente) específico para las células precursoras neurales, tales como un anticuerpo anti-nestina. Por tanto, mediante el tratamiento en un medio que contiene un agente antineoplásico, las células no diferenciadas pueden eliminarse. Ejemplos de tal agente antineoplásico incluyen mitomicina C, 5-fluorouracilo, adriamicina y metotrexato.

Las células precursoras neurales pueden trasplantarse dentro de sitios de enfermedades por una técnica descrita en la naturaleza, por ejemplo, Neuroscience, 2, 1137 (1999) o N Engl J Med.; 344: 710-9 (2001).

Ejemplos

La presente invención se describirá más adelante en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos, aunque el alcance técnico de la presente invención no está limitado a éstos.

Métodos

Células y cultivo

Se proporcionaron células ES humanas (KhES-1, KhES-2 y KhES-3) del Institute for Frontier Medical Sciences, Universidad de Kioto, y entonces se cultivaron por el método conocido (Suemori H, et al. Biochem Biophys Res Commun. 345: 926-32, 2006) (métodos usando células KhES se muestran para referencia solo). Las células iPS humanas (G1, G4, B6 y B7) se proporcionaron por el Dr. Yamanaka de la Universidad de Kioto y luego se cultivaron por el método conocido (Takahashi K, et al. Cell. 131: 861-72, 2007 y Nakagawa M, et al. Nat Biotechnol. 26: 101-6, 2008). Se sembraron células PA6 (RIKEN BRC Cell Bank) sobre una placa recubierta con gelatina y a continuación se cultivaron usando MEM alfa que contenía 10 % de FBS. Tras la inducción de la diferenciación, las células se cultivaron durante al menos un día, se confirmó que eran confluentes, y a continuación se usaron como células nodrizas. Se establecieron células iPS humanas (404C2) introduciendo factores de reprogramación (OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28 y ARNhp para p53) dentro de fibroblasto humano usando un vector que contenía EBNA-1 y oriP (documentos US61/232.402 y US61/307.306), luego se cultivaron por el mismo método de otras células iPS humanas.

Inducción de la diferenciación en células precursoras neurales (en presencia de células nodrizas: método SDIA)

Se cultivaron células ES o células iPS usando células STO como células nodrizas. Un día antes del inicio de la inducción de la diferenciación, se añadió inhibidor de ROCK 10 μM (Y276352) en un medio. Se añadió solución de disociación de CTK (0,25 % de tripsina, 1 mg/ml de colagenasa y KSR 20 %, y CaCl_2 1 mM) a 500 μl /10 cm de placa, seguido de 3 a 5 minutos de incubación a 37 °C. La placa se golpeó suavemente para eliminar las células nodrizas. Después de lavar una vez con PBS, la solución de disociación de CTK se añadió otra vez, seguido de 10-15 minutos de incubación a 37 °C. Las células ES o células iPS desprendidas de la placa se suspendieron en 5 ml de medio de diferenciación (DMEM/Ham's F12 que contiene 5 % de sustitución de suero Knockout (KSR), L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales y 2-mercaptoetanol 1 μM (2-ME)). Después de la centrifugación, los sobrenadantes se eliminaron. Otra vez, las células se suspendieron en 1 ml del medio de diferenciación y entonces se separaron entre sí pipeteando, para producir agregados pequeños (10-20 células/grumo).

Los agregados pequeños obtenidos se sembraron sobre placas que tenían PA6 como células nodrizas a concentraciones que oscilaban de 2500 a 5000 células/cm². Como medio, se usó un medio de diferenciación que contenía dorsomorfina 2 μM (Sigma) y/o SB431542 10 μM (Sigma) y/o 300 ng/ml de Noggin (HZ-1026: HumanZyme) o 2 μl /pocillo de DMSO. Se añadió Y276352 10 μM solo en el cultivo inicial. El intercambio de medio no se realizó hasta el día 7, y entonces se realizó una vez cada 3 a 4 días.

Inducción de la diferenciación en células precursoras neurales (en ausencia de células nodrizas: método SFEBq)

Por el método anterior, células ES o células iPS, de las que se habían eliminado células nodrizas, se incubaron durante 5 minutos a 37 °C usando 1 ml de Accumax (TM) para la separación. Después de lavar, el número de células se contó. Las células se suspendieron en el medio de diferenciación anterior y a continuación se sembraron sobre una placa de 96 pocillos de baja adhesión (placa de recubrimiento Lipidure: NOF Corporation) a 9000 células/pocillo. Para el cultivo, se usó un medio de diferenciación que contenía dorsomorfina 2 μM y SB431542 10 μM y se añadió Y276352 50 nM solo en el cultivo inicial. No se realizó intercambio del medio hasta el día 7, y entonces se realizó una vez cada 3 días.

Inducción de la diferenciación en células neurales usando cada fármaco (método de Matrigel)

Se separaron las células iPS (G4) por 20 minutos de tratamiento con Accutase, se lavaron con un medio de células ES humanas, y entonces se dejaron sobre una placa de recubrimiento de gelatina durante 1 hora con un medio que contenía inhibidor de ROCK (Y276352), de manera que se eliminaron las células nodrizas. Posteriormente, las células ES o células iPS (18000 células/cm²) se sembraron sobre una placa de recubrimiento Matrigel (BD) y a continuación se cultivaron durante 3 días usando un medio acondicionado MEF complementado con bFGF y un inhibidor de ROCK (Y276352), de manera que las células alcanzaron la confluencia (se eliminó Y276352 en término medio).

A continuación, las células se cultivaron durante 5 días en un medio de diferenciación (DMEM/F12, 20 % de sustitución de suero Knockout (Gibco) y 2-mercaptoetanol 0,1 mM) que contenía SB431542 10 μM , dorsomorfina 2 μM , 300 ng/ml de Noggin, LDN-193189 1 nM-100 nM (STEMGENT04-0019) o DMSO (control), o una combinación de los mismos. Sin adición de SB431542 en el día 5, las células se cultivaron continuamente en un medio de diferenciación complementado con dorsomorfina, Noggin, LDN-193189 o DMSO. En este momento, la proporción de medio N2 (el medio preparado añadiendo un suplemento de N2 a DMEM/F12) aumentó a intervalos de dos días hasta el 25 %, 50 %, y luego el 75 % sin cambiar las concentraciones de otros fármacos.

Inducción de la diferenciación en células neurales mediante la adición de LDN-193189 y SB431542 (método SDIA)

Un día antes del inicio de la inducción de la diferenciación, se añadió la solución de disociación CTK (0,25 % de tripsina, 1 mg/ml de colagenasa y KSR 20 %, y CaCl_2 1 mM) a células ES (KhES-1, KhES-4 y KhES-5), las colonias se disociaron. Las células ES desprendidas de la placa se sometieron a eliminación de MEF sobre recubrimiento de gelatina, suspenso en un medio de diferenciación (DMEM/Ham's F12 que contiene 5 % de sustitución de suero Knockout (KSR), L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales y 2-mercaptoetanol 1 μM (2-ME)) durante 1 hora, y a continuación se separaron pipeteando para producir pequeños agregados (10-20 células/coágulo). Los pequeños agregados obtenidos se sembraron sobre PA6 a una concentración que oscilaba de 2500 a 5000 células/cm². En el día 4 de cultivo, el medio se intercambió con un medio de diferenciación complementado con SB431542 10 μM y LDN-193189 5-1.000 nM. Tres días después, el medio se intercambió con un medio de diferenciación sin SB431542 y LDN-193189. A partir de aquí, los intercambios de medio con un medio de diferenciación tal sin SB431542 y LDN-193189 se realizaron a intervalos de 2 a 3 días.

Investigación de la combinación de agentes de inducción de la diferenciación en las condiciones del método SFEBq

Un día antes del inicio de la inducción de la diferenciación de células iPS humanas (404C2), se añadió inhibidor de ROCK 10 μM (Y276352) en un medio. Se añadió solución de disociación CTK (0,25 % de tripsina, 1 mg/ml de colagenasa y KSR 20 % y CaCl_2 1 mM) a 500 μl /10 cm de placa, seguido de 3 a 5 minutos de incubación a 37 °C. La placa se golpeó suavemente para eliminar células nodrizas. Después de lavar una vez con PBS, la disociación se realizó con 5 minutos de incubación a 37 °C con 1 ml de Accumax™. Después de lavar, el número de células se

contó. Las células se suspendieron en el medio de diferenciación anterior y a continuación se sembraron sobre una placa de 96 pocillos de baja adhesión (placa de recubrimiento Lipidure: NOF Corporation) a 9000 células/pocillo. Después de cultivarse las células con medio que consistía en las 6 siguientes combinaciones durante 4 días, entonces el medio se cambió al medio de diferenciación anterior (DMEM/Ham's F12 que contenía 5 % de sustitución de suero Knockout (KSR), L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales y 2-mercaptoetanol 1 μ M (2-ME)). Las células diferenciadas se evaluaron con marcador no diferenciado (Nanog) y marcador diferenciado neural (Pax6 y Sox1).

- A : DFK5% antiguo + dorsomorfina 2 μ M + SB431542 10 μ M
- B : GMK8% antiguo + LDN913189 100 nM + A-83-01 0,5 μ M
- C : DFK5% + dorsomorfina 2 μ M + SB431542 10 μ M
- D : GMK8% + LDN913189 100 nM + A-83-01 0,5 μ M
- E : GMK8% + LDN913189 100 nM + SB431542 10 μ M
- F : GMK8% + LDN913189 100 nM + A-83-01 0,5 μ M + PD0325901 0,5 μ M

en las que

- i) "antiguo" significa 20 días de pase después de la preparación.
- ii) GMK8% significa el medio que consiste en MEM de Glasgow (Invitrogen), 8 % de KSR, 2ME 1 μ M, piruvato y aminoácidos no esenciales.
- iii) A-83-01 se compró de Sigma-Aldrich Inc., y PD0325901 se compró de Wako, Japón.

Inmunotinción

En el día 14 después de la inducción de la diferenciación, las células se fijaron con 4 % de PFA durante 30 minutos a 4 °C y a continuación se inmunotincieron en PBS con cada anticuerpo enumerado en la Tabla 1.

