

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 289**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/0793 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2012 E 12157671 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2634195**

54 Título: **Separación de neuronas vivas intactas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2017

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC GMBH (100.0%)
Friedrich-Ebert-Strasse 68
51429 Bergisch Gladbach, DE**

72 Inventor/es:

JUNGLUT, MELANIE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 616 289 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

Separación de neuronas vivas intactas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al campo de la separación de células, en particular a los procedimientos para la separación de células neuronales intactas.

10 Antecedentes de la invención

15 Una suspensión celular que se obtiene después de la disociación de tejido neural comprende una amplia variedad de tipos de células diferentes. Sin embargo, el direccionamiento y el aislamiento selectivos de un tipo de célula especial es a menudo el requisito previo para los estudios in vitro experimentales en estas células. Técnicas relativamente sencillas como la centrifugación con gradiente de densidad o el aislamiento de células vivas por las condiciones de cultivo conducen a bajas purezas y pérdida masiva de células.

20 Un enfoque ampliamente utilizado en el campo de la neurobiología es el uso de ratones transgénicos que expresan una proteína fluorescente controlada por un promotor específico de tipo celular en combinación con clasificación celular activada por fluorescencia lo que facilita el aislamiento de una población celular especial (Nolte et al, 2001: Glia 33: 72-86, Tomomura et al, 2001: Eur J Neurosci 14: 57-63, Tamamaki et al, 2003: J Comp Neurol 467, 60-79; Zuo colaboradores: 10999-11009).

25 Pero, además de la necesidad de ratones transgénicos y equipo costoso, este procedimiento es bastante complicado y lleva varias horas. También se describió la clasificación de células activadas por fluorescencia de neuronas para animales no transgénicos, después de marcar las células con el marcador específico de neurona NeuN (Guez-Barber et al, 2012: J Neurosci Methods 203, 10-18). Sin embargo, este enfoque no permite la separación de las neuronas vivas, ya que requiere el marcado de un marcador intracelular.

30 Otra técnica que conduce al aislamiento de células neurales fue descrita por Barres et al (1988: Neuron 1: 791-803). El método denominado inmunocriba utiliza una adhesión celular mediada por anticuerpos. Originalmente descrito para el aislamiento de células retinales usando Thy-1 como marcador específico para células ganglionares de la retina, el método también se aplicó para el aislamiento de neuronas (Cahoy et al, 2008: J Neurosci 28: 264-278) por agotamiento posterior de oligodendrocitos, microglia y astrocitos. Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito un aislamiento de un paso para neuronas utilizando esta técnica.

35 Un método directo para el aislamiento de un tipo celular deseado es la separación magnética de células, por ejemplo, la clasificación de células activadas magnéticas (tecnología MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Alemania; US5411863, US5543289, US6020210, US6417011). Esta tecnología requiere un marcador que permita la separación directa de las células de interés mediante un anticuerpo acoplado a una microperla magnética. Sin embargo, hasta ahora no se conoce un marcador general específico de superficie de células neuronales y por lo tanto no es aplicable la clasificación directa de células magnéticas de neuronas viables. Sin embargo, se puede aplicar una estrategia de aislamiento negativo para aislar poblaciones celulares que no pueden ser tratadas directamente. En este enfoque, las células no diana se marcan magnéticamente y son agotadas, aislando de este modo las células no marcadas de interés.

45 El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado para separar células neuronales vivas y eliminar células no neuronales de una suspensión celular derivada de tejido nervioso.

50 Resumen de la invención

Los inventores identificaron sorprendentemente la CD51 (Integrina alfa V) como un marcador que es expresado por la mayoría de las células no neuronales que están presentes en una suspensión celular obtenida a partir de tejido nervioso, por ejemplo, astrocitos, precursores de astrocitos, microglia, oligodendrocitos, precursores de oligodendrocitos, células endoteliales, fibroblastos y linfocitos. Además, los inventores también identificaron CD51 como un marcador que es expresado por la mayoría de las células no neuronales que están presentes en células pluripotentes diferenciadas espontáneamente. Por lo tanto, este marcador puede usarse como un marcador de superficie celular no panneuronal para el agotamiento de células no neuronales.

60 El CD51 representa la cadena alfa V de integrina (UniProtKB no. P43406 (ratón), P06756 (humano)). Se asocia no covalentemente con las subunidades β de la familia de integrinas incluyendo $\beta 1$ (CD29), $\beta 3$ (CD61), $\beta 5$ y $\beta 6$ para formar complejos de señalización funcional. La integrina alfa V es expresada por una variedad de tejidos durante el desarrollo y en el adulto. Juega un papel crucial en vasculogénesis, angiogénesis, cicatrización de heridas, tumorigénesis, neurogénesis e inflamación (Takada et al, 2007: Genome Biology 8: 215.1-215.9). También se describió que el CD51 era expresada por fibroblastos (Treese et al, 2008: Citometrie A 73A: 351-360) y por células del músculo esquelético (Hirsch et al, 1994: Dev Dyn 201: 108-120). Se encontró que era crucial en el cerebro para las interacciones adhesivas neuronal-glia durante la migración neuronal en la corteza cerebral (Anton et al, 1999: Neuron 22: 277-289).

La presente invención proporciona el uso del antígeno CD51 como marcador de selección negativo para células neuronales.

5 Un método para el enriquecimiento, aislamiento y/o detección de células neuronales vivas comprende las etapas de a) poner en contacto una muestra que contiene células neuronales con un fragmento de unión al antígeno tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico para el antígeno CD51 acoplado a una fase sólida marcando por lo tanto células positivas para CD51 de dicha muestra, y b) aislar las células no marcadas de dicha muestra, es decir, las células que no están unidas por el fragmento de unión a antígeno específico para el antígeno CD51. Estas son las células diana intactas, es decir, las células neuronales enriquecidas sustancialmente libres de células no neuronales.

La pureza puede aumentarse adicionalmente si se utiliza un marcador de superficie celular específico de astrocitos además de CD51 para agotar una subpoblación de astrocitos restantes negativos para CD51.

15 Breve descripción de los dibujos

FIGURA 1

Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD51 en tejido cerebral disociado de ratón postnatal.

20 FIGURA 2A y FIGURA 2B

Caracterización por citometría de flujo de la expresión de CD51 en diferentes tipos de células neuronales en cerebro de ratón postnatal disociado por cotinción de CD51 y marcadores específicos para diferentes subpoblaciones neuronales.

FIGURA 3

25 Agotamiento de células positivas para CD51 por separación de células magnéticas usando una estrategia de marcado directo (A) o indirecto (B).

FIGURA 4A y FIGURA 4B

Agotamiento eficiente de subpoblaciones no neuronales por CD51-Biotina y microperlas de Anti-Biotina

30

FIGURA G5

Aumento de la pureza mediante el uso de un marcador específico de astrocitos en combinación con CD51.

FIGURA G6

35 Aislamiento de neuronas de diferentes regiones del cerebro utilizando CD51-Biotina y Microperlas de Anti-Biotina.

Descripción detallada de la invención

40 Inesperadamente, los inventores encontraron que CD51 es expresado por la mayoría de las células no neuronales, incluyendo por ejemplo astrocitos, precursores de astrocitos, microglia, oligodendrocitos, precursores de oligodendrocitos, células endoteliales y linfocitos, pero no por neuronas (véase el Ejemplo 2). Por lo tanto, sorprendentemente, el marcador de superficie celular CD51 es bien adecuado como marcador de selección negativa para células neuronales.

45 En un aspecto principal, la presente invención proporciona el uso de CD51 como marcador de selección negativa para células neuronales.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para el enriquecimiento, aislamiento y/o detección de células neuronales que comprende las etapas de

50

a) poner en contacto una muestra que contiene células neuronales con un fragmento de unión al antígeno específico para el antígeno CD51 acoplado a una fase sólida, marcando así las células positivas para CD51 de dicha muestra, b) aislar las células no marcadas de dicha muestra.

55 Las células no marcadas o intactas son las células que no están unidas por el fragmento de unión al antígeno específico para el antígeno CD51.

La pureza puede aumentarse adicionalmente si se utiliza un marcador de superficie de células específicas de astrocitos además de CD51 para agotar una subpoblación de astrocitos restantes. Por lo tanto, en una realización de la invención, se proporciona un método para enriquecimiento y aislamiento de células neuronales que comprende las etapas de

60

a) poner en contacto una muestra que contiene células neuronales con un fragmento de unión a antígeno específico para el antígeno CD51 acoplado a una fase sólida y con un fragmento de unión a antígeno específico para un marcador de superficie celular específico para astrocitos, por ejemplo, ACSA-2 (ACSA: antígeno de superficie celular de astrocito) o GLAST (ACSA-1) acoplado a una fase sólida, marcando así las células positivas para CD51 y las células que expresan un marcador de superficie celular específico de astrocito de dicha muestra

65

b) aislar las células no inmovilizadas de dicha muestra.

