

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 941**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0797 (2010.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/079 (2010.01)
C12N 5/0793 (2010.01)
C12M 3/00 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
A61K 35/30 (2015.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2013 PCT/CN2013/071468**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013 WO13127293**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2013 E 13754150 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2821481**

54 Título: **Medio de cultivo para la preparación de células madre neurales y utilización del mismo**

30 Prioridad:

29.02.2012 CN 201210051095

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.08.2017

73 Titular/es:

**GUANGZHOU INSTITUTE OF BIOMEDICINE AND
HEALTH, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES
(100.0%)
190 Kai Yuan Avenue Science Park Luogang
District
Guangzhou, Guangdong 510530, CN**

72 Inventor/es:

**PAN, GUANGJIN;
PEI, DUANQING;
WANG, LIHUI;
WANG, LINLI y
XUE, YANTING**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

ES 2 628 941 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

Medio de cultivo para la preparación de células madre neurales y utilización del mismo

5 SECTOR TÉCNICO

Las realizaciones de la presente divulgación se refieren, en general, a un sector de la biomedicina, más particularmente, a un medio para la preparación de una célula madre neural y a la utilización del mismo.

10 ANTECEDENTES

Las células madre son una fuente inicial del ser humano y de varios tejidos y células del mismo, cuya característica biológica más prominente no es sólo poseer una probabilidad de autorrenovación y proliferación, sino que también poseen una probabilidad de pluripotencia. Las células madre se clasifican en células madre somáticas y células madre embrionarias (ES), según las diferentes fuentes. Entre las células madre somáticas se incluyen las células madre neurales, las células madre mesenquimales y las células madre hematopoyéticas, etc. Actualmente, además de muchos estudios sobre las células madre hematopoyéticas y las células madre mesenquimales, también son relativamente profundas las investigaciones sobre las células madre neurales.

En 1992, Reynolds y Weiss y otros aislaron en primer lugar células madre neurales a partir de un cuerpo estriado de un ratón adulto, que no sólo poseen probabilidades de autorrenovación, división y proliferación, sino que también pueden diferenciarse en la mayoría de tipos de células del sistema nervioso, que pueden responder a lesiones y enfermedades. En 1998, Okano de Japón y Goldman de la Universidad de Cornell demostraron simultáneamente la presencia de las células madre neurales en los tejidos de cerebro humano adulto. El documento WO2010/144696A1 da a conocer composiciones y procedimientos para producir células neurales a partir de células madre y utilizaciones de las mismas. El documento WO2010/063848A1 da a conocer un medio de cultivo que comprende un inhibidor de la vía de señalización BMP; y un inhibidor de la vía de señalización TGF/activina/nodal, y un procedimiento para obtener una población de precursores neurales utilizando dicho medio de cultivo. La publicación de X. Li y otros: "“ROCK” inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells", Human reproduction, volumen 24, número 3, 4 de diciembre de 2008, páginas 580-589, da a conocer que el tratamiento con el inhibidor Y-27632 de la quinasa asociada a Rho junto con acutasa se puede utilizar para mejorar la tasa de supervivencia después de la descongelación de células hES individuales utilizando protocolos convencionales de congelación lenta y descongelación rápida en condiciones de cultivo sin suero y sin alimentador. La publicación de T. Zhou y otros: "generation of induced pluripotent stem cells from urine", Journal of the American Society of Nephrology, Williams y Wilkins, Baltimore, MD, Estados Unidos, volumen 22, número 7, 1 de julio de 2011, páginas 1.221 a 1.228, da a conocer un procedimiento sencillo, reproducible, no invasivo para generar iPSC humanas a partir de células tubulares renales presentes en la orina. Actualmente, se ha demostrado la presencia de células madre multipotentes en el sistema nervioso a través de la práctica gradual, a continuación, se ha aislado con éxito del mismo, lo cual aporta nuevas esperanzas para la reparación de lesiones en el sistema nervioso y la terapia de reemplazo celular de trastornos neurodegenerativos. Dado que la característica de una neurona de no ser regenerativa y no realizar la autorreparación ha sido un obstáculo insalvable en la ciencia médica, y debido a la vulnerabilidad de la estructura de organización del sistema nervioso central y la importancia de la misma en la actividad intelectual, el trastorno adicional del sistema nervioso central y las secuelas del mismo son una de las enfermedades más crónicas que afectan a la salud humana y a la calidad de vida, el estudio de los mismos en base a células madre neurales se ha convertido en un tema de actualidad y se centra parcialmente en el sector de la investigación de células madre, lo cual tiene una perspectiva brillante en la aplicación clínica.

Sin embargo, en la actualidad la investigación relacionada con las células madre neurales aún debe mejorarse.

50 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

Las realizaciones de la presente divulgación buscan resolver, como mínimo, uno de los problemas existentes en la técnica relacionada, como mínimo, en cierto grado. De este modo, un propósito de la presente divulgación es dar a conocer medios para la preparación eficaz de una célula madre neural.