Tabla 1: Lista de anticuerpos

Antígeno	Modelo número	Empresa de ventas	Relación de dilución
Nestina	MAB5326	Chemicon	1:500
Oct3/4	SC9081	SantaCruz	1:500
Pax6	PRB-278P-100	Covance	1:200
Nanog	AF1997	R&D Systems	1:200
PSA-NCAM	-	Chemicon	1:100
SSEA3	-	Chemicon	1:100

FACS

Las células se incubaron usando Accumax (TM) durante 20 minutos a 37 °C para la separación y a continuación se analizaron usando FACS Aria2. Para el análisis, las células se tincieron con un anticuerpo PSA-NCAM o anticuerpo conjugado SSEA-4-PE o anticuerpo Oct3/4 o anticuerpo SSEA-1 o anticuerpo Tuj1 y las células muertas se eliminaron usando tinción con 7AAD como indicador o el kit de tinción de células muertas fijables Red dye Live/dead (Invitrogen).

PCR en tiempo real

Se recogió ARN usando RNeasy Plus Mini (QIAGEN) de células ES o células iPS de las que se habían eliminado las células nodrizas por el método anterior y a continuación se analizaron por un sistema Thermal Cycler Dice Real Time TP800 (TaKaRa) usando SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa).

Estadística

Con el uso de GraphPad Prism 5 (software GraphPad), el análisis se realizó (n = 4) por ANOVA unilateral, a posteriori (prueba de comparaciones múltiples de Dunnett).

Ejemplo 1

Se cultivaron células iPS (G4) durante 14 días usando células PA6 como células nodrizas bajo tres condiciones: grupo de adición de dorsomorfina (grupo D); grupo de adición de SB431542 (grupo S); y grupo de adición de dorsomorfina y SB431542 (grupo D+S). Así, se realizó la inducción de la diferenciación. Como resultado, en el grupo D, se confirmaron las colonias positivas para tanto nestina como Oct3/4. En el grupo S, se confirmaron poblaciones de células agregadas en grupos de células extendidos de forma plana. Las poblaciones de células agregadas fueron positivas para nestina. Sin embargo, en el grupo D+S, se encontró que casi todas las colonias eran positivas para

nestina y casi no se observaron colonias positivas para Oct3/4 (Fig. 1). Se realizó inmunotinción usando el otro marcador sin diferenciación, Nanog o SSEA3, y un marcador neural, Pax6 o PSA-NCAM. Como resultado, se confirmó similarmente lo siguiente: en el grupo D, coexistieron células no diferenciadas y células precursoras neurales; en el grupo S, células precursoras neurales aparecieron en las poblaciones de células agregadas; y en el grupo D y S, las células se diferenciaron casi completamente en células precursoras neurales (Fig. 2). A continuación, el grupo D+S se sometió a 21 días de inducción de la diferenciación, de manera que se confirmaron las células positivas para un marcador de neuronas de dopamina, TH (tirosina hidroxilasa) y un marcador nervioso, TuJ1 (Fig. 3). Como se ha descrito anteriormente, se confirmó que la diferenciación de células iPS dentro de células neurales podría inducirse eficientemente cultivando células iPS usando células PA6 como células nodrizas en condiciones en las que se habían añadido dorsomorfina y SB431542.

A continuación, células ES (KhES-1, KhES-2 y KhES-3) y otras células iPS (G1, B6 y B7) se sometieron a inducción de la diferenciación por un método similar. La Fig. 4 muestra el resumen de resultados para 7 tipos (KhES-1, KhES-2, KhES-3, G1, G4, B6 y B7) de líneas celulares. Se confirmó que el número de colonias de un grupo al que se había añadido o bien dorsomorfina o SB431542 o ambos o al que ambos se habían añadido era significativamente superior al número de colonias de un grupo de control o un grupo al que se había añadido Noggin (proteína antagonista de BMP) (Fig. 4A). Por tanto, se confirmó que los fármacos anteriores tenían efectos de contribuir a la supervivencia de células pluripotentes (células ES y células iPS) tras la inducción de la diferenciación. Mientras tanto, se confirmó en la inducción de la diferenciación dentro de colonias que contienen células neurales que SB431542 fue eficaz en la eliminación de células no diferenciadas (Fig. 4B). Por tanto, la eficiencia de producción de colonias que contienen células neurales fue significativamente mayor con la combinación de dorsomorfina y SB431542 que con la combinación de Noggin y SB431542.

Se observaron tendencias similares para líneas celulares individuales (células ES (Fig. 5) y células iPS (Fig. 6)). Estos resultados también pueden entenderse a partir del resultado de que la expresión de proteínas diana para los fármacos anteriores (TGF/Activin/Nodal: SB431542; BMP: dorsomorfina) permaneció casi igual para cada línea celular (Fig. 7).

Con respecto al resultado anterior, la eficiencia de inducción en células precursoras neurales se determinó basándose en el número de colonias, cada una de las cuales contuvo al menos una célula positiva para un gen marcador. Esto es inapropiado para la comparación de la eficiencia de inducción en una célula completa. Por lo tanto, para la observación de la inducción de la diferenciación basándose en la unidad de célula, pero no basándose en la unidad de colonia, se realizó análisis de FACS. Según el método de actividad de inducción derivada de células del estroma convencional (método SDIA) (Kawasaki H, et al. *Neuron*. 28: 31-40, 2000 o Kawasaki H, et al. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99: 1580-5, 2002), la diferenciación se indujo sin usar dorsomorfina o SB431542, pero usando células PA6 como células nodrizas. En el día 14 después de la inducción de la diferenciación, las células se analizaron por FACS (Fig. 8). Este método puede producir algunas líneas celulares para las que se observan células positivas para SSEA4 (un marcador de no diferenciación). Por consiguiente, el método no es un método de inducción fiable debido a las diferencias en la resistencia a la diferenciación entre líneas celulares. A continuación, la diferenciación de células ES (KhES1) se indujo por un método que implicaba la adición de dorsomorfina y SB431542. El número de células positivas para PSA-NCAM fue 3 o más veces superior al número de las mismas en un grupo de control al que no se había añadido nada, y se encontró que el número de células positivas para SSEA4 se reducía (Fig. 9). Por tanto, se confirmó que la diferenciación altamente eficiente en células precursoras neurales es posible por el método de uso de dorsomorfina y SB431542.

Ejemplo 2

Se sometieron células iPS (G4) a la formación de un cuerpo embrioides bajo condiciones de baja adhesión, y se añadieron dorsomorfina y SB431542 a las células, diferenciándose así las células en las células precursoras neurales. Como resultado, en el día 14 después de la inducción de la diferenciación, casi el 99,6 % de las células fueron positivas para PSA-NCAM (Fig. 10A). Por tanto, como resultado de la inmunotinción, las células sometidas a inducción de la diferenciación fueron positivas para nestina y Pax6, los marcadores neurales del estadio temprano (Fig. 10B). Como se ha descrito anteriormente, se confirmó que, usando el método de inducción de la diferenciación en ausencia de células nodrizas, fue posible usar diferenciación altamente eficiente en células precursoras neurales usando dorsomorfina y SB431542.

Ejemplo 3

Inducción de la diferenciación en células precursoras neurales usando cada fármaco (método de Matrigel)

Se cultivaron células iPS (G4) durante 14 días por el método de Matrigel bajo las siguientes condiciones: DMSO solo (control) (grupo C); Noggin solo (grupo N); Noggin + SB431542 (grupo NS); dorsomorfina sola (grupo D); SB431542 solo (grupo S); dorsomorfina + SB431542 (grupo DS); LDN-193189 (1 nM) (grupo L1); LDN-193189 (5 nM) (grupo L5); LDN-193189 (10 nM) (grupo L10); LDN-193189 (5 nM) + SB431542 (grupo L5S); LDN-193189 (10 nM) + SB431542 (grupo L10S); LDN-193189 (50 nM) + SB431542 (grupo L50S); y LDN-193189 (100 nM) + SB431542 (grupo L100S). Las Fig. 11 y Fig. 12 muestran los resultados.

Después de la inducción de la diferenciación, se confirmó que hubo un gran número de células viables en el grupo NS, el grupo DS, el grupo L50S y el grupo L100S como resultado de observar visualmente células y determinar el número de células en el día 14.

5 Posteriormente, tanto si fue como no posible la diferenciación en células precursoras neurales, se confirmó basándose en la expresión del marcador de células neurales PAX6 y el marcador de no diferenciación Nanog (Fig. 13). Como resultado, el número de células positivas para PAX6 y negativas para Nanog fue alto en el grupo L100S. Así, se confirmó que la inducción de la diferenciación en células precursoras neurales bajo las condiciones anteriormente mencionadas era relativamente satisfactoria.

10 Ejemplo 4

Determinación de una concentración óptima de LDN-193189 para la diferenciación en células precursoras neurales (método SDIA)

15 Se sometieron células ES humanas (KhES-1, KhES-4 y KhES-5) a inducción de la diferenciación realizada por un método de actividad de inducción derivada de células del estroma (método SDIA) usando LDN-193189 a una concentración que oscilaba de 5 nM a 1000 nM, con el fin de determinar una concentración óptima de LDN-193189.

20 La Fig. 14 muestra imágenes de tinción obtenidas usando anticuerpo anti-nestina en el día 14 después de la inducción de la diferenciación. La diferenciación de células Kh-ES5 se indujo añadiendo SB431542 y LDN-193189 (a varias concentraciones) a las células, para inducir su diferenciación en células precursoras neurales. Por tanto, se confirmó que la diferenciación de células KhES-5 en células precursoras neurales se indujo relativamente satisfactoriamente cuando la concentración de LDN-193189 fue 50 nM o superior (grupo L50S, grupo L100S y grupo L500nMS). Por tanto, no se observó que el efecto aumentara cuando la concentración de LDN-193189 fue superior a 50 nM.