El contacto de la muestra que contiene las células neuronales con un fragmento de unión al antígeno específico para el antígeno CD51 y con un fragmento de unión al antígeno específico para un marcador de superficie celular específico para astrocitos tal como ACSA-2 o GLAST (ACSA-1) se puede realizar simultáneamente o posteriormente.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición de células neuronales sustancialmente pura que puede obtenerse mediante los métodos descritos en el presente documento, en donde la composición de células neuronales comprende células MAP2 +/PSANCAM. La invención permite el aislamiento de todas las neuronas que están presentes en las suspensiones de células neuronales mixtas. La composición celular muestra solo contaminación mínima por células no neuronales y comprende una variedad de subtipos neuronales diferentes, que no pueden obtenerse por otros métodos de la técnica anterior.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit para el enriquecimiento, aislamiento y/o detección de células neuronales que comprende a) un fragmento de unión al antígeno específico para el antígeno CD51 acoplado a una fase sólida; y opcionalmente además b) un fragmento de unión al antígeno específico para un marcador de superficie celular específico de astrocitos tal como ACSA-2 o GLAST (ACSA-1) acoplado a una fase sólida. Las células obtenidas mediante el método de la presente invención pueden cultivarse y/o analizarse (caracterizarse) después del enriquecimiento de acuerdo con todos los métodos conocidos por el experto en la técnica.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

El término "muestra" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una muestra que contiene células neuronales y no neuronales en cualquier relación. Preferentemente, estas células son viables. Pero estas células también pueden ser células fijadas que pueden usarse para extracción subsiguiente de ácidos nucleicos o de proteínas. Las muestras pueden ser de animales, especialmente mamíferos tales como ratón, ratas o seres humanos. Se puede utilizar tejido derivado del sistema nervioso, por ejemplo, tejido cerebral entero, regiones cerebrales especiales, médula espinal, tejido nervioso periférico, células neuronales derivadas de células madre embrionarias (ES) o derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPS) o cualquier tejido que contenga células neuronales. La invención se ilustra principalmente aislando células neuronales de tejido cerebral disociado de ratón. Sin embargo, abarca el aislamiento de células neuronales de cualquier tejido de mamífero en general utilizando anticuerpos que detectan el antígeno CD51.

A manera de ejemplo se describe en el Ejemplo 9 que el perfil de expresión de CD51 es equivalente en seres humanos. Todos los procedimientos de las realizaciones de la presente invención y las composiciones obtenibles mediante los métodos también pueden ser de origen humano o de cualquier otra especie que no sea el ratón. El término "células diana" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a las células que son las células deseadas separadas por la presente invención. Regularmente, las células diana son las células neuronales negativas CD51 no marcadas generadas por el procedimiento de la presente invención.

El término células no diana, como se usa en el presente documento, se refiere a las células no neuronales que están específicamente unidas por un fragmento de unión al antígeno que está acoplado a una fase sólida.

El término "fracción negativa" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a las células neuronales que están y no están unidas por un fragmento de unión al antígeno acoplado a una fase sólida y son las células diana deseadas.

El término "fracción positiva" como se usa en el presente documento se refiere a las células no neuronales que están unidas por un fragmento de unión al antígeno acoplado a una fase sólida y son las células no diana indeseadas.

El término "fracción original" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la suspensión de células neuronales mixtas antes de la separación celular que contiene las células neuronales así como no neuronales deseadas.

El término "agotamiento" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un proceso de una selección negativa que separa las células neuronales deseadas de las células no neuronales no deseadas que están marcadas por un fragmento de unión al antígeno acoplado a una fase sólida.

El término "no marcadas" o "intactas" como se usa en el presente documento se refiere a las células neuronales que no están unidas por un fragmento de unión al antígeno acoplado a una fase sólida. La fracción celular no marcada e intactas contiene las células diana deseadas.

El término "pureza" tal como se utiliza en el presente documento se refiere al porcentaje de células CD51 o CD51/ACSA-2 negativas en la fracción de células negativas.

El término "neural" tal como se usa en el presente documento se refiere a todas las diferentes subpoblaciones de

células derivadas de tejido del sistema nervioso que contiene células neuronales y no neuronales.

El término "marcador", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un antígeno celular expresado específicamente por un cierto tipo de célula. Preferentemente, el marcador es un marcador de superficie celular, de manera que se puede realizar el enriquecimiento, aislamiento y/o detección de células vivas.

El término "fase sólida" tal como se utiliza en el presente documento se refiere al acoplamiento del fragmento de unión al antígeno, por ejemplo un anticuerpo, a otras moléculas, por ejemplo partículas, fluoróforos, haptenos como biotina, o superficies más grandes tales como placas de cultivo y placas de microtitulación. En algunos casos, el acoplamiento da como resultado la inmovilización directa del fragmento de unión al antígeno, por ejemplo si el fragmento de unión al antígeno se acopla a una superficie más grande de una placa de cultivo. En otros casos, este acoplamiento da como resultado una inmovilización indirecta, por ejemplo un fragmento de unión al antígeno acoplado directa o indirectamente (a través de, por ejemplo, biotina) a una perla magnética se inmoviliza si dicha perla se retiene en un campo magnético. En otros casos, el acoplamiento del fragmento de unión al antígeno a otras moléculas no da lugar a una inmovilización directa o indirecta, sino que permite el enriquecimiento, separación, aislamiento y detección de células de acuerdo con la presente invención, por ejemplo si el fragmento de unión al antígeno está acoplado a un fluoróforo que luego permite la discriminación de células marcadas y de células no marcadas, por ejemplo mediante métodos de citometría de flujo, como selección por FACS, o microscopía de fluorescencia.

El término "partícula" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una fase sólida tal como partículas coloidales, microesferas, nanopartículas o perlas. Los métodos para la generación de tales partículas son bien conocidos en el campo de la técnica. Las partículas pueden ser partículas magnéticas. Las partículas pueden estar en una solución o suspensión o pueden estar en un estado liofilizado antes de su uso en la presente invención. La partícula liofilizada se reconstituye después en regulador conveniente antes de ponerse en contacto con la muestra que se va a procesar en relación con la presente invención.

El término "magnética" en "partícula magnética" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a todos los subtipos de partículas magnéticas que pueden prepararse con métodos bien conocidos por el experto en la técnica, especialmente partículas ferromagnéticas, partículas superparamagnéticas y partículas paramagnéticas. Los materiales "ferromagnéticos" son fuertemente susceptibles a campos magnéticos y son capaces de retener propiedades magnéticas cuando el campo es retirado. Los materiales "paramagnéticos" tienen solamente una susceptibilidad magnética débil y cuando el campo se retira rápidamente pierden su magnetismo débil. Los materiales "superparamagnéticos" son altamente susceptibles magnéticamente, es decir, se vuelven fuertemente magnéticos cuando se colocan en un campo magnético, pero, al igual que los materiales paramagnéticos, pierden rápidamente su magnetismo.

El término "fragmento de unión al antígeno" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier unidad estructural que se une preferentemente a la molécula diana deseada de la célula, es decir, al antígeno. El término unidad estructural comprende, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El término "anticuerpo" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a anticuerpos policlonales o monoclonales que pueden generarse por métodos bien conocidos por la persona experta en la técnica. El anticuerpo puede ser de cualquier especie, por ejemplo murrino, rata, oveja, humano. Para fines terapéuticos, si se van a utilizar fragmentos de unión a antígenos no humanos, éstos pueden ser humanizados por cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos modificados (por ejemplo oligómeros, anticuerpos reducidos, oxidados y marcados). El término "anticuerpo" comprende tanto moléculas intactas como fragmentos de anticuerpos, tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y anticuerpos monocatenarios. Adicionalmente, el término "fragmento de unión al antígeno" incluye cualquier unidad estructural distinta de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se une preferentemente a la molécula diana deseada de la célula. Las unidades estructurales adecuadas incluyen, sin limitación, oligonucleótidos conocidos como aptámeros que se unen a las moléculas diana deseadas (Hermann y Pantel, 2000: Science 289: 820-825), carbohidratos, lectinas o cualquier otra proteína de unión al antígeno (por ejemplo, interacción receptor-ligando).

El enlace entre el anticuerpo y la partícula puede ser covalente o no covalente. Un enlace covalente puede ser, por ejemplo la unión a grupos carboxilo en perlas de poliestireno, o a grupos NH₂ o SH₂ sobre perlas modificadas. Un enlace no covalente es, por ejemplo a través de biotina-avidina o una partícula de acoplada al fluoróforo enlazada a un anticuerpo antifluoróforo. Los métodos para acoplar anticuerpos a partículas, fluoróforos, haptenos como biotina o superficies mayores tales como placas de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Para el enriquecimiento, el aislamiento o la selección se puede utilizar en principio cualquier tecnología de clasificación. Esto incluye, por ejemplo, cromatografía de afinidad o cualquier otra técnica de separación dependiente de anticuerpos conocida en la técnica. Cualquier técnica de separación dependiente de ligandos conocida en la técnica puede usarse conjuntamente con técnicas de separación tanto positivas como negativas que dependen de las propiedades físicas de las células. Una tecnología de clasificación especialmente potente es la clasificación de células magnéticas. Los métodos para separar las células magnéticamente están disponibles comercialmente, por ejemplo de Invitrogen, Stem Cell Technologies, en Cellpro, Seattle o Advanced Magnetics, Boston. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden acoplarse directamente a partículas de poliestireno magnético como Dynal M 450 o partículas magnéticas similares y se usan por ejemplo para la separación celular. La tecnología Dynabeads no está basada en columnas, en

