

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 544**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0797 (2010.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A61K 35/30 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.02.2011 PCT/KR2011/000730**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2011 WO2011096728**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2011 E 11740024 (2)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2531594**

54 Título: **Método para provocar la proliferación de células madre mediante la activación de la señalización de Notch**

30 Prioridad:

03.02.2010 KR 20100010117
03.02.2010 KR 20100010116

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.03.2017

73 Titular/es:

**SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE
FOUNDATION (100.0%)
742-3 Hannam-dong
Yongsan-gu, Seoul 140-893, KR**

72 Inventor/es:

**NAM, DO HYUN;
HONG, SEUNG CHYUL;
KANG, BONG GU y
JOO, KYEUNG MIN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 606 544 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 provocar la proliferación de células madre mediante la activación de la señalización de Notch

Campo técnico

5 Se describen en este documento células madre en las que se introduce un gen que activa la señalización y un método para la proliferación de las células madre. Más particularmente, se describe un método para aumentar significativamente la capacidad de las células madre para proliferar, mediante la transfección de células madre con el Dominio intracelular Notch (NICD) para activar la ruta de señalización Notch.

Antecedentes de la invención

10 La biotecnología en el siglo 21 presenta la posibilidad de nuevas soluciones a los problemas de alimentación, medioambientales y de salud, con el objeto último de promover la prosperidad humana. En los últimos años, la tecnología que usa células madre ha sido considerada como una nueva forma de tratar enfermedades incurables. Anteriormente, el trasplante de órganos, la terapia génica, etc., se presentaron para el tratamiento de enfermedades humanas incurables, pero su uso eficiente no se ha logrado debido al rechazo inmunológico, escasez de órganos, el desarrollo insuficiente de los vectores y un conocimiento insuficiente de los genes de las enfermedades.

15 Con el aumento del interés en los estudios sobre células madre, se ha reconocido que las células madre totipotentes, que tienen la capacidad de formar todos los órganos mediante la proliferación y la diferenciación, no sólo pueden tratar la mayoría de las enfermedades, sino también curar fundamentalmente lesiones de órganos. Las células madre se refieren a aquellas células que tienen no sólo la capacidad de autorreplicación, sino también la capacidad de diferenciarse en al menos dos células, y pueden dividirse en células madre totipotentes, células madre pluripotentes, y células madre multipotentes. Muchos científicos han sugerido una aplicabilidad clínica de las células madre para la regeneración de todos los órganos y el tratamiento de enfermedades incurables, incluyendo la enfermedad de Parkinson, varios tipos de cáncer, la diabetes y los daños medulares.

20 En particular, las células madre neurales son capaces de auto-renovación y tienen el potencial de diferenciarse en tres tipos principales de células del sistema nervioso central que incluyen neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. De acuerdo con ello, los intereses en las células madre neurales están aumentando recientemente, no sólo con respecto a la investigación básica sobre los mecanismos de proliferación y diferenciación de las células madre y el desarrollo de los sistemas nerviosos, sino también con respecto a la posibilidad de nuevas células y la terapia génica en enfermedades neurológicas, las cuales son conocidas por no estar reguladas, una vez dañadas, utilizando características biológicas de las células madre neurales.

25 El concepto de que las células madre requieren microambientes celulares específicos, o nichos, por su cultivo, es una teoría bien establecida en la biología de las células madre. Como técnicas para cultivar selectivamente las células madre neurales, se ha publicado la formación de neuroesferas, el cultivo de baja densidad, y el cultivo de alta densidad, etc., pero se sabe que es difícil expandir las células en cultivos a gran escala en un estado indiferenciado.

30 Varios investigadores han intentado cultivos a gran escala de células madre. Sin embargo, las células madre neurales del adulto humanas son particularmente difíciles de cultivar in vitro y también tienen una capacidad limitada para proliferar. Por esta razón, los estudios sobre células madre neurales adultas humanas están en un punto muerto.

35 Por consiguiente, los presentes inventores han llevado a cabo estudios para superar el problema de la capacidad limitada de las células madre neurales de adulto humanas de proliferar, y, como resultado, han encontrado que, cuando las células madre neurales adultas cultivadas se cultivan principalmente después de que los genes que pueden activar las vías de señalización en las células madre neurales han sido transfectados en la célula madre neural, la capacidad de las células madre neurales de proliferar se incrementa significativamente, completando así la presente invención.

Compendio de la invención

45 La presente invención proporciona un método in vitro para aumentar la proliferación de células madre neurales que comprende una etapa de transfectar dichas células madre neurales con un gen que activa la señalización de Notch y cultivar las células madre neurales, en donde el gen codifica el NICD (Dominio IntraCelular Notch) que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 2, y la célula transfectada muestra una mayor proliferación comparado con la célula no transfectada.

50 La presente invención proporciona el uso de un gen que activa la señalización de Notch para aumentar la proliferación de células madre neurales in vitro, en donde dichas células madre neurales se transfectan in vitro con el gen, el gen codifica el NICD (Dominio IntraCelular Notch) que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 2, y la célula transfectada muestra una mayor proliferación comparado con la célula no transfectada.

Además, las células madre que se introducen con un gen que activa la señalización de Notch, y, por tanto, que tienen una capacidad excelente de proliferar, y un método para producir las células madre que se describen en este documento.

5 También se describe un agente terapéutico celular para el tratamiento de la enfermedad de los nervios craneales, que comprende células madre neurales, en las que se introduce el gen de NICD (Dominio IntraCelular Notch) y como un ingrediente activo.

Se describe un uso de las células madre neuronales transfectadas con el gen NICD para tratar o prevenir la enfermedad de los nervios craneales.

10 Por lo tanto, se describen células madre que tienen una excelente capacidad de proliferar, en las que se introduce un gen que activa la señalización de Notch, y un método para la proliferación de las células madre, comprendiendo el método una etapa de cultivar de células madre transfectadas con un gen que activa la señalización de Notch.

Se describe un agente terapéutico celular, como un ingrediente activo, para el tratamiento de la enfermedad de los nervios craneales, que comprende células madre neurales o células madre de la cresta neural en las que se introduce el gen de NICD (Dominio IntraCelular Notch) y la señalización de Notch se activa.

15 Otras características y realizaciones de la presente invención serán más evidentes a partir de las siguientes descripciones detalladas y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

20 La FIG. 1A es un conjunto de fotografías de cada paso de las células madre neurales de adulto, obtenido por un cultivo primario de tejido del lóbulo temporal humano y del tejido del hipocampo (P0: células al inicio del cultivo in vitro, y P18: células en el paso 18), y la figura 1B es un diagrama gráfico que muestra el número acumulado de las células madre neurales adultas que proliferaron por los pasos in vitro.

La FIG. 2 muestra los resultados del examen de la expresión de proteínas marcadoras específicas de células madre neurales de adulto humano mediante inmunocitoquímica (A: nestina+/CD133+/GFAP+/Olig2-/Tuj-1-; y B: Sox2+/Sox9+/vimentina+/Sox10-).

25 La FIG. 3 muestra los resultados del examen de las expresiones de proteínas marcadoras específicas de células madre neurales inferiores por inmunocitoquímica con el fin de examinar la capacidad de diferenciarse de las células madre neurales adultas humanas. La FIG. 3 muestra que las células madre neurales adultas obtenidas por cultivo in vitro mantienen la capacidad de diferenciarse a través de todos los pasos y muestra que las células de paso temprano, pasaron 3 veces, y las células de paso tardío, pasaron 18 veces, todas diferenciadas en células neuronales.

30 La FIG. 4A muestra la estructura de un vector de lentivirus construido para transfectar el gen NICD en células madre neurales de adulto, la FIG. 4B muestra los resultados del examen de la expresión de proteínas marcadoras específicas de las células madre neuronales en las células madre neuronales de adulto transfectadas con genes NICD por inmunocitoquímica (marcadores específicos de células madre neurales), y la FIG. 4C muestra los resultados del examen de la capacidad de estas células para diferenciarse en células madre neurales inferiores (marcadores específicos de astrocitos, oligodendrocitos y neuronas).

La FIG. 5A muestra los resultados del examen de la capacidad de proliferación de las células madre neurales de adulto transfectadas por el gen NICD por ensayo de CCK, y la FIG. 5B muestra el número acumulado de células totales que proliferaron por subcultivo.

40 La FIG. 6A muestra la estructura de un vector de lentivirus construido para transfectar el gen c-MET en células madre neurales de adulto, la FIG. 6B muestra los resultados del examen de la expresión de proteínas marcadoras específicas de las células madre neuronales en las células madre neuronales adultas transfectadas por el gen c-MET por inmunocitoquímica (marcadores específicos de células madre neurales), y la FIG. 6C muestra los resultados del examen de la capacidad de estas células para diferenciarse en células madre neurales inferiores (marcadores específicos de astrocitos, oligodendrocitos y neuronas).

45 La FIG. 7A muestra los resultados del examen de la capacidad de proliferación de células madre neurales de adulto transfectadas por c-MET por ensayo de CCK, y la FIG. 7B muestra el número acumulado de células totales que proliferaron por subcultivo.

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas

50 Se describen en este documento células madre que tienen una excelente capacidad de proliferar, en las cuales un gen activa la señalización de Notch, y un método para la proliferación de células madre, que comprende una etapa de cultivar dichas células madre.

Las células madre descritas en este documento pueden tener una capacidad de diferenciarse en diversos tejidos, y, por lo tanto, son eficaces para terapia celular.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "células madre" se refiere a células no diferenciadas que pueden diferenciarse en células que constituyen tejidos y que empiezan a diferenciarse bajo estímulos de diferenciación específicos (medio ambiente). A diferencia de las células diferenciadas con la división celular detenida, las células madre conservan la capacidad de auto-renovación a través de la división celular, y, por lo tanto, pueden proliferar (expandirse). Por otra parte, las células madre se diferencian en células específicas cuando se aplican estímulos de diferenciación a las mismas, y también pueden diferenciarse en diferentes células en diferentes entornos o estímulos de diferenciación, lo que indica que las células madre tienen plasticidad en la diferenciación. Tales células madre se pueden dividir, según el origen del desarrollo de las mismas, en células madre embrionarias y células madre adultas. Se puede preferir el uso de células madre adultas en lugar de células madre embrionarias que arrastran serias cuestiones biológicas, éticas y legales que limitan la aplicación clínica de las mismas.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "células madre adultas" se refiere a células madre extraídas de tejidos del cuerpo de adultos, que están justo antes de diferenciarse en las células de un órgano específico. Las células madre adultas son difíciles de proliferar y tienen una fuerte tendencia a diferenciarse fácilmente, pero pueden diferenciarse en células progenitoras de tejido específicos en el cuerpo humano. Las células madre adultas pueden diferenciarse en células que tienen diferentes características y tienen la capacidad de producir células de reemplazo para los varios tejidos y órganos, incluyendo el corazón, el páncreas, el tejido nervioso, muscular y el cartilago.

Las células madre adultas que se describen anteriormente se pueden derivar de seres humanos, primates, roedores y aves. Preferiblemente, las células madre adultas se pueden derivar de mamíferos, especialmente ratones, ratas y seres humanos. Por ejemplo, estas células madre adultas se pueden obtener de la mayoría de los tejidos, incluyendo la médula ósea humana, la grasa, la sangre del cordón umbilical, la sangre, el hígado, la piel, el tracto gastrointestinal, la placenta, el útero, el cerebro, el páncreas, el ojo y los tejidos fetales.