25 A continuación, la línea celular KhES-1 y la línea celular KhES-4 se sometieron a inducción de la diferenciación añadiendo LDN-193189 y SB431542. Así se confirmó que las células positivas para nestina fueron relativamente satisfactorias cuando la concentración de LDN-193189 osciló de 25 nM a 75 nM (Fig. 15A). Similarmente, las células se tiñeron con el marcador neural Pax6. Se confirmó que las células se tiñeron con el mayor grado cuando la concentración de LDN-193189 fue 20 nM (Fig. 15B).

30 Ejemplo 5

35 Las células neurales que indujeron eficiencia con 6 combinaciones de fármacos se mostraron en la Fig. 16. Cada combinación de fármacos no fue diferente entre sí, pero bajo la condición de DFK5% pre-establecido que contiene dorsomorfina y SB431542, la inducción neural de la diferenciación es un efecto más bajo que los otros. Por otra parte, la condición de GMK8% que contuvo LDN913189 y A-83-01 tuvo mayor probabilidad de supervivencia que la de la condición de DFK5% que contuvo dorsomorfina y SB431542.

40 Los diversos tipos de genes marcadores (Oct3/4, PSA-NCAM, Tuj-1, SSEA1 y SSEA4) de células diferenciadas cultivadas en la condición de GMK8% que contuvo LDN913189 y A-83-01 se analizaron con citómetro de flujo (Fig. 17). Los genes marcadores no diferenciados (Oct3/4 y SSEA4) disminuyeron y aumentaron los marcadores de genes neurales (PSA-NCAM, Tuj-1 y SSEA1). Para este resultado, la condición de cultivo se indujo a diferenciación neural eficaz.

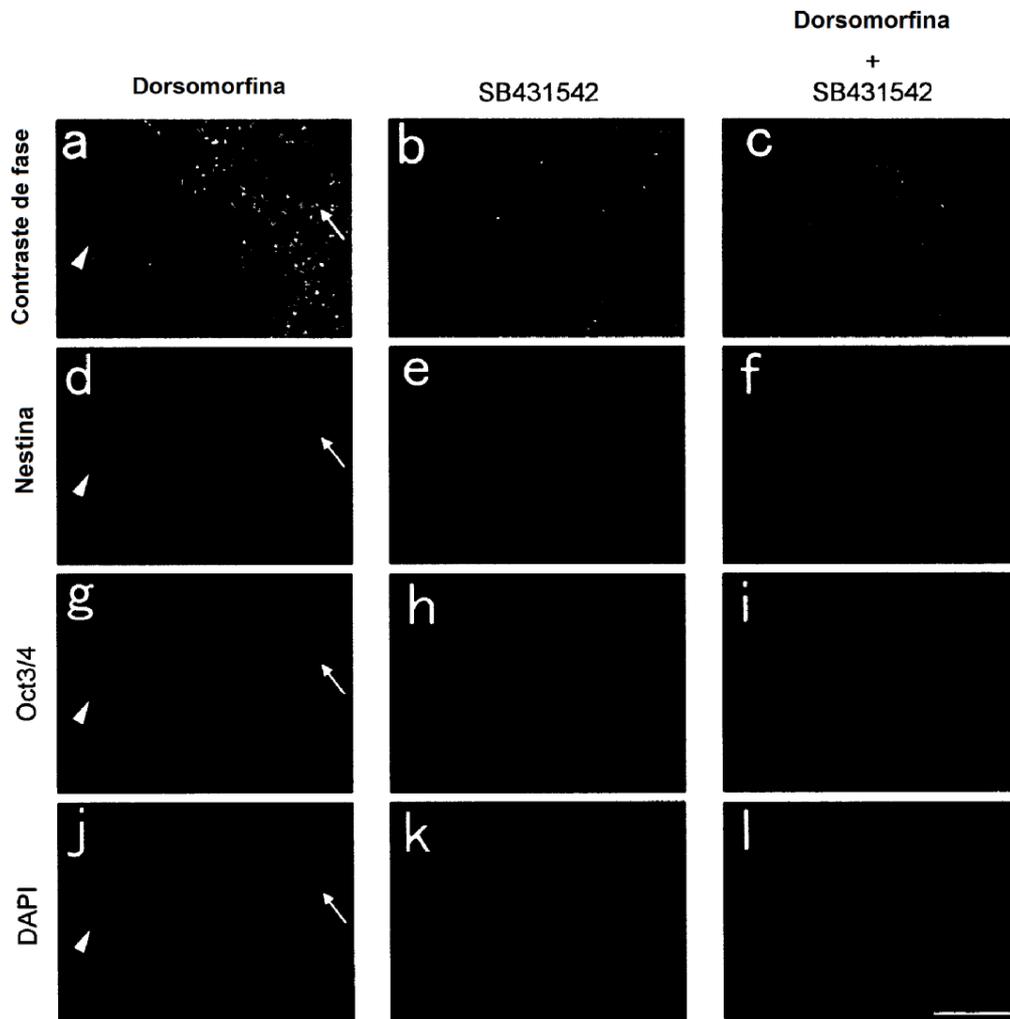
45 Aplicabilidad industrial

50 Según la presente invención, es posible producir eficientemente células precursoras neurales a partir de células madre pluripotentes tales como células ES o células iPS, mientras que se disminuye una tasa de supervivencia de células no diferenciadas. Las células precursoras neurales pueden usarse en el campo de la medicina regenerativa prevista para tratar enfermedades del sistema nervioso.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de inducción de la diferenciación de una célula madre pluripotente en una célula precursora neural, que comprende cultivar la célula madre pluripotente en presencia de un inhibidor de BMP de molécula pequeña y un inhibidor de la familia TGF β de molécula pequeña, en el que el inhibidor de BMP de molécula pequeña es dorsomorfina o LDN-193189, en el que el inhibidor de la familia TGF β de molécula pequeña es SB431542 o A-83-01, en el que la concentración de LDN-193189 es superior a 50 nM.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en el que el cultivo se realiza con formación de un cuerpo embrioide en condición sin suero.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que el cultivo se realiza sobre una placa de recubrimiento Matrigel™ sin usar células nodrizas.
- 15 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la célula madre pluripotente es una célula madre pluripotente inducida.