- 5 cambio estas perlas magnéticas con células unidas disfrutan de una cinética de fase líquida en un tubo de muestra, y las células se aíslan colocando el tubo sobre un estante magnético. Sin embargo, en una realización preferida para enriquecer, clasificar y/o detectar células neuronales de una muestra que contiene células neuronales según la presente invención, se utilizan anticuerpos monoclonales junto con micropartículas superparamagnéticas coloidales que tienen un revestimiento orgánico por ejemplo, polisacáridos (tecnología de selección de células activada magnéticamente (MACS) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania)). Estas partículas (nanoperlas o MicroPerlas) pueden ser conjugadas directamente con anticuerpos monoclonales o usadas en combinación con Microperlas específicas para antiinmunoglobulina, avidina o antihapteno.
- 10 La tecnología MACS permite separar las células incubándolas con nanopartículas magnéticas recubiertas con anticuerpos dirigidos contra un antígeno de superficie particular. Esto hace que las células que expresan este antígeno se unan a las nanopartículas magnéticas. Posteriormente la solución celular se transfiere sobre una columna colocada en un campo magnético fuerte. En este paso, las células se unen a las nanopartículas (que expresan el antígeno) y permanecen en la columna, mientras que otras células (que no expresan el antígeno) fluyen a su través. Con este método, las células pueden separarse positivamente o negativamente con respecto al antígeno o antígenos particulares.
- 15 En el caso de una selección positiva, las células que expresan el o los antígenos de interés, que se unen a la columna magnética, se lavan a un recipiente separado, después de retirar la columna del campo magnético.
- 20 En el caso de una selección negativa, el anticuerpo utilizado está dirigido contra el(los) antígeno(s) de superficie que se sabe están presentes en células que no son de interés. Después de la aplicación de la solución de células/nanopartículas magnéticas sobre la columna, las células que expresan estos antígenos se unen a la columna y se recoge la fracción que pasa, ya que contiene las células de interés. Dado que estas células no están marcadas por un anticuerpo acoplado a nanopartículas, están "intactas".
- 25 El procedimiento se puede llevar a cabo mediante marcación magnética directa o marcación magnética indirecta. Para la marcación directa, el anticuerpo específico se acopla directamente a la partícula magnética. La marcación indirecta es una alternativa conveniente cuando la marcación magnética directa no es posible o no se desea. Para esta estrategia de marcación se puede utilizar un anticuerpo primario, un anticuerpo monoclonal o policlonal específico, una combinación de anticuerpos primarios dirigidos contra cualquier marcador de superficie celular. El anticuerpo primario puede estar no conjugado, biotinilado o conjugado con fluoróforo. La marcación magnética se logra entonces con Microperlas anti-inmunoglobulina, Microperlas anti-biotina o Microperlas anti-fluoróforo. El método de la presente invención permite tanto la marcación magnética directa como la marcación magnética indirecta (véase el Ejemplo 3).
- 30 La expresión "composición de células neuronales sustancialmente pura" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una composición celular que contiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 90%, más preferentemente al menos 95% de células negativas CD51 o CD51/ACSA (antígeno de superficie celular de astrocito) en la fracción de células diana, en el que la composición de células neuronales comprende células MAP2⁺/PSA⁻ NCAM⁻. Las células CD51 negativas están en la fracción de células diana si el método de la presente invención se lleva a cabo utilizando un fragmento de unión al antígeno específico para el antígeno CD51. Las células CD51/ACSA negativas están en la fracción de células diana si el método de la presente invención se lleva a cabo utilizando un fragmento de unión al antígeno específico para el antígeno CD51 y un fragmento de unión al antígeno específico para un marcador de superficie específico de astrocitos, por ejemplo ACSA-2 o GLAST (ACSA-1).
- 35 Normalmente, las células neuronales se integran en una red de diferentes tipos celulares in vivo. Para hacerlo accesibles a las técnicas de enriquecimiento y clasificación, el tejido debe disociarse antes de utilizar tales métodos.
- 40 En la presente invención, el tejido cerebral es disociado enzimáticamente con un procedimiento basado en tripsina o papaína usando por ejemplo El Kit de MACS® de Disociación de Tejidos Neuronales (T) (NTDK (T)) o el Kit de MACS® de Disociación de Tejidos Neuronales (P) (NTDK (P)) (Miltenyi Biotec). El tejido se disocia mecánicamente adicionalmente de forma manual o con un instrumento que permite la disociación automatizada de tejidos, por ejemplo Dissociator gentleMACS™ (Miltenyi Biotec). Pueden utilizarse también otros métodos que permiten la generación de una suspensión de células únicas viables a partir de tejido neural y son bien conocidos por el experto en la técnica.
- 45 Las células neuronales obtenibles por los métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse para etapas subsiguientes tales como investigación, diagnóstico, aplicaciones farmacológicas o clínicas conocidas por el experto en la técnica. La purificación de neuronas de la variedad de otros tipos de células en el cerebro, es un requisito previo para el análisis in vitro, molecular, bioquímico o electrofisiológico. Las células se pueden cultivar utilizando un medio optimizado para esta aplicación, por ejemplo MACS® Neuro Medium suplementado con MACS® Suplemento B27 PLUS (Miltenyi Biotec). En la presente invención, las células aisladas se sembraron en cubreobjetos de vidrio revestidos con poli-L-lisina y se mantuvieron en una atmósfera humidificada (5% de CO₂, 95% de aire) a 37°C durante 1 semana usando MACS® Neuro Medium suplementado con MACS® (Miltenyi Biotec) Suplemento B27 PLUS (Miltenyi Biotec) y L-glutamina (0,5 mM, Invitrogen).
- 50 Dichos cultivos de células neuronales se pueden usar para estudiar, por ejemplo el desarrollo neural, la sinaptogénesis, la señalización celular, la liberación de neurotransmisores, o realizar mediciones electrofisiológicas para la investigación

de la actividad neuronal.

5 Las células neuronales enriquecidas pueden usarse también antes y/o después del cultivo celular como una composición farmacéutica en terapia, por ejemplo terapia celular, o prevención de enfermedades. La composición farmacéutica puede usarse para el tratamiento y/o prevención de enfermedades en mamíferos, especialmente humanos, incluyendo posiblemente la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de la composición farmacéutica al mamífero.

10 La enfermedad puede ser cualquier enfermedad que pueda ser tratada y/o prevenida a través de la presencia de células neuronales y/o aumentando la concentración de las células relevantes en/al lugar relevante, es decir, el cerebro o la médula espinal. La enfermedad tratada y/o preventivamente tratada puede ser cualquier trastorno cerebral, por ejemplo un trastorno degenerativo de las neuronas de un área particular del sistema nervioso central. El tratamiento puede ser el trasplante de células neuronales enriquecidas al lugar relevante del cerebro.

15 Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden administrarse de una manera apropiada para la enfermedad por tratar (o prevenir). La cantidad y frecuencia de administración se determinará por factores tales como la condición del paciente, y el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, aunque las dosificaciones apropiadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos.

20 Realizaciones

Los métodos que permiten el uso de un marcador de selección negativo para el enriquecimiento, aislamiento y/o detección de células son, por ejemplo, métodos de separación de células magnéticas, inmunocriba y clasificación de FACS.

25 Los fragmentos de unión al antígeno pueden marcarse con partículas, por ejemplo partículas magnéticas, haptenos como biotina, o fluoróforos. Los fragmentos de unión al antígeno pueden inmovilizarse, por ejemplo, fijándolos en la superficie de las bandejas de cultivo o marcándolos con partículas tales como perlas magnéticas.

30 En una realización de la presente invención, el fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo CD51 marcado con partículas magnéticas (CD51 Microperlas). El acoplamiento del anticuerpo y la partícula puede ser covalente o no covalente. Si el acoplamiento es covalente, el anticuerpo CD51 se acopla directamente a la partícula magnética. Si el acoplamiento no es covalente, la partícula es por ejemplo una Microperla anti-biotina o una Microperla de estreptavidina y el anticuerpo CD51 es biotinilado. La muestra, por ejemplo la célula neuronal marcada se carga sobre una columna que se coloca en un campo magnético. Las células no neuronales marcadas magnéticamente se mantienen dentro de la columna y el flujo pasante contiene las neuronas enriquecidas intactas. El cultivo de estas células conduce a una fracción de células neuronales con solo un bajo porcentaje de células no neuronales contaminantes (<10%) (véase el Ejemplo 5).

40 En otra realización de la presente invención, los fragmentos de unión al antígeno son un anticuerpo anti-CD51 y un anticuerpo específico para un marcador de superficie celular específico para astrocitos tal como ACSA-2 o GLAST (ACSA-1). Estos anticuerpos están acoplados covalentemente a partículas magnéticas. La muestra, por ejemplo la suspensión de células neuronales se marca simultáneamente con las Microperlas Anti-CD51 y por ejemplo las Microperlas Anti-ACSA-2 y se cargan en una columna que se coloca en un campo magnético. Las células no neuronales marcadas magnéticamente se mantienen dentro de la columna y el flujo pasante contiene las neuronas enriquecidas intactas. El cultivo de estas células conduce a una fracción de células neuronales que muestra solo un bajo porcentaje de células no neuronales contaminantes (<5%). En una variante de esta realización, el anticuerpo anti-CD51 y el anticuerpo específico para un marcador de superficie celular específico de astrocitos se acoplan a la misma partícula magnética.