El método para el aislamiento de las células madre adultas a partir de diversos tejidos humanos se puede realizar usando un método convencional conocido en la técnica, que es adecuado para cada tejido. Por ejemplo, puede ser usado un método que comprenda el tratamiento de un tejido específico recogido con solución de tripsina y/o colagenasa para aislar las células individuales, cultivar las células individuales en un medio suplementado con cantidades adecuadas de factores de crecimiento (por ejemplo, bFGF, EGF, etc.), y aislar las células madre adultas a partir del cultivo por FACS o de acuerdo con la tasa de crecimiento.

Las células madre adultas que pueden usarse según se describe en este documento incluyen células madre neurales o células madre de la cresta neural (CTCN).

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "células madre neurales" describe células que son capaces de experimentar más de 20-30 divisiones celulares mientras se mantiene la potencia para generar tanto neuronas como glia. Preferiblemente, dichas células son capaces de experimentar más de 40, más preferiblemente más de 50, lo más preferido ilimitadas, divisiones celulares. Las células madre neurales son por definición multipotentes, es decir, son capaces de diferenciarse en un número de tipos de células neuronales (por ejemplo, neuronas/glia). Las células madre neurales pueden ser obtenidas por cultivo primario de los tejidos del sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP) y se diferencian en células del linaje glial y del linaje neural bajo respectivos conjuntos de condiciones (Sally Temple et al. 2001). Tal como se utiliza en este documento, la expresión "células madre de la cresta neural (CTCN)" se refiere a células madre que aparecen temporalmente durante el proceso de desarrollo embrionario temprano y también son células madre multipotentes.

Es posible que las células madre neurales se deriven de diversas fuentes. Por ejemplo, las células madre neuronales se pueden derivar de tejido adulto de cerebro humano, en el que el cerebro puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en cerebro, diencéfalo, mesencéfalo, cerebelo, bulbo raquídeo, protuberancia y médula espinal. Preferiblemente, las células madre neuronales se pueden derivar a partir de tejido cerebral, tal como el tejido del lóbulo temporal o tejido del hipocampo. Las células madre neurales humanas se pueden comprar de fuentes disponibles comercialmente, y preferiblemente, pueden ser producidas mediante el cultivo de células, obtenidas a partir de tejido adulto de cerebro humano, en un medio que contiene factores de crecimiento de células madre neurales (Ejemplo 1).

En particular, las células madre neurales adultas son muy difíciles de cultivar in vitro y también tienen una capacidad limitada para proliferar. Por esta razón, era difícil cultivar células madre neuronales en grandes cantidades en un estado indiferenciado por métodos de cultivo convencionales.

En el documento WO 2005/121318 se describe un método para la promoción de la división simétrica de las células madre neuronales, un activador de una ruta de señalización corriente abajo de un receptor de la familia del receptor EGF junto con una ruta de señalización corriente abajo de un receptor de la familia de receptores FGF. A diferencia de esto, en la presente invención, el problema anteriormente descrito se resuelve ya sea mediante la transfección de células madre con un gen que activa la señalización de Notch para activar la ruta de señalización de Notch,

mejorando así la capacidad de las células madre (en particular las células madre neurales) para proliferar, de modo que las células madre se puedan obtener en grandes cantidades.

Las células madre descritas en este documento se transfectan estructuralmente con un gen que activa la señalización de Notch, y la ruta de señalización Notch se activa funcionalmente.

5 Notch es el nombre derivado de un gen que induce el crecimiento excesivo de las alas de *Drosophila* durante la mutación que produce muescas en las alas. Es una ruta de señalización que juega un papel crucial en la rápida señalización de célula a célula y en la amplificación en los animales multicelulares. Notch transduce una señal por el contacto de célula a célula a través de un ligando de Delta o Serrate presente en la célula adyacente. Como se describe en este documento, con el fin de activar la ruta de señalización Notch, un gen que está implicado en la ruta de señalización Notch se transfecta en células madre.

La transfección de células madre con un gen que activa medios de señalización Notch introduce un ácido nucleico que codifica el gen en las células madre.

15 Cualquier gen que activa la señalización de Notch se puede utilizar sin limitación como se describe en este documento. Preferiblemente, puede ser utilizado el gen NICD. Se puede utilizar sin limitación como un ácido nucleico que codifica el NICD, uno que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la NICD, conocido en la técnica. Preferiblemente, el gen que activa la señalización de Notch puede tener una secuencia de codificación de NICD que comprende una secuencia de ADN expuesta en la SEQ ID NO: 1 y puede tener una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 y la invención se refiere a esta realización. Es decir, se puede tener una secuencia de nucleótidos que codifica un equivalente funcional de NICD.

20 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "equivalente funcional" se refiere a un polipéptido que tiene sustancialmente la misma actividad fisiológica como el NICD descrito en este documento, que tiene una homología de secuencia de al menos el 70%, preferiblemente al menos 80%, y más preferiblemente al menos 90%, con una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, como un resultado de la adición, sustitución o delección de aminoácidos. Por ejemplo, el polipéptido tiene una homología de secuencia de 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 25 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83 %, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. Tal como se utiliza en este documento, la expresión "sustancialmente la misma actividad fisiológica" como el NICD se refiere a la actividad que activa la ruta de señalización Notch. Además, el ácido nucleico que codifica el NICD se puede preparar por un método de recombinación de genes conocido en la técnica.

30 El gen que activa la señalización de Notch como se describe en este documento, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica NICD puede ser unido operativamente a una secuencia de control de la expresión y puede ser insertado en un vector de expresión. Tal como se utiliza en este documento, la expresión "secuencia de control de expresión" se refiere a una secuencia de ADN que regula la expresión del ácido nucleico operativamente unido en una célula huésped específica. Tal secuencia de control de la expresión incluye un promotor para iniciar la transcripción, una 35 secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, y una secuencia de control de terminación de la transcripción o la traducción. Tal como se utiliza en este documento, la expresión "vector de expresión" se refiere a un plásmido, vector viral u otros vehículos conocidos en la técnica, en los que un ácido nucleico que codifica el gen estructural puede insertarse y que puede expresarse en el ácido nucleico en una célula huésped. Preferiblemente, el vector de expresión puede ser un vector viral.

40 Los ejemplos del vector de expresión incluyen, pero no se limitan a, un vector retroviral, un vector adenoviral, un vector de herpes-virus, un vector de la viruela aviar viral, un vector viral de Epstein-Barr, un vector lentiviral, etc. Puede utilizarse un vector lentiviral.

45 El método de preparación del lentivirus que utiliza un vector de expresión recombinante como se describe en este documento puede llevarse a cabo utilizando un método conocido en la técnica. El vector de expresión que comprende el ácido nucleico descrito en este documento puede introducirse en células madre por cualquier método conocido en la técnica, tal como la transfección transitoria, microinyección, transducción, fusión celular, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por liposomas, transfección mediada con DEAE dextrano, transfección mediada con polibreno, electroporación, pistola de genes u otros procedimientos para introducir ADN en las células.

50 Las células madre neurales en las que un gen que activa la señalización de Notch se introduce se puede preparar, por ejemplo, mediante un método que comprende las etapas de:

(a) preparar un vector viral recombinante que comprende una construcción de ADN que contiene un ácido nucleico que codifica NICD;

(b) transfectar el vector viral recombinante en una línea de células productoras de virus para preparar un virus recombinante que expresa NICD; y

55 (c) infectar las células madre neurales con los virus recombinantes que expresan NICD.

5 La línea celular que produce el virus que se utiliza como se describe en este documento puede ser una línea celular que produce un virus correspondiente al vector viral usado. Por ejemplo, si se utiliza un vector lentiviral, se pueden usar células 293FT productoras de lentivirus. A continuación, el vector lentiviral recombinante que expresa NICD se transfecta en células madre neurales humanas. Las células madre cultivadas principalmente como se describen en este documento son transfectadas preferiblemente con un gen que activa la señalización de Notch, por ejemplo, el gen de NICD.

10 Con el fin de transfectar las células madre neuronales humanas con lentivirus, puede ser utilizado cualquier método convencional conocido en la técnica. El método puede comprender, por ejemplo, cultivar en placas células madre nerviosas en un medio que contiene factor de crecimiento, tratar las células cultivadas en placas con polibreno, y añadir al medio partículas virales correspondientes a un MOI (multiplicidad de infección) adecuado, por lo tanto infectando las células. Después de la infección, el medio que contiene el virus puede ser reemplazado por un medio fresco para el cultivo de células madre neuronales, después de lo cual las células pueden ser cultivadas.

15 La línea de las células madre descrita en este documento, que está sobreexpresando el gen que activa la señalización de Notch y preparado como se describe anteriormente, tiene una muy excelente capacidad de proliferar. Es decir, cuando la ruta de señalización Notch es activada con el gen que activa la ruta de señalización Notch, la proliferación de las células madre se vuelve activa. Los ejemplos más preferidos de las células madre que tienen una excelente capacidad de proliferar son células madre neurales o células madre de la cresta neural que se transfectan con el gen de NICD y en el que se activa la ruta de señalización Notch.

20 Las células madre neurales anteriormente preparadas, en las que se introduce el gen de NICD y se activa la ruta de señalización Notch, se pueden caracterizar porque:

- (i) las células madre expresan nestina y CD 133, conocidas como proteínas marcadoras específicas de las células madre neurales, y GFAP, una proteína marcadora específica de astrocitos;
- (ii) las células madre no expresan Olig2, un marcador específico de oligodendrocitos, y la proteína Tuj-I, un marcador específico neuronal;
- 25 (iii) las células madre tienen una capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula seleccionado del grupo que consiste de neuronas, oligodendrocitos y astrocitos;
- (iv) las células madre sobreexpresan NICD;
- (v) se activa la ruta de señalización Notch.

30 En un ejemplo descrito en este documento, se cultivaron las células madre neurales introducidas con el gen NCID, y como resultado, se confirmó que la proliferación de las células fue significativamente mayor (véase el Ejemplo 4-3).

35 Un medio que puede utilizarse en el cultivo de células madre como es descrito en este documento puede ser un medio adecuado conocido en la técnica dependiendo del tipo de célula madre. El medio puede contener ácido ascórbico, factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina, antibióticos y FBS (suero bovino fetal). Por ejemplo, para las células madre neuronales, se puede utilizar un medio NBE que contiene factor de crecimiento, en particular, un medio que contiene el suplemento B27™, suplemento N2™, bFGF y EGF.

40 Cuando las células madre se cultivan después de la introducción con un gen que activa la ruta de señalización de Notch, por ejemplo, el gen de NICD, la proliferación de las células madre se produce muy activamente en comparación con las células madre no introducidas. Además, el número acumulado de las células madre cambia significativamente a medida que el número de pasos aumenta. Preferiblemente, las células madre se cultivan durante más de tres pasos.

45 A saber, en el método para la proliferación de células madre como es descrito en este documento, se introduce un gen que activa la ruta de señalización de Notch dentro de las células madre, de modo que las células madre proliferaron en grandes cantidades en un estado indiferenciado. La introducción a las células madre con el gen de activación de la ruta de señalización de Notch, por ejemplo, el gen de NICD, se lleva a cabo como se describe anteriormente.

Se describe en este documento un agente terapéutico celular que comprende, como ingredientes activos, las células madre en las que un gen que activa la señalización Notch se introduce estructuralmente y la señalización Notch se activa funcionalmente.

