

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 229**

51 Int. Cl.:

C12N 5/079 (2010.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2009 PCT/US2009/002664**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2009 WO09134409**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2009 E 09739212 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2274430**

54 Título: **Células de regeneración nerviosa con alteraciones en la metilación del ADN**

30 Prioridad:

30.04.2008 US 125978 P

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

16.12.2016

73 Titular/es:

**SANBIO, INC. (100.0%)
231 South Whisman Road, Suite A
Mountain View, CA 94041-1522, US**

72 Inventor/es:

CASE, CASEY

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 594 229 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células de regeneración nerviosa con alteraciones en la metilación del ADN

5 Declaración en relación con la ayuda federal

No aplicable.

Campo

10 La presente descripción se encuentra en el campo de la terapia celular para los trastornos del sistema nervioso y la regulación epigenética de la expresión génica y la diferenciación.

Antecedentes

15 La diferenciación celular es controlada, en parte, por la regulación de la expresión génica. La regulación de la transcripción; *es decir*, el uso de ADN como molde para la síntesis de una molécula de ARNm; es uno de los mecanismos por los que se regula la expresión de los genes. La regulación transcripcional de la expresión génica puede ser el resultado, por ejemplo, de la alteración de la estructura de la cromatina y/o de la unión de proteínas reguladoras de la transcripción a secuencias específicas de ADN en o cerca del gen.

20 Otro medio por el cual se efectúa el control transcripcional de la expresión génica es mediante la alteración química del ADN. El aspecto más ampliamente estudiado de esta forma de regulación es la metilación del ADN. En genomas de eucariotas, la forma primaria de metilación del ADN es la conversión de citosina a 5-metil-citosina, a través de la acción de una de una serie de metiltransferasas celulares. En la mayoría de los casos, los residuos de C metilados se encuentran directamente aguas arriba de un residuo G. En general, la metilación de residuos de C en o cerca de un gen se correlaciona con la reducción de la expresión del gen. En la mayoría de los casos, la metilación de CpG no es en sí misma la causa inmediata de la represión transcripcional de un gen, pero parece ser un mecanismo para perpetuar la represión transcripcional inicialmente mediada por proteínas reguladoras de genes.

25 La frecuencia de secuencias de dinucleótidos CG en las regiones aguas arriba de ciertos genes de vertebrados no específicos del tipo de células (*es decir*, genes constitutivos) es mucho mayor de lo que sería de esperar basándose en el contenido de GC del genoma; estas regiones se conocen como islas de CpG. Las islas de CpG son sitios en los que el estado de metilación de los residuos de C puede afectar a la transcripción del gen asociado. Por el contrario, el estado de metilación de los residuos de C en una isla de CpG u otra región asociada con un gen particular se puede utilizar como un indicador potencial del estado transcripcional de ese gen y/o como un marcador de diagnóstico para caracterizar un tipo de célula particular. Véase, por ejemplo, el documento WO 2006/094836.

Compendio

30 Se describen en la presente memoria células que son capaces de estimular la recuperación del sistema nervioso y/o la regeneración nerviosa después del trasplante a los sitios de lesión o enfermedad del sistema nervioso. En ciertas realizaciones, las células son descendientes de células madre adherentes de la médula (MASC), pero han sido objeto de alteraciones en el estado de metilación de ciertos genes después del tratamiento y el cultivo *in vitro*. Por lo tanto, el autor de la invención ha descubierto que la alteración del estado de metilación de uno o más genes puede convertir una célula progenitora en una célula descendiente que tiene propiedades regenerativas del sistema nervioso no poseídas por la célula progenitora.

35 Como resultado de este descubrimiento, la presente descripción describe *entre otras cosas*, las siguientes revelaciones:

- 40 1. Un método para alterar el estado de metilación de un gen en una célula, comprendiendo el método:
 - 45 (a) transfectar la célula con un polinucleótido que comprende secuencias que codifican un dominio intracelular Notch; y
 - 50 (b) cultivar la célula transfectada de manera que el estado de metilación de un gen en la célula o uno o más descendientes de la célula esté alterado en comparación con el gen en una célula no transfectada, alterando de este modo el estado de metilación del gen.
- 55 2. El método de la realización 1, en donde el gen es el gen PITX2.
3. El método de la realización 1, en donde el gen es el gen DNMT3b.
4. El método de la realización 1, en donde el gen es el gen IGF2R.
- 60 5. El método de la realización 1, en donde el gen es el gen SDF4.
6. El método de la realización 1, en donde el gen es el gen ROPN1L.
7. El método de la realización 1, en donde el gen es el gen TMEM179.
8. El método de cualquiera de las realizaciones 1-5, en donde la metilación del gen es mayor en la célula descendiente.

9. El método de cualquiera de las realizaciones 1 6 o 7, en donde la metilación del gen se disminuye en la célula descendiente.
10. El método de la realización 9, en donde la secuencia C-A-T-C^{me}-G-C-C-C se convierte en C-A-T-C-G-C-C-C.
11. El método de cualquiera de las realizaciones 1-10, en donde la célula es una célula estromal adherente de médula (MASC).
12. Un método para elaborar una célula descendiente en la que se altera el estado de metilación de un gen, comprendiendo el método:
- (a) transfectar una célula progenitora con un polinucleótido que comprende secuencias que codifican un dominio intracelular Notch;
 - (b) cultivar la célula transfectada; y
 - (c) obtener, entre la progenie de la célula transfectada, una o más células descendientes en las que se altera el estado de metilación del gen.
13. El método de la realización 12, en donde el gen es el gen PITX2.
14. El método de la realización 12, en donde el gen es el gen DNMT3b.
15. El método de la realización 12, en donde el gen es el gen IGF2R.
16. El método de la realización 12, en donde el gen es el gen SDF4.
17. El método de la realización 12, en donde el gen es el gen ROPN1L.
18. El método de la realización 12, en donde el gen es el gen TMEM179.
19. El método de cualquiera de las realizaciones 12-16, en donde la metilación del gen es mayor en la célula descendiente en comparación con la célula progenitora.
20. El método de cualquiera de las realizaciones 12 ó 17 ó 18, en donde la metilación del gen disminuye en la célula descendiente en comparación con la célula progenitora.
21. El método de la realización 20, en donde la secuencia C-A-T-C^{me}-G-C-C-C se convierte en C-A-T-C-G-C-C-C.
22. El método de cualquiera de las realizaciones 12-21, en donde la célula progenitora es una célula estromal adherente de médula (MASC).
23. Un método para la conversión de una célula progenitora a una célula de regeneración nerviosa, comprendiendo el método la alteración del estado de metilación de uno o más genes en la célula progenitora.
24. El método de la realización 23, en donde el gen es el gen PITX2.
25. El método de la realización 23, en donde el gen es el gen DNMT3b.
26. El método de la realización 23, en donde el gen es el gen IGF2R.
27. El método de la realización 23, en donde el gen es el gen SDF4.
28. El método de la realización 23, en donde el gen es el gen ROPN1L.
29. El método de la realización 23, en donde el gen es el gen TMEM179.
30. El método de cualquiera de las realizaciones 23-27, en donde la metilación del gen es mayor en la célula de regeneración nerviosa, en comparación con la célula progenitora.
31. El método de cualquiera de las realizaciones 23, 28 o 29, en donde la metilación del gen disminuye en la célula de regeneración nerviosa, en comparación con la célula progenitora.
32. El método de la realización 31, en donde la secuencia C-A-T-C^{me}-G-C-C-C se convierte en C-A-T-C-G-C-C-C.
33. El método de cualquiera de las realizaciones 23-32, en donde la célula progenitora es una célula estromal adherente de médula (MASC).
34. El método de la realización 23, en donde el estado de metilación del gen se altera mediante:
- (a) la transfección de la célula progenitora con un polinucleótido que comprende secuencias que codifican un dominio intracelular Notch;
 - (b) el cultivo de la célula transfectada; y
 - (c) la obtención, entre la progenie de la célula transfectada, de una o más células descendientes en las que el estado de metilación del gen está alterado;
- en donde dicha célula descendiente en la que se altera el estado de metilación del gen es una célula de regeneración neural.
35. El método de la realización 30, en donde el estado de metilación del gen se altera por contacto de la célula progenitora con una proteína de fusión que comprende un dominio de metilación y un dominio de unión a ADN, o con un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un dominio de metilación y un dominio de unión a ADN, en donde el dominio de unión de ADN está modificado para que se una a una o más secuencias en el gen.
36. El método de la realización 31, en donde el estado de metilación del gen se altera por contacto de la célula progenitora con una proteína de fusión que comprende un dominio de desmetilación y un dominio de unión a ADN, o con un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un dominio de desmetilación y un dominio de unión a ADN, en donde el dominio de unión de ADN está modificado para que se una a una o más secuencias en el gen.
37. Una célula que es descendiente de una célula progenitora través del cultivo *in vitro*, en donde:
- (a) la célula soporta el crecimiento y/o la regeneración del tejido nervioso;
 - (b) el estado de metilación de uno o más genes en la célula está alterado en comparación con la célula