Fig. 1



→ : Positivas para Oct3/4

▲ : Positivas dobles para nestina y Oct3/4

Fig. 2

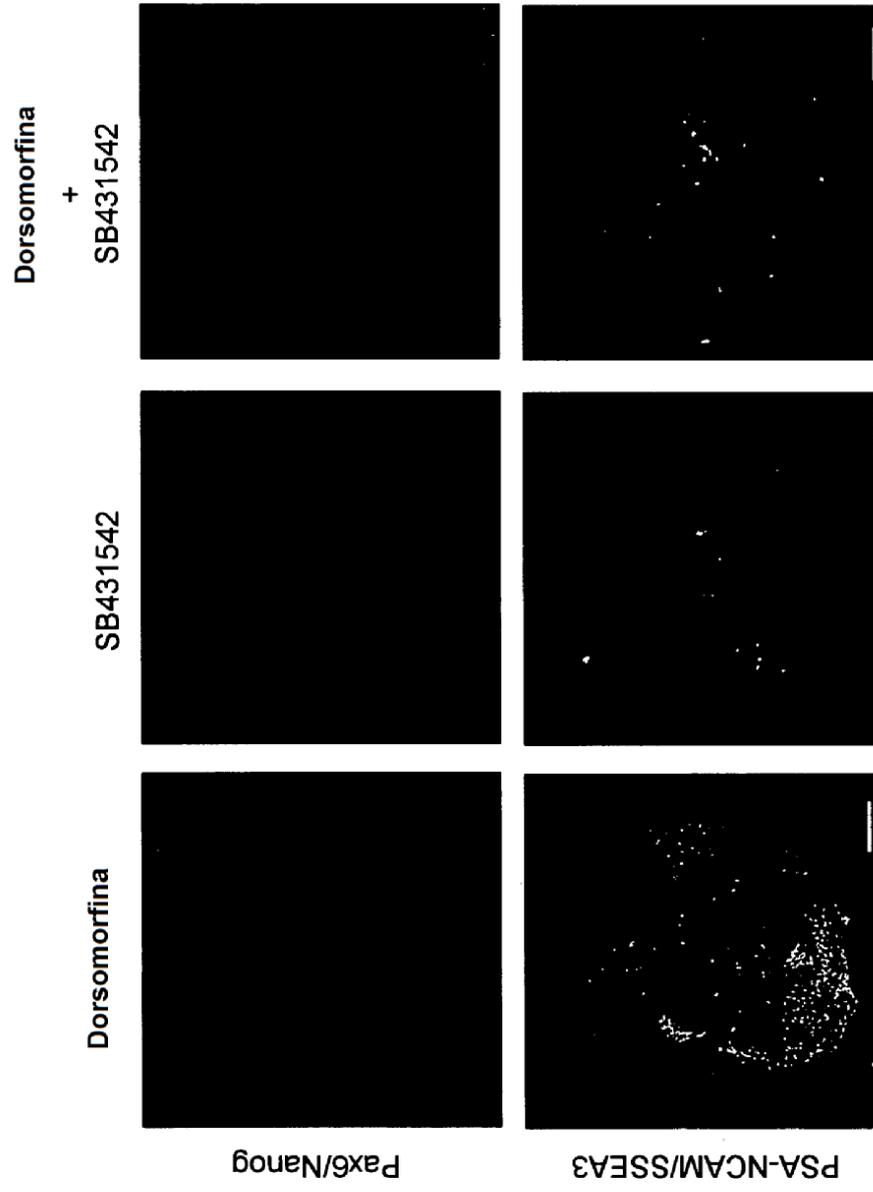


Fig. 3

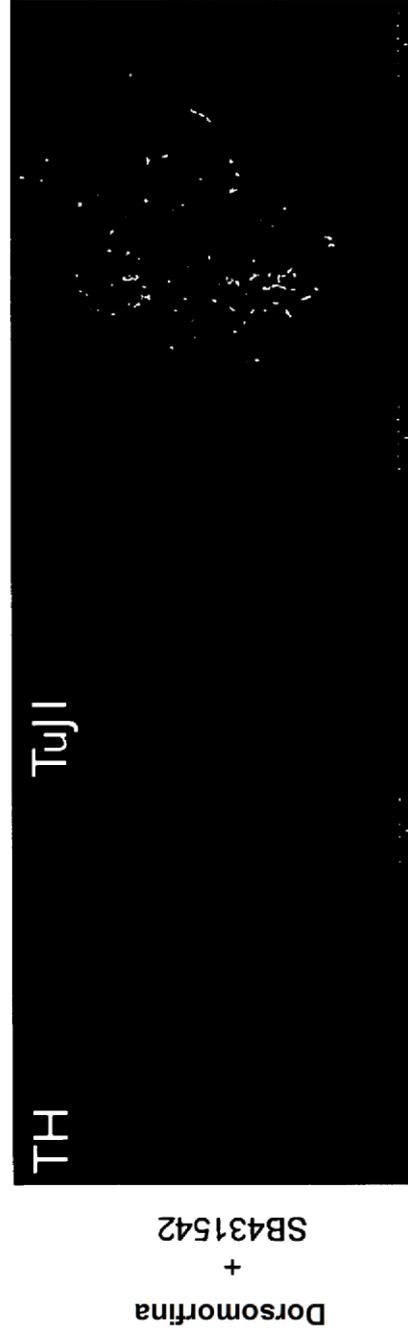
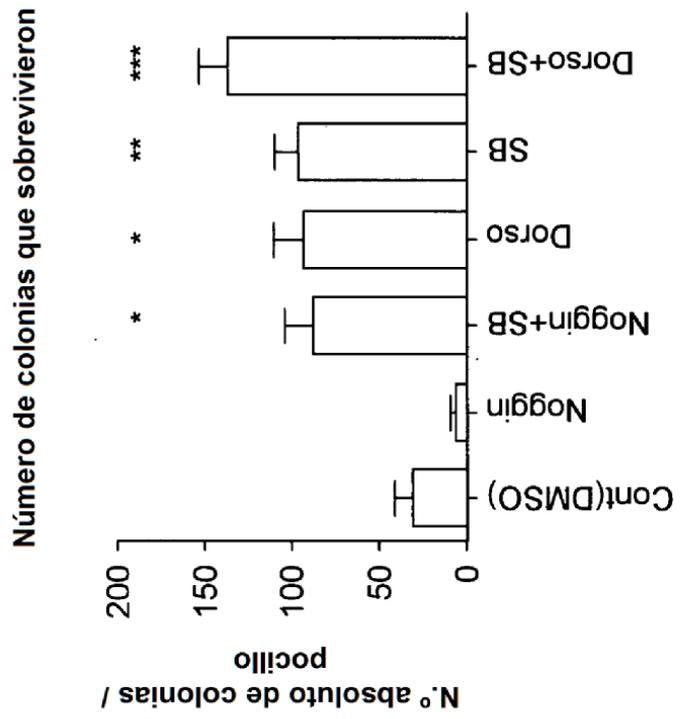
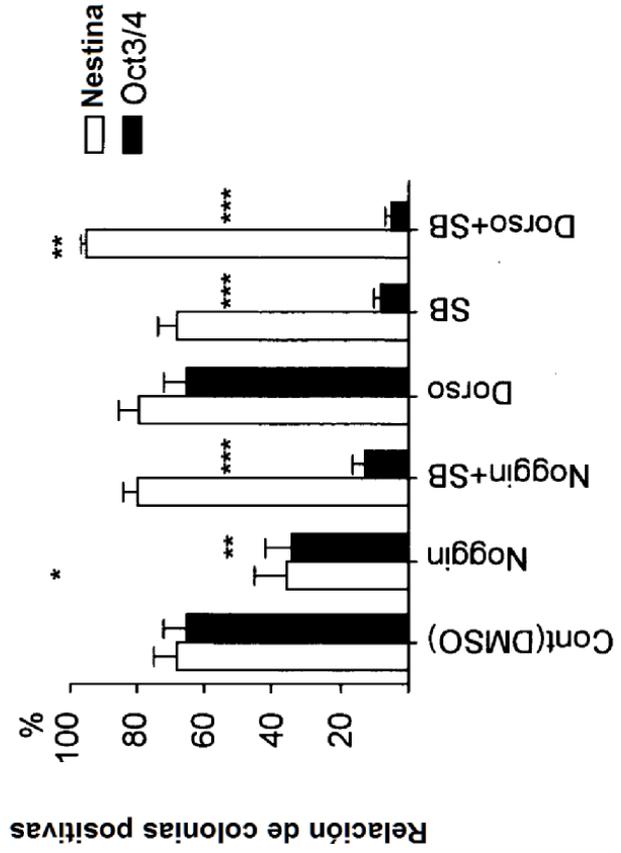