50 En particular, las células madre neurales o células madre de la cresta neural, en las que se introduce el gen de NICD y se activa la ruta de señalización de Notch, se pueden usar como agentes terapéuticos celulares para el tratamiento de enfermedades de los nervios craneales. Las enfermedades de los nervios craneales típicamente incluyen las enfermedades neurodegenerativas. Las enfermedades o los trastornos neurodegenerativos son enfermedades o condiciones médicas asociadas con la pérdida neuronal o la disfunción.

Ejemplos de enfermedades neurodegenerativas o trastornos incluyen enfermedades neurodegenerativas, lesiones del sistema nervioso central o disfunciones. Las enfermedades neurodegenerativas incluyen, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer u otra demencia, esclerosis múltiple (EM), esquizofrenia, degeneración macular, glaucoma, retinopatía diabética, neuropatía periférica, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Parkinson. Las lesiones del SNC incluyen, por ejemplo, los eventos cerebrovasculares como accidentes cerebrovasculares (por ejemplo, los accidentes cerebrovasculares hemorrágicos, accidentes cerebrovasculares isquémicos focales o accidentes cerebrovasculares isquémicos globales), isquemia ocular y trombosis de los senos de la duramadre; lesiones traumáticas del cerebro o de la médula espinal (por ejemplo, las lesiones causadas por cirugía del cerebro o de la médula espinal o los accidentes físicos); concusión; lesión inducida por drogas (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, drogas recreativas, y neurolépticos); cirugía de revascularización coronaria (CABG); e isquemia en el nacimiento del niño. Las disfunciones del SNC incluyen, por ejemplo, depresión, epilepsia, neurosis y psicosis.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" se refiere a cualquier manera en la cual se mejoran los síntomas de una enfermedad o se alteran de otro modo de forma beneficiosa. El tratamiento también abarca el retraso del progreso de una enfermedad y la mejora, la paliación y la remisión (parcial o completa) de los síntomas. Además, el tratamiento puede significar una mayor posibilidad de supervivencia en comparación con la ausencia del tratamiento. El tratamiento también abarca medidas profilácticas además de las intervenciones terapéuticas. Los casos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos con enfermedades existentes y aquellos en los que se requiere la prevención. La mejora de las enfermedades significa la mejora o el retraso de los síntomas en comparación con la ausencia de tratamiento.

Se describe en este documento el uso de células madre, en particular células madre neuronales, un gen que activa la ruta de señalización de Notch, por ejemplo, el gen de NICD, para la preparación de un agente terapéutico celular. Las células madre y los efectos de las mismas son como se describen anteriormente.

Las células madre descritas en este documento se administran de una manera que se les permita injertarse o migrar al lugar del tejido deseado y reconstituir o regenerar la zona funcionalmente deficiente. Por ejemplo, las células madre neurales o las células madre de la cresta neural, en las que se introduce el gen de NICD y se activa la ruta de señalización de Notch, pueden ser trasplantadas directamente en los sitios del parénquima o intratecales del sistema nervioso central. Los trasplantes pueden hacerse utilizando una única suspensión o pequeños agregados a una densidad de $1 \times 10^5 \sim 1,5 \times 10^5$ células por μl . El agente terapéutico celular descrito en este documento se puede administrar a una dosis de $10^4 \sim 10^{10}$ células/cuerpo, y preferiblemente $10^6 \sim 10^8$ células/cuerpo, una vez o varias veces al día.

Sin embargo, debe entenderse que la dosificación real del ingrediente activo debe ser determinada considerando diversos factores relacionados, incluyendo la enfermedad a tratar, la vía de administración, la edad del paciente, el sexo y el peso, y la gravedad de la enfermedad.

Las células madre descritas en este documento se pueden proporcionar en forma de una composición farmacéutica para la administración en seres humanos. La composición farmacéutica descrita en este documento puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en este documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un agente no tóxico para una célula o sujeto que está expuesto a la composición. Los ejemplos del vehículo que se pueden utilizar descritos en este documento incluyen los conocidos en la técnica, incluyendo un agente tampón, un agente conservante, un analgésico, un agente solubilizante, un agente isotónico, una base, un excipiente, un agente lubricante, etc. La composición farmacéutica descrita en este documento se puede preparar en forma de diversas formulaciones de acuerdo con una técnica convencional conocida en la técnica. Por ejemplo, para preparaciones inyectables, se puede preparar en la forma de ampollas de dosis unitarias o recipientes de dosis múltiples. Para el principio general de las preparaciones medicinales de la composición farmacéutica descrita en este documento, se puede hacer referencia a la literatura conocida.

Además, se describe un método para el tratamiento de tumores, comprendiendo el método administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de células madre, particularmente células madre neurales, en las que la ruta de señalización Notch se activa. Tal como se utiliza en este documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad en la que las células madre descritas en este documento exhiben un efecto terapéutico en el sujeto. Tal como se utiliza en este documento, el término "sujeto" se refiere a mamíferos, particularmente animales, incluyendo seres humanos. El sujeto puede ser un paciente en necesidad de tratamiento. Las células madre descritas en este documento se pueden administrar hasta que se pueda obtener el efecto deseado entre los efectos descritos anteriormente. Además, estas células madre pueden administrarse a través de diferentes rutas de acuerdo con cualquier método convencional conocido en la técnica.

Se describe en este documento el uso de células madre para la preparación de agentes terapéuticos. Las células madre y los efectos de las mismas son como se describen anteriormente.

Ejemplos

En lo sucesivo en este documento, la presente invención se describirá con más detalles con referencia a los ejemplos. Será obvio para cualquier persona con experiencia ordinaria en la técnica que estas realizaciones son meramente para fines ilustrativos.

5 Ejemplo 1: Preparación de las células madre neurales humanas

1 - 1: Aislamiento y cultivo de las células madre neurales humanas

Se obtuvieron tejidos del lóbulo temporal y del hipocampo de pacientes con epilepsia (Departamento de Neurocirugía, Samsung Medical Center) por operación quirúrgica.

10 En menos de 3 horas después de la operación quirúrgica, cada tejido se lavó con PBS, y luego se cortó mecánicamente utilizando tijeras o cuchillas quirúrgicas. El tejido cortado se trató a 37°C durante 1 hora o menos con una solución enzimática, se preparó mezclando colagenasa (0,4 mg/ml, Gibco), DNaseI (0,01-1 mg/ml, Roche), papaína (10 unidades/ml, Sigma), DL-cisteína (400 ng/ml, Sigma) y DNaseI (0,01-1 mg/ml, Roche). A continuación, el tejido tratado se disoció en células individuales utilizando una pipeta de suero, y después se pasó a través de una malla de nylon, obteniendo así células individuales.

15 La suspensión de las células individuales se sometió a un gradiente de concentración (Percoll, Sigma) y se centrifugó para eliminar los glóbulos rojos y las células muertas. Las células resultantes se suspendieron en un medio Neurobasal-A (Gibco) o DMEM:F12 (Gibco) que contenía FBS, suplemento B27 (Gibco), suplemento N2 (Gibco), bFGF (R&D) y EGF (R&D). Entonces, las células se cultivaron en una placa de cultivo de células pre-tratadas con poli L-ornitina (Sigma), obteniendo de este modo las células madre neurales primariamente cultivadas.

20 1-2: Cultivo de paso

Las células madre neurales obtenidas en el Ejemplo 1-1 se pasaron a intervalos de aproximadamente 10 días. El cultivo de paso se realizó de la siguiente manera.

25 El medio se retiró de la placa de cultivo de células, y las células se trataron con 2 ml de 0,05% de tripsina/EDTA (T/E, Gibco) y se incubó en un incubador de 5% de CO₂ a 37°C. A continuación, para detener la acción de la tripsina, se añadió al mismo 2,5 ml de 1% de medio que contenía FBS y se mezcla con ello. La suspensión celular se transfirió a un tubo cónico de 15 ml (Falcon). Se centrifugó para eliminar el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1 ml de medio Neurobasal-A (Gibco) o DMEM:F12 (Gibco), y después se midió el número de células. A continuación, la suspensión de células que contenía aproximadamente 10⁵ ~ 5x10⁵ células se transfirió a una placa de cultivo fresco que contenía 50% del medio anterior, y se añadieron 50 ng/ml de bFGF y 50 ng/ml de EGF a la misma. Entonces, las células se incubaron en 5% de CO₂.

30 La FIG. 1A es un conjunto de fotografías que muestra las células madre neuronales adultas aisladas de los tejidos del lóbulo temporal y del hipocampo humano en varios pasos.

Se midió el número acumulado de las células madre neurales que proliferaron durante los pasos. Como resultado, como se muestra en la figura 1B, se obtuvo una curva de crecimiento de células que tiene una pendiente constante.

35 1-3: Análisis de las características de las células madre neurales humanas

Las células madre neurales obtenidas como se describen anteriormente fueron fijadas con 4% de paraformaldehído (PFA, Sigma) o acetona/metanol, y luego se permeabilizaron con PBS que contenía 0,05% de Triton X-100 (Sigma) durante 15 minutos. A continuación, el tejido se bloqueó con 5% de suero de caballo normal/1% de suero de cabra normal (Vector Lab.) a temperatura ambiente durante 1 hora.

40 A continuación, las células se lavaron varias veces con PBS que contenía 0,01% de Triton X-100 (Sigma) y se trataron con una combinación de anti-CD133 (Abeam), anti-musashi (Chemicon), anti-nestina (Abcam o Millipore), anti-Sox2 (R&D), anti-Sox9 (Abcam), anti-Sox10 (Abcam), anti-vimentina (Millipore), anti-GFAP (Sigma o Abcam), anti-Olig2 (Millipore), anti-04 (Chemicon), y anti-Tuj-I (Millipore). A continuación, las células se incubaron a 4°C durante la noche.

45 Después, las células se trataron con anticuerpos secundarios (anti-ratón-488 (BD), anti-ratón-594 (BD), anti-conejo-488 (BD), anti-conejo-594 (BD), anti-rata-488 (BD), y antirata-594 (BD)) que corresponden a los anticuerpos primarios anteriores. Finalmente, las células fueron teñidas por el núcleo con DAPI (Sigma), y la expresión de la fluorescencia final se observó con un microscopio de fluorescencia (Axiovert, Zeiss).

50 Como resultado, la expresión de nestina y CD133, conocida como proteínas marcadoras específicas de las células madre neurales, y el marcador específico de astrocitos GFAP, se observó, y se observó que no se expresaron el marcador de oligodendrocitos específico Olig2 y el marcador específico de neuronas Tuj-I (Fig. 2A), y Sox2, Sox9 y vimentina se expresaron con fuerza (Fig. 2B). Esto sugiere que las características de las células madre neurales se mantuvieron durante todos los pasos.

1-4: Examen de la capacidad de las células madre neurales humanas para diferenciarse

Con el fin de confirmar si las células madre adultas neural obtenidas como se describe anteriormente tienen la capacidad de diferenciarse en células madre neurales inferiores y si la capacidad de diferenciación se mantiene durante el período del subcultivo, se suspendieron las células en medio Neurobasal-A (Gibco) o DMEM:F12 (Gibco) que contenía FBS, suplemento B27 (Gibco) y suplemento N2 (Gibco). Después, las células se cultivaron en una placa de cultivo de células pre-tratadas con poli-L-ornitina (Sigma) y laminina (Sigma). Entonces, las células se cultivaron en un medio Neurobasal-A que contenía 10% de FBS (Gibco) o DMEM:F12 (Gibco) o un medio Neurobasal-A (Gibco) que contenía factor de crecimiento neural (R&D), IBMX y dcAMP durante 1-2 semanas, lo que indujo la diferenciación de las mismas. La expresión de proteínas marcadoras específicas de las células neuronales inferiores en estas células diferenciadas se analizó mediante inmunocitoquímica. Como resultado, se pudo ver que la capacidad de diferenciación de las células se mantuvo durante todos los pasos (Fig. 3).