50 En otra realización de la presente invención, los fragmentos de unión al antígeno son un anticuerpo anti-CD51 y un anticuerpo específico para un marcador de superficie celular específico de astrocitos tal como ACSA-2 o GLAST (ACSA-1). Estos anticuerpos se acoplan covalentemente a partículas magnéticas. La muestra, por ejemplo la suspensión de células neuronales se marca primero con las Microperlas CD51 y se carga sobre una columna que se coloca en un campo magnético. Las células no neuronales marcadas magnéticamente se mantienen dentro de la columna y el flujo pasante contiene las neuronas enriquecidas intactas. A continuación, el flujo pasante es marcado con las Microperlas específicas de astrocitos y se carga sobre una segunda columna que se coloca en un campo magnético. Los astrocitos marcados magnéticamente se mantienen dentro de la columna y el flujo pasante contiene las neuronas enriquecidas adicionalmente. En una variante de esta realización, el orden de marcación de la muestra que contiene células neuronales se altera hasta la primera marcación con por ejemplo las Microperlas Anti-ACSA-2 y posteriormente con las Microperlas CD51.

60 En otra realización de la presente invención, los fragmentos de unión al antígeno son un anticuerpo anti-CD51 y un anticuerpo específico para un marcador de superficie celular específico para astrocitos como ACSA-2 o GLAST (ACSA-1). Estos anticuerpos están biotinilados. La muestra, por ejemplo la suspensión de células neuronales se marca simultáneamente o posteriormente con la CD51-Biotina y por ejemplo la Anti-ACSA-2-Biotina. La marcación magnética se logra entonces con Microperlas anti-Biotina o Microperlas de estreptavidina y las células se cargan en una columna

que se coloca en un campo magnético. Las células no neuronales marcadas magnéticamente se mantienen dentro de la columna y el flujo pasante contiene las neuronas enriquecidas intactas. El cultivo de estas células conduce a una fracción de células neuronales que muestra solo un bajo porcentaje de células no neuronales contaminantes (<5%) (véase el Ejemplo 8).

En otra realización de la presente invención, la muestra que contiene células neurales se ha agotado en células CD51 negativas usando inmunocriba con anticuerpos CD51. El anticuerpo CD51 se inmoviliza en la superficie de una placa de criba, por ejemplo una placa de Petri o una placa de varios pocillos. La muestra que contiene las células neuronales en regulador de criba se incuba en la placa de criba de CD51 para enlazar células que expresan CD51. Las células no adherentes se recogen, por ejemplo por centrifugación y se resuspenden en, por ejemplo, medio de cultivo celular para uso posterior.

Para aumentar la pureza de las células neuronales, las células pueden además agotarse en astrocitos después del agotamiento de células positivas a CD51 usando una placa de criba de astrocitos, es decir, una placa sobre la cual se inmoviliza un anticuerpo específico para un marcador de astrocitos como ACSA-2 o GLAST (ACSA-1).

En otra realización de la presente invención, la muestra que contiene las células neuronales está marcada con un anticuerpo CD51 marcado con fluorescencia (y opcionalmente con un anticuerpo marcado fluorescentemente adicional específico para marcadores específicos de astrocitos) y es sometida a un método de citometría de flujo, por ejemplo clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Los componentes de separación celular necesarios para llevar a cabo los métodos descritos en la presente invención se pueden proporcionar como un kit. Cada kit contiene los componentes necesarios para realizar la separación de células deseadas de una muestra que contiene células neuronales. Un kit para enriquecimiento, aislamiento y/o detección de células neuronales comprende

a) un fragmento de unión al antígeno específico para el antígeno CD51 acoplado a una fase sólida; y opcionalmente
b) un fragmento de unión al antígeno específico para un marcador de superficie celular específico de astrocitos acoplado a una fase sólida.

Para su uso en la clasificación de células magnéticas, los fragmentos de unión al antígeno están acoplados a partículas magnéticas como se describe en el presente documento. Las partículas magnéticas, por ejemplo las Microperlas del kit pueden estar en una solución o suspensión o pueden estar en un estado liofilizado antes de su uso en un método de la presente invención. La partícula liofilizada se reconstituye entonces en un regulador conveniente antes de ponerse en contacto con la muestra que contiene células neuronales que se van a procesar con respecto a la presente invención.

El fragmento de unión al antígeno específico para un marcador de superficie celular específico de astrocitos puede ser Anti-ACSA-2 o Anti-GLAST (ACSA-1). Preferentemente, el marcador de superficie celular específico de astrocitos es ACSA-2.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describe con más detalle y específicamente con referencia a los ejemplos, los cuales sin embargo no pretenden limitar la presente invención.

Ejemplo 1: Expresión de CD51 en tejido cerebral postnatal de ratón.

Se disoció tejido cerebral de ratón derivado de ratones P6 CD1 con un procedimiento basado en tripsina o papaína utilizando el Kit de Disociación de MACS® de Tejidos Neuronales (T) (NTDK (T)) o el Kit de MACS® de Disociación de Tejidos Neuronales (P) (NTDK (P)) (Miltenyi Biotec) en combinación con el Dissociator gentleMACS™ (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las suspensiones de células únicas se tñeron con el anticuerpo CD51 conjugado con APC o PE para análisis por citometría de flujo. Para evitar la tinción falsa positiva debido a las interacciones de los receptores Fc, se aplicó el reactivo de bloqueo FcR (Miltenyi Biotec) antes de la marcación del anticuerpo. Se excluyeron del análisis los restos celulares y las células muertas (identificadas por yoduro de propidio). Los datos se adquirieron en un analizador MACSQuant® (Miltenyi Biotec).

Se detectaron células positivas para CD51 en la tripsina, así como tejido cerebral disociado con papaína con un porcentaje de 21,8-25,4%. El porcentaje de células positivas para CD51 difirió ligeramente dependiendo del conjugado de anticuerpo y de la enzima utilizada para la disociación, pero no se detectaron diferencias significativas. Este experimento muestra que el antígeno CD51 no muestra sensibilidad a la papaína ni a la tripsina y las células positivas para CD51 pueden discriminarse claramente a partir de células CD51 negativas en una suspensión celular obtenida a partir de tejido cerebral de ratón (véase la FIG 1).

Ejemplo 2: Caracterización por citometría de flujo de células positivas para CD51 en tejido cerebral postnatal de ratón

Se disoció tejido cerebral de ratón derivado de ratones P1, P2 o P3 CD1, como se describió antes, usando NTDK (T) o (P). La suspensión de células individuales resultante se sometió a tinción con CD51 y marcadores específicos para diferentes subpoblaciones neurales y se sometió a análisis por citometría de flujo. Para la tinción de los epítomos

sensibles a la proteasa, CD31 y AN2, la suspensión celular se incubó durante 2 h a 37°C en MACS® Neuro Medium + MACS® Supplement B27 PLUS bajo rotación continua para volver a expresar los epítomos. Debido a la falta de marcadores que permitan marcar las poblaciones de células neuronales vivas, se usaron ratones transgénicos GAD67-GFP para detectar neuronas GABAérgicas mediante su expresión de GFP (proteína fluorescente verde). El análisis

mostró que las neuronas GABAérgicas positivas para GAD67-GFP carecían de expresión de CD51. Además, las células progenitoras neuronales, identificadas por expresión de PSA-NCAM, se identificaron como CD51 negativas (véase FIG2A). En comparación, se detectaron por CD51 microglia positivos para CD11b, linfocitos positivos para CD45, precursores de oligodendrocitos positivos para AN2, oligodendrocitos positivos para O4, así como células endoteliales positivas para CD31 (véase FIG2A y B). En el caso de tinción con AN2 y CD31, el porcentaje total de células positivas para CD51 aumentó debido al tratamiento para la reexpresión de los epítomos AN2 y CD31. La mayoría de los astrocitos, que fueron identificados por los anticuerpos anti-GLAST (ACSA-1) y Anti-ACSA-2 específicos de astrocitos, también fueron positivos para CD51. Aproximadamente el 50% de las células progenitoras A2B5 positivas mostraron expresión de CD51 (véase FIG 2B). Todos los conjugados de anticuerpos usados en este análisis están disponibles en Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania.

Ejemplo 3: Agotamiento de células positivas para CD51 por separación de células magnéticas

Para el agotamiento de las células positivas para CD51 no neuronales se comparó una estrategia de marcación directa con una marcación indirecta con respecto a la pureza y la recuperación de las células diana. Para la marcación directa se conjugó covalentemente un anticuerpo específico de CD51 a partículas magnéticas.

La generación de partículas superparamagnéticas tal como se usa aquí se describe en US5543289 la cual se incluye aquí como referencia. Los anticuerpos monoclonales que reconocen el antígeno CD51 se conjugaron covalentemente a perlas magnéticas, dando como resultado 25 µg de anticuerpo por ml de suspensión de perlas a una concentración de OD450 = 10.

Se dieron diferentes concentraciones de anticuerpos conjugados con perlas (0,75, 1,5, 3, 6 DO450/ml) a 100 µl de una suspensión de células neuronales que contenía 1×10^7 células. Las células se incubaron durante 15 minutos a 4°C, se lavaron una vez con 1 ml de regulador PBS + 0,5% BSA, después se resuspendieron en 1 ml del mismo regulador y se cargaron en una columna LD colocada en el campo magnético de un separador MidiMACS™ (Miltenyi Biotec). La columna se lavó dos veces con 1 ml del mismo regulador. Las células positivas para CD51 marcadas magnéticamente fueron retenidas dentro de la columna, mientras que el flujo pasante contenía las células diana negativas para CD51. Las células positivas para CD51 fueron retenidas dentro de la columna y se eluyeron como fracción celular seleccionada positivamente después de retirar la columna del imán.