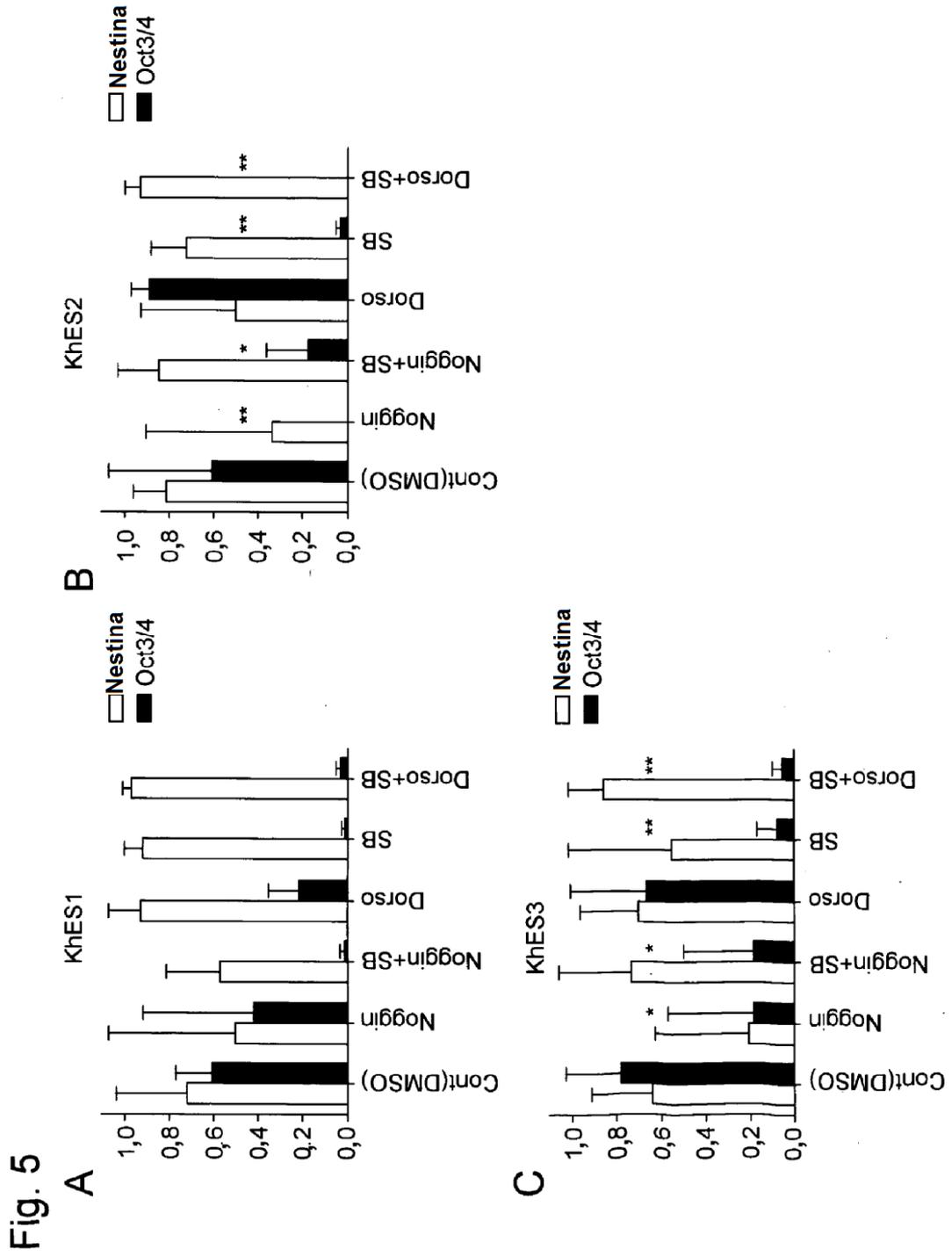
Fig. 4

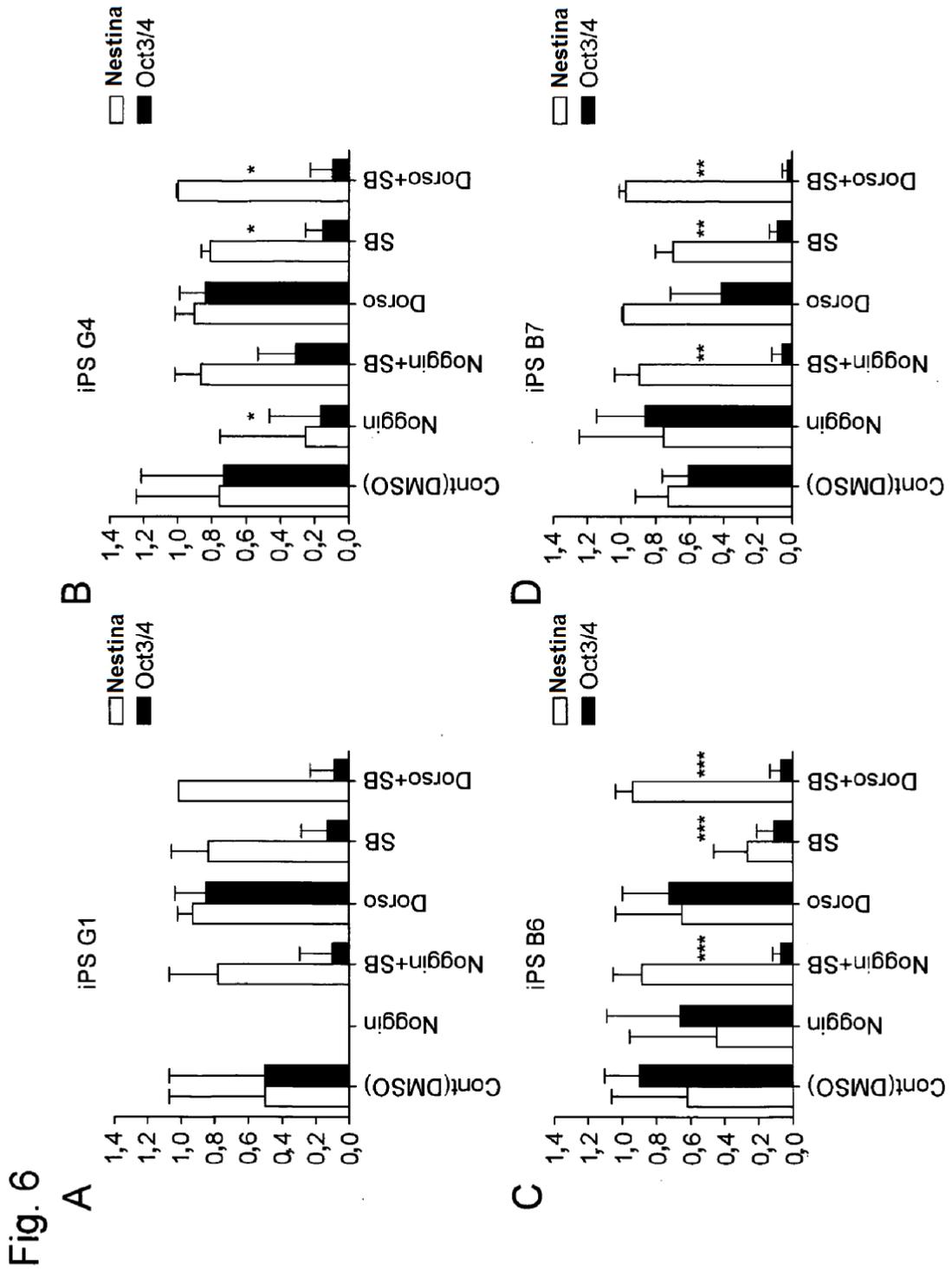
A



B







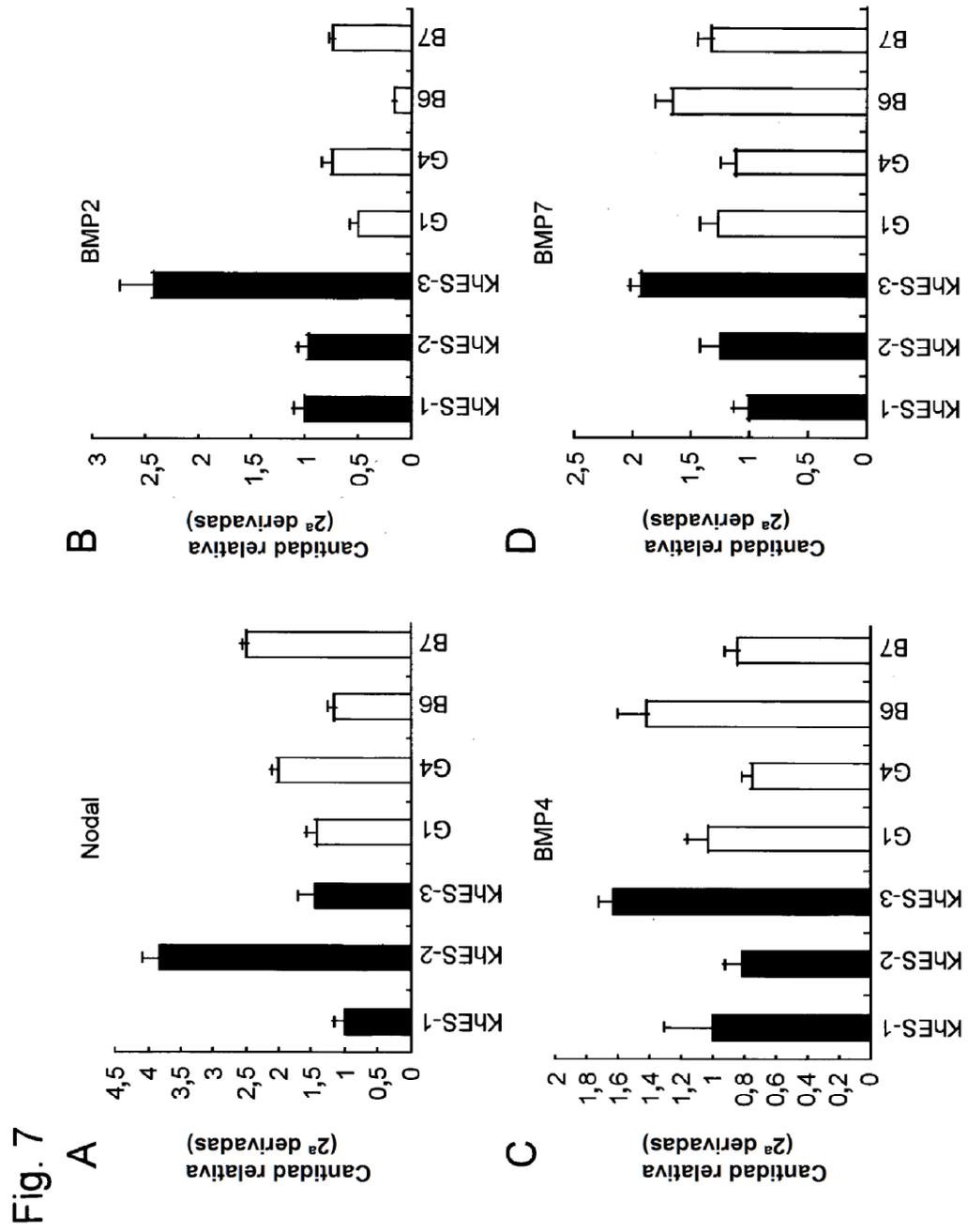