Ejemplo 2: Construcción de lentivirus recombinante que expresa NICD (dominio intracelular Notch)

2- 1: Preparación de un vector viral recombinante

En primer lugar, el NICD de la SEQ ID NO: 1 se amplificó a partir de células madre neurales por RT-PCR. El ARN total se extrajo de las células madre neurales del Ejemplo 1 usando un kit de RNeasy (Qiagen), y después se trató con transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen) para sintetizar ADNc que se usó como una temperatura para la amplificación PCR. El gen EmGFP (Invitrogen) se amplificó por PCR a partir de un vector pLenti6.3/V5-GW/EmGFP (Invitrogen). Los cebadores usados en la amplificación PCR de los dos genes contenían una secuencia CACC con el fin de iniciar la expresión de los aminoácidos en el vector de lentivirus. Específicamente, los cebadores tenían las siguientes secuencias:

Cebador directo: CACC ATG CGG CGG CAG CAT GGC CAG (SEQ ID NO: 3)

Cebador inverso: TTA CTT GAA GGC CTC CGG AAT G (SEQ ID NO: 4)

La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; 15 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 60°C durante 30 seg, y amplificación a 72°C durante 3 min; y amplificación final a 72°C durante 10 min. El producto de PCR amplificado se clonó en un vector pENTR-D-TOPO (Invitrogen).

Para la expresión estable del gen de introducción en las células madre neurales, la región promotora del gen de la ubiquitina C humana (UbC) se amplificó por PCR a partir de un vector pLenti6/UbC/V5-DEST (Invitrogen). Los cebadores usados en la amplificación PCR contenían las secuencias de enzimas de restricción ClaI y SpeI para cada clonación. La región del promotor amplificado anterior del gen UbC se clonó en un vector pGEM-T easy (Promega), y después se trató con las enzimas de restricción ClaI y SpeI, obteniendo así un fragmento del gen. Además, la región del promotor CMV de un vector pLenti7.3/V5-DEST (Invitrogen) se eliminó usando las mismas enzimas de restricción, obteniéndose así un fragmento del vector. A continuación, el fragmento de gen y el fragmento del vector fueron tratados con ligasa (Promega), obteniendo de este modo un vector de expresión insertado con el promotor UbC.

Para insertar un gen reportero, el vector se insertó con una enzima de restricción KpnI para obtener un fragmento del vector, y un vector pSuper-retro (Oligoengine) se trató con la misma enzima de restricción para obtener un fragmento del gen. A continuación, el fragmento del gen y el fragmento del vector se trataron con ligasa (Promega), obteniendo de este modo un vector de expresión insertado con el promotor UbC. Los genes de NiCd y EmGFP se transfirieron al vector de expresión obtenido usando LR clonasa (Invitrogen), obteniendo de este modo un vector de expresión final.

La estructura del vector lentivirus construido como se describe anteriormente se muestra en la figura 4-A.

2-2: Preparación del lentivirus recombinante que expresa NICD

(1) Producción del lentivirus

Como una línea celular de empaquetamiento del virus, se utilizó una línea celular 293FT (Invitrogen). La línea celular 293FT se co-transfectó con el vector que sobreexpresa NICD, construido en el Ejemplo 2-1, y tres vectores asociado al empaquetamiento de VIMS (PLP-1, PLP-2, y pLP/VSVG; Invitrogen), usando el reactivo Lipofectamina (Invitrogen), induciendo con ello la producción de virus.

(2) Recuperación de las partículas del lentivirus

El cultivo de células de la línea celular productora del virus obtenida como se ha descrito anteriormente se recogió hasta 72 horas después de la co-transfección. El cultivo del sobrenadante se recogió 6 veces al sustituir el medio con un medio fresco a intervalos de 12 horas. El virus recogido se almacenó a 4°C.

(3) Titulación de las partículas del lentivirus

El sobrenadante del cultivo que contiene el virus anteriormente recogido se pasó a través de un filtro de jeringa de 0,22 micras para eliminar la suspensión de células. En una placa de 24 pocillos, se trataron células 293FT, cultivadas a una concentración celular de 1×10^4 células/ml, con 6 µg/ml de polibreno (Sigma), se infectaron con los virus preparados, y se diluyeron en serie diluidos a 10x, 1x, 0,5x, 0,25x, 0,125x, y 0,0625x.

- 5 Entonces, el número de células que expresaban EGFP se contó mediante el ensayo de FACS (FACS Calibur, BD.), o la concentración en la que la relación de las partículas de virus respecto al número de células alcanzó 1:1 fue seleccionada a través de la selección de antibióticos de puromicina. En este documento, se cuantificó el número de partículas de virus según la concentración.

10 Ejemplo 3: Infección de las células madre neurales por el lentivirus recombinante que expresaba NICD y selección de la línea celular infectada

En una placa de 24 pocillos pretratados con poli-L-ornitina, fueron tratadas células madre neuronales cultivadas a una concentración celular de 1×10^4 células/ml con 6 µg/ml de polibreno (Sigma). A continuación, las células se infectaron con el lentivirus recombinante que expresaba NICD del Ejemplo 2 en 1×10^3 unidades de transducción (TU).

- 15 A las 3 horas después del inicio de la infección, el medio que contenía el virus anterior fue sustituido por un medio fresco para el cultivo de células madre neurales, y, a continuación, las células se cultivaron durante 12 horas. Después del cultivo, se añadió 1 µg/ml del antibiótico puromicina (Sigma) al mismo, y la selección con el antibiótico se llevó a cabo durante 5 días.

Ejemplo 4: Examen de las características de las células madre neurales en las que se introduce el gen NICD

20 4-1: Examen de las células madre neurales en las cuales se introduce el gen NICD

Para la línea de las células madre neuronales transfectadas con el lentivirus recombinante que expresaban NICD, seleccionadas en el Ejemplo 3, las características de las células madre neuronales transfectadas con el gen NICD se analizaron de la misma manera que en el Ejemplo 1-2.

- 25 Como resultado, como se muestra en la figura 4, se expresaron fuertemente Musashi, nestina, Sox2 y CD133, conocidas como proteínas marcadoras específicas de las células madre neurales (Fig. 4-B).

4-2: Examen de la capacidad de las células madre neurales con el gen NICD introducido de diferenciarse

- 30 Con el fin de confirmar si las células madre neurales adultas que sobreexpresaban NICD, obtenidas como se describe anteriormente, tenían la capacidad de diferenciarse en células neurales inferiores y si la capacidad de las células para diferenciarse se mantenía durante los pasos, las células se suspendieron en un cultivo Neurobasal-A (Gibco) o cultivo DMEM:F12 (Gibco) que contenía FBS, suplemento B27 (Gibco) y suplemento N2 (Gibco), y después se cultivaron en una placa de cultivo de células, pretratadas con poli-L-ornitina (Sigma) y laminina (Sigma). A continuación, las células se cultivaron durante 1-2 semanas en un medio con Neurobasal A que contenía 10% de FBS (Gibco) o DMEM:F12 (Gibco) o en un medio Neurobasal-A (Gibco) que contenía factor de crecimiento neural (R&D), IBMX y dcAMP, induciendo así la diferenciación de las células. La expresión de proteínas marcadoras específicas de las células neuronales inferiores en las células diferenciadas se analizó mediante inmunohistoquímica de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1-3. Como resultado, se pudo ver que la capacidad de las células madre para diferenciarse se mantuvo durante todos los pasos (Fig. 4C). En la figura. 4C, GFAP: un marcador específico de astrocitos; O4: un marcador específico de oligodendrocitos; y Tuj-I: marcador específico de neuronas.

4-3: Examen de la capacidad de las células madre neurales con el gen NICD introducido de proliferar

- 40 Las células madre neuronales transfectadas con el lentivirus recombinante que expresaban NICD seleccionadas en el Ejemplo 3 se cultivaron en una placa de 24 pocillos, previamente tratada con poli-L-ornitina, a una concentración celular de 5×10^3 células/ml. A continuación, las células se trataron con la misma cantidad del reactivo CCK-8 (Dojindo) y se cultivaron en una incubadora de células con CO₂ a 5% y a 37°C durante 2-4 horas. El sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pocillos, y después se midió la absorbancia a una longitud de onda de 460 nm utilizando un lector de placas de micropocillos.

- 45 Como resultado, como se muestra en la figura 5 A, la proliferación de la línea celular que expresa NICD se aumentó significativamente en comparación con la línea celular de tipo salvaje y la línea celular que expresaba EmGFP. A continuación, se subcultivaron las células madre neurales, mientras que se observaba la misma proliferación. Se contó el número de células proliferadas, y los resultados se muestran en la figura 5-B. Como puede verse en la misma, el número acumulado de células totales fue significativamente mayor en la línea celular que expresaba NICD que en el grupo control.

Tales resultados indican que la activación de la ruta de señalización Notch por la introducción del gen NICD aumenta significativamente la capacidad de proliferar de las células madre neurales del adulto. Esto sugiere que las células

madre neurales adultas pueden proliferaron en grandes cantidades para que puedan ser utilizadas como agentes terapéuticos celulares.

Ejemplo 5 comparativo: Construcción del lentivirus recombinante que expresaba c-MET

5- 1: Preparación de un vector viral recombinante

5 En primer lugar, un gen c-MET de la SEQ ID NO: 5 se amplificó a partir de células madre neurales por RT-PCR. El ARN total se extrajo de las células madre neurales del Ejemplo 1 usando el kit RNeasy (Qiagen), y después se trató con transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen) para sintetizar ADNc que se utilizó a continuación como plantilla para la amplificación por PCR. El gen EmGFP (Invitrogen) se amplificó a partir de un vector pLenti6.3/V5-GW/EmGFP (Invitrogen) mediante PCR. Los cebadores utilizados para la amplificación de los dos genes contenían una secuencia CACC con el fin de iniciar la expresión de los aminoácidos en un vector de lentivirus. Específicamente, los cebadores tenían las siguientes secuencias:

Cebador directo: CACCGGTACCATGAAGGCCCGCTGTGC (SEQ ID NO: 7)

Cebador inverso: GCGGCCGCTATGATGTCTCCAGAAGGAGG (SEQ ID NO: 8)

15 La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; 15 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 60°C durante 30 seg, y amplificación a 72°C durante 3 min; amplificación final a 72°C durante 10 min. El producto de la PCR amplificado se clonó en un vector pENTR-D-TOPO (Invitrogen).

20 También, para la expresión estable del gen introducido en las células madre neurales, la región promotora del gen de la ubiquitina C humana (UbC) se amplificó por PCR a partir de un vector pLenti6/UbC/V5-DEST (Invitrogen). Los cebadores usados en esta amplificación PCR contenían las secuencias de las enzimas de restricción ClaI y SpeI para facilitar la clonación. La región del promotor amplificado anteriormente del gen UbC se clonó en un vector pGEM-T easy (Promega), y después se trató con las enzimas de restricción ClaI y SpeI, obteniendo así un fragmento del gen. Además, la región del promotor CMV de un vector pLenti7.3/V5-DEST (Invitrogen) se eliminó usando las mismas enzimas de restricción, obteniéndose así un fragmento del vector. A continuación, el fragmento del gen y el fragmento del vector fueron tratados con ligasa (Promega), obteniendo de este modo un vector de expresión insertado con el promotor UbC.