La presente invención se refiere a un medio para la preparación de células madre neurales, según la reivindicación 1. Por consiguiente, el medio comprende: un medio básico para el cultivo de células madre y un inhibidor que consiste en un inhibidor de GSK, un inhibidor de MEK, un inhibidor de TGF- β , un inhibidor de ROCK y un inhibidor de BMP. Los inventores de la presente divulgación han descubierto que utilizando el medio para el cultivo de células somáticas, en particular, células somáticas que expresan factores de regulación de la transcripción, se pueden transdiferenciar de manera eficaz las células somáticas en células madre neurales (en el presente documento también conocidas como "células madre neurales inducidas"), mediante lo cual se pueden acortar ampliamente los tiempos para la transdiferenciación.

También se da a conocer un kit para la preparación de una célula madre neural, el kit puede incluir el medio mencionado anteriormente. Los inventores de la presente divulgación han descubierto que utilizando el kit para el

cultivo de células somáticas, en particular, células somáticas que expresan factores de regulación de la transcripción, se pueden transdiferenciar de manera eficaz las células somáticas en células madre neurales, lo que puede acortar ampliamente los tiempos para la transdiferenciación.

5 También se da a conocer la utilización del kit mencionado anteriormente en la preparación de una célula madre neural. Utilizando el kit, según las realizaciones de la presente divulgación, se pueden cultivar de manera eficaz células somáticas, en particular, células somáticas que expresan factores de regulación de la transcripción, que pueden posteriormente transdiferenciar de manera eficaz las células somáticas en células madre neurales en un tiempo muy acortado.

10 También se da a conocer la utilización del medio mencionado anteriormente en la preparación de una célula madre neural, que puede transdiferenciar de manera eficaz las células somáticas en células madre neurales en un tiempo muy acortado mediante el cultivo de las células somáticas in vitro, en particular, células somáticas que expresan factores de regulación de la transcripción.

15 La presente invención se refiere, además, a un procedimiento para la preparación de una célula madre neural, según la reivindicación 4. Por consiguiente, el procedimiento comprende: cultivar una célula somática utilizando el medio mencionado anteriormente, en el que la célula somática comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor de células madre pluripotentes para inducir una transdiferenciación desde la célula somática a la célula madre neural, siendo el factor de célula madre pluripotente, como mínimo, uno seleccionado entre el grupo que comprende Oct4, Sox2, Klf4 y miR302 y en el que las células somáticas son células exfoliativas de orina humana. Los inventores de la presente divulgación han descubierto que utilizando el medio, según las realizaciones de la presente divulgación, para cultivar las células somáticas que contienen la secuencia de ácido nucleico del factor de células madre pluripotentes codificado por factores de transcripción específicos, se pueden transdiferenciar de manera eficaz las células somáticas en células madre neurales en un tiempo muy acortado.

25 También se da a conocer una célula madre neural o un derivado de la misma. Según las realizaciones de la presente divulgación, la célula madre neural se obtiene mediante el procedimiento mencionado anteriormente. Además, las células madre neurales o derivados de las mismas, según las realizaciones de la presente divulgación, pueden diferenciarse de manera eficaz en células neurales en condiciones apropiadas.

30 También se da a conocer la utilización de la célula madre neural o el derivado de la misma, mencionados anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inducida por el daño en células neurales. Dado que la célula madre neural y el derivado de la misma, según las realizaciones de la presente divulgación, se pueden diferenciar de manera eficaz en células neurales en condiciones apropiadas, la célula madre neural y el derivado de la misma pueden prepararse posteriormente como un medicamento, que puede utilizarse para el tratamiento de la enfermedad inducida por el daño en células neurales.

35 Las células madre neurales se pueden utilizar en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad inducida por el daño en células neurales. El procedimiento puede comprender: introducir la célula madre neural o el derivado de la misma, mencionados anteriormente, en un paciente. Mediante la introducción en el paciente de la célula madre neural o el derivado de la misma, mencionados anteriormente, las células madre neurales pueden diferenciarse de manera eficaz en células neurales, que pueden curar posteriormente un daño corporal inducido por el daño en células neurales.

40 También se da a conocer un procedimiento para la preparación de una célula madre neural. El procedimiento puede comprender: cultivar la célula madre neural mencionada anteriormente en condiciones adecuadas para la diferenciación. Utilizando el procedimiento, según las realizaciones de la presente divulgación, pueden diferenciarse de manera eficaz las células madre neurales en células neurales, con lo que pueden prepararse de manera eficaz las células neurales.

45 También se da a conocer un sistema para la preparación de una célula madre neural. El sistema puede comprender: un aparato de aislamiento, para aislar células exfoliativas de orina humana de la orina humana, un aparato de transformación, conectado al aparato de aislamiento y equipado con un vector de una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor de células madre pluripotentes para transformar las células exfoliativas de orina humana, siendo el factor de células madre pluripotentes, como mínimo, uno seleccionado entre el grupo que comprende Oct4, Sox2, Klf4 y miR302; y un aparato de transdiferenciación, conectado al aparato de transformación y equipado con el medio mencionado anteriormente, para someter las células exfoliativas de orina humana transformadas a transdiferenciación, para inducir la transdiferenciación de células exfoliativas de orina humana transformadas en células madre neurales. Utilizando el sistema se puede aplicar el procedimiento de manera eficaz para la preparación de la célula neural mencionada anteriormente, con lo que pueden prepararse de manera eficaz las células madre neurales.