progenitora; y

(c) durante el cultivo *in vitro*, ni la célula progenitora ni ninguno de sus descendientes fueron transfectados con un polinucleótido que comprendía secuencias que codificaban el dominio intracelular Notch (NICD).

- 5 38. La célula de la realización 37, en donde el gen es el gen PITX2.
 39. La célula de la realización 37, en donde el gen es el gen DNMT3b.
 40. La célula de la realización 37, en donde el gen es el gen IGF2R.
 41. La célula de la realización 37, en donde el gen es el gen SDF4.
 42. La célula de la realización 37, en donde el gen es el gen ROPN1L.
 10 43. La célula de la realización 37, en donde el gen es el gen TMEM179.
 44. La célula de cualquiera de las realizaciones 37-41, en donde la metilación del gen aumenta en la célula de regeneración nerviosa, en comparación con la célula progenitora.
 45. La célula de cualquiera de las realizaciones 37, 42 ó 43, en donde la metilación del gen disminuye en la célula de regeneración nerviosa en comparación con la célula progenitora.
 15 46. La célula de la realización 45, en donde la secuencia C-A-T-C^{me}-G-C-C se convierte en C-A-T-C-G-C-C-C.
 47. La célula de cualquiera de las realizaciones 37-46, en donde la célula progenitora es una célula estromal adherente de la médula (MASC).
 48. La célula de la realización 37, en donde el estado de metilación del gen se altera por contacto de la célula progenitora con una proteína de fusión que comprende un dominio de metilación y un dominio de unión a ADN, o con un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un dominio de metilación y un dominio de unión a ADN, en donde el dominio de unión de ADN está modificado para que se una a una o más secuencias en el gen.
 20 49. La célula de la realización 37, en donde el estado de metilación del gen se altera por contacto de la célula progenitora con una proteína de fusión que comprende un dominio de desmetilación y un dominio de unión a ADN, o con un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un dominio de desmetilación y un dominio de unión a ADN, en donde el dominio de unión de ADN está modificado para que se una a una o más secuencias en el gen.
 25 50. Un método para identificar una célula de regeneración nerviosa, comprendiendo el método someter a ensayo el estado de metilación de uno o más genes en la célula, en donde un cambio en el estado de metilación de los genes sometidos a ensayo es indicativo de células de regeneración nerviosa.
 30 51. El método de la realización 50, en donde el análisis es para una mayor metilación de los uno o más genes.
 52. El método de la realización 50, en donde el análisis es para una menor metilación de los uno o más genes.
 53. El método de la realización 50, en donde el análisis es para una mayor metilación de uno o más de los primeros genes y para una menor metilación de uno o más de los segundos genes.
 35 54. El método de la realización 50, en donde los uno o más genes es/son seleccionados del grupo que consiste en PITX2, ROPN1L, DNMT3b, IGF2R, TMEM179 y SDF4.

Breve descripción de los dibujos

- 40 No aplicable.

Descripción detallada

Estado de metilación como diagnóstico

- 45 Se puede utilizar el análisis de los cambios en el estado de metilación del ADN de las secuencias de CpG específicas en o cerca de uno o más genes de interés para identificar una célula y para distinguirla de otras células con diferentes patrones de metilación del ADN. Por ejemplo, si, en una célula madre u otro tipo de célula progenitora, una secuencia de CpG concreta está metilada en su residuo de C, y tras una diferenciación adicional, el residuo de C se convierte en desmetilado; la desmetilación de ese residuo de C se puede utilizar como un marcador para esa etapa de diferenciación. Por el contrario, la metilación de un residuo de C puede servir como un marcador para la diferenciación. No son necesarios cambios absolutos, todos o ninguno, en el estado de metilación; un cambio en la frecuencia de metilación en una secuencia de CpG en particular también puede servir como diagnóstico.
- 55 Se pueden utilizar numerosos métodos, conocidos en la técnica, para distinguir los residuos de citosina metilados de los no metilados. Estos incluyen, pero no se limitan a, tratamiento de ADN con bisulfito, y análisis de la escisión del ADN con enzimas de restricción sensibles a la metilación y dependientes de la metilación. El tratamiento con bisulfito (SO₃) desamina la citosina no metilada, convirtiéndola en desoxiuridina que, después de la replicación, moldea un residuo de adenosina en la hebra de ADN naciente. Por lo tanto, el tratamiento con bisulfito da como resultado la eventual conversión de un par de bases C-G en un par de bases T-A; y tales cambios pueden ser detectados por métodos de secuenciación de DNA convencionales. Los residuos de C metilados no son afectados por el tratamiento con bisulfito; por lo tanto, los pares de bases C^{me}-G permanecen sin cambios.
- 60

Para el análisis del estado de metilación utilizando enzimas de restricción, se pueden utilizar las enzimas con la

secuencia CG en su sitio de reconocimiento. Para ciertos sitios de reconocimiento que contienen la secuencia CG, una enzima que reconozca el sitio no lograra escindirlo si el residuo C está metilado, pero un isoesquímico de esa enzima (*es decir*, una enzima que reconozca la misma secuencia) escindirá el sitio esté el residuo C metilado o no. Por ejemplo, tanto *HpaII* como *MspI* reconocen la secuencia CCGG. *MspI* escinde el sitio independientemente de si el segundo residuo C está metilado. Sin embargo, *HpaII* escindirá el sitio sólo si el segundo residuo C no está metilado. Por lo tanto, la escisión de una secuencia CCGG por ambas enzimas indica que el segundo residuo C en el sitio no está metilado (*es decir*, el sitio tiene la secuencia C-C-G-G); mientras que la escisión por *MspI* sólo indica que el segundo residuo C está metilado (*es decir*, el sitio tiene la secuencia C-C^{me}-G-G).