30 Para insertar un gen reportero, el vector se trató con una enzima de restricción KpnI para obtener un fragmento del vector, y un vector pSuper-retro (Oligoengine) se trató con la misma enzima de restricción para obtener un promotor de expresión antibiótico y un fragmento del gen. A continuación, el fragmento del gen y el fragmento del vector fueron tratados con ligasa (Promega), obteniendo de este modo un vector de expresión insertado con el promotor UbC. Los genes cMet y EmGFP se transfirieron al vector de expresión obtenido usando LR clonasa (Invitrogen), obteniendo de este modo un vector de expresión final.

Las estructuras del vector del lentivirus que expresaba c-MET y del vector del lentivirus que expresaba EmGFP preparados como se describe anteriormente se muestran en la figura 6A.

35 5-2: Preparación del vector lentiviral recombinante que expresa c-MET

40 Como una línea celular de empaquetamiento del virus, se utilizó la línea celular 293FT (Invitrogen). La línea celular 293FT fue co-transfectada con el vector que sobreexpresaba c-MET, construido en el Ejemplo 2-1, y con tres vectores asociados al empaquetamiento del virus (PLP-1, el PLP-2, y pLP/VSVG; Invitrogen), utilizando reactivo de lipofectamina (Invitrogen), induciendo así la producción del virus. Además, se utilizó el vector recombinante que expresaba EmGFP de la misma manera, lo que induce la producción de VIMS.

La recogida y la valoración de las partículas del lentivirus se realizaron de la misma manera que en los Ejemplos 2-2 y 2-3.

Ejemplo 6 comparativo: Infección de las células madre neurales mediante el lentivirus recombinante que expresa c-MET y selección de la línea celular infectada

45 Las células madre neurales fueron cultivadas en una placa de 24 pocillos, pretratados con poli-L-ornitina, a una concentración celular de 1×10^4 células/ml. Las células cultivadas se trataron con 6 $\mu\text{g/ml}$ de polibreno (Sigma). A continuación, las células se infectaron con el lentivirus recombinante que expresaba c-MET, preparado en el Ejemplo 2, en 1×10^3 unidades de transducción (TU).

50 A las 3 horas después del inicio de la infección, el medio que contenía el virus anterior fue sustituido por un medio fresco para el cultivo de células madre neurales, a continuación, las células se cultivaron durante 12 horas. Después del cultivo, se añadió 1 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico puromicina (Sigma) a las células, y la selección por el antibiótico se llevó a cabo durante 5 días.

Ejemplo 7 comparativo: Examen de las características de las células madre neurales en las que se introduce el gen C-MET

7-1: Examen de las características de las células madre neurales en las que se introduce el gen C-MET

5 Para la línea de las células madre neuronales transfectadas con el lentivirus recombinante que expresaba c-MET, seleccionado en el Ejemplo 5, las características de las células madre neuronales transfectadas con el gen c-MET se examinaron de la manera que se describe en los Ejemplos 1 y 2.

Como resultado, como se muestra en la figura 6, se expresaron fuertemente Musashi, nestina, Sox2 y CD133, conocidas como proteínas marcadoras específicas de las células madre neurales (Fig. 6B).

7-2: Examen de la capacidad de las células madre neurales con el gen c-MET introducido para diferenciarse

10 Con el fin de confirmar si las células madre neurales adultas que sobreexpresaban c-MET obtenidas como se describió anteriormente tenían la capacidad de diferenciarse en células neuronales inferiores y si la capacidad de diferenciación se mantenía durante el período de subcultivo, las células se suspendieron en un medio Neurobasal-A (Gibco) o medio DMEM:F12 (Gibco) que contiene FBS, suplemento B27 (Gibco) y suplemento N2 (Gibco), y se cultivaron en una placa de cultivo de células pretratadas con poli-L-ornitina (Sigma) y laminina (Sigma).
 15 A continuación, las células se cultivaron durante 1-2 semanas en un cultivo con Neurobasal-A que contenía 10% de FBS (Gibco) o cultivo DMEM:F12 (Gibco) o un medio Neurobasal-A (Gibco) que contiene el factor de crecimiento neuronal (R&D), IBMX y dcAMP, induciendo así la diferenciación de las células. La expresión de proteínas marcadoras específicas de las células neuronales inferiores en las células diferenciadas se analizó mediante inmunohistoquímica de la misma manera que en el Ejemplo 1-3. Como resultado, se encontró que la capacidad de
 20 las células para diferenciarse se mantuvo durante el período del subcultivo (Fig. 6C). En la figura 6C, GFAP: un marcador específico de astrocitos; 04: un marcador específico de oligodendrocitos; y Tuji: un marcador específico de neuronas.

7-3: Examen de la capacidad de las células madre neurales con el gen c-MET introducido de proliferar

25 Para las células madre neuronales transfectadas con el lentivirus recombinante que expresaba c-MET o con el lentivirus recombinante que expresaba EmGFP, seleccionadas en el Ejemplo 5, se añadió HGF a un medio de cultivo celular a una concentración de 10-1.000 µg/ml para cada grupo celular. Entonces, las células se cultivaron en una placa de 24 pocillos, pretratados con poli-L-ornitina, a una concentración celular de 5×10^3 células/ml en un incubador de 5% de CO₂ a 37°C. Para medir la capacidad de proliferar de las células, el medio se trató con la misma cantidad del reactivo CCK-8 (Dojindo). Después de 2-4 horas del cultivo de las células, el sobrenadante del cultivo
 30 se transfirió a una placa de 96 pocillos, y la absorbancia a una longitud de onda de 460 nm se midió utilizando un lector de placas de micropocillos.

Como resultado, como se muestra en la figura 7-A, la proliferación de las células fue significativamente mayor en la línea celular de que expresaba c-MET que en líneas celulares tipo salvaje y que expresaban EmGFP.

35 A continuación, se subcultivaron las células madre neurales, mientras que se observó la misma proliferación. Se contó el número de células proliferadas, y los resultados se muestran en la figura 7-B. Como puede verse en la misma, el número acumulado de células totales fue significativamente mayor en la línea celular de que expresaba c-MET que en el grupo control.

40 A partir de tales resultados, se pudo ver que la activación de la ruta de señalización de c-MET/HGF aumentó significativamente la capacidad de las células madre neurales adultas a proliferar. Esto sugiere que las células madre neurales adultas pueden proliferar en grandes cantidades para que puedan ser utilizadas como agentes terapéuticos celulares.

45 En los ejemplos anteriores, las células madre en las que se activó la ruta de señalización de c-Met/HGF se prepararon mediante el tratamiento de las células transfectadas con genes c-Met con el ligando HGF. Sin embargo, será evidente para cualquier persona de experiencia ordinaria en la técnica que las células madre en las que se activa la ruta de señalización de c-Met/HGF se pueden preparar mediante la introducción del gen c-Met y el gen de HGF al mismo tiempo y expresando el gen de HGF en las células. La introducción del gen de HGF se puede lograr utilizando retrovirus, adenovirus, virus del herpes, virus Epstein-Barr, lentivirus o similares, como un vector, de una manera similar a la introducción del gen de c-MET.

50 **Aplicabilidad Industrial**

Según la presente invención, como resultado de la activación de la ruta de señalización Notch, pueden ser producidas en grandes cantidades células madre que tienen una excelente capacidad de proliferar. En particular, las células madre neurales que han sido difíciles de cultivar in vitro pueden proliferar en grandes cantidades, y por lo

tanto las células madre neurales serán más útiles para la preparación de agentes terapéuticos celulares para el tratamiento de enfermedades de los nervios craneales.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Samsung Life Welfare Foundation
- 5 <120> Método para provocar la proliferación de células madre mediante la activación de la señalización de genes
- <130> PP-B0968
- <150> KR10-2010-0010116
- 10 <151> 03-02-2010
- <150> KR10-2010-0010117
- <151> 03-02-2010
- 15 <160> 8
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- 20 <211> 2395
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

```

<400> 1
caccatgctgg cggcagcatg gccagctctg gttccctgag ggcttcaaag tgtctgaggc      60
cagcaagaag aagcggcggg agcccctcgg cgaggactcc gtgggcctca agcccctgaa      120
gaacgcttca gacggtgccc tcatggacga caaccagaat gagtgggggg acgaggacct      180
ggagaccaag aagttccggg tggaggagcc cgtgggttctg cctgacctgg acgaccagac      240
agaccaccgg cagtggactc agcagcacct ggatgccgct gacctgcgca tgtctgccat      300
ggccccca cgcgccaggt gtgagggtga cgcggactgc atggacgtca atgtccgcgg      360
gcctgatggc ttcacccgcg tcatgatcgc ctctgcagc gggggcggcc tggagacggg      420
caacagcgag gaagaggagg acgcgccggc cgtcatctcc gacttcatct accagggcgc      480
cagcctgcac aaccagacag accgcacggg cgagaccgcc ttgcacctgg ccgcccgcta      540
ctcacgctct gatgccgcca agcgcctgct ggaggccagc gcagatgcca acatccagga      600
caacatgggc cgcacccgcg tgcattgggc tgtgtctgcc gacgcacaag gtgtcttcca      660
gatcctgatc cggaaaccgag ccacagacct ggatgcccgc atgcatgatg gcacgacgcc      720
actgatcctg gctgcccgcc tggccgtgga gggcatgctg gaggacctca tcaactcaca      780
cgccgacgtc aacgccgtag atgacctggg caagtccgcc ctgactggg ccgccgccgt      840
gaacaatgtg gatgccgag ttgtgctcct gaagaacggg gctaacaaag atatgcagaa      900
caacagggag gagacacccc tgtttctggc cgcgccggag ggcagctacg agaccgcaa      960
ggtgctgctg gaccactttg ccaaccggga catcacggat catatggacc gcctgccgcg      1020
cgacatcgca caggagcgca tgcattcacga catcgtgagg ctgctggacg agtacaacct      1080
ggtgctgacg ccgcagctgc acggagcccc gctggggggc acgcccaccc tgtcgcccc      1140
gctctgctcg cccaacggct acctgggcag cctcaagccc ggcgtgcagg gcaagaaggt      1200

```

ES 2 606 544 T3

ccgcaagccc agcagcaaag gcctggcctg tgggaagcaag gaggccaagg acctcaaggc 1260
 acggaggaag aagtcccagg acggcaaggg ctgcctgctg gacagctccg gcatgctctc 1320
 gcccggtggac tccctggagt caccocatgg ctacctgtca gacgtggcct cgccgccact 1380
 gctgccctcc ccgttccagc agtctccgtc cgtgcccctc aaccacctgc ctgggatgcc 1440
 cgacaccacac ctgggcatcg ggcacctgaa cgtggcggcc aagcccgaga tggcggcgct 1500
 ggggtgggggc ggccggctgg cctttgagac tggcccacct cgtctctccc acctgcctgt 1560
 ggctctggc accagcaccg tcctgggctc cagcagcggga ggggccctga atttcaactgt 1620
 gggcgggtcc accagtttga atggtcaatg cgagtggctg tcccggctgc agagcggcat 1680
 ggtgccgaac caatacaacc ctctgccccg gagtgtggca ccaggccccc tgagcacaca 1740
 ggccccctcc ctgcagcatg gcatggtagg cccgctgcac agtagccttg ctgccagcgc 1800
 cctgtcccag atgatgagct accagggcct gccagcacc cggctggcca cccagcctca 1860
 cctggtgcag acccagcagg tgcagccaca aaacttacag atgcagcagc agaacctgca 1920
 gccagcaaac atccagcagc agcaaagcct gcagccgcca ccaccaccac cacagccgca 1980
 ccttggcgtg agctcagcag ccagcggcca cctgggcccg agcttctga gtggagagcc 2040
 gagccaggca gacgtgcagc cactgggccc cagcagcctg gcggtgcaca ctattctgcc 2100
 ccaggagagc cccgccctgc ccacgtcgt gcatcctcg ctggtcccac ccgtgaccgc 2160
 agcccagttc ctgacgcccc cctcgcagca cagctactcc tcgcctgtgg acaacacccc 2220
 cagccaccag ctacaggtgc ctgagcacc cttcctcacc ccgtcccctg agtcccctga 2280
 ccagtggctc agctcgtccc cgcattccaa cgtctccgac tgggtccgagg gcgtctccag 2340
 ccctcccacc agcatgcagt cccagatcgc ccgcattccg gaggccttca agtaa 2395