50 También se da a conocer un procedimiento de cribado de un compuesto para inducir la diferenciación de una célula madre neural. El procedimiento puede comprender: poner en contacto la célula madre neural mencionada anteriormente con un compuesto candidato y determinar la pluripotencia de la célula madre neural antes y después

de la etapa de poner en contacto la célula madre neural con el compuesto candidato, respectivamente, en el que la disminución de la pluripotencia después de poner en contacto la célula madre neural con el compuesto candidato es un indicador de que el compuesto candidato tiene la capacidad de inducir la diferenciación de las células madre neurales. Utilizando el procedimiento se puede realizar un cribado de manera eficaz para obtener el compuesto para inducir la diferenciación de la célula madre neural.

Las células madre neurales se pueden utilizar en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa o de una enfermedad inducida por el daño en células neurales. El procedimiento puede comprender: aislar una célula somática de un paciente; preparar una célula madre neural basada en la célula somática, según el procedimiento mencionado anteriormente; e introducir la célula madre neural en el paciente. Utilizando el procedimiento para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa o de una enfermedad inducida por el daño en células neurales, se pueden introducir de manera eficaz las células madre neurales obtenidas en un paciente, que posteriormente pueden diferenciarse de manera eficaz en células neuronales en el paciente y curar un daño en el organismo inducido por la neurodegeneración y el daño en células neurales, con las cuales se puede tratar la enfermedad neurodegenerativa y la enfermedad inducida por el daño en células neurales.

También se da a conocer un procedimiento para la determinación de si un medicamento afecta al sistema nervioso. El procedimiento puede comprender: poner en contacto el medicamento con la célula madre neural, según las realizaciones de la presente divulgación, y determinar la célula madre neural antes y después de la etapa de puesta en contacto del medicamento con la célula madre neural, determinando así si el medicamento afecta al sistema nervioso basándose en un cambio de la célula madre neural. Utilizando el procedimiento se puede determinar de manera eficaz si el medicamento afecta al sistema nervioso.

Los aspectos y ventajas adicionales de las realizaciones de la presente divulgación se proporcionan, en parte, en las siguientes descripciones, serán evidentes, en parte, a partir de las siguientes descripciones o se aprenderán a partir de la práctica de las realizaciones de la presente divulgación.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Estos y otros aspectos y ventajas de las realizaciones de la presente divulgación serán evidentes y se entenderán más fácilmente a partir de las siguientes descripciones realizadas con referencia a los dibujos adjuntos, en los que: la figura 1 es un diagrama de flujo que muestra un procedimiento para la preparación de una célula madre neural, según una realización de la presente divulgación; la figura 2 es un diagrama esquemático que muestra un sistema para la preparación de una célula madre neural, según una realización de la presente divulgación; la figura 3 es un diagrama de flujo que muestra un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa o de una enfermedad inducida por el daño en células neurales, según una realización de la presente divulgación; la figura 4 es una imagen que muestra la morfología celular de diferentes fases durante la inducción de células madre neurales inducidas, según una realización de la presente divulgación; la figura 5 es una imagen que muestra un nivel de expresión de un gen marcador en células madre neurales en células madre neurales inducidas determinado mediante inmunofluorescencia y PCR en tiempo real, según una realización de la presente divulgación; y la figura 6 es una imagen que muestra las expresiones de diferentes marcadores específicos para diferentes tipos de neuronas y células de la neuroglia entre productos de diferenciación in vitro que derivan de células madre neurales inducidas determinadas mediante inmunofluorescencia, según una realización de la presente divulgación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se hará referencia en detalle a realizaciones de la presente divulgación. Las realizaciones descritas en el presente documento con referencia a los dibujos son explicativas, ilustrativas y se utilizan para entender, en general, la presente divulgación. Las realizaciones no se interpretarán como limitativas de la presente divulgación. Los mismos elementos o elementos similares y los elementos que tienen las mismas funciones o funciones similares se designan mediante números de referencia del mismo tipo a lo largo de las descripciones.

La presente invención se refiere a un medio para la preparación de una célula madre neural, caracterizado por que comprende: un medio básico para el cultivo de células madre y un inhibidor que consiste en un inhibidor de GSK, un inhibidor de MEK, un inhibidor de TGF- β , un inhibidor de ROCK y un inhibidor de BMP. Los inventores de la presente divulgación han descubierto que utilizando el medio para el cultivo de células somáticas, en particular, células somáticas que expresan factores de regulación de la transcripción, se pueden transdiferenciar de manera eficaz las células somáticas en células madre neurales, mediante lo cual se pueden acortar ampliamente los tiempos para la transdiferenciación.

Según las realizaciones de la presente divulgación, los tipos del medio básico no están sometidos a restricciones especiales. Según una realización de la presente divulgación, el medio básico es mTeSR1 (se puede adquirir de la compañía Stem Cell). Según una realización de la presente divulgación, el inhibidor puede comprender el inhibidor