En la práctica, el análisis del estado de metilación de una secuencia de CpG particular, implica la identificación de una secuencia más larga que incluye el CpG de interés. Esta secuencia, a menudo designada amplicón, se elige generalmente de manera que incluya una o más secuencias de dinucleótidos CpG (en los que el estado de metilación puede ser diferente en diferentes tipos de células) y sea adecuada para la amplificación; *p.ej.*, por medio de reacción en cadena de la polimerasa. Tales secuencias de amplicón son por lo general suficientemente largas como para ser únicas en un genoma del tamaño del de los mamíferos.

Otros detalles y otra información relacionados con el análisis de metilación y los amplicones ilustrativos que pueden ser utilizados para el análisis de metilación del ADN se encuentran en el documento WO 2006/094836 (14 Sept., 2006), con el propósito de proporcionar detalles adicionales y otra información relacionada con el análisis de metilación y los amplicones ilustrativos que se pueden utilizar para el análisis de metilación del ADN.

Células progenitoras

Las células progenitoras, que pueden ser convertidas en células de regeneración nerviosa mediante la alteración del estado de metilación de ciertos genes, pueden ser de cualquier tipo de célula diferenciada no terminalmente. Por ejemplo, las células madre totipotentes como describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.843.780; 6.200.806 y 7.029.913 representan células progenitoras de referencia. Las células madre totipotentes pueden ser cultivadas (*p. ej.*, Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.602.711 y 7.005.252) y diferenciadas en diversos tipos de células pluripotentes (*p. ej.*, Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.280.718; 6.613.568 y 6.887.706), que representan las células progenitoras de referencia.

Otro tipo ilustrativo de células progenitoras son las células estromales adherentes de la médula (MASC), también conocidas como células estromales de la médula ósea (BMSC), células madre adherentes de médula y células madre mesenquimales. Se proporcionan descripciones ilustrativas de MASC en la Publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos Núm. 2003/0003090; Prockop (1997) *Science* 276: 71-74 y Jiang (2002), *Nature* 418: 41-49. Los métodos para el aislamiento y purificación de MASC se pueden encontrar, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.486.359; Pittenger et al. (1999) *Science* 284: 143-147 y Dezawa et al. (2001) *Eur. J. Neurosci.* 14: 1771-1776. Las MASC humanas se encuentran disponibles en el mercado (*p. ej.*, BioWhittaker, Walkersville, MD) o se pueden obtener de donantes, *p. ej.*, por medio de aspiración de médula ósea, seguido de la selección de células de médula ósea adherentes. Véase, *p. ej.*, el documento WO 2005/100552.

Las MASC también se pueden aislar de la sangre del cordón umbilical. Véase, por ejemplo, Campagnoli et al. (2001) *Blood* 98: 2396-2402; Erices et al. (2000) *Br. J. Haematol.* 109: 235-242 y Hou et al. (2003) *Int. J. Hematol.* 78: 256-261.

Dominio intracelular de Notch

La proteína Notch es un receptor transmembrana, que se encuentra en todos los metazoos, que influye en la diferenciación de células a través de la señalización intracelular. El contacto del dominio extracelular de Notch con un ligando de Notch (*p. ej.*, Delta, Serrate, Jagged) da como resultado dos escisiones proteolíticas de la proteína Notch, la segunda de las cuales es catalizada por una γ -secretasa y libera el dominio intracelular Notch (NICD) en el citoplasma. En la proteína Notch de ratón, esta escisión se produce entre los aminoácidos gly1743 y val1744. El NICD se transloca al núcleo, donde actúa como un factor de transcripción, reclutando las proteínas reguladoras de la transcripción adicionales (*p. ej.*, MAM, histona acetilasas) para aliviar la represión de la transcripción de diversos genes diana (*p. ej.*, Hes 1).

Los detalles adicionales y la información relacionada con la señalización de Notch se encuentran, por ejemplo, en Artavanis-Tsakonas et al. (1995) *Science* 268: 225-232; Mumm y Kopan (2000) *Develop. Biol.* 228: 151-165 y Ehebauer et al. (2006) *Sci. STKE* 2006 (364), CM7. [DOI: 10.1126/stke.3642006cm7].

La transfección de las células progenitoras (*p. ej.*, MASC) con un ácido nucleico que codifica el dominio intracelular Notch humano, seguida del enriquecimiento de las células transfectadas por la selección de fármacos y el cultivo adicional, da como resultado la producción de células de regeneración nerviosa con alteración de la metilación del ADN en sus genomas, véase el Ejemplo 2, más abajo, para obtener detalles adicionales.

Cultivo celular y transfección

Los métodos convencionales para el cultivo de células son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, R. I. Freshney "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique", Quinta edición, Wiley, Nueva York, 2005.

Los métodos para la introducción de ADN exógeno en las células (*es decir*, transfección) también son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Nueva York, 1987 y actualizaciones periódicas.

Los métodos ilustrativos para la transfección y el cultivo se proporcionan en los Ejemplos 1 y 2, más abajo.

Métodos para la alteración selectiva de la metilación del ADN

Debido a que la conversión de las células progenitoras en células de regeneración nerviosa está acompañada de cambios en el estado de metilación de ciertos genes; la alteración selectiva del estado de metilación se puede utilizar para convertir una célula progenitora en una célula de regeneración nerviosa.

Los métodos para alterar el estado de metilación en un residuo de C concreto, son conocidos en la técnica. Para aumentar la metilación de una secuencia concreta, se pueden utilizar proteínas de fusión que comprenden un dominio de unión a ADN y un dominio de metilación. Véase, por ejemplo, Bestor U.S. 2002/0188103 (12 Dic., 2002) y el documento WO 97/11972 (3 Abril, 1997). Las enzimas ADN metiltransferasas ilustrativas, que pueden servir como fuente de dominios de metilación, se describen en las referencias anteriormente mencionadas. Una ADN metiltransferasa es una proteína que es capaz de metilar una secuencia concreta de ADN, cuya secuencia de ADN concreta puede ser CpG. Esta proteína puede ser una ADN metiltransferasa mutada, una ADN metiltransferasa de tipo salvaje, una ADN metiltransferasa de origen natural, una variante de una ADN metiltransferasa de origen natural, una ADN metiltransferasa truncada, o un segmento de una ADN metiltransferasa que es capaz de metilar el ADN. La ADN metiltransferasa puede incluir ADN metiltransferasa de mamífero, ADN metiltransferasa bacteriana, ADN metiltransferasa M.Sss1 y otras proteínas o polipéptidos que tienen capacidad de metilación de ADN.

Las ADN metiltransferasas ilustrativas que pueden servir como fuente de dominios de metilación para la construcción de proteínas de fusión incluyen, pero no están limitadas a, ADN metiltransferasas de citosina, metiltransferasa *dam*, metiltransferasa *dcm*, DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b, CpG metilasas, metiltransferasa M.sss1, CviPI, HhaI, metiltransferasa HhaI, metiltransferasa HpaII, metiltransferasa MspI, metiltransferasa TaqI, metiltransferasa BamHI, metiltransferasa EcoRI, metiltransferasa HaeIII, metiltransferasa AluI, y metiltransferasa SssI.

Para reducir el grado de metilación de una secuencia de ADN concreta, se pueden utilizar fusiones entre un dominio de unión a ADN y un dominio de desmetilación. Los dominios de desmetilación de ADN ilustrativos han sido descritos. Véase, por ejemplo, Bhattacharya et al. (1999) Nature (Londres) 397: 579-583; Cervoni et al. (1999) J. Biol. Chem. 274: 8363-8366.

Otro método ilustrativo para reducir el grado de metilación de una secuencia de interés consiste en expresar, en la célula, una fusión entre un dominio de unión a ADN (que se une a la secuencia de interés) y una 5-metilcitosina ADN glicosilasa. La proteína de fusión elimina la base citosina metilada de la cadena principal de azúcar-fosfato del ADN, que va a ser reemplazada por citosina por las enzimas de reparación del ADN celular.