Para determinar la eficiencia de agotamiento, la fracción de células original y negativa se tiñó con CD51-APC y se analizó mediante citometría de flujo. Una concentración de Microperlas de 3 OD450/ml dio como resultado una alta pureza de células CD51 negativas. La Figura 3A muestra la fracción original, negativa y positiva de un experimento representativo. El $96,7 \pm 0,5\%$ de las células en la fracción de células negativas se identificaron como negativas para CD51. El $88,4 \pm 2,2\%$ de las células diana contenidas en la fracción original se recolectó en la fracción negativa. En la figura 3A se muestra un experimento representativo.

Además, se probó una estrategia indirecta de marcación. Por lo tanto, se marcaron primero 1×10^7 células con el anticuerpo específico CD51 biotinilado durante 10 minutos y se lavaron una vez con 1 ml de PBS + 0,5% de regulador BSA. A continuación, se aplicaron Microperlas superparamagnéticas acopladas a un anticuerpo anti-Biotina. Las células se incubaron durante 15 minutos a 4°C y luego se lavaron una vez. La separación se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. Se ensayaron diferentes concentraciones del conjugado CD51-Biotina (1, 2, 4, 6, 8 µg/ml). La pureza más alta de las células negativas para CD51 se obtuvo con una concentración de CD51-Biotina de 6 µg/ml. En la figura 3B muestra un experimento representativo.

El análisis mostró que $98,6 \pm 0,17\%$ de las células en la fracción de células negativas eran negativas para CD51. La recuperación de las células diana fue de $76, \pm 2,6\%$ (véase la Figura 3B).

Ejemplo 4: Agotamiento eficiente de células no neuronales

Las células positivas para CD51 se agotaron utilizando cerebro de ratón completo derivado de ratones P2 o P3 CD1 y una estrategia de marcación indirecta como se describió anteriormente. La fracción celular original, tanto negativa como positiva, se mantuvo con anticuerpos específicos CD51 y, a manera de ejemplo, A2B5, O4, GLAST (ACSA-1), ACSA-2, CD11b para determinar el porcentaje de diferentes subtipos neuronales en el original negativo, así como en la fracción celular positiva. El uso de ratones GAD67-GFP permitió la detección de neuronas GABAérgicas. La Fig. 4A muestra que las neuronas GABAérgicas positivas para GAD67-GFP se enriquecieron en la fracción de células diana negativas, mientras que las células no neuronales, como precursores de oligodendrocitos positivos para AN2, oligodendrocitos positivos para O4 y microglia positiva para CD11b se agotaron y se encontraron en la fracción positiva (véase FIG 4A, B). La mayoría de astrocitos positivos para GLAST (ACSA-1) y ACSA-2 también se agotó, pero aproximadamente el 6% de estas células se retuvieron dentro de la fracción negativa (véase FIG 4B). Todos los conjugados de anticuerpos usados en este análisis están disponibles en Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania.

Ejemplo 5: Cultivo de la fracción celular negativa

Se obtuvieron hemisferios corticales a partir de ratones de 1 día de edad y se disociaron usando la NTDK (P). Las células positivas para CD51 se marcaron usando el anticuerpo específico CD51 primario biotinilado a una concentración de 6 µg/ml y Microperlas Anti-Biotina y luego se agotaron como se describió anteriormente. Se cultivaron tanto la fracción de células negativas como las positivas. Por lo tanto, las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio revestidos con poli-L-lisina y se mantuvieron en una atmósfera humidificada (5% de CO₂, 95% de aire) a 37°C durante 5 días usando por ejemplo MACS® Neuro Medium (Miltenyi Biotec) suplementado con MACS® Supplement B27 PLUS (Miltenyi Biotec) y L-glutamina (0,5 mM, Invitrogen). Los cultivos se fijaron entonces con paraformaldehído al 4% (PFA) en PBS (pH 7,4) durante 20 min a 4°C. Para la inmunotinción de anticuerpos primarios contra GLAST (ACSA-1, IgG2a de ratón, Miltenyi Biotec), se aplicaron GFAP (IgG1 de ratón, Millipore), Proteína Básica de Mielina (MBP) (IgG2a de ratón, Millipore) y Proteína 2 asociada a Microtúbulos (MAP2) (conejo policlonal, Millipore) durante la noche a 4°C o durante 3 h a temperatura ambiente. Después de enjuagar 3 veces con PBS, las muestras se incubaron durante 3 h a 4°C o 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes (Invitrogen). Los portaobjetos se montaron sobre portaobjetos de vidrio utilizando un medio de montaje para fluorescencia (Dako) y las muestras se analizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia (Leica TCS SP2).

La inmunotinción MAP2 detectó una gran cantidad de neuronas en la fracción de células negativas y solo unas pocas neuronas en la fracción positiva. La tinción para MAP2 y los marcadores específicos de astrocitos GFAP así como GLAST (ACSA-1) mostraron que algunos astrocitos se encontraron en la fracción negativa, pero muchos más se detectaron en la fracción positiva. Casi no se detectaron oligodendrocitos positivos para MBP en la fracción negativa y se encontraron principalmente en la fracción positiva. El porcentaje de astrocitos contaminantes y oligodendrocitos fue <10%.

Ejemplo 6: Aumento de la pureza usando un marcador específico para astrocitos además de CD51

Se disoció tejido entero de cerebro de ratón derivado de ratones P3 CD1 usando el NTDK (P) como se describió anteriormente. Para aumentar aún más la pureza de la fracción de células neuronales y para agotar también los astrocitos contaminantes, se utilizó el anticuerpo anti-ACSA-2 específico de astrocitos en combinación con CD51 a diferentes concentraciones. Por lo tanto, se aplicaron simultáneamente diferentes concentraciones del anticuerpo CD51 conjugado con biotina y del anticuerpo anti-ACSA-2 a 100 µl de una suspensión celular neuronal que contenía 1×10^7 células y después se incubaron durante 10 minutos a 4°C. Las células se procesaron posteriormente y se separaron usando una columna LD como se describió anteriormente. Para determinar la eficacia de agotamiento, se tiñeron la fracción de células original y negativa y positiva con el anticuerpo CD51 conjugado con fluorocromo y Anti-ACSA-2 y luego se analizaron mediante citometría de flujo. Se obtuvo la mejor pureza y recuperación de células diana cuando se aplicó una concentración de 4 µg/ml del conjugado CD51-Biotina y una concentración de 1 µg/ml de Anti-ACSA-2-Biotina. La figura 5 muestra un experimento representativo. Las células CD51/ACSA-2 positivas detectadas en la fracción original se agotaron casi completamente en la fracción de células diana negativa (véase la Figura 5). La pureza media de las células CD51/ACSA-2 negativas obtenidas con esta composición de anticuerpos fue de $98,55 \pm 1,2\%$, mientras que el $69,5 \pm 3,15\%$ de las células diana se recuperó en la fracción negativa.

Ejemplo 7: Separación de neuronas de diferentes regiones cerebrales

Se separaron cerebros de ratones P4 CD1 y se disociaron separadamente los hemisferios corticales, cerebelo, mesencéfalo o bulbo olfativo utilizando la NTDK (P). Las células se marcaron como se ha descrito anteriormente con los anticuerpos conjugados con CD51 y Anti-ACSA-2-Biotina a una concentración de 4 µg/ml y 1 µg/ml, respectivamente. A continuación, se aplicaron Microperlas de Anti-Biotina durante 15 minutos. Después de la separación, la fracción de células original, negativa y positiva se tiñó con anticuerpos conjugados con fluorocromo específico para ACSA-2 y CD51 y se analizó mediante citometría de flujo para determinar la pureza. La frecuencia de células CD51 y ACSA-2 positivas difirió en la fracción celular original dependiendo de la región del cerebro. En el caso de células neurales derivadas de tejido de bulbo olfativo, las células CD51/ACSA-2 positivas mostraron un porcentaje de solo 8%. En el cerebelo el porcentaje aumentó a aproximadamente 15%, mientras que en el caso de hemisferios corticales el 40% y en mesencéfalo incluso el 60% de todas las células eran células no neuronales CD51/ACSA-2 positivas. Sin embargo, la pureza de las células neuronales en la fracción negativa fue de alrededor del 99% en el caso del bulbo olfativo, el cerebelo y los hemisferios corticales y el 97% para el tejido del cerebro medio (véase la figura 6)

Ejemplo 8: Cultivo de células neuronales aisladas de tejido cerebral de ratón derivado de ratones de diferente edad

Se obtuvieron hemisferios corticales a partir de ratones de 1, 3 o 5 días de edad y se disociaron usando la NTDK (P). Las células se marcaron indirectamente y se separaron como se describió anteriormente con los anticuerpos CD51 y Anti-ACSA-2 biotinilados primero y después con las Microperlas de Anti-Biotina. Se cultivaron tanto la fracción de células negativas como las positivas. Para ello, las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina y se mantuvieron en una atmósfera humidificada (5% de CO₂, 95% de aire) a 37°C durante 5 días usando por ejemplo MACS® Neuro Medium (Miltenyi Biotec) suplementado con MACS® Supplement B27 PLUS (Miltenyi Biotec) y L-glutamina (0,5 mM, Invitrogen). Los cultivos se fijaron entonces con paraformaldehído al 4% (PFA) en PBS (pH 7,4) durante 20 min a 4°C. Para la inmunotinción, los anticuerpos primarios contra GLAST (ACSA-1, IgG2a de ratón, Miltenyi Biotec), GFAP (IgG1 de ratón, Millipore), Proteína Básica de Mielina (MBP) (IgG2a de ratón, Millipore), Proteína 2 asociada a Microtubuli (MAP2) (conejo policlonal, Millipore) y NeuN (IgG1 de ratón, Millipore) se aplicaron durante la noche a 4°C o durante 3 h a temperatura ambiente. Después de enjuagar 3 veces con PBS, las muestras se incubaron

durante 3 h a 4°C o 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes (Invitrogen). Los portaobjetos se montaron sobre portaobjetos de vidrio utilizando un medio de montaje de fluorescencia (Dako) y las muestras se analizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia (Leica TCS SP2).