de GSK, CHIR99021, el inhibidor PD0325901 de MEK, el inhibidor A83-01 de TGF- β , el inhibidor tiazovivina de ROCK y el inhibidor DMH1 de BMP. Todos estos inhibidores están disponibles en el mercado, mediante lo cual se puede mejorar adicionalmente la eficacia de la diferenciación de las células somáticas en células madre neurales. Las concentraciones de cada uno de los inhibidores en el medio para la preparación de células madre neurales no están sometidas a restricciones especiales. Según una realización de la presente divulgación, el inhibidor puede comprender: de aproximadamente 0,3 μ M a aproximadamente 30 μ M de inhibidor CHIR99021 de GSK; de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 10 μ M de inhibidor PD0325901 de MEK; de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 5 μ M de inhibidor A83-01 de TGF- β ; de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 5 μ M de inhibidor tiazovivina de ROCK; y de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 2 μ M de inhibidor DMH1 de BMP. De manera preferente, según una realización de la presente divulgación, el inhibidor puede comprender: aproximadamente 3 μ M de inhibidor CHIR99021 de GSK, aproximadamente 1 μ M de inhibidor PD0325901 de MEK, aproximadamente 0,5 μ M de inhibidor A83-01 de TGF- β , aproximadamente 0,5 μ M de inhibidor tiazovivina de ROCK, y aproximadamente 0,2 μ M de inhibidor DMH1 de BMP, mediante el cual se puede mejorar adicionalmente la eficacia de la diferenciación de las células somáticas en células madre neurales.

También se da a conocer un kit para la preparación de una célula madre neural. El kit puede comprender: un inhibidor que consiste en un inhibidor de GSK, un inhibidor de MEK, un inhibidor de TGF- β , un inhibidor de ROCK y un inhibidor de BMP. Los inventores de la presente divulgación han descubierto que utilizando el kit para el cultivo de células somáticas, en particular, células somáticas que expresan factores de regulación de la transcripción, se pueden transdiferenciar de manera eficaz las células somáticas en células madre neurales, mediante lo cual se pueden acortar ampliamente los tiempos para la transdiferenciación. Según realizaciones de la presente divulgación, los tipos de inhibidores no están sometidos a restricciones especiales. Según una realización de la presente divulgación, el inhibidor puede comprender el inhibidor CHIR99021 de GSK, el inhibidor PD0325901 de MEK, el inhibidor A83-01 de TGF- β , el inhibidor tiazovivina de ROCK y el inhibidor DMH1 de BMP. Todos estos inhibidores están disponibles en el mercado, lo cual puede mejorar adicionalmente la eficacia de la diferenciación de las células somáticas en células madre neurales. Las concentraciones de cada uno de los inhibidores en el medio para la preparación de células madre neurales no están sometidas a restricciones especiales. Según una realización de la presente divulgación, el inhibidor CHIR99021 de GSK, el inhibidor PD0325901 de MEK, el inhibidor A83-01 de TGF- β , el inhibidor tiazovivina de ROCK y el inhibidor DMH1 de BMP, están contenidos en diferentes recipientes, respectivamente. De este modo, el kit se puede utilizar de manera conveniente en la transdiferenciación de las células somáticas en células madre neurales. Según una realización de la presente divulgación, el kit puede comprender, además, un medio básico, en el que el medio básico es mTeSR1 (se puede adquirir de la compañía Stem Cell).

En el kit, el inhibidor está disuelto en el medio básico. De este modo, el kit se puede utilizar de manera conveniente en la transdiferenciación de las células somáticas en células madre neurales. Según una realización de la presente divulgación, en el kit, el inhibidor disuelto en el medio básico puede comprender el inhibidor CHIR99021 de GSK, que tiene una concentración de aproximadamente 3 μ M, el inhibidor PD0325901 de MEK, que tiene una concentración de aproximadamente 1 μ M, el inhibidor A83-01 de TGF- β , que tiene una concentración de aproximadamente 0,5 μ M, el inhibidor tiazovivina de ROCK, que tiene una concentración de aproximadamente 0,5 μ M, y el inhibidor DMH1 de BMP, que tiene una concentración de aproximadamente 0,2 μ M. De este modo, se puede mejorar adicionalmente la eficacia de la transdiferenciación de las células somáticas en células madre neurales utilizando el kit mencionado anteriormente.

Además, el kit puede incluir el medio. Los inventores de la presente divulgación han descubierto que utilizando el kit para el cultivo de células somáticas, en particular, células somáticas que expresan factores de regulación de la transcripción, se pueden transdiferenciar, de manera eficaz, las células somáticas en células madre neurales, mediante lo cual se pueden acortar considerablemente los tiempos para la transdiferenciación. El medio para la preparación de células madre neurales se ha descrito en detalle anteriormente, por lo cual se omite por razones de brevedad. El kit mencionado anteriormente se puede utilizar en la preparación de una célula madre neural. Utilizando el kit se pueden cultivar, de manera eficaz, células somáticas, en particular, células somáticas que expresan factores de regulación de la transcripción, que posteriormente pueden transdiferenciar, de manera eficaz, las células somáticas en células madre neurales en un tiempo muy acortado. El kit se ha descrito en detalle anteriormente, por lo cual se omite por razones de brevedad. El medio mencionado anteriormente se puede utilizar en la preparación de una célula madre neural, mediante lo cual se pueden transdiferenciar, de manera eficaz, las células somáticas en células madre neurales en un tiempo muy acortado mediante el cultivo de las células somáticas in vitro, en particular las células somáticas que expresan factores de regulación de la transcripción. El medio para la preparación de las células madre neurales se ha descrito en detalle anteriormente, por lo cual se omite por razones de brevedad.