La desmetilación de una secuencia de ADN de interés también se puede lograr mediante el bloqueo del acceso de las metilasas de mantenimiento a esa secuencia durante la replicación; evitando de este modo la metilación de la cadena no metilada del ADN semimetilado replicado recientemente. Una ronda adicional de replicación dará lugar a ADN dúplex hijos que no están metilados en la secuencia de interés. Tal bloqueo puede lograrse mediante la expresión en la célula de un dominio de unión a ADN de dedo de zinc que está modificado para que se una a la secuencia de interés (véase más adelante).

La actividad de un dominio de metilación o dominio desmetilación puede ser dirigida a un resto concreto de C mediante la construcción de una proteína de fusión (o un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión) que comprende un dominio de metilación y un dominio de unión de ADN, en donde el dominio de unión a ADN o bien se une naturalmente a una secuencia en o cerca del residuo de C elegido o bien ha sido modificado para que se una a una secuencia en o cerca del residuo de C elegido. El dominio de unión a ADN puede ser un dominio de unión a ADN de origen natural o un dominio de unión a ADN modificado de origen no natural.

A este respecto, el dominio de unión a ADN de dedo de cinc es útil, en tanto que es posible modificar proteínas con dedos de cinc que se unen a cualquier secuencia de ADN de elección. Un dominio de unión de dedo de cinc comprende una o más estructuras de dedos de cinc. Miller et al. (1985) EMBO J. 4:1609-1614; Rhodes (1993)

Scientific American Febrero: 56-65; Patente de los Estados Unidos Núm. 6.453.242. Típicamente, un solo dedo de cinc tiene aproximadamente 30 aminoácidos de longitud y contiene cuatro residuos de aminoácido de coordinación con cinc. Estudios estructurales han demostrado que el motivo de dedo de cinc canónico (C₂H₂) contiene dos láminas beta (mantenido en un giro beta, que generalmente contiene dos residuos de cisteína de coordinación con cinc) y una hélice alfa (que contiene por lo general dos residuos de histidina de coordinación con cinc).

Los dedos de zinc incluyen tanto dedos de zinc C₂H₂ canónicos (*es decir.*, aquellos en los que el ion de cinc está coordinado por dos residuos de cisteína y dos de histidina) como no canónicos tales como, por ejemplo, dedos de zinc C₃H (aquellos en los que el ion de cinc está coordinado por tres restos de cisteína y un residuo de histidina) y dedos de zinc C₄ (aquellos en los que el ion de cinc está coordinado por cuatro residuos de cisteína). Los dedos de zinc no canónicos también pueden incluir aquellos en los que un aminoácido distinto de cisteína o histidina se sustituye por uno de estos residuos de coordinación con cinc. Véase *p. ej.*, el documento WO 02/057293 (25 Julio, 2002) y el documento US 2003/0108880 (12 Junio, 2003).

Los dominios de unión en dedo de zinc pueden ser modificados para que se unan a una secuencia de elección. Véase, por ejemplo, Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20: 135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70: 313-340; Isalan et al. (2001) Nature Biotechnol. 19: 656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12: 632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416. Los dominios de unión en dedo de cinc están modificados para que tengan una nueva especificidad de unión, en comparación con una proteína en dedo de zinc de origen natural. Los métodos de diseño incluyen, pero no se limitan a, diseño racional y diversos tipos de métodos de selección empíricos. El diseño racional incluye, por ejemplo, la utilización de bases de datos que comprenden secuencias de nucleótidos en triplete (o cuadruplete) y secuencias de aminoácidos de dedos de cinc individuales, en donde cada secuencia de nucleótidos en triplete o cuadruplete se asocia con una o más secuencias de aminoácidos en dedo de zinc que se unen a la secuencia en triplete o cuadruplete concreta. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.140.081; 6.453.242; 6.534.261; 6.610.512; 6.746.838; 6.866.997; 7.067.617; Publicaciones de Solicitudes de Patentes de los Estados Unidos Núms. 2002/0165356; 2004/0197892; 2007/0154989; 2007/0213269; y las Publicaciones de Solicitudes de Patentes Internacionales Núms. WO 98/53059 y WO 2003/016496.

Los métodos de selección ilustrativos, incluyendo la presentación en fagos, las trampas de interacción, la selección de híbridos y los sistemas de dos híbridos, se describen en Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.789.538; 5.925.523; 6.007.988; 6.013.453; 6.140.466; 6.200.759; 6.242.568; 6.410.248; 6.733.970; 6.790.941; 7.029.847 y 7.297.491; así como las Publicaciones de Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Núms. 2007/0009948 y 2007/0009962; WO 98/37186; WO 01/60970 y GB 2.338.237.

La mejora de la especificidad para los dominios de unión en dedo de cinc ha sido descrita, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.794.136 (21 Sept., 2004). Otros aspectos del diseño de dedos de cinc, con respecto a secuencias conectoras entre los dedos, se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.479.626 y la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2003/0119023. Véanse también Moore et al. (2001a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 1432-1436; Moore et al. (2001b) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 1437-1441 y documento WO 01/53480.

Todas las referencias citadas en esta sección, titulada "Métodos para la alteración específica de la metilación del ADN", dan a conocer dominios de metilación y dominios de desmetilación ilustrativos (de tipo salvaje y mutante), métodos reconocidos en la técnica para el diseño, la selección y la modificación de ADN de dominios de unión en dedo de cinc, y la construcción de proteínas de fusión que comprenden dominios de metilación y/o dominios de unión al ADN en dedo de cinc.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de células estromales adherentes de médula (MASC)

Se dividieron aspirados de médula ósea, obtenidas de donantes humanos, en alícuotas de 12,5 ml en tubos de 50 ml, y se añadieron 12,5 ml de medio de crecimiento (FEBS al 10% en α MEM, con un suplemento de penicilina/estreptomicina y L-glutamina 2 mM) a cada tubo. El contenido de los tubos se mezcló por inversión y los tubos se centrifugaron a 200 x g durante 8 minutos. La fase clara, superior se desechó, el volumen de la fase inferior se ajustó a 25 ml con medio de cultivo de nueva aportación, y los tubos se mezclaron de nuevo y se centrifugaron. Se eliminó de nuevo la capa superior. El volumen de la fase inferior de cada tubo se ajustó de nuevo a 25 ml y el contenido de todos los tubos se agrupó en un tubo de 250 ml. Después de la determinación de la concentración de células por medio de exclusión con Azul Tripán y la determinación del recuento de células nucleadas, las células se colocaron en placas en matraces T225, en 40 ml por matraz de medio de crecimiento a una densidad de 100 x 10⁶ células nucleadas totales por matraz. Los matraces se incubaron a 37°C durante 3 días en una incubadora con CO₂, tiempo durante el cual las MASC se anclaron al matraz.

Después de 3 días, las células no ancladas se eliminaron por oscilación de los frascos y retirada del medio de cultivo. Cada matraz se lavó tres veces con 40 ml de α MEM con un suplemento de penicilina/estreptomicina; a continuación, se añadieron 40 ml de medio de crecimiento precalentado (37°C) a cada matraz y las células se cultivaron a 37°C en una incubadora con CO₂. Durante este tiempo, el medio se reemplazó por 40 ml de medio de crecimiento de nueva aportación cada 3-4 días, y se controló el crecimiento de colonias y la densidad celular de las células.