<210> 2
 <211> 795
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2
 Arg Arg Gln His Gly Gln Leu Trp Phe Pro Glu Gly Phe Lys Val Ser
 1 5 10 15
 Glu Ala Ser Lys Lys Lys Arg Arg Glu Pro Leu Gly Glu Asp Ser Val
 20 25 30
 Gly Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ala Ser Asp Gly Ala Leu Met Asp Asp
 35 40 45
 Asn Gln Asn Glu Trp Gly Asp Glu Asp Leu Glu Thr Lys Lys Phe Arg
 50 55 60
 Phe Glu Glu Pro Val Val Leu Pro Asp Leu Asp Asp Gln Thr Asp His
 65 70 75 80
 Arg Gln Trp Thr Gln Gln His Leu Asp Ala Ala Asp Leu Arg Met Ser

ES 2 606 544 T3

85					90					95					
Ala	Met	Ala	Pro	Thr	Pro	Pro	Gln	Gly	Glu	Val	Asp	Ala	Asp	Cys	Met
		100						105					110		
Asp	Val	Asn	Val	Arg	Gly	Pro	Asp	Gly	Phe	Thr	Pro	Leu	Met	Ile	Ala
		115					120					125			
Ser	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Glu	Thr	Gly	Asn	Ser	Glu	Glu	Glu	Glu
	130					135					140				
Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Ile	Ser	Asp	Phe	Ile	Tyr	Gln	Gly	Ala	Ser	Leu
145					150					155					160
His	Asn	Gln	Thr	Asp	Arg	Thr	Gly	Glu	Thr	Ala	Leu	His	Leu	Ala	Ala
				165					170					175	
Arg	Tyr	Ser	Arg	Ser	Asp	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu	Leu	Glu	Ala	Ser	Ala
			180					185					190		
Asp	Ala	Asn	Ile	Gln	Asp	Asn	Met	Gly	Arg	Thr	Pro	Leu	His	Ala	Ala
		195					200					205			
Val	Ser	Ala	Asp	Ala	Gln	Gly	Val	Phe	Gln	Ile	Leu	Ile	Arg	Asn	Arg
	210					215					220				
Ala	Thr	Asp	Leu	Asp	Ala	Arg	Met	His	Asp	Gly	Thr	Thr	Pro	Leu	Ile
225					230					235					240
Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	Ala	Val	Glu	Gly	Met	Leu	Glu	Asp	Leu	Ile	Asn
				245					250					255	
Ser	His	Ala	Asp	Val	Asn	Ala	Val	Asp	Asp	Leu	Gly	Lys	Ser	Ala	Leu
			260					265					270		
His	Trp	Ala	Ala	Ala	Val	Asn	Asn	Val	Asp	Ala	Ala	Val	Val	Leu	Leu
		275					280					285			
Lys	Asn	Gly	Ala	Asn	Lys	Asp	Met	Gln	Asn	Asn	Arg	Glu	Glu	Thr	Pro
	290					295					300				
Leu	Phe	Leu	Ala	Ala	Arg	Glu	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Ala	Lys	Val	Leu
305					310					315					320
Leu	Asp	His	Phe	Ala	Asn	Arg	Asp	Ile	Thr	Asp	His	Met	Asp	Arg	Leu
				325					330					335	
Pro	Arg	Asp	Ile	Ala	Gln	Glu	Arg	Met	His	His	Asp	Ile	Val	Arg	Leu
			340					345					350		
Leu	Asp	Glu	Tyr	Asn	Leu	Val	Arg	Ser	Pro	Gln	Leu	His	Gly	Ala	Pro
		355					360					365			
Leu	Gly	Gly	Thr	Pro	Thr	Leu	Ser	Pro	Pro	Leu	Cys	Ser	Pro	Asn	Gly
	370					375					380				
Tyr	Leu	Gly	Ser	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Gln	Gly	Lys	Lys	Val	Arg	Lys
385					390					395					400
Pro	Ser	Ser	Lys	Gly	Leu	Ala	Cys	Gly	Ser	Lys	Glu	Ala	Lys	Asp	Leu
				405					410					415	
Lys	Ala	Arg	Arg	Lys	Lys	Ser	Gln	Asp	Gly	Lys	Gly	Cys	Leu	Leu	Asp

ES 2 606 544 T3

	755	760	765	
	Val Ser Asp Trp Ser Glu Gly	Val Ser Ser Pro Pro Thr Ser Met Gln		
	770	775	780	
	Ser Gln Ile Ala Arg Ile Pro Glu Ala Phe Lys			
	785	790	795	
5	<210> 3			
	<211> 25			
	<212> ADN			
	<213> Secuencia Artificial			
	<220>			
	<223> Cebador de NICD sentido			
	<400> 3			
10	caccatgagg cggcagcatg gccag			25
	<210> 4			
	<211> 22			
	<212> ADN			
15	<213> Secuencia Artificial			
	<220>			
	<223> Cebador de NICD anti-sentido			
	<400> 4			
20	ttacttgaag gcctccgaa tg			22
	<210> 5			
	<211> 4173			
	<212> ADN			
25	<213> Homo sapiens			
	<400> 5			
	atgaaggccc ccgctgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tcctgtttac cttgggtgcag			60
	aggagcaatg gggagtgtaa agaggcacta gcaaagtccg agatgaatgt gaatatgaag			120
	tatcagcttc ccaacttcac cgcggaaaca cccatccaga atgtcattct acatgagcat			180
	cacattttcc ttggtgccac taactacatt tatgttttaa atgaggaaga ccttcagaag			240
	gttgetgagt acaagactgg gcctgtgctg gaacaccag attgtttccc atgtcaggac			300
	tgcagcagca aagccaattt atcaggaggt gtttgaaag ataacatcaa catggctcta			360
	gttgtcgaca cctactatga tgatcaactc attagctgtg gcagcgtcaa cagagggacc			420
	tgccagcgac atgtctttcc ccacaatcat actgctgaca tacagtcgga ggttcactgc			480
	atattctccc cacagataga agagcccagc cagtgtcctg actgtgtggt gagcgcctg			540
	ggagccaaag tcctttcatc tgtaaaggac cggttcatca acttctttgt aggcaatacc			600
	ataaattctt cttattttccc agatcatcca ttgcattcga tatcagtgag aaggctaaag			660

ES 2 606 544 T3

gaaacgaaag atggttttat gtttttgacg gaccagtcct acattgatgt tttacctgag 720
 ttcagagatt ottaccccat taagtatgtc catgcctttg aaagcaacaa ttttatttac 780
 ttcttgacg tccaaagga aactctagat gctcagactt ttcacacaag aataatcagg 840
 ttctgttcca taaactctgg attgcattcc tacatggaaa tgcctctgga gtgtattctc 900
 acagaaaaga gaaaaaagag atccacaaag aaggaagtgt ttaatatact tcaggctgag 960
 tatgtcagca agcctggggc ccagcttgct agacaaatag gagccagcct gaatgatgac 1020
 attcctttcg ggggtgttcg acaaagcaag ccagattctg ccgaaccaat ggatcgatct 1080
 gccatgtgtg cattccctat caaatatgtc aacgacttct tcaacaagat cgtcaacaaa 1140
 aacaatgtga gatgtctcca gcatttttac ggaccaatc atgagcactg ctttaatagg 1200
 acacttctga gaaattcatc aggctgtgaa gcgcgccgtg atgaatatcg aacagagttt 1260
 accacagctt tgcagcgcgt tgacttattc atgggtcaat tcagcgaagt cctcttaaca 1320
 tctatatcca ccttcattaa aggagacctc accatagcta atcttgggac atcagagggt 1380
 cgcttcatgc aggttgtggt ttctcgatca ggaccatcaa cccctcatgt gaattttctc 1440
 ctggactccc atccagtgtc tccagaagtg attgtggagc atacattaaa ccaaatggc 1500
 tacacactgg ttatcactgg gaagaagatc acgaagatcc cattgaatgg cttgggctgc 1560
 agacatttcc agtcctgcag tcaatgcctc tctgccccac cctttgttca gtgtggctgg 1620
 tgccacgaca aatgtgtgag atcggaggaa tgcctgagcg ggacatggac tcaacagatc 1680
 tgtctgcctg caatctacaa ggttttccca aatagtgcac cccttgaagg agggacaagg 1740
 ctgaccatat gtggctggga ctttgattt cggaggaata ataaattga tttaaagaaa 1800
 actagagttc tccttgaaa tgagagctgc accttgactt taagtgagag cacgatgaat 1860
 acattgaaat gcacagttgg tcctgccatg aataagcatt tcaatatgtc cataattatt 1920
 tcaaatggcc acgggacaac acaatacagt acattctcct atgtggatcc tgtaataaca 1980
 agtatttcgc cgaaatacgg tcctatggct ggtggcactt tacttacttt aactggaaat 2040
 tacctaaca gtgggaattc tagacacatt tcaattggtg gaaaaacatg tactttaaaa 2100
 agtgtgtcaa acagtattct tgaatgttat accccagccc aaaccatttc aactgagttt 2160
 gctgttaaat tgaaaattga cttagccaac cgagagacaa gcatcttcag ttaccgtgaa 2220
 gatcccatg tctatgaaat tcatccaacc aaatcttita ttagtgggtg gagcacaata 2280
 acaggtgttg ggaaaaacct gaattcagtt agtgtcccga gaatggatcat aaatgtgcat 2340
 gaagcaggaa ggaactttac agtggcatgt caacatcgct ctaattcaga gataatctgt 2400
 tgtaccactc cttccctgca acagctgaat ctgcaactcc ccctgaaaac caaagccttt 2460
 ttcatgtag atgggatcct ttccaaatac tttgatctca tttatgtaca taatcctgtg 2520
 tttaaagcctt ttgaaaagcc agtgatgatc tcaatgggca atgaaaatgt actggaaatt 2580