La presente invención se refiere, además, a un procedimiento para la preparación de una célula madre neural, según la reivindicación 4. Por consiguiente, el procedimiento comprende: cultivar una célula somática utilizando el medio mencionado anteriormente, en el que la célula somática comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor de células madre pluripotentes para inducir la transdiferenciación desde la célula somática a la célula madre neural, siendo el factor de células madre pluripotentes, como mínimo, uno seleccionado entre el grupo

que comprende Oct4, Sox2, Klf4 y miR302, y en el que las células somáticas son células exfoliativas de orina humana. Los inventores de la presente divulgación han descubierto que utilizando el medio, según las realizaciones de la presente divulgación, para el cultivo de células somáticas que contienen la secuencia de ácido nucleico del factor de células madre pluripotentes codificado por factores de transcripción específicos, se pueden transdiferenciar, de manera eficaz, las células somáticas en células madre neurales en un tiempo muy acortado. De este modo, se puede obtener de manera conveniente una célula inicial, que puede mejorar adicionalmente la eficacia de la preparación de células madre neurales, reducir los costes para la preparación de células madre neurales y ahorrar en costes de mano de obra y de materiales para la obtención de células iniciales utilizando cirugía invasiva.

Además, según las realizaciones de la presente divulgación, la célula somática comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor de células madre pluripotentes, en el que el factor de células madre pluripotentes es, como mínimo, uno seleccionado entre el grupo que comprende Oct4, Sox2, Klf4 y miR302, también se puede obtener sometiendo la célula somática sin el factor de células madre pluripotentes a un tratamiento biológico. De manera específica, según las realizaciones de la presente divulgación, la célula somática que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica el factor de células madre pluripotentes, en el que el factor de células madre pluripotentes es, como mínimo, uno seleccionado entre el grupo que comprende Oct4, Sox2, Klf4 y miR302, se puede obtener mediante las siguientes etapas:

en primer lugar, centrifugar orina humana para obtener un precipitado, en segundo lugar, cultivar el precipitado utilizando un medio para el cultivo de orina para obtener una célula exfoliativa de orina humana primaria, y finalmente, transformar la células exfoliativa de orina humana primaria utilizando un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor de células madre pluripotentes para obtener la célula somática, en el que el factor de células madre pluripotentes es, como mínimo, uno seleccionado entre el grupo que comprende Oct4, Sox2, Klf4 y miR302. Según una realización de la presente divulgación, el vector contiene la secuencia de ácido nucleico que codifica Oct4, Sox2, Klf4 y miR302. Según una realización de la presente divulgación, el vector comprende plásmidos que contienen la secuencia de ácido nucleico que codifica Oct4, Sox2, Klf4 y miR302, respectivamente. Según una realización de la presente divulgación, la célula exfoliativa de orina humana primaria se transforma mediante una transducción eléctrica.

Después de la obtención de la célula madre neural, ésta se puede someter posteriormente a un cultivo proliferativo. Según las realizaciones de la presente divulgación, los procedimientos para someter la célula madre neural al cultivo proliferativo no están sometidos a restricciones especiales. Según una realización de la presente divulgación, el procedimiento para la preparación de la célula madre neural puede comprender, además, las siguientes etapas para someter la célula madre neural al cultivo proliferativo:

en primer lugar, precultivar la células madre neural utilizando un medio básico para obtener una célula madre neural adherente, en el que el medio básico puede ser mTeSR1, en segundo lugar, cultivar la célula madre neural adherente en un medio para células madre neurales, en el que el medio para células madre neurales comprende un medio DMEM/F2 complementado con aproximadamente el 1% de suplemento de N2, aproximadamente el 1% de aminoácidos no esenciales, aproximadamente el 0,1% de heparina, aproximadamente 20 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico y aproximadamente 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico.

También se da a conocer una célula madre neural o un derivado de la misma. La célula madre neural se obtiene mediante el procedimiento mencionado anteriormente. Además, las células madre neurales o derivados de las mismas se pueden diferenciar, de manera eficaz, en células neurales en condiciones apropiadas. La célula madre neural o el derivado de la misma, mencionados anteriormente, se pueden utilizar en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inducida por el daño en células neurales. Como la célula madre neural y el derivado de la misma se pueden diferenciar, de manera eficaz, en células neurales en condiciones apropiadas, la célula madre neural y el derivado de la misma se pueden preparar posteriormente como un medicamento, el cual puede utilizarse para el tratamiento de la enfermedad inducida por el daño en células neurales. Las células madre neurales se pueden utilizar en un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad inducida por daño en células neurales. Dicho procedimiento puede comprender: introducir la célula madre neural o el derivado de la misma, mencionados anteriormente, en un paciente. Mediante la introducción de la célula madre neural o el derivado de la misma, mencionados anteriormente, en el paciente, las células madre neurales pueden diferenciarse de manera eficaz en células neurales, que pueden curar posteriormente un daño corporal inducido por el daño en células neurales.