Cuando los cultivos alcanzaron 25-30% de confluencia (generalmente 10.000-20.000 células por colonia y en 10-14 días), se recogieron las MASC (pase M0) para obtener otro pase más. Las MASC se recogieron de hasta 10 matraces T-225 a la vez. Se retiró el medio de los matraces y las células adherentes se lavaron con 20 ml de DPBS sin Ca/Mg (DPBS $-/-$, HyClone) 2 veces. Se añadieron diez ml de tripsina/EDTA al 0,25% (Invitrogen, Carlsbad, CA) a cada matraz y los matraces se incubaron durante aproximadamente 5 min a temperatura ambiente. Cuando las células se hubieron desprendido y las colonias se hubieron dispersado en células individuales, la tripsina se inactivó por adición de 10 ml de medio de crecimiento, seguido de mezclado suave. Las suspensiones celulares se retiraron de los matraces, y se agruparon en tubos de 250 ml. Los tubos se sometieron a centrifugación a 200 x g durante 8 minutos. Los sobrenadantes se retiraron cuidadosamente y los sedimentos de células húmedas se resuspendieron en medio de crecimiento a una concentración de células estimada de aproximadamente 1×10^6 células/ml. Se determinó el recuento de células viables y las células se cultivaron en placa en matraces T225 a una concentración de 2×10^6 células por matraz en medio de crecimiento (pase M1). Las células se cultivaron durante 3-5 días, o hasta 85 a 90% de confluencia, cambiando el medio cada 2 a 3 días. A 85-90% de confluencia, las células M1 de paso se recogieron por tripsinización y se volvieron a cultivar en placa a 2×10^6 células por matraz T225 como se describió anteriormente, para generar cultivos de pase M2. Los cultivos M2 fueron alimentados con medio de nueva aportación cada tres días, cuando fue necesario. Cuando los cultivos de pase M2 85-90% de confluencia (por lo general en 3-5 días), se recogieron para la transfección para generar NRC (Ejemplo 2 a continuación) o se congelaron para un futuro uso.

Ejemplo 2: Preparación de células de regeneración nerviosa (NCR)

Se prepararon células de regeneración nerviosa, también conocidas como RRC o células SB623, a partir MASC cosechadas de cultivos de pase M2, como sigue.

A. Preparación de mezcla de transfección

Se elaboraron células nerviosas en regeneración por medio de transfección MASC de pase M2 con un plásmido que codificaba el dominio intracelular Notch. El plásmido (pN2) comprendía una cadena principal pCI-neo (Promega, Madison, WI) en el que se habían introducido secuencias que codificaban los aminoácidos 1703-2504 de la proteína Notch-1 humana, que codifican el dominio intracelular, en el sitio de clonación múltiple. Para cada matraz de MASC, se utilizaron 5 ml de mezcla de transfección, que contenía 40 μ g de plásmido y 0,2 ml de solución de Fugene 6[®]. Para elaborar la mezcla de transfección, se añadió la cantidad apropiada de solución de Fugene[®] (en función del número de matraces de células que fueran a ser transfectadas) a α MEM en un tubo de 250 ml estéril, usando una pipeta de vidrio. La solución se mezcló suavemente y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Después se añadió la cantidad apropiada de ADN plasmídico gota a gota a la mezcla de Fugene[®]/ α MEM, se mezcló suavemente, y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente.

Antes de la adición de ADN de pN2 a la mezcla de Fugene[®]/MEM, se retiraron 5 ml y se colocaron en un tubo de 15 ml al que se habían añadido 40 μ g de plásmido pEGFP. Esta solución se utilizó para transfectar un matraz de células, como control para la eficacia de transfección.

B. Transfección

Para la transfección, se cosecharon las MASC de pase M2 por medio de tripsinización (como se describe en el Ejemplo 1) y se cultivaron en placa a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células en 40 ml de medio de crecimiento por matraz T225. Cuando las células alcanzaron 50-70% de confluencia (generalmente en 18-24 horas) se prepararon para la transfección, mediante la sustitución de su medio de crecimiento por 35 ml por matraz de medio de transfección (α MEM + FBS al 10% y sin penicilina/estreptomicina).

Tres horas después de la introducción de medio de transfección, se añadieron 5 ml de la mezcla de transfección (Sección A anterior) a cada matraz T-225 pipeteando directamente en el medio, sin entrar en contacto la superficie de crecimiento, seguido de mezclado suave. Un matraz T-225 de control se transfectó con 40 μ g de plásmido pEGFP, para la determinación de la eficacia de transfección.

Después de incubar los cultivos a 37°C en medio de transfección durante 24 horas, el medio de transfección se reemplazó por α MEM + FBS al 10% + penicilina/estreptomicina.

C. Selección de células transfectadas

Las células que habían incorporado el ADN del plásmido se seleccionaron 48 horas después de la transfección mediante la sustitución del medio con 40 ml por matraz de medio de selección (medio de crecimiento que contiene 100 µg/ml de G-418). El medio de selección de nueva aportación se proporcionó 3 días, y de nuevo 5 días después de que se iniciara la selección. Después de 7 días, el medio de selección se retiró y las células se alimentaron con 40 ml de medio de crecimiento. Los cultivos se hicieron crecer a continuación durante aproximadamente 3 semanas (intervalo de 18 a 21 días), siendo re-alimentados con medio de cultivo de nueva aportación cada 2-3 días.

Aproximadamente 3 semanas después de que se iniciara la selección, cuando las células supervivientes comenzaron a formar colonias, se recogieron las células. Se retiró el medio de los matraces utilizando una pipeta de aspiración y se añadieron 20 ml de DPBS sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, a temperatura ambiente. La superficie de cultivo se enjuagó suavemente, la solución de lavado se separó por aspiración y se repitió la etapa de enjuagado. A continuación, se añadieron a cada matraz 10 ml de Tripsina/EDTA al 0,25% precalentado (37°C), se enjuagaron sobre la superficie de crecimiento, y los matraces se incubaron durante 5-10 min. a temperatura ambiente. Los cultivos se controlaron con un microscopio para garantizar la separación completa de las células. Cuando el desprendimiento se hubo completado, la tripsina se inactivó por adición de 10 ml de medio de crecimiento por matraz. La mezcla se enjuagó sobre la superficie de cultivo, se mezcló pipeteando 4-5 veces con una pipeta de 10 ml, y la suspensión se transfirió a un tubo de centrifuga cónico de 50 ml estéril. Las células recogidas de varios matraces se pudieron combinar en un solo tubo. Si se encontraba presente alguna masa, se permitía que se asentasen y la suspensión se retiraba a un tubo nuevo.

Las suspensiones de células se centrifugaron a 800 rpm (200 x g) durante 8 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se eliminaron mediante aspiración. Los sedimentos celulares se aflojaron golpeando el tubo con los dedos, se añadieron aproximadamente 10 ml de DPBS sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ a cada tubo y las células se volvieron a suspender pipeteando suavemente 4-5 veces con una pipeta de 10 ml para obtener una suspensión uniforme.

D. Expansión de las células transfectadas

Se determinó el número de células para la suspensión de las células transformadas, seleccionadas y las células se sembraron en matraces T-225 a 2×10^6 células por matraz (proporcionando aproximadamente el 30% de la siembra de células viables). Este cultivo se denomina M2P1 (pase núm. 1). Los cultivos M2P1 se alimentaron con medio de nueva aportación cada 2-3 días, y cuando las células alcanzaron 90-95% de confluencia (generalmente 4-7 días después del pase), se recogieron y se volvieron a cultivar en placa a 2×10^6 células por matraz para generar el pase M2P2. Cuando los cultivos M2P2 alcanzaron una confluencia de 90-95%, se recogieron para su posterior análisis.