Fig. 8

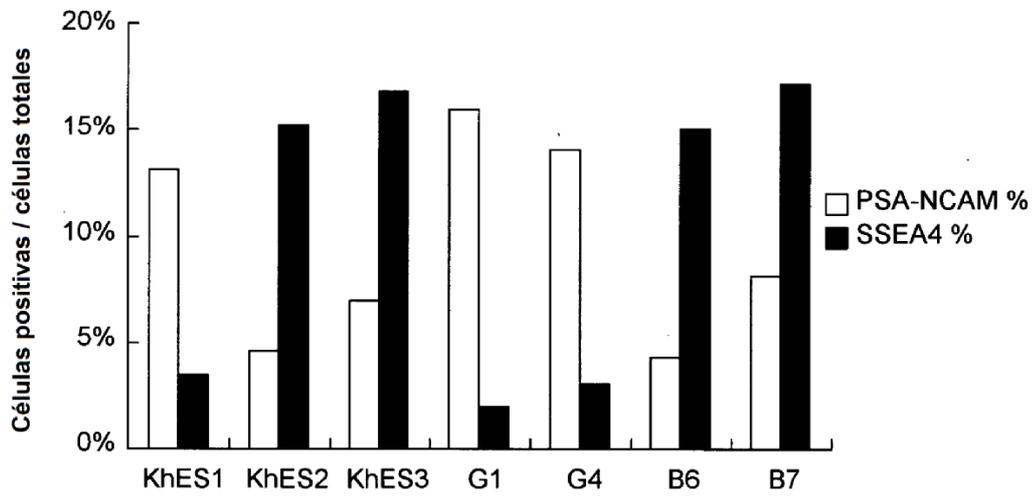


Fig. 9

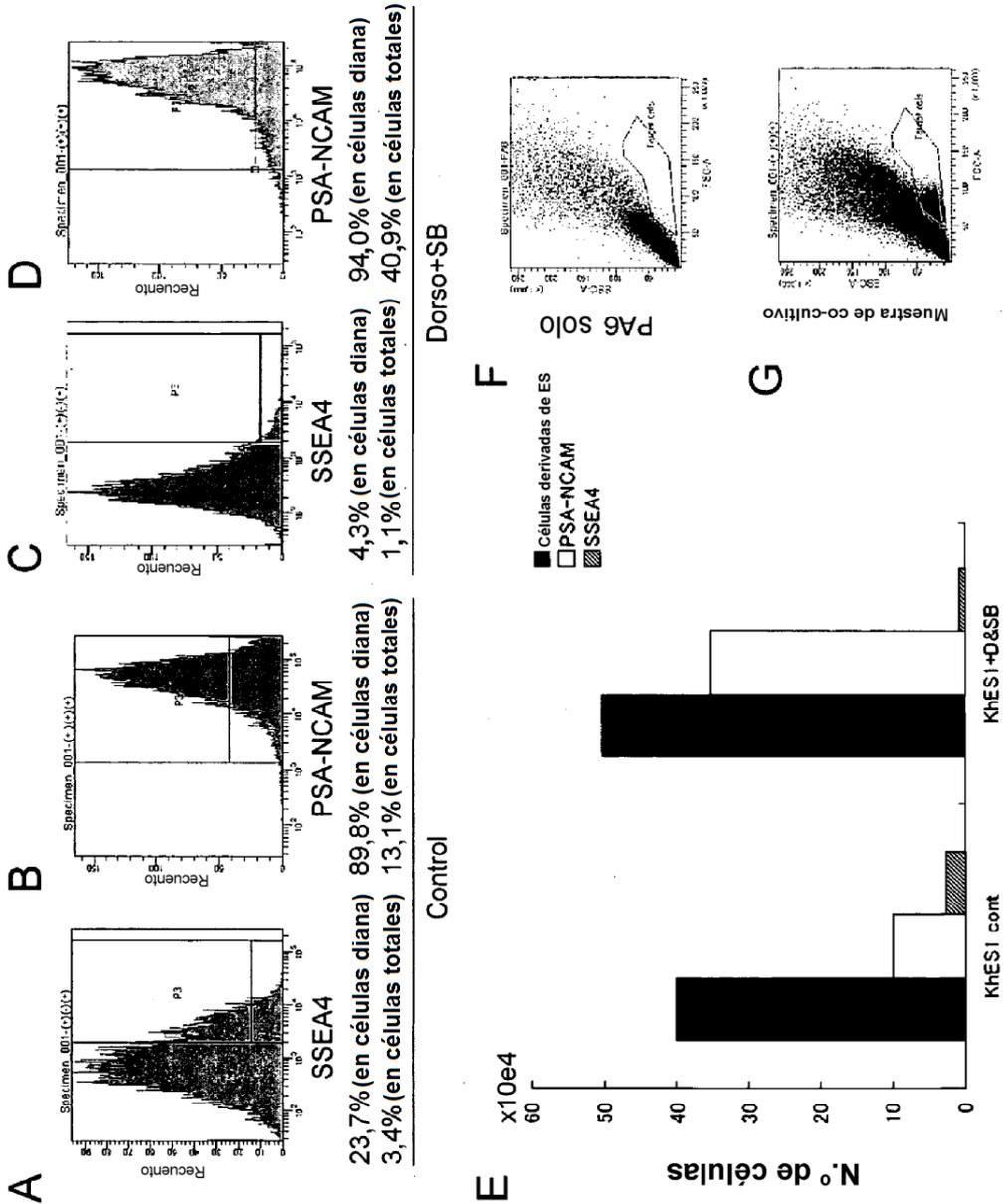
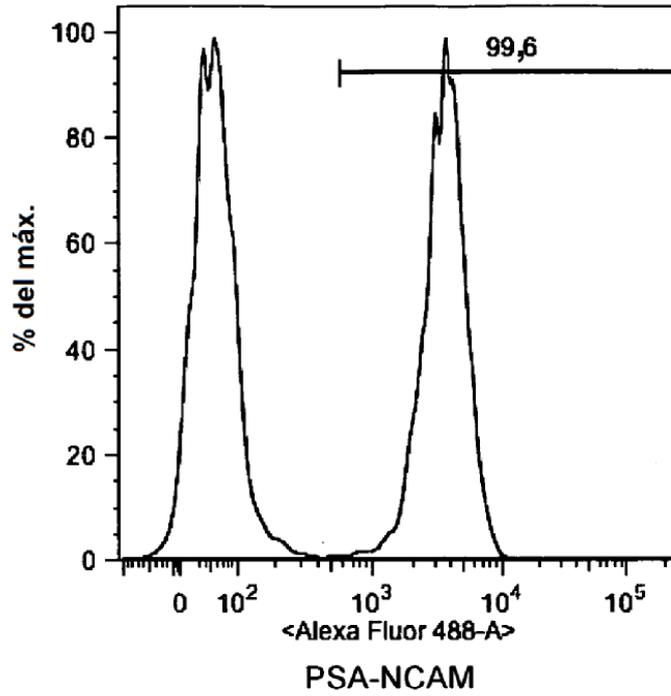