ES 2 606 544 T3

aagggaaatg atattgaccc tgaagcagtt aaaggtgaag tgttaaaagt tggaaataag 2640
 agctgtgaga atatacactt acattctgaa gccgttttat gcacgggcc caatgacctg 2700
 ctgaaattga acagcgagct aaatatagag tggaagcaag caatttcttc aaccgtcctt 2760
 ggaaaagtaa tagttcaacc agatcagaat ttcacaggat tgattgctgg tgttgtctca 2820
 atatcaacag cactggttatt actacttggg tttttcctgt ggctgaaaa gagaaagcaa 2880
 attaaagatc tgggcagtga attagttcgc tacgatgcaa gagtacacac tcctcatttg 2940
 gataggcttg taagtgcccg aagtgtaagc ccaactacag aaatggtttc aaatgaatct 3000
 gtagactacc gagctacttt tccagaagat cagtttccta attcatctca gaacggttca 3060
 tgccgacaag tgcagtatcc tctgacagac atgtcccca tcctaactag tggggactct 3120
 gatatatcca gtccattact gcaaaatact gtccacattg acctcagtgc tctaaatcca 3180
 gagctgggcc aggcagtgca gcatgtagtg attgggcccc gtagcctgat tgtgcatttc 3240
 aatgaagtca taggaagagg gcattttggt tgtgtatatc atgggacttt gttggacaat 3300
 gatggcaaga aaattcactg tgctgtgaaa tccttgaaca gaatcactga cataggagaa 3360
 gtttcccaat ttctgaccga gggaatcatc atgaaagatt ttagtcatcc caatgtcctc 3420
 tcgctcctgg gaatctgcct gcgaagtgaa gggctcctcg tggtggctcct accatacatg 3480
 aaacatggag atcttcgaaa tttcattcga aatgagactc ataatccaac tgtaaaagat 3540
 cttattggct ttggtcttca agtagccaaa ggcatgaaat atcttgcaag caaaaagttt 3600
 gtccacagag acttggtctg aagaaactgt atgctggatg aaaaattcac agtcaaggtt 3660
 gctgattttg gtcttgccag agacatgtat gataaagaat actatagtgt acacaacaaa 3720
 acaggtgcaa agctgccagt gaagtggatg gctttggaaa gtctgcaaac tcaaaaagttt 3780
 accaccaagt cagatgtgtg gtcccttggc gtgctcctct gggagctgat gacaagagga 3840
 gccccacctt atcctgacgt aacacacctt gatataactg tttacttgtt gcaagggaga 3900
 agactcctac aaccgaata ctgccagac cccttatatg aagtaatgct aaaatgctgg 3960
 caccctaaag ccgaaatgcg cccatccttt tctgaactgg tgtccggat atcagcgatc 4020
 ttctctactt tcattgggga gcaactatgt catgtgaacg ctacttatgt gaacgtaaaa 4080
 tgtgtcgctc cgtatccttc tctgttgca tcagaagata acgctgatga tgaggtggac 4140
 acacgaccag cctccttctg ggagacatca tag 4173

<210> 6
 <211> 1390
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe

5

ES 2 606 544 T3

1				5					10					15			
Thr	Leu	Val	Gln	Arg	Ser	Asn	Gly	Glu	Cys	Lys	Glu	Ala	Leu	Ala	Lys		
			20					25					30				
Ser	Glu	Met	Asn	Val	Asn	Met	Lys	Tyr	Gln	Leu	Pro	Asn	Phe	Thr	Ala		
		35					40					45					
Glu	Thr	Pro	Ile	Gln	Asn	Val	Ile	Leu	His	Glu	His	His	Ile	Phe	Leu		
	50					55					60						
Gly	Ala	Thr	Asn	Tyr	Ile	Tyr	Val	Leu	Asn	Glu	Glu	Asp	Leu	Gln	Lys		
65					70					75					80		
Val	Ala	Glu	Tyr	Lys	Thr	Gly	Pro	Val	Leu	Glu	His	Pro	Asp	Cys	Phe		
				85					90					95			
Pro	Cys	Gln	Asp	Cys	Ser	Ser	Lys	Ala	Asn	Leu	Ser	Gly	Gly	Val	Trp		
			100					105					110				
Lys	Asp	Asn	Ile	Asn	Met	Ala	Leu	Val	Val	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Asp		
		115					120						125				
Gln	Leu	Ile	Ser	Cys	Gly	Ser	Val	Asn	Arg	Gly	Thr	Cys	Gln	Arg	His		
	130					135						140					
Val	Phe	Pro	His	Asn	His	Thr	Ala	Asp	Ile	Gln	Ser	Glu	Val	His	Cys		
145					150					155					160		
Ile	Phe	Ser	Pro	Gln	Ile	Glu	Glu	Pro	Ser	Gln	Cys	Pro	Asp	Cys	Val		
				165					170					175			
Val	Ser	Ala	Leu	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Ser	Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe		
			180					185					190				
Ile	Asn	Phe	Phe	Val	Gly	Asn	Thr	Ile	Asn	Ser	Ser	Tyr	Phe	Pro	Asp		
		195					200						205				
His	Pro	Leu	His	Ser	Ile	Ser	Val	Arg	Arg	Leu	Lys	Glu	Thr	Lys	Asp		
	210					215						220					
Gly	Phe	Met	Phe	Leu	Thr	Asp	Gln	Ser	Tyr	Ile	Asp	Val	Leu	Pro	Glu		
225					230					235					240		
Phe	Arg	Asp	Ser	Tyr	Pro	Ile	Lys	Tyr	Val	His	Ala	Phe	Glu	Ser	Asn		
				245					250					255			
Asn	Phe	Ile	Tyr	Phe	Leu	Thr	Val	Gln	Arg	Glu	Thr	Leu	Asp	Ala	Gln		
			260					265					270				
Thr	Phe	His	Thr	Arg	Ile	Ile	Arg	Phe	Cys	Ser	Ile	Asn	Ser	Gly	Leu		
		275					280						285				
His	Ser	Tyr	Met	Glu	Met	Pro	Leu	Glu	Cys	Ile	Leu	Thr	Glu	Lys	Arg		
	290					295						300					
Lys	Lys	Arg	Ser	Thr	Lys	Lys	Glu	Val	Phe	Asn	Ile	Leu	Gln	Ala	Ala		
305					310					315					320		
Tyr	Val	Ser	Lys	Pro	Gly	Ala	Gln	Leu	Ala	Arg	Gln	Ile	Gly	Ala	Ser		
				325					330					335			
Leu	Asn	Asp	Asp	Ile	Leu	Phe	Gly	Val	Phe	Ala	Gln	Ser	Lys	Pro	Asp		

ES 2 606 544 T3

340					345					350					
Ser	Ala	Glu	Pro	Met	Asp	Arg	Ser	Ala	Met	Cys	Ala	Phe	Pro	Ile	Lys
		355					360					365			
Tyr	Val	Asn	Asp	Phe	Phe	Asn	Lys	Ile	Val	Asn	Lys	Asn	Asn	Val	Arg
	370					375					380				
Cys	Leu	Gln	His	Phe	Tyr	Gly	Pro	Asn	His	Glu	His	Cys	Phe	Asn	Arg
385					390					395					400
Thr	Leu	Leu	Arg	Asn	Ser	Ser	Gly	Cys	Glu	Ala	Arg	Arg	Asp	Glu	Tyr
				405					410					415	
Arg	Thr	Glu	Phe	Thr	Thr	Ala	Leu	Gln	Arg	Val	Asp	Leu	Phe	Met	Gly
			420					425					430		
Gln	Phe	Ser	Glu	Val	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Phe	Ile	Lys	Gly
		435					440					445			
Asp	Leu	Thr	Ile	Ala	Asn	Leu	Gly	Thr	Ser	Glu	Gly	Arg	Phe	Met	Gln
	450					455					460				
Val	Val	Val	Ser	Arg	Ser	Gly	Pro	Ser	Thr	Pro	His	Val	Asn	Phe	Leu
465					470					475					480
Leu	Asp	Ser	His	Pro	Val	Ser	Pro	Glu	Val	Ile	Val	Glu	His	Thr	Leu
				485					490					495	
Asn	Gln	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Val	Ile	Thr	Gly	Lys	Lys	Ile	Thr	Lys
			500					505					510		
Ile	Pro	Leu	Asn	Gly	Leu	Gly	Cys	Arg	His	Phe	Gln	Ser	Cys	Ser	Gln
		515					520					525			
Cys	Leu	Ser	Ala	Pro	Pro	Phe	Val	Gln	Cys	Gly	Trp	Cys	His	Asp	Lys
	530					535					540				
Cys	Val	Arg	Ser	Glu	Glu	Cys	Leu	Ser	Gly	Thr	Trp	Thr	Gln	Gln	Ile
545					550					555					560
Cys	Leu	Pro	Ala	Ile	Tyr	Lys	Val	Phe	Pro	Asn	Ser	Ala	Pro	Leu	Glu
				565					570					575	
Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Ile	Cys	Gly	Trp	Asp	Phe	Gly	Phe	Arg	Arg
			580					585					590		
Asn	Asn	Lys	Phe	Asp	Leu	Lys	Lys	Thr	Arg	Val	Leu	Leu	Gly	Asn	Glu
		595					600					605			
Ser	Cys	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Glu	Ser	Thr	Met	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys
	610					615					620				
Thr	Val	Gly	Pro	Ala	Met	Asn	Lys	His	Phe	Asn	Met	Ser	Ile	Ile	Ile
625					630					635					640
Ser	Asn	Gly	His	Gly	Thr	Thr	Gln	Tyr	Ser	Thr	Phe	Ser	Tyr	Val	Asp
				645					650					655	
Pro	Val	Ile	Thr	Ser	Ile	Ser	Pro	Lys	Tyr	Gly	Pro	Met	Ala	Gly	Gly
			660					665					670		
Thr	Leu	Leu	Thr	Leu	Thr	Gly	Asn	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Asn	Ser	Arg

ES 2 606 544 T3

	675					680						685			
His	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Lys	Thr	Cys	Thr	Leu	Lys	Ser	Val	Ser	Asn
	690					695					700				
Ser	Ile	Leu	Glu	Cys	Tyr	Thr	Pro	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Thr	Glu	Phe
705					710					715					720
Ala	Val	Lys	Leu	Lys	Ile	Asp	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Thr	Ser	Ile	Phe
				725					730						735
Ser	Tyr	Arg	Glu	Asp	Pro	Ile	Val	Tyr	Glu	Ile	His	Pro	Thr	Lys	Ser
			740					745					750		
Phe	Ile	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile	Thr	Gly	Val	Gly	Lys	Asn	Leu	Asn
		755					760					765			
Ser	Val	Ser	Val	Pro	Arg	Met	Val	Ile	Asn	Val	His	Glu	Ala	Gly	Arg
	770					775					780				
Asn	Phe	Thr	Val	Ala	Cys	Gln	His	Arg	Ser	Asn	Ser	Glu	Ile	Ile	Cys
785					790					795					800
Cys	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Gln	Gln	Leu	Asn	Leu	Gln	Leu	Pro	Leu	Lys
				805					810						815
Thr	Lys	Ala	Phe	Phe	Met	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu	Ser	Lys	Tyr	Phe	Asp
			820					825					830		
Leu	Ile	Tyr	Val	His	Asn	Pro	Val	Phe	Lys	Pro	Phe	Glu	Lys	Pro	Val
		835					840					845			
Met	Ile	Ser	Met	Gly	Asn	Glu	Asn	Val	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Asn	Asp
	850					855					860				
Ile	Asp	Pro	Glu	Ala	Val	Lys	Gly	Glu	Val	Leu	Lys	Val	Gly	Asn	Lys
865					870					875					880
Ser	Cys	Glu	Asn	Ile	His	Leu	His	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Cys	Thr	Val
				885					890						895
Pro	Asn	Asp	Leu	Leu	Lys	Leu	Asn	Ser	Glu	Leu	Asn	Ile	Glu	Trp	Lys
			900					905					910		
Gln	Ala	Ile	Ser	Ser	Thr	Val	Leu	Gly	Lys	Val	Ile	Val	Gln	Pro	Asp
		915					920						925		
Gln	Asn	Phe	Thr	Gly	Leu	Ile	Ala	Gly	Val	Val	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala
	930					935					940				
Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Phe	Phe	Leu	Trp	Leu	Lys	Lys	Arg	Lys	Gln
945					950					955					960
Ile	Lys	Asp	Leu	Gly	Ser	Glu	Leu	Val	Arg	Tyr	Asp	Ala	Arg	Val	His
				965					970						975
Thr	Pro	His	Leu	Asp	Arg	Leu	Val	Ser	Ala	Arg	Ser	Val	Ser	Pro	Thr
			980					985						990	
Thr	Glu	Met	Val	Ser	Asn	Glu	Ser	Val	Asp	Tyr	Arg	Ala	Thr	Phe	Pro
		995					1000					1005			
Glu	Asp	Gln	Phe	Pro	Asn	Ser	Ser	Gln	Asn	Gly	Ser	Cys	Arg	Gln	Val