Ejemplo 3: Comparación de los patrones de metilación entre MASC y NRC

Se prepararon MASC a partir de cada uno de tres donantes humanos independientes (denominados D33, D39 y D41), como se describe en el Ejemplo 1 anterior. Se utilizó una porción de cada preparación de MASC para preparar células de regeneración nerviosa, como se describe en el Ejemplo 2, anterior. El ADN genómico fue aislado de cada una de estos seis preparaciones de células, y para cada uno de los tres donantes, se comparó el estado de metilación de ADN de las células de regeneración nerviosa con el del ADN de sus células progenitoras MASC.

Los genes cuyo estado de metilación fue analizado fueron seleccionados de acuerdo con tres criterios:

1. marcadores de metilación de ADN conocidos para MASC y líneas de células mesenquimales;
2. genes identificados como marcadores de metilación para MASC en un escrutinio de todo el genoma utilizando la hibridación de metilación diferencial; y
3. genes descritos en la bibliografía por tener un efecto sobre la diferenciación de células madre embrionarias.

Para el análisis del estado de metilación, la secuenciación de bisulfito se realizó en porciones seleccionadas (amplicones) de los genes seleccionados de acuerdo con los criterios mencionados anteriormente. Ciertos genes no mostraron diferencias significativas en el estado de metilación entre MASC y NRC. Estos genes se enumeran en la Tabla 1. Numerosos genes contenían amplicones que mostraban diferencias en el estado de metilación entre MASC y NRC. Éstos se enumeran en la Tabla 2. Entre ellos había cinco genes cuyas diferencias de metilación fueron suficientemente significativas como para ser útiles en la distinción de las NRC de las MASC. Estos fueron PITX2 (también conocido como homeodominio Pituitaria 2; factor de transcripción del homeodominio relacionado con biocoid RIEG), ROPN1L (proteína de tipo Ropporina 1; proteína de esperma asociada a AKAP), DNMT3b (C5-N-metil transferasa 3b de ADN), IGF2R (receptor del factor de crecimiento de tipo insulínico 2) y SDF4 (factor derivado de células del estroma 4). Los detalles de las diferencias de metilación para los amplicones seleccionados en estos cinco genes se proporcionan en las Tablas 3-7.

Las Tablas 3-7 muestran el estado de metilación en numerosas secuencias CpG en cada uno de los amplicones.

Las "células de Control" se refieren a MASC, y las "células diana" se refieren a las NRC. Las células se obtuvieron a partir de tres donantes diferentes, y tanto las MASC como las NRC se prepararon a partir de cada donante. Las MASC SB101 y las NRC SB102 eran del mismo donante; las MASC SB 103 y las NRC SB 104 se obtuvieron a partir de un segundo donante, y las MASC SB105 y las NRC SB106 se obtuvieron de un tercer donante. Cada tabla muestra los resultados obtenidos para un amplicón diferente. Las columnas 2-7 en cada tabla muestran los niveles de metilación de CpG sitios concretos dentro del amplicón (identificados por el número que sigue a los dos puntos en la Columna 1) en las MASC (columnas 2-4) y las NRC (columnas 5-7). El nivel de metilación medio para cada CpG analizado se proporciona en la columna 8 para las MASC y en la columna 9 para las NRC, y la diferencia en el nivel de metilación medio entre las MASC y las NRC se muestra en la columna 10.

La columna 11 muestra la "Puntuación de Fisher" para cada secuencia CpG analizada. La Puntuación de Fisher se calcula como sigue:

$$\frac{[\text{Valor de metilación medio (MASC)} - \text{Valor de metilación medio (NRC)}]^2}{[\text{Desviación típica (MASC)}]^2 + [\text{Desviación típica (NRC)}]^2}$$

El criterio de Fisher indica la variabilidad en los niveles de metilación en un sitio CpG concreto. Las puntuaciones de Fisher superiores a 1 se consideran significativas.

Estos datos muestran que la metilación de secuencias CpG en los genes PITX2, DNMT3b, IGF2R y SDF4 se incrementa en las NRC, en comparación con las MASC. En contraste, la metilación de secuencias CpG en el gen RPON1L se reduce en las RNC, en comparación con las MASC. Del mismo modo, la metilación de TMEM179 disminuye. En particular, la desmetilación de un residuo de C metilado en la posición 292 en el amplicón 549 representa una diferencia significativa en las RNC, en comparación con sus células progenitoras MASC.

Por consiguiente, estos cambios en la metilación son un diagnóstico para las NRC; por otra parte, la consecución de los mismos cambios de metilación por otros medios también es útil para la preparación de las NRC.

Tabla 1: amplicones que no muestran diferencias de metilación entre MASC y NRC

Núm. de amplicón	Gen
32	Precursor de CD4
38	Colágeno α3 (VI)
105	Colágeno α1 (II)
112	Precursor de prolargina
121	Osteopontina
127	BMP4
135	Anexina 6
179	HIF 1A
208	GLI3
308	Queratina 8
475	LRRK 1
488	KCTD 5
509	Precursor Frizzled 1
510	HAND 2
514	ZNF 74
522	PKNOX 2
528	GENSCAN 00000032124
532	Q9C015

Núm. de amplicón	Gen
537	C15 o f27
546	GENSCAN 00000000442
563	GENSCAN 00000003261
824	LIF
827	OCT4
830	DNMT3B
831	IGF2R
832	IGF2R
835	SLUG
836	SLUG
837	PTN
838	PTN
839	ID3
840	ID3
841	ID4
842	ID4
843	SDF4
845	KLF2
846	KLF2
847	P107/RBL1
848	P107/RBL1
849	RELN
850	RELN
851	SST
852	SST

Tabla 2: Amplicones que están metilados diferencialmente en MASC y NRC

ID amplicón	Gen
18	GDF5
164	FGFR1
227	LPIN1
825	NANOG
826	NANOG
834	NNAT
497	PITX2
549	ROPN1L
829	DNMT3b

ES 2 594 229 T3

ID amplicón	Gen
833	IGF2R
844	SDF4
1303	TMEM179

Tabla 3: Cambios en la metilación en el gen PITX2

ID CpG	Células de control			Células diana			Metilación media		Metilación Diferencia	Fisher Criterio
	SBI01	SBI03	SBI05	SBI02	SBI04	SBI06	Control	Diana		
AMP497:62	1,00	1,00	1,00	0,97	0,97	1,00	1,00	0,98	0,02	1,33
AMP497:73	0,60	0,58	0,64	0,56	0,66	0,94	0,61	0,72	-0,11	0,32
AMP497:82	0,80	0,79	0,80	0,67	0,82	0,98	0,80	0,82	-0,03	0,03
AMP497:105	0,81	0,89	0,85	0,94	0,93	1,00	0,85	0,96	-0,11	3,75
AMP497:109	0,64	0,69	0,77	0,66	0,87	0,96	0,70	0,83	-0,13	0,60
AMP497:135	0,69	0,66	0,78	0,75	0,84	0,82	0,71	0,80	-0,09	1,52
AMP497:139	0,76	0,77	0,83	0,96	0,89	1,00	0,79	0,95	-0,16	5,88
AMP497:142	0,83	0,83	0,84	1,00	0,94	1,00	0,83	0,98	-0,15	17,44
AMP497:153	0,76	0,76	0,88	0,92	1,00	0,97	0,80	0,96	-0,16	4,15
AMP497:172	0,95	0,88	0,96	1,00	1,00	1,00	0,93	1,00	-0,07	2,92
AMP497:184	0,84	0,77	0,92	1,00	1,00	1,00	0,84	1,00	-0,16	4,77