Fig. 10

A



B

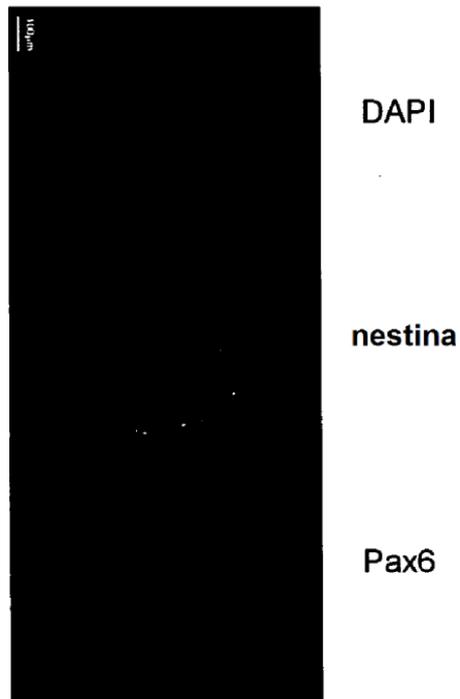


Fig. 11

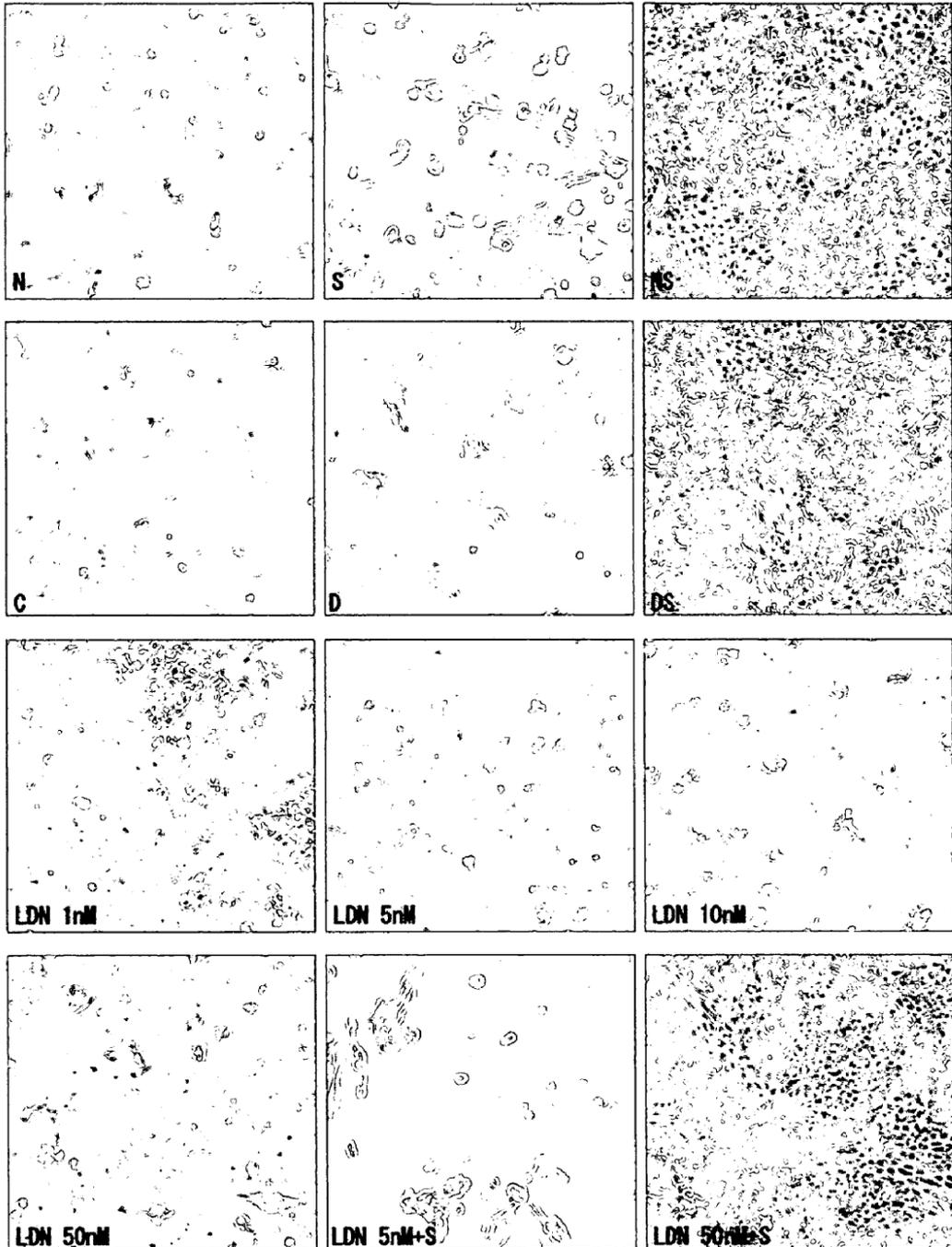


Fig. 12

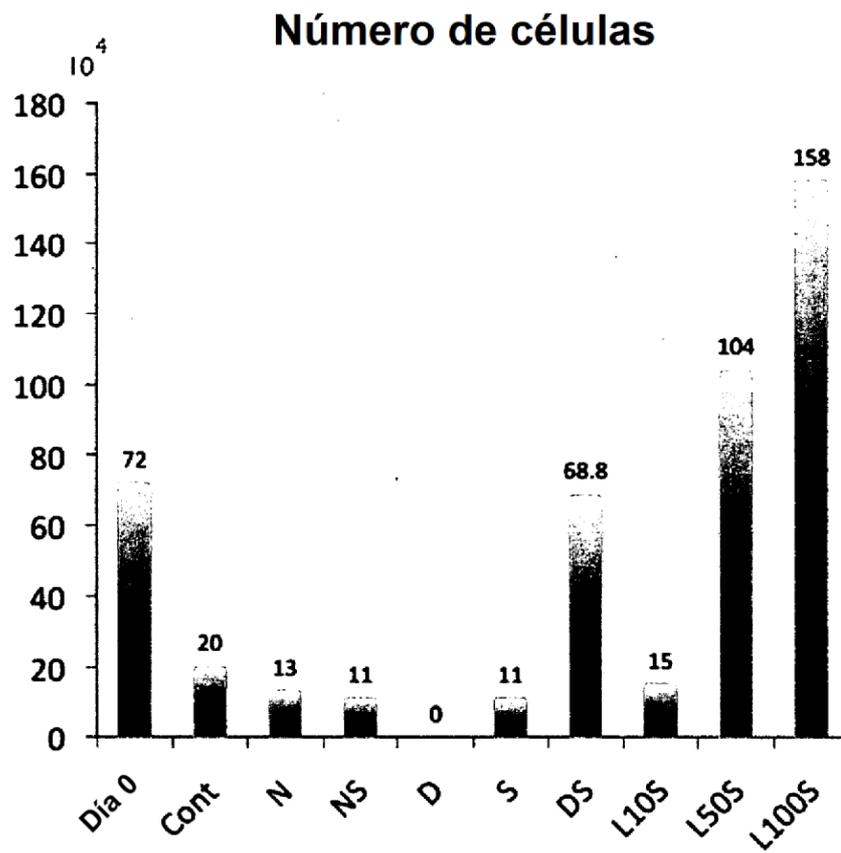


Fig. 13

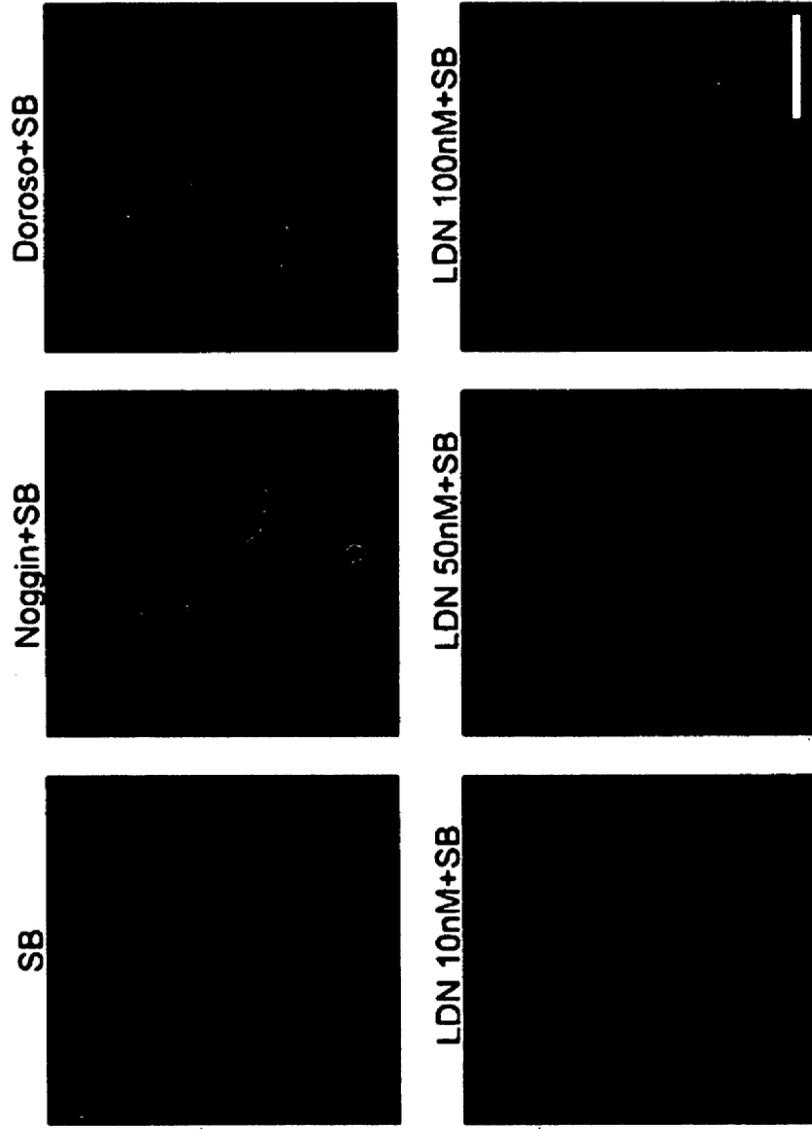


Fig. 14A