También se da a conocer un procedimiento para la preparación de una célula madre neural. El procedimiento puede comprender: cultivar la célula madre neural mencionada anteriormente en condiciones adecuadas para la diferenciación. Utilizando el procedimiento, según las realizaciones de la presente divulgación, se pueden diferenciar, de manera eficaz, las células madre neurales en células neurales, mediante lo cual se pueden preparar, de manera eficaz, las células neuronales. Según realizaciones de la presente divulgación, los procedimientos para someter la célula madre neural al cultivo diferencial no están sometidos a restricciones especiales. Según una

realización de la presente divulgación, la célula madre neural se cultiva en medio DMEM/F12 complementado con aproximadamente el 1% de suplemento de N2, aproximadamente el 1% de aminoácidos no esenciales, aproximadamente el 0,1% de heparina y neurotrofina, para obtener diferentes tipos de neuronas y células de la neuroglia, en el que la neurotrofina consiste en aproximadamente 10 ng/ml de BDNF, aproximadamente 10 ng/ml de GDNF, aproximadamente 10 ng/ml de CNTC y aproximadamente 10 ng/ml de IGF.

También se da a conocer un sistema para la preparación de una célula madre neural. Con referencia a la figura 2, el sistema -1000- puede comprender: el aparato de aislamiento -100-, el aparato de transformación -200- y el aparato de transdiferenciación -300-, en el que el aparato de aislamiento -100- se utiliza para aislar células exfoliativas de orina humana de la orina humana. El aparato de transformación -200-, conectado al aparato de aislamiento -100- y equipado con un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor de células madre pluripotentes, en el que el factor de células madre pluripotentes es, como mínimo, uno seleccionado ente el grupo que comprende Oct4, Sox2, Klf4 y miR302, se utiliza para transformar las células exfoliativas de orina humana recibidas del aparato de aislamiento -100-. El aparato de transdiferenciación -300-, conectado al aparato de transformación y equipado con el medio mencionado anteriormente, para someter las células exfoliativas de orina humana transformadas recibidas del aparato de transformación -200- a la transdiferenciación, se utiliza para inducir la transdiferenciación de células exfoliativas de orina humana transformadas en células madre neurales. Utilizando el sistema se puede aplicar, de manera eficaz, el procedimiento para la preparación de la célula neural mencionada anteriormente, mediante lo cual se pueden preparar, de manera eficaz, células madre neurales. También se da a conocer un procedimiento de cribado de un compuesto para inducir la diferenciación de células madre neurales. El procedimiento puede comprender: poner en contacto la célula madre neural mencionada anteriormente con un compuesto candidato y determinar la pluripotencia de la célula madre neural antes y después de la etapa de contacto de la célula madre neural con el compuesto candidato, respectivamente, en el que la disminución de la pluripotencia después de poner en contacto la célula madre neural con el compuesto candidato es un indicador de que el compuesto candidato tiene la capacidad de inducir la diferenciación de una célula madre neural. Utilizando el procedimiento se puede realizar un cribado, de manera eficaz, para obtener el compuesto para inducir la diferenciación de la célula madre neural. Las células madre neurales se pueden utilizar para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad inducida por el daño en células neurales. Con referencia a la figura 3, dicha utilización puede comprender las siguientes etapas:

en primer lugar, aislar una célula somática de un paciente,
en segundo lugar, preparar una célula madre neural basada en la célula somática según el procedimiento anterior;
e introducir la célula madre neural en el paciente.

Utilizando dicho procedimiento para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad inducida por el daño en células neurales, se pueden introducir, de manera eficaz, las células madre neurales obtenidas en un paciente, que pueden diferenciarse posteriormente, de manera eficaz, en células neurales en el paciente, y curar un daño en el organismo inducido por la neurodegeneración y el daño en células neurales, con las cuales se puede tratar la enfermedad neurodegenerativa y la enfermedad inducida por el daño en células neurales.

También se da a conocer un procedimiento para la determinación de si un medicamento afecta al sistema nervioso. El procedimiento puede comprender: poner en contacto el medicamento con la célula madre neural, según las realizaciones de la presente divulgación; y determinar la célula madre neural antes y después de la etapa de contacto del medicamento con la célula madre neural, determinando así si el medicamento afecta al sistema nervioso basándose en un cambio de la célula madre neural. Utilizando el procedimiento se puede determinar, de manera eficaz, si el medicamento afecta al sistema nervioso.

Cabe señalar que el medio para la preparación de la célula madre neural y la utilización del mismo se han alcanzado a través de un trabajo muy creativo y un lenguaje óptimo de los inventores de la presente divulgación. Además, las características descritas en cada aspecto de la presente divulgación pueden referirse mutuamente entre sí, lo cual se omite en el presente documento por conveniencia.

Se hará referencia en detalle a los ejemplos de la presente divulgación. Los expertos en la materia entenderán que los siguientes ejemplos son explicativos y no se pueden interpretar como limitativos del alcance de la presente divulgación. Si la tecnología o condiciones específicas no están especificados en los ejemplos, se realizará una etapa, según las técnicas o condiciones descritas en la bibliografía en la técnica o según las instrucciones del producto. Si no se especifican los fabricantes de los reactivos o instrumentos, los reactivos o instrumentos pueden estar disponibles en el mercado.