Tabla 4: Cambios en la metilación en el gen ROPN1L

ID CpG	Células de control			Células diana			Metilación media		Metilación Diferencia	Fischer Criterio
	SBI01	SBI03	SBI05	SBI02	SBI04	SBI06	Control	Diana		
AMP549:148	0,47	1,00	1,00	0,34	0,72	0,90	0,82	0,65	0,17	0,16
AMP549:167	0,39	0,83	0,83	0,02	0,28	0,80	0,68	0,37	0,32	0,45
AMP549:185	0,09	0,66	0,80	0,00	0,23	0,53	0,52	0,25	0,26	0,33
AMP549:190	0,12	0,66	0,66	0,00	0,43	0,47	0,48	0,30	0,18	0,20
AMP549:249	0,32	0,97	1,00	0,00	0,37	0,65	0,76	0,34	0,43	0,71
AMP549:292	1,00	1,00	1,00	0,38	0,55	1,00	1,00	0,64	0,36	1,25
AMP549:359	1,00	1,00	N/A	1,00	1,00	N/A	1,00	1,00	0,00	N/A

5

Tabla 5: Cambios en la metilación en el gen DNMT3b

ID CpG	Células de control			Células diana			Metilación media		Metilación Diferencia	Fischer Criterio
	SBI01	SBI03	SBI05	SBI02	SBI04	SBI06	Control	Diana		
AMP829:63	1,00	0,56	0,84	N/A	1,00	0,92	0,80	0,96	-0,16	N/A
AMP829:67	0,56	0,52	0,63	N/A	0,81	0,61	0,57	0,71	-0,14	N/A
AMP829:111	0,79	0,50	0,76	0,50	1,00	0,78	0,68	0,76	-0,08	0,07
AMP829:116	0,80	0,58	0,75	0,39	1,00	0,72	0,71	0,70	0,01	0,00
AMP829:127	0,73	0,71	0,76	0,62	1,00	0,70	0,73	0,77	-0,04	0,04
AMP829:134	1,00	1,00	0,76	0,93	0,84	1,00	0,92	0,92	0,00	0,00

ES 2 594 229 T3

ID CpG	Células de control			Células diana			Metilación media		Metilación	Fischer
	SBI01	SBI03	SBI05	SBI02	SBI04	SBI06	Control	Diana	Diferencia	Criterio
AMP829:137	0,51	0,21	0,73	0,73	0,73	0,56	0,48	0,67	-0,19	0,46
AMP829:140	1,00	0,58	0,45	0,60	0,38	0,74	0,68	0,57	0,10	0,09
AMP829:154	0,46	0,21	0,21	0,36	0,23	0,30	0,29	0,30	0,00	0,00
AMP829:158	0,67	0,54	0,65	0,56	0,91	0,74	0,62	0,74	-0,12	0,38
AMP829:186	0,21	0,16	0,14	0,20	0,26	0,26	0,17	0,24	-0,07	1,96
AMP829:216	0,33	0,69	0,00	1,00	1,00	0,80	0,34	0,93	-0,59	2,66
AMP829:298	0,08	0,06	0,00	0,53	0,12	0,00	0,05	0,22	-0,17	0,37
AMP829:337	0,20	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,08	0,64
AMP829:358	0,03	0,01	0,00	0,17	0,00	0,00	0,01	0,06	-0,04	0,19
AMP829:369	0,34	0,07	0,00	0,08	0,00	0,00	0,14	0,03	0,11	0,35

Tabla 6: Cambios en la metilación en el gen IGF2R

ID CpG	Células de control			Células diana			Metilación media		Metilación	Fischer
	SBI01	SBI03	SBI05	SBI02	SBI04	SBI06	Control	Diana	Diferencia	Criterio
AMP833:33	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	N/A
AMP833:44	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	N/A
AMP833:58	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	N/A
AMP833:82	1,00	1,00	0,83	1,00	N/A	1,00	0,94	1,00	-0,06	N/A
AMP833:102	1,00	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	0,97	1,00	-0,03	0,33
AMP833:104	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	N/A
AMP833:116	1,00	0,94	0,84	1,00	1,00	1,00	0,93	1,00	-0,07	0,82
AMP833:118	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	N/A
AMP833:146	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	N/A
AMP833:155	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	N/A
AMP833:162	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	N/A
AMP833:164	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	N/A
AMP833:176	0,82	0,83	0,87	1,00	1,00	1,00	0,84	1,00	-0,16	36,57
AMP833:178	0,72	0,77	0,92	1,00	1,00	1,00	0,80	1,00	-0,20	3,57
AMP833:191	0,77	0,85	0,85	0,97	1,00	0,96	0,82	0,98	-0,15	9,16
AMP833:193	0,87	0,92	0,88	0,97	1,00	1,00	0,89	0,99	-0,10	10,00
AMP833:217	0,76	0,74	0,77	0,86	0,90	0,88	0,76	0,88	-0,12	24,02
AMP833:230	0,74	0,83	0,82	0,94	0,90	0,93	0,80	0,92	-0,13	5,60
AMP833:239	0,59	0,80	0,81	0,92	0,84	0,89	0,73	0,88	-0,15	1,32
AMP833:246	0,64	0,79	0,78	0,89	0,87	0,87	0,74	0,88	-0,14	2,73
AMP833:248	0,66	0,80	0,76	0,83	0,85	0,84	0,74	0,84	-0,10	1,80
AMP833:265	0,65	0,76	0,75	0,87	0,86	0,85	0,72	0,86	-0,14	5,09
AMP833:277	0,65	0,73	0,73	0,87	0,84	0,84	0,70	0,85	-0,15	8,98
AMP833:291	0,52	0,75	0,49	0,71	0,74	0,70	0,59	0,72	-0,13	0,82

ID CpG	Células de control			Células diana			Metilación media		Metilación	Fischer
	SBI01	SBI03	SBI05	SBI02	SBI04	SBI06	Control	Diana	Diferencia	Criterio
AMP833:306	0,48	0,66	0,60	0,76	0,69	0,67	0,58	0,71	-0,13	1,51
AMP833:321	0,46	0,56	0,50	0,70	0,67	0,67	0,51	0,68	-0,17	10,60
AMP833:347	0,47	0,64	0,53	0,48	0,70	0,63	0,55	0,60	-0,06	0,15
AMP833:356	0,45	0,53	0,34	0,61	0,51	0,59	0,44	0,57	-0,13	1,41
AMP833:360	0,41	0,47	0,41	0,61	0,51	0,51	0,43	0,54	-0,11	2,96
AMP833:383	0,40	0,48	0,40	0,64	0,60	0,57	0,43	0,60	-0,18	9,60
AMP833:385	0,34	0,51	0,44	0,53	0,62	0,56	0,43	0,57	-0,14	2,09
AMP833:399	0,53	0,49	0,35	0,62	0,66	0,52	0,46	0,60	-0,14	1,43
AMP833:401	N/A	0,42	0,32	0,49	0,61	0,47	0,37	0,52	-0,15	N/A
AMP833:416	N/A	0,42	0,33	0,60	0,76	0,32	0,38	0,56	-0,19	N/A
AMP833:418	N/A	0,29	0,33	0,48	0,45	0,21	0,31	0,38	-0,07	N/A