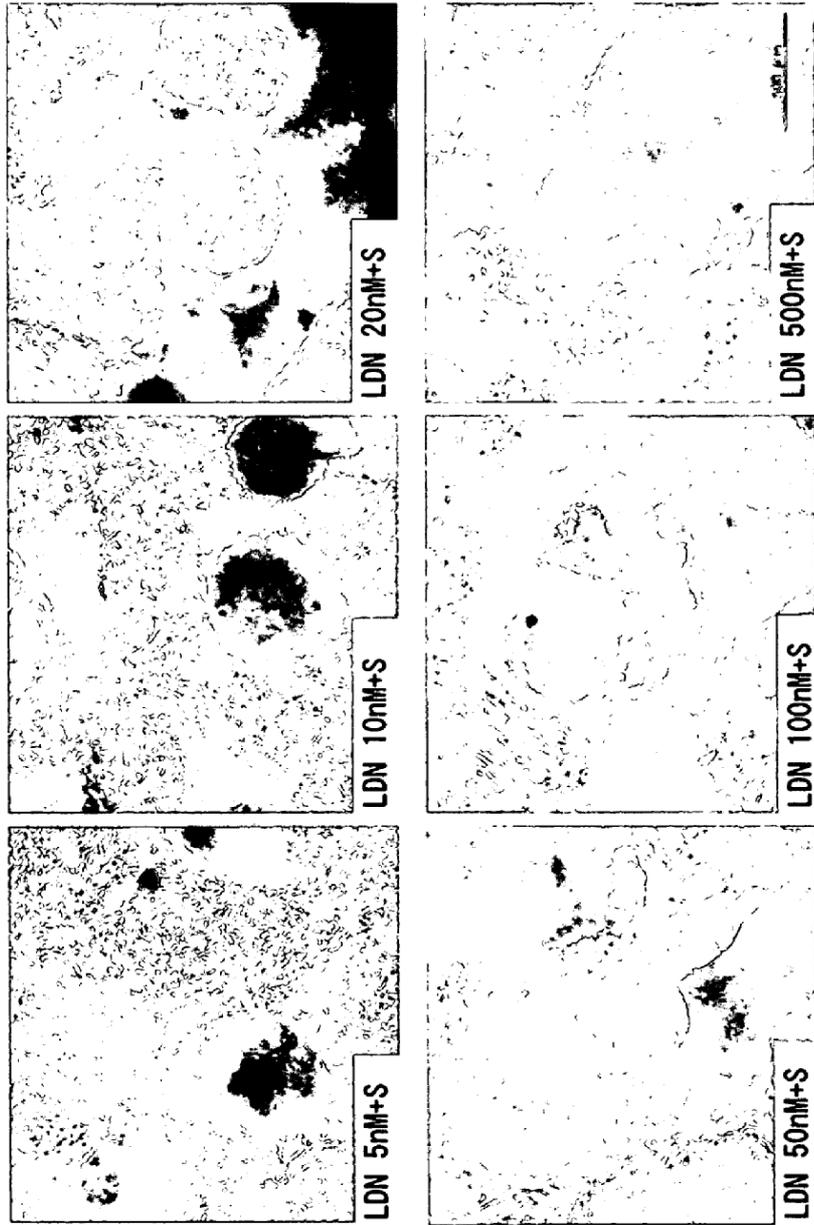


Fig. 14B

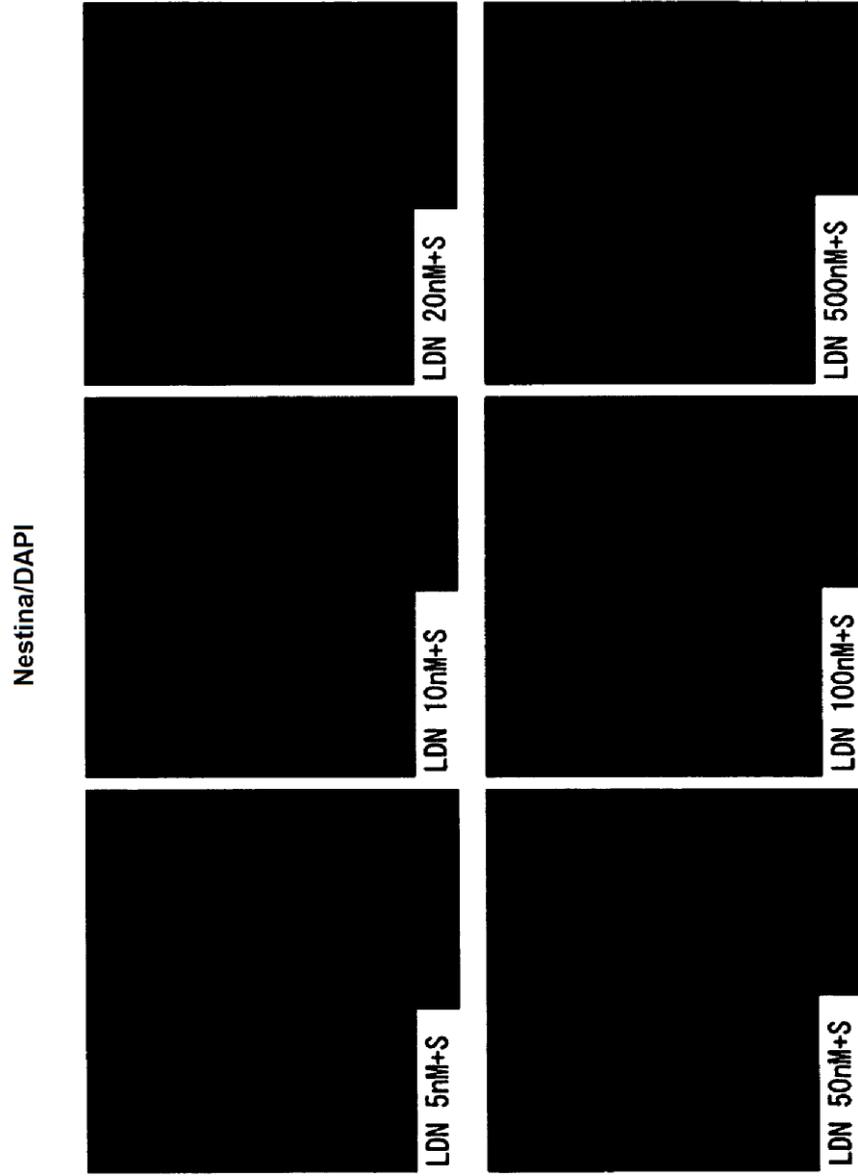


Fig. 15A

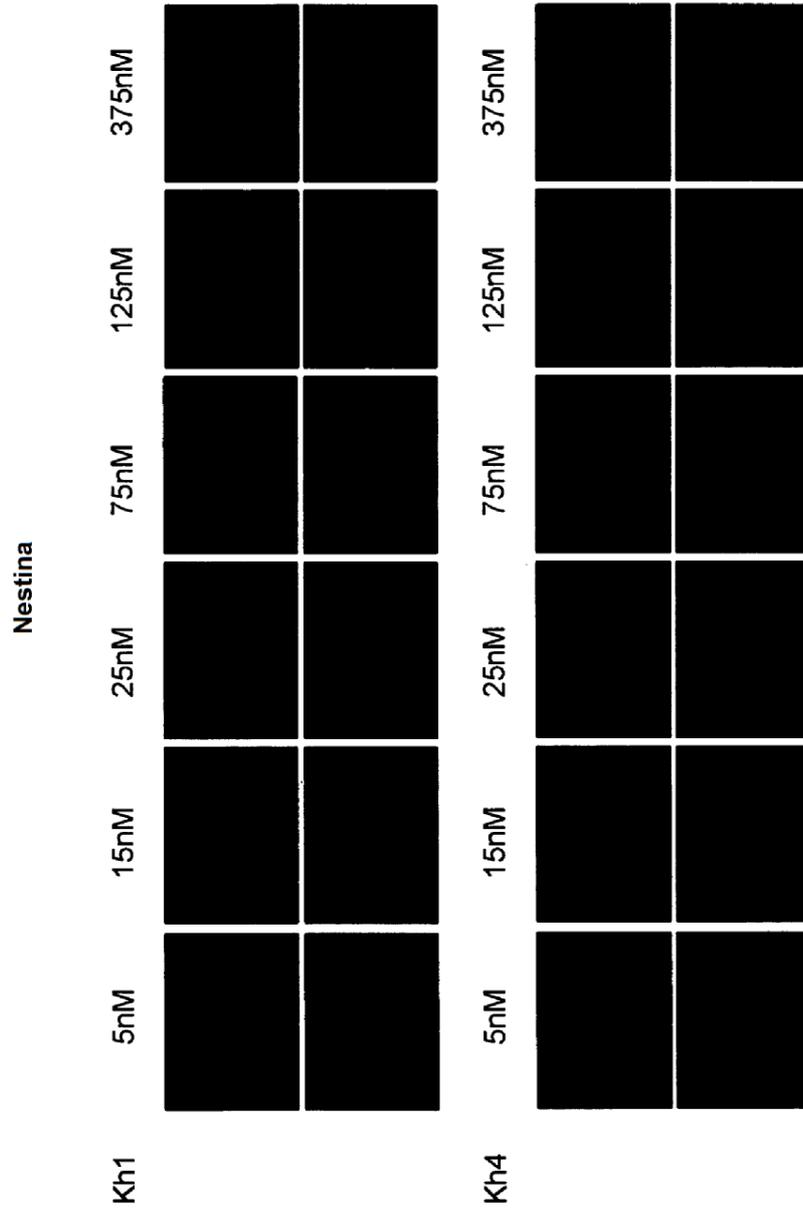


Fig. 15B

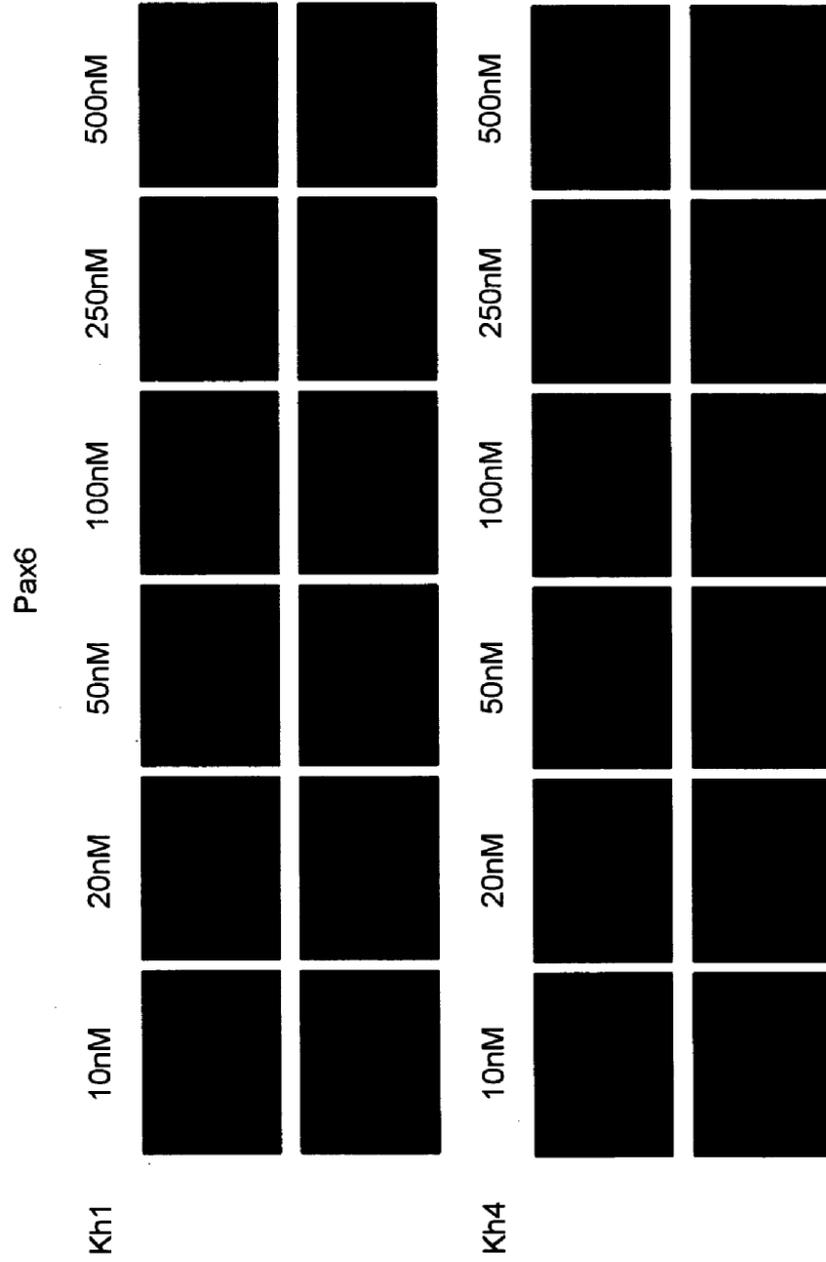


Fig. 16

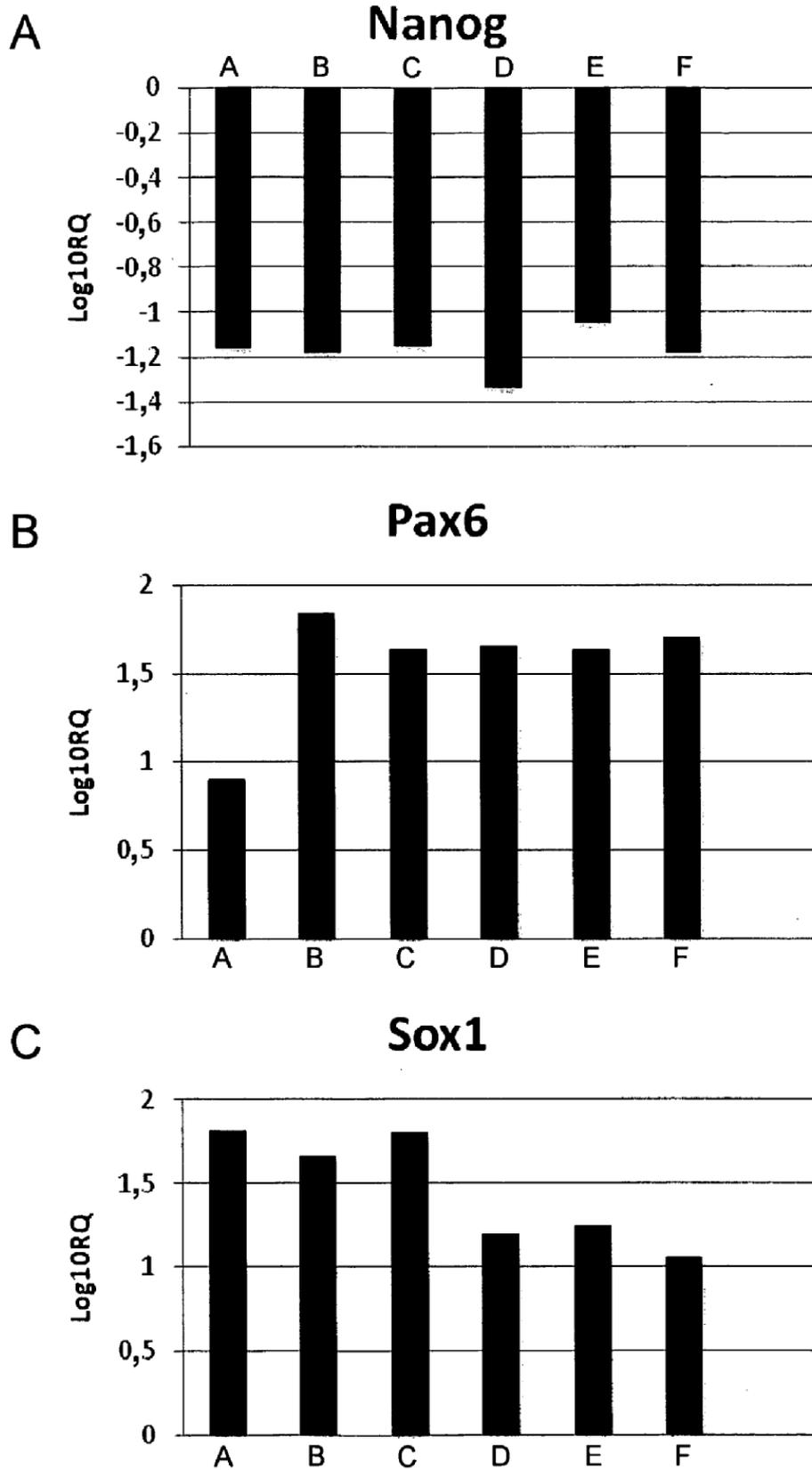


Fig. 17