- 5 La inmunotinción de la fracción celular negativa así como positiva mostró que principalmente las neuronas identificadas por MAP2 y NeuN inmunotinción estaban presentes en la fracción de células neuronales. Solo un número muy bajo de contaminantes GLAST o GFAP positivos para astrocitos y positivos para oligodendrocitos MBP se detectó en la fracción de células diana (<5%). Las neuronas aisladas de tejido cerebral de ratón P1, P3 y P7 se cultivaron con éxito (véase FIG 8).
- 10 Ejemplo 9: expresión de CD51 en células neuronales derivadas de células madre pluripotentes humanas inducidas (iPS)
- 15 Los experimentos de tinción inmunocitoquímica utilizando células madre humanas pluripotentes inducidas (iPS) que se mantuvieron bajo condiciones que promovían la diferenciación espontánea mostraron que las neuronas identificadas por inmunotinción de MAP2 y NeuN carecían de inmunoreactividad a CD51. Por el contrario, se encontró que las células no neuronales como astrocitos y oligodendrocitos expresan CD51.

Reivindicaciones

1. El uso del marcador de superficie celular CD51 como marcador de selección negativa para células neuronales.
- 5 2. Un método para enriquecimiento, aislamiento y/o detección de células neuronales que comprende las etapas de
 - a) poner en contacto una muestra que contiene células neuronales con un fragmento de unión al antígeno específico para el antígeno CD51 acoplado a una fase sólida, marcando así las células positivas para CD51 de dicha muestra
 - b) aislar las células no marcadas de dicha muestra.
- 10 3. El método de la reivindicación 2, en donde dicha muestra en la etapa
 - a) se pone en contacto simultáneamente con un fragmento de unión al antígeno específico para el antígeno CD51 acoplado a una fase sólida y con un fragmento de unión al antígeno específico para un marcador de superficie celular específico de astrocito acoplado a una superficie sólida, marcando así las células positivas para CD51 y las células que expresan un marcador de superficie específico de astrocitos de dicha muestra.
- 15 4. El método de la reivindicación 2, en donde el método comprende las etapas adicionales subsiguientes a la etapa a) y b)
 - c) poner en contacto las células no marcadas de la etapa b) con un fragmento de unión al antígeno específico para un marcador de superficie celular específico de astrocito acoplado a una superficie sólida, marcando así las células que expresan un marcador de superficie específico de astrocito,
 - d) aislar las células no marcadas.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde los fragmentos de unión al antígeno son anticuerpos o fragmentos de anticuerpo.
- 25 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la fase sólida es una partícula magnética.
- 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde el fragmento de unión al antígeno específico para un marcador de superficie celular específico de astrocitos se selecciona del grupo que consiste en Anti-ACSA-2, Anti-GLAST (ACSA-1).
- 35 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde el fragmento de unión al antígeno específico para un marcador de superficie celular específico de astrocitos es ACSA-2.
- 40 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en donde las células neuronales son células de mamífero.
- 45 10. El método de la reivindicación 9, en donde las células de mamífero son células murinas o humanas.
- 50 11. Una composición de células neuronales obtenible por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en donde dicha composición de células neuronales contiene al menos 80% de células neuronales negativas para CD51.
- 55 12. Una composición farmacéutica que comprende una composición de células neuronales que puede obtenerse mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en donde dicha composición de células neuronales contiene al menos 80% de células neuronales negativas para CD51.
- 60 13. Un kit para enriquecimiento, aislamiento y/o detección de células neuronales que comprende
 - a) un anticuerpo anti-CD51 o fragmento de anticuerpo del mismo acoplado a una fase sólida; y,
 - b) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo específico para un marcador de superficie celular específico de astrocitos acoplado a una fase sólida.
14. El kit de la reivindicación 13, en donde la fase sólida es una partícula magnética.
15. El kit de la reivindicación 13 o 14, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo específico para un marcador de superficie celular específico de astrocitos es un anticuerpo Anti-ACSA-2 o Anti-GLAST (ACSA-1) o fragmento de anticuerpo del mismo.