EJEMPLO 1: Preparación de célula madre neural

1. Aislamiento de una célula exfoliativa de orina humana (células de orina, UC)

El aislamiento de una célula exfoliativa de orina humana se lleva a cabo según las siguientes etapas:

(1) recoger 150-200 ml de la parte media de la corriente de orina en un recipiente estéril que contiene penicilina/estreptomicina;

- (2) transferir la orina a un tubo de centrífuga de 50 ml y centrifugar a 400 g durante 10 min;
- (3) descartar el sobrenadante para conservar aproximadamente 5 ml de la orina;
- (4) añadir aproximadamente de 10 a 30 ml de PBS que contiene la penicilina/estreptomicina a la orina obtenida en la etapa (3) y centrifugar a 400 g durante 10 min después de mezclar con suavidad;
- (5) descartar el sobrenadante hasta que el líquido restante es inferior a 0,5 ml;
- (6) añadir 1 ml de medio para el cultivo de orina al líquido restante de la orina para resuspender el precipitado obtenido y recoger las células;
- (7) sembrar las células recogidas en una placa de cultivo de 60 mm (o una placa de seis pocillos) recubiertas con gelatina al 0,1% con 1 ml adicional de medio para el cultivo de orina, en el que el medio para el cultivo de orina se obtuvo mediante la mezcla en partes iguales de DMEM con un alto contenido de glucosa (medio Eagle modificado por Dulbecco, de Hyclone) complementado con suero bovino fetal (FBS, de PAA) al 10% y penicilina/estreptomicina, con medio del kit SingleQuot CC-4127 REGM (de Lonza);
- (8) colocar la placa de cultivo sembrada con células en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂, durante 3 días;
- (9) observar si las células se unieron al fondo de la placa y añadir con suavidad 1 ml adicional del medio a la orina de cultivo, colocar la placa de cultivo sembrada con células en la incubadora a 37°C, 5% de CO₂, para el cultivo continuo;
- (10) descartar el medio en la placa de cultivo en el día 5 a 7 desde el día de la siembra, añadir medio fresco para el cultivo de orina (sin antibiótico) a la placa de cultivo después de lavarse con PBS una vez, mediante lo cual se pudo observar el crecimiento de células adherentes;
- (11) añadir o cambiar el medio dependiendo de las condiciones de crecimiento celular, que se podría subcultivar utilizando tripsina al 0,25%;
- (12) recoger las células exfoliativas de orina humana primarias de la 2ª generación y congelar y almacenar en nitrógeno líquido utilizando un líquido congelado (90% de FBS + 10% de DMSO) para su utilización.

2. Inducción de células madre neurales inducidas (iNSC)

El experimento de inducción de células madre neurales inducidas incluyó: la preparación de células, la transducción eléctrica de plásmido, la inducción de la siembra de células, la selección de clones de células, la amplificación de iNSC y así sucesivamente. En detalle:

- (1) descongelar las células exfoliativas de orina humana primarias congeladas, sembrar en una placa de 10 cm (o una placa de seis pocillos);
- (2) digerir las células adherentes utilizando tripsina al 0,25% cuando la confluencia de las células exfoliativas de orina humana primarias adherentes fue aproximadamente del 90% en la placa de 10 cm y, a continuación, recoger y contar las células digeridas;
- (3) transferir las células digeridas que tienen un número apropiado de células (el número de células varió de 500.000 a 1.500.000 en todos los sistemas de transducción eléctrica) a un tubo de EP de 1,5 ml y, a continuación, centrifugar a 200 g durante 5 minutos;
- (4) descartar el sobrenadante obtenido en la etapa (3) y recoger el precipitado celular obtenido en una copa de transducción eléctrica;
- (5) preparar un sistema transformante de plásmidos: añadir 82 µl de solución Basic Nucleofector® para células epiteliales de mamífero y 18 µl de suplemento 1 (Lonza) en esta secuencia, seguido de mezcla suave y, a continuación, añadir 5 µg de plásmidos con mezclado suficiente, para obtener el sistema transformante de plásmidos, en el que los plásmidos incluían pCEP4-O2SET2K (3 µg) y pCEP4-miR-302 (2 µg);
- (6) colocar la copa mencionada en la etapa (4) sobre un electroporador Amaxa (Lonza) y realizar la transducción eléctrica mediante la selección del procedimiento T-013 (o T-020); (7) transferir las células transducidas eléctricamente a una placa de seis pocillos (o una placa de 10 cm) recubierta con Matrigel con una densidad de siembra de 100.000 a 300.000 células por pocillo, que se podrían ajustar dependiendo de las condiciones de las células y, a continuación, añadir el medio para el cultivo de células de orina; (8) cambiar el medio para el cultivo de células de orina por medio mTeSR1 que contenía 3 µM de CHIR99021, 1 µM de PD0325901, 0,5 µM de A83-01 (Tocris Bioscience), 0,5 µM de tiazovivina y 0,2 µM de DMH1 (Tocris Bioscience) en el segundo día desde la siembra en la etapa (7) (o el segundo día después de la transfección), en el que el medio mTeSR1 era el medio para la preparación de células madre neurales de la presente divulgación, que se utilizó para el cultivo de células y se cambió cada dos días.
- (9) seleccionar un clon de células y dividir en trozos pequeños mediante un procedimiento mecánico y, a continuación, sembrar las células seleccionadas en una placa de seis pocillos (o una placa de doce pocillos) recubierta con Matrigel y cultivar las células sembradas con medio mTeSR1 convencional, en la que el clon de células se obtuvo después de 12 a 15 días desde la transducción eléctrica, y el clon de células estaba en una forma con un tamaño apropiado, un borde nítido y una disposición compacta que se desarrolló a partir de células transducidas eléctricamente.
- (10) cambiar el medio fresco cuando se observaron células adherentes y cultivar las células adherentes durante otros tres a cinco días cambiando el medio cada dos días, mediante lo cual se observó un gran número de grupos de células del tipo de células madre neurales dispuestas en una estructura neural de tipo Rosette o con forma de polaridad. (11) seleccionar el grupo de células del tipo de células madre neurales mediante un procedimiento mecánico y pipetear suavemente el grupo de células del tipo de células madre neurales con una pipeta de 1 ml, para