Tabla 7: Cambios en la metilación en el gen SDF4

ID CpG	Células de control			Células diana			Metilación media		Metilación	Fischer
	SBI01	SBI03	SBI05	SBI02	SBI04	SBI06	Control	Diana	Diferencia	Criterio
AMP844:215	0,29	0,00	0,59	0,48	N/A	0,68	0,29	0,58	-0,29	N/A
AMP844:221	0,52	0,00	0,80	0,72	N/A	1,00	0,44	0,86	-0,42	N/A
AMP844:224	0,40	0,00	0,51	0,89	N/A	0,66	0,30	0,77	-0,47	N/A
AMP844:235	0,67	0,00	0,77	0,49	0,59	1,00	0,48	0,69	-0,21	0,18
AMP844:237	0,43	0,00	0,79	0,91	0,66	0,93	0,41	0,83	-0,43	1,03
AMP844:240	0,74	0,00	0,71	1,00	0,55	0,97	0,48	0,84	-0,36	0,53
AMP844:243	0,47	0,00	0,87	0,58	0,15	0,89	0,45	0,54	-0,09	0,03
AMP844:272	0,32	0,13	0,72	0,64	0,38	0,79	0,39	0,60	-0,22	0,35
AMP844:275	0,40	0,07	0,60	0,60	0,06	0,45	0,36	0,37	-0,01	0,00
AMP844:278	0,35	0,12	0,77	0,77	0,57	0,77	0,41	0,70	-0,29	0,71
AMP844:303	0,43	0,30	0,56	1,00	0,31	0,82	0,43	0,71	-0,28	0,54
AMP844:340	0,65	0,42	0,74	0,71	0,27	0,88	0,60	0,62	-0,01	0,00
AMP844:342	1,00	0,77	1,00	0,72	0,29	1,00	0,92	0,67	0,25	0,44
AMP844:375	0,48	0,10	0,41	0,43	0,65	0,61	0,33	0,56	-0,23	1,01
AMP844:393	0,32	0,07	0,65	0,21	0,49	0,51	0,35	0,40	-0,06	0,03
AMP844:417	0,43	0,23	N/A	0,64	0,43	0,61	0,33	0,56	-0,23	N/A
AMP844:426	0,26	0,12	N/A	0,56	0,27	0,58	0,19	0,47	-0,28	N/A

Ejemplo 4: Cambios en el estado de metilación del gen ROPN1L

5

Las secuencias de nucleótidos de los amplicones que contienen cambios en el estado de metilación en el gen ROPN1L en las RNC, en comparación con MASC, se analizaron para identificar con precisión los nucleótidos cuyo estado de metilación estaba alterado. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8: Cambios en la metilación de residuos de citosina específicos en el gen ROPN1L

Número de amplicón	Secuencia en:	
	MASC	NRC
549:148	T-T-A-C ^{me} - G-C-C-T	T-T-A-C- G-C-C-T
549:167	T-C-T-C ^{me} - G-G-A-G	T-C-T-C- G-G-A-G
549:185	C-C-T-C ^{me} - G-G-G-G	C-C-C-T- G-G-G-G
549:190	G-G-A-C ^{me} - G-A-T-C	G-G-A-C- G-A-T-C
549:249	C-C-T-C ^{me} - G-G-C-C	C-C-C-T- G-G-C-C
549:292	C-A-T-C ^{me} - G-C-C-C	C-A-T-C- G-C-C-C
549:359	G-T-C-C ^{me} - G-A-T-G	G-T-C-C- G-A-T-G

Ejemplo 5: Propiedades de regeneración nerviosa de los NRC con metilación del ADN alterada

- 5 Las células de regeneración nerviosa preparadas como se describe en el Ejemplo 2, que tienen los cambios de metilación descritos en los Ejemplos 3 y 4, son útiles en el tratamiento de diversos trastornos de los sistemas nerviosos central y periférico. Véase, por ejemplo, el documento de propiedad común WO 2009/023251 (19 Feb., 2009).
- 10 Las células descritas y caracterizadas en la presente descripción también se pueden convertir, después de otros tratamientos, en células que tienen las propiedades de las células nerviosas y las células precursoras nerviosas. Véase, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud de Patente Núm. 2006/0166362 (27 Julio, 2006), que describe tales tratamientos ilustrativos, y las propiedades de las células tratadas de esta manera. Véase también la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2006/0216276 (28 Sept., 2006), que describe las propiedades adicionales de las células así tratadas.
- 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la conversión de una célula progenitora en una célula de regeneración nerviosa que es capaz de estimular la recuperación nerviosa y/o la regeneración nerviosa después del trasplante a un sitio de lesión o enfermedad del sistema nervioso, comprendiendo el método
- 10 (a) el aumento de la metilación de los genes PITX2, DNMT3b, IGF2R y SDF4 en comparación con la célula progenitora y
 (b) la disminución de la metilación de los genes y ROPN1L y TMEM179 en comparación con la de las células progenitoras en donde la célula progenitora es una célula estromal adherente de médula (MASC); adicionalmente en donde ni la célula progenitora ni ninguna de sus descendientes fueron transfectadas con un polinucleótido que comprende secuencias que codifican un dominio intracelular Notch.
- 15 2. Una célula de regeneración nerviosa para el uso en un método para estimular la recuperación nerviosa o la regeneración nerviosa después del trasplante a los sitios de lesión o enfermedad del sistema nervioso en donde la célula es descendiente de una célula progenitora través del cultivo *in vitro*, en donde:
- 20 (a) la célula soporta el crecimiento o la regeneración de tejido nervioso;
 (b) la metilación de los genes PITX2, DNMT3B, IGF2R y SDF4 aumenta en comparación con la célula progenitora;
 (c) la metilación de los genes y ROPN1L TMEM179 se reduce en comparación con la célula progenitora; y
 (d) durante el cultivo *in vitro*, ni la célula progenitora ni ninguna de sus descendientes fueron transfectadas con un polinucleótido que comprende secuencias que codifican un dominio intracelular Notch, y en donde la célula progenitora es una célula estromal adherente de la médula (MASC).
- 25 3. El método de la reivindicación 1, o la célula para el uso de la reivindicación 2, en donde el estado de metilación de los genes PITX2, DNMT3b, IGF2R y SDF4 se incrementa:
- 30 poniendo en contacto la célula progenitora con las proteínas de fusión que comprenden un dominio de metilación y un dominio de unión a ADN, o con ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión que comprenden un dominio de metilación y un dominio de unión a ADN, en donde los dominios de unión a ADN están modificados para que se unan a una o más secuencias en cada uno de los genes PITX2, DNMT3b, IGF2R y SDF4.
- 35 4. El método de la reivindicación 1, o la célula para el uso de la reivindicación 2, en donde el estado de metilación de los genes y ROPN1L TMEM179 se reduce:
- poniendo en contacto la célula progenitora con las proteínas de fusión que comprenden un dominio de desmetilación y un dominio de unión a ADN, o con ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión que comprenden un dominio de desmetilación y un dominio de unión a ADN, en donde los dominios de unión a ADN están modificados para que se unan a una o más secuencias en cada uno de los genes ROPN1L y TMEM179.
- 40 5. Un método para la identificación de una célula de regeneración nerviosa, comprendiendo el método el análisis del estado de metilación de los genes PITX2, DNMT3b, IGF2R, SDF4, ROPN1L y TMEM179 en la célula, en donde un aumento en el estado de metilación de los genes PITX2, DNMT3b, IGF2R y SDF4, y una disminución en el estado de metilación de los genes ROPN1 L y TMEM179, en comparación con un progenitor de la célula de regeneración nerviosa, son indicativos de una célula de regeneración nerviosa.

45