FIG1

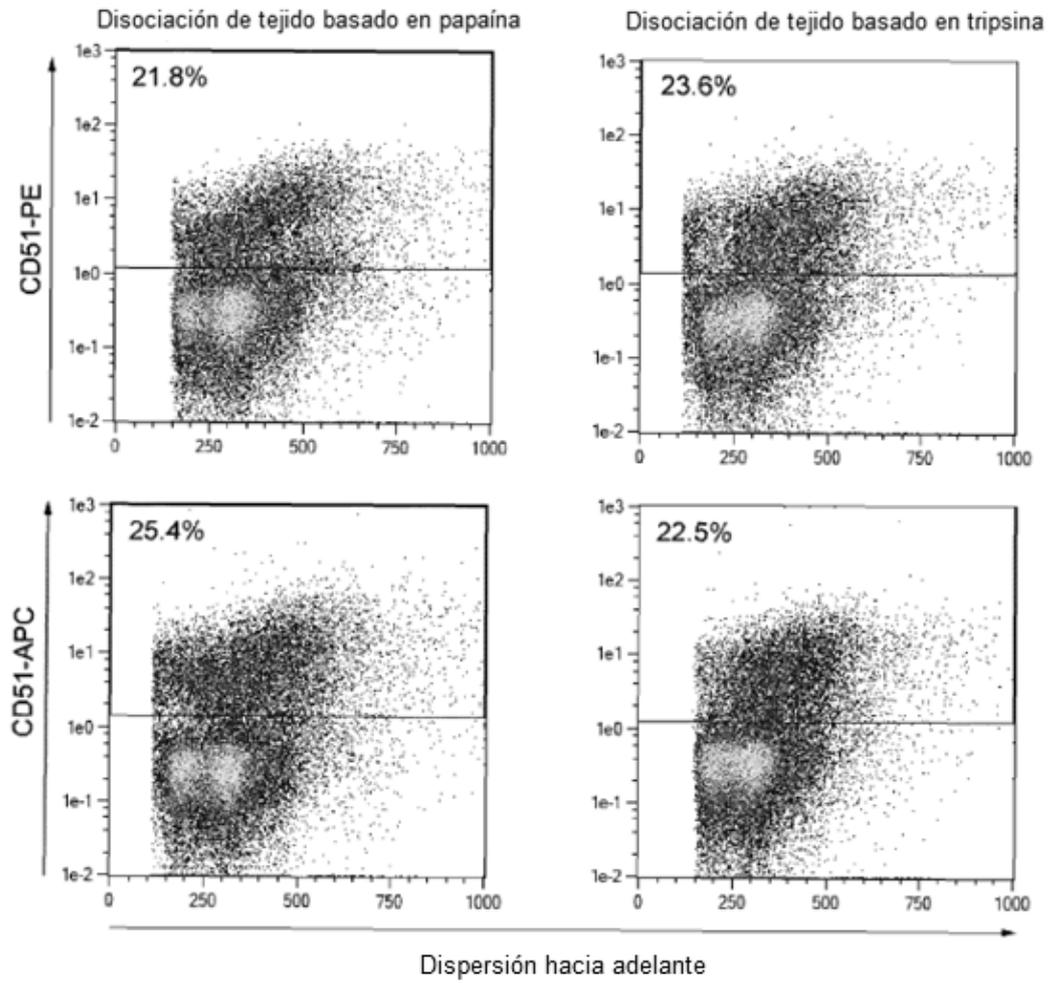


FIG2A

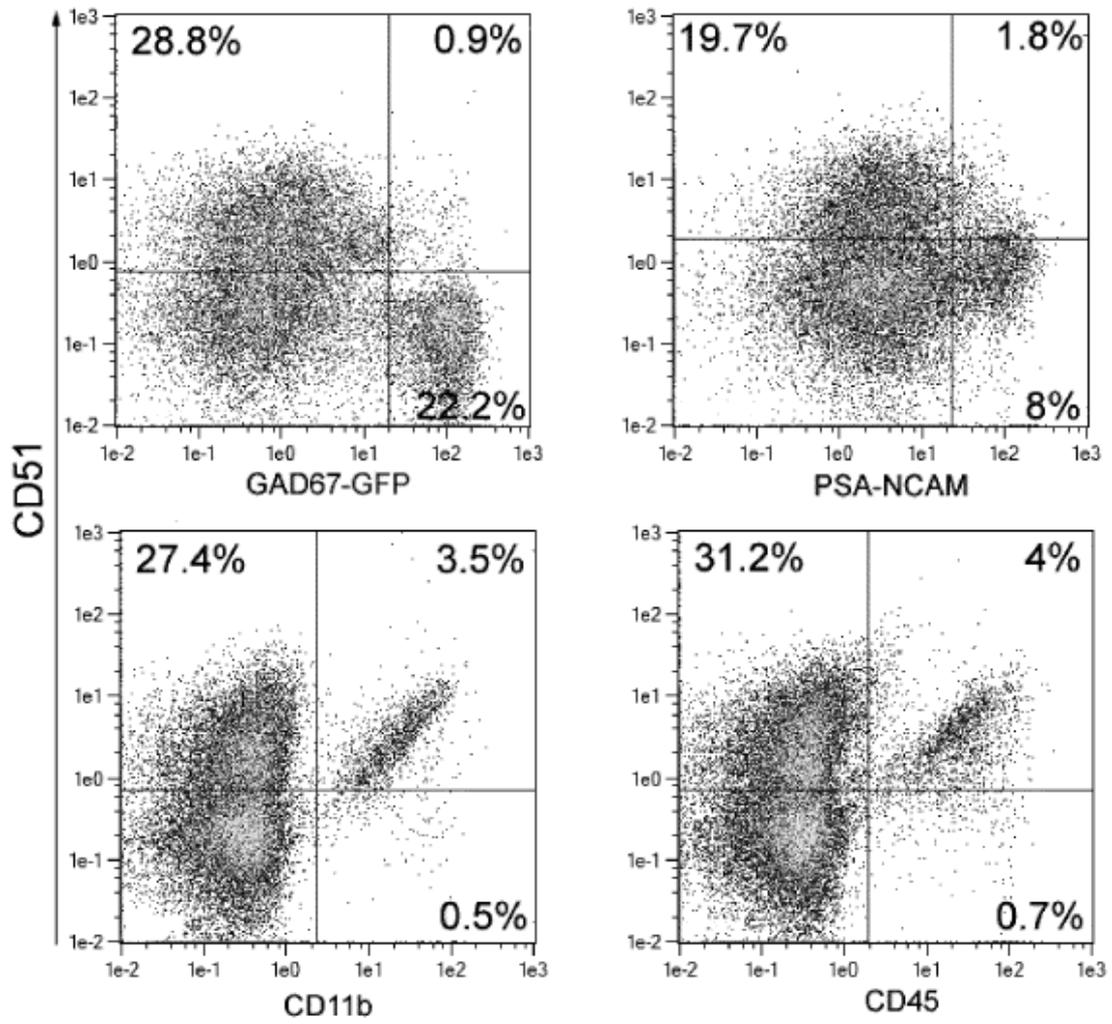


FIG2B

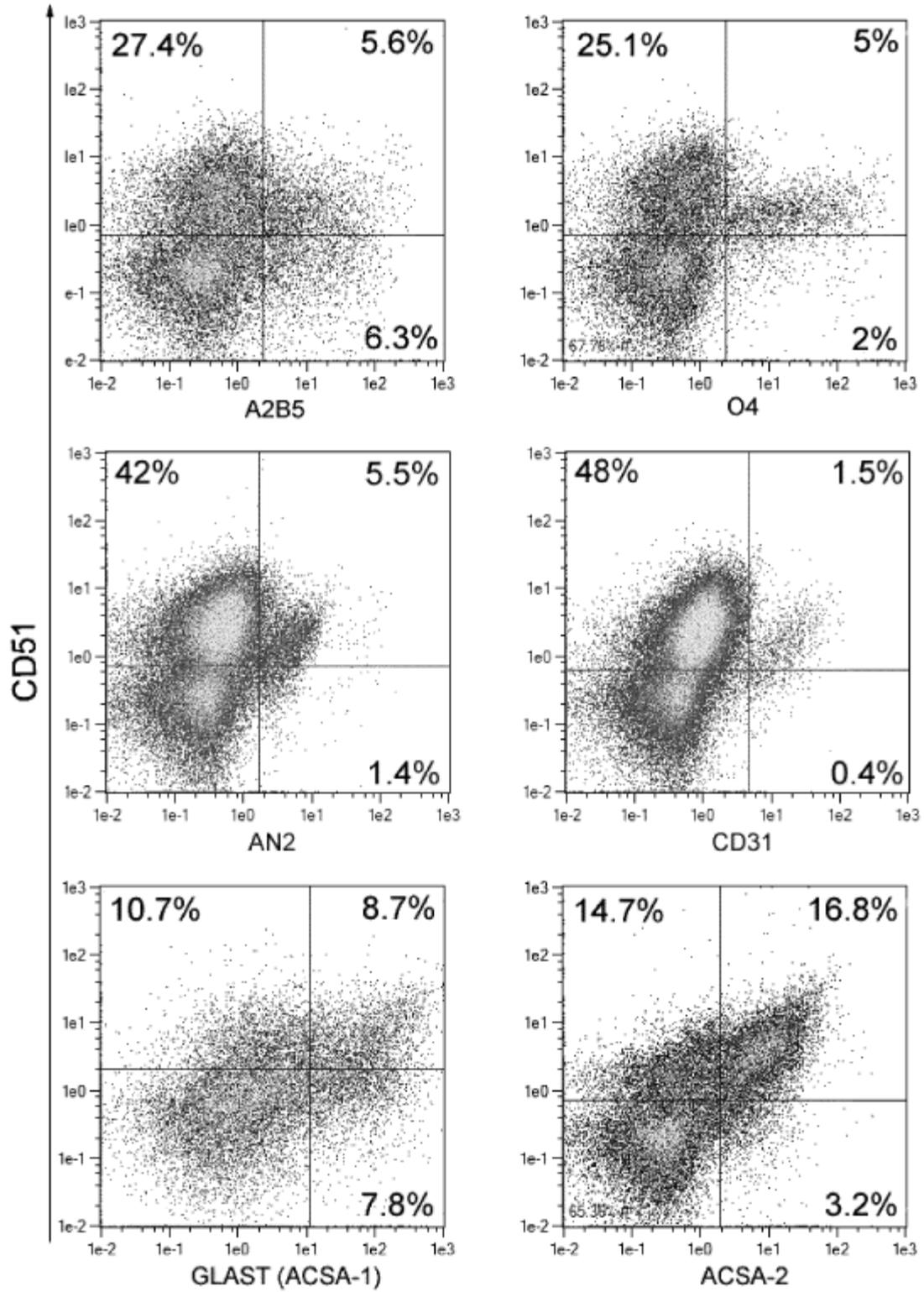


FIG3A

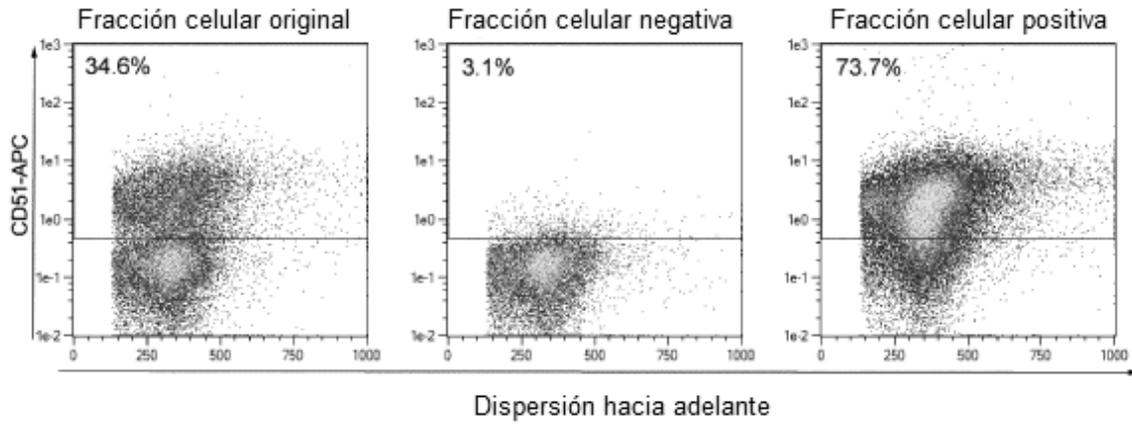