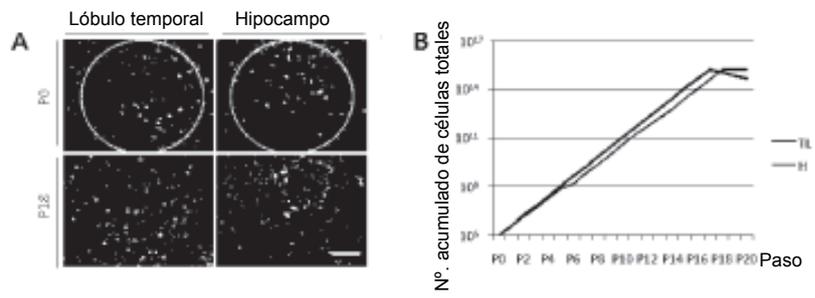
ES 2 606 544 T3

1010			1015			1020		
Gln Tyr Pro	Leu Thr Asp	Met Ser Pro	Ile Leu Thr	Ser Gly Asp	Ser			
1025	1030		1035		1040			
Asp Ile Ser	Ser Pro Leu	Leu Leu Gln	Asn Thr Val	His Ile Asp	Leu Ser			
	1045		1050		1055			
Ala Leu Asn	Pro Glu Leu	Val Gln Ala	Val Gln His	Val Val Ile	Gly			
	1060		1065		1070			
Pro Ser Ser	Leu Ile Val	His Phe Asn	Glu Val Ile	Gly Arg Gly	His			
	1075		1080		1085			
Phe Gly Cys	Val Tyr His	Gly Thr Leu	Leu Asp Asn	Asp Gly Lys	Lys			
1090		1095		1100				
Ile His Cys	Ala Val Lys	Ser Leu Asn	Arg Ile Thr	Asp Ile Gly	Glu			
1105		1110		1115	1120			
Val Ser Gln	Phe Leu Thr	Glu Gly Ile	Ile Met Lys	Asp Phe Ser	His			
	1125		1130		1135			
Pro Asn Val	Leu Ser Leu	Leu Gly Ile	Cys Leu Arg	Ser Glu Gly	Ser			
	1140		1145		1150			
Pro Leu Val	Val Leu Pro	Tyr Met Lys	His Gly Asp	Leu Arg Asn	Phe			
	1155		1160		1165			
Ile Arg Asn	Glu Thr His	Asn Pro Thr	Val Lys Asp	Leu Ile Gly	Phe			
1170		1175		1180				
Gly Leu Gln	Val Ala Lys	Gly Met Lys	Tyr Leu Ala	Ser Lys Lys	Phe			
1185		1190		1195	1200			
Val His Arg	Asp Leu Ala	Ala Arg Asn	Cys Met Leu	Asp Glu Lys	Phe			
	1205		1210		1215			
Thr Val Lys	Val Ala Asp	Phe Gly Leu	Ala Arg Asp	Met Tyr Asp	Lys			
	1220		1225		1230			
Glu Tyr Tyr	Ser Val His	Asn Lys Thr	Gly Ala Lys	Leu Pro Val	Lys			
1235		1240		1245				
Trp Met Ala	Leu Glu Ser	Leu Gln Thr	Gln Lys Phe	Thr Thr Lys	Ser			
1250		1255		1260				
Asp Val Trp	Ser Phe Gly	Val Leu Leu	Trp Glu Leu	Met Thr Arg	Gly			
1265		1270		1275	1280			
Ala Pro Pro	Tyr Pro Asp	Val Asn Thr	Phe Asp Ile	Thr Val Tyr	Leu			
	1285		1290		1295			
Leu Gln Gly	Arg Arg Leu	Leu Gln Pro	Glu Tyr Cys	Pro Asp Pro	Leu			
	1300		1305		1310			
Tyr Glu Val	Met Leu Lys	Cys Trp His	Pro Lys Ala	Glu Met Arg	Pro			
	1315		1320		1325			
Ser Phe Ser	Glu Leu Val	Ser Arg Ile	Ser Ala Ile	Phe Ser Thr	Phe			
1330		1335		1340				
Ile Gly Glu	His Tyr Val	His Val Asn	Ala Thr Tyr	Val Asn Val	Lys			

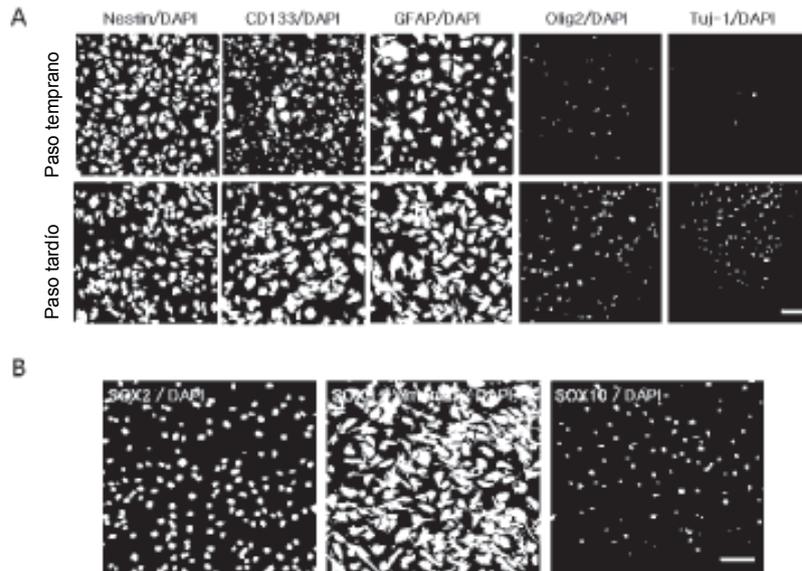
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método in vitro para aumentar la proliferación de células madre neurales que comprende una etapa de transfectar dichas células madre neurales con un gen que activa la señalización de Notch y cultivar las células madre neurales, en donde el gen codifica el NICD (Dominio IntraCelular Notch) que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 2, y la célula transfectada muestra una mayor proliferación comparado con la célula no transfectada.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el gen comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1.
- 10 3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el gen se introduce mediante un vector viral.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cultivo se realiza en un medio que comprende FBS, suplemento B27, suplemento N2, bFGF y EGF.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el cultivo se lleva a cabo durante más de tres pasos.
- 15 6. El uso de un gen que activa la señalización de Notch in vitro para aumentar la proliferación de células madre neurales in vitro, en el que dichas células madre neurales se transfectan in vitro con el gen y el gen codifica el NICD (Dominio IntraCelular Notch) que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 2, y la célula transfectada muestra una mayor proliferación comparado con la célula no transfectada.
- 20 7. El uso de la reivindicación 6, en el que el gen comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1.

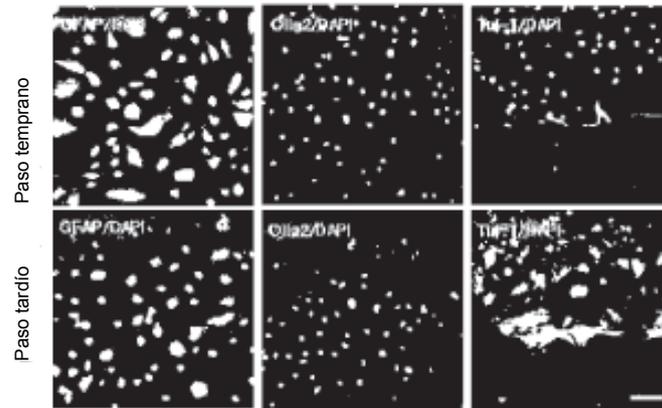
[Fig. 1]



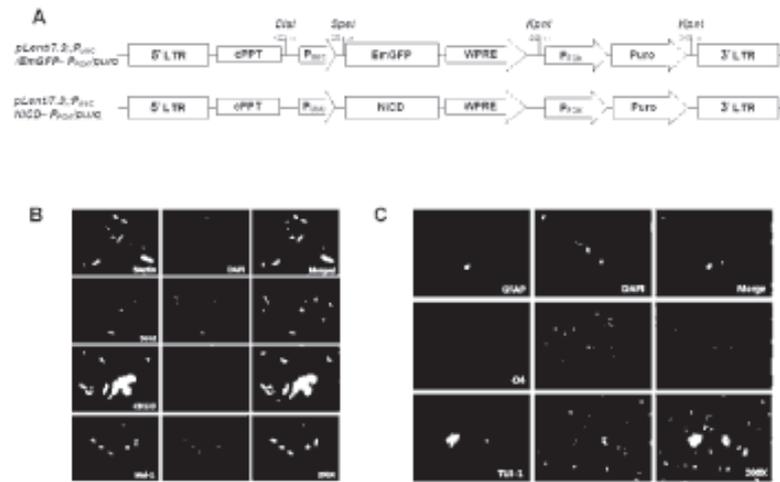
[Fig. 2]



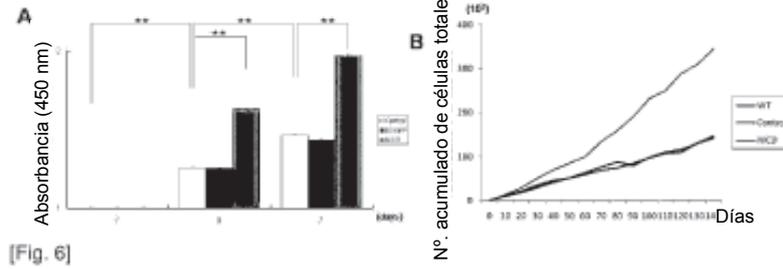
[Fig. 3]



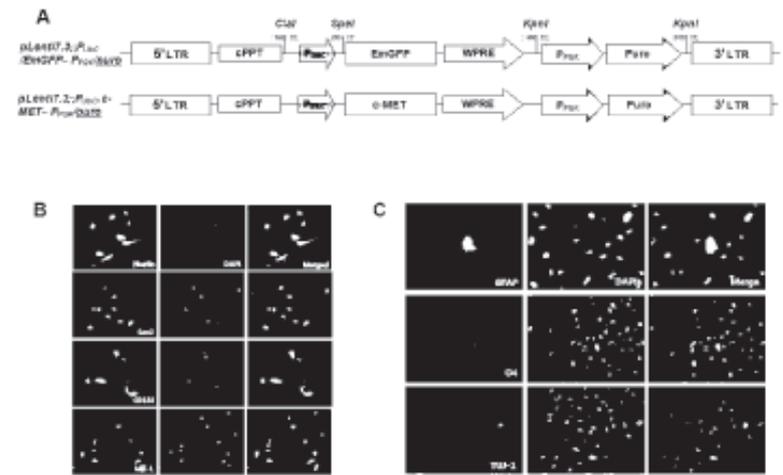
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]