FIG3B

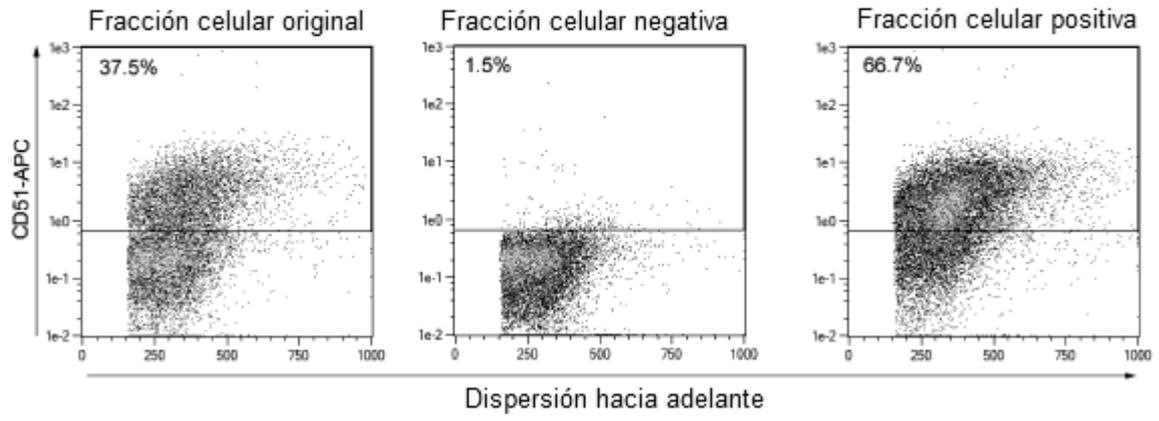


FIG4A

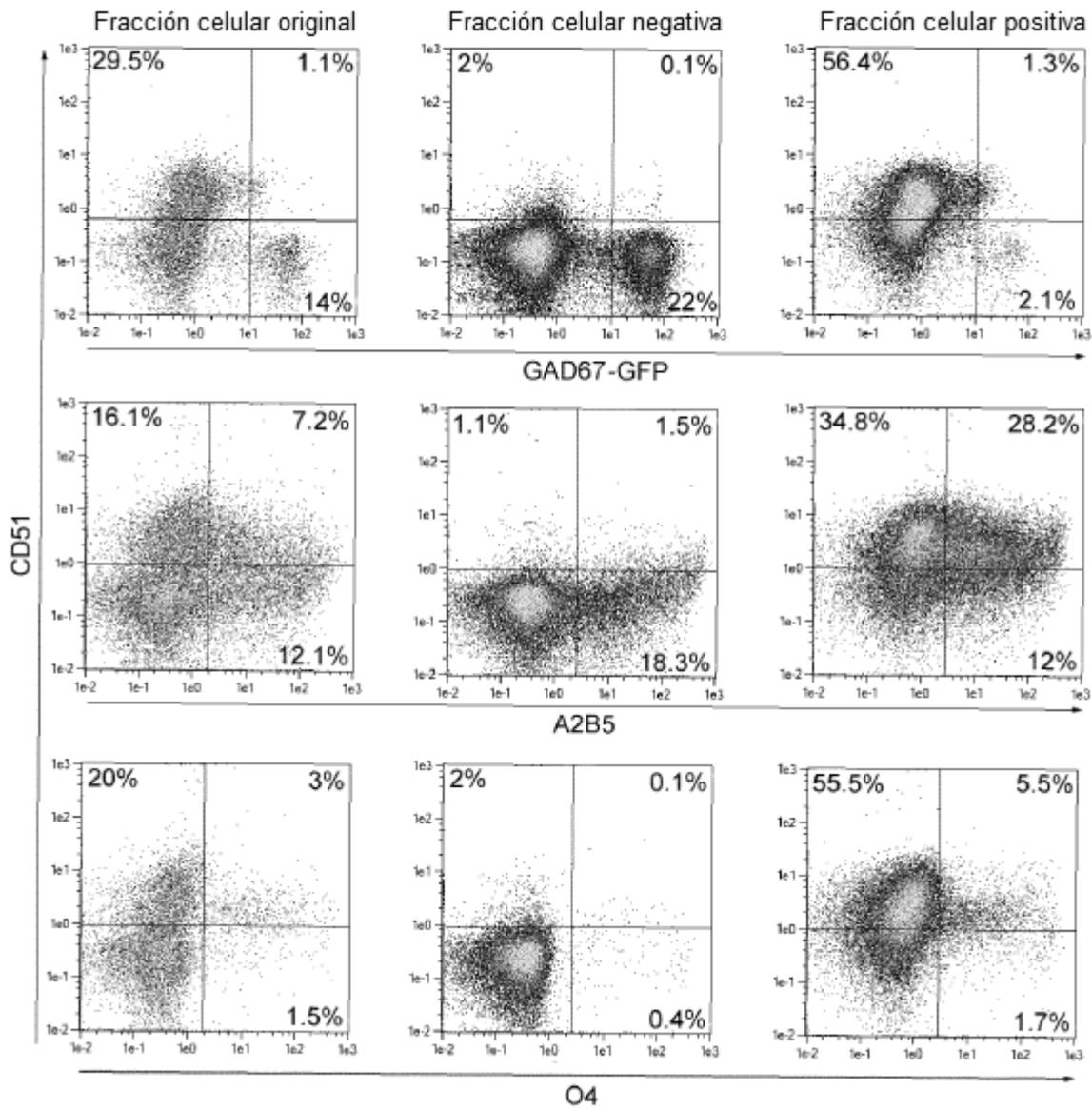


FIG4B

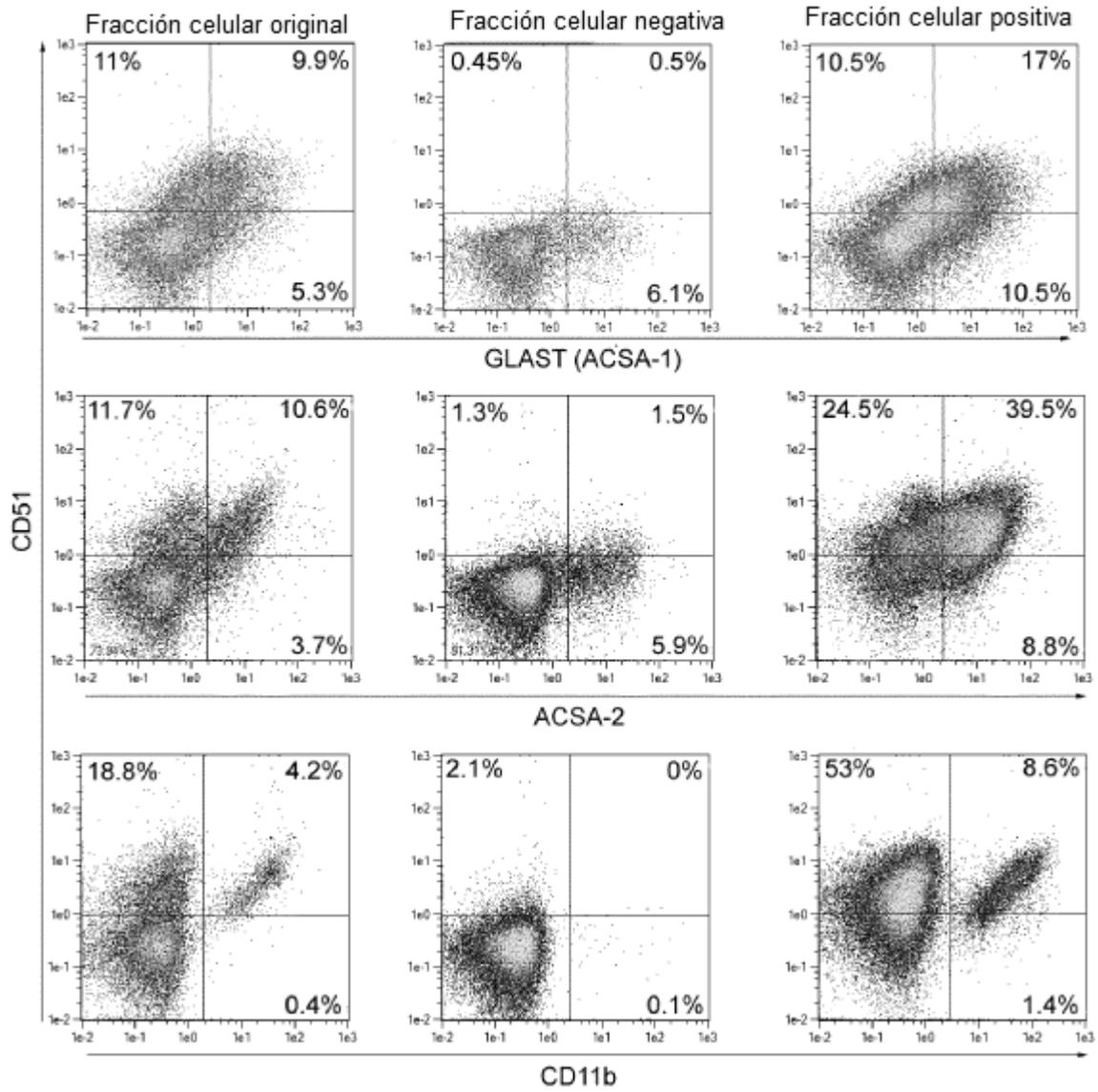


FIG5

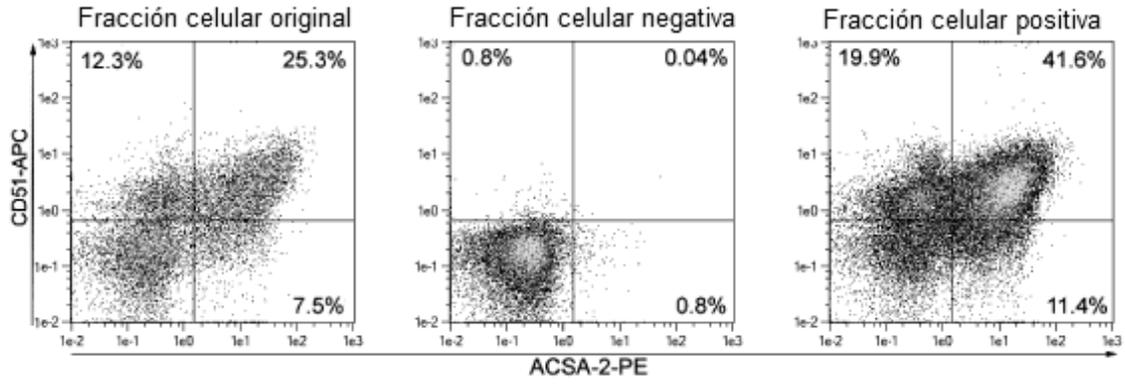


FIG6