pipetear el grupo de células del tipo de células madre neurales en trozos pequeños o células individuales, a continuación, transferir las células individuales obtenidas a un matraz T25 que contenía el medio para el cultivo de células madre neurales, en la que el medio para el cultivo de células madre neurales incluía medio DMEM/F2 complementado con un 1% de suplemento de N2 (Gibco), un 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA, Gibco), un 0,1% de heparina (Sigma), 20 ng/ml del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, Invitrogen) y 20 ng/ml del factor de crecimiento epidérmico (EGF, R&D System);

(12) obtener esferas neurales con un límite nítido a partir de las células individuales en suspensión cultivadas en el matraz T25 durante una semana (las esferas neurales en el presente documento se definieron como esferas neurales de la generación P1), a partir de lo cual se cambió el medio cada dos o tres días con medio volumen en comparación con el del medio original.

(13) pasar las esferas neurales cuando las células individuales se cultivaron durante 7 a 14 días y tenían un tamaño de esferas neurales, a saber, del 7º al 14º día desde el día de la transferencia de las células individuales al matraz T25, y cultivarlas con el medio para el cultivo de células madre neurales, seleccionar y transferir las esferas neurales que tienen un diámetro de más de 300 µm a un tubo de centrifuga de 15 ml, sedimentar las esferas neurales o centrifugar a 50 g durante 1 minuto o 2 minutos, digerir a 37°C durante 3 min a 5 min con 1 ml de acutasa después de descartar el sobrenadante obtenido;

(14) añadir el medio para el cultivo de células madre neurales (en la que el medio para el cultivo de células madre neurales incluía medio DMEM/F2 complementado con un 1% de suplemento N2 (Gibco), un 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA, Gibco), un 0,1 % de heparina (Sigma), 20 ng/ml del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, Invitrogen) y 20 ng/ml del factor de crecimiento epidérmico (EGF, R&D System)) al tubo de centrifuga anterior hasta que el sistema de reacción en el mismo tenía un volumen de 10 ml, a continuación, centrifugar a 200 g durante 5 minutos,

(15) añadir una pequeña cantidad del medio para cultivar células madre (aproximadamente 500 µl) después de descartar el sobrenadante obtenido en la etapa (14) y seguido de una mezcla suave, y pipetear suavemente el grupo de células en trozos pequeños utilizando una pipeta de 1 ml, añadir 1 ml del medio para el cultivo de células madre neurales al tubo de centrifuga, sembrar las células obtenidas después de mezclarse uniformemente en un nuevo matraz, para obtener la segunda generación de esferas neurales.

Opcionalmente, se utilizó un microscopio invertido (Olympus, BX51) para observar y fotografiar la morfología de las células en diferentes fases celulares durante la preparación de la célula madre neural mediante la inducción de las células exfoliativas de orina humana primarias, un resultado de esto puede encontrarse en la figura 4. La figura 4 es una imagen que muestra la morfología celular de diferentes fases durante la inducción de células madre neurales inducidas, según una realización de la presente divulgación.

Tal como se muestra en la figura 4, A representaba las células exfoliativas de orina humana primarias; B representaba el clon de células inducido al someter las células a transducción eléctrica; C es la morfología del clon de células adherentes seleccionado; D eran esferas neurales de iNSC, el factor de ampliación era de 100.

EJEMPLO 2: Determinación del fenotipo de células madre inducidas (iNSC)

1 Determinación de la expresión del marcador de NSC en iNSC mediante inmunofluorescencia

(1) colocar un portaobjetos recubierto con Matrigel en una placa de 24 pocillos, uniendo de 5 a 10 de esferas neurales de iNSC con un pequeño volumen preparado en el ejemplo 1 al portaobjetos y, a continuación, añadir 100 µl del medio para el cultivo de células madre neurales sobre el mismo, a continuación, añadir 500 µl del medio para el cultivo de células madre neurales a cada pocillo de la placa de 24 pocillos en el día siguiente, a continuación, cultivar durante 1 a 2 días;

(2) dejar que se fijen las células cultivadas obtenidas en la etapa (1) durante 20 minutos a temperatura ambiente en paraformaldehído al 4%;

(3) aclarar las células fijadas tres veces con PBS durante 5 minutos cada vez;

(4) incubar las células obtenidas en la etapa (3) en PBS al que se añade un anticuerpo primario (Pax6, nestina, Sox1 o Sox2), BSA al 1%, suero de cabra normal al 10%, Triton-X al 0,3%, a 4°C durante la noche;

(5) aclarar las células obtenidas en la etapa (4) tres veces con PBS durante 5 minutos cada vez;

(6) incubar las células obtenidas en la etapa (5) con el anticuerpo secundario (Invitrogen) marcado con Alexa 568 o 488 durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad;

(7) aclarar las células obtenidas en la etapa (6) tres veces con PBS durante 5 minutos cada vez;

(8) incubar las células obtenidas en la etapa (7) con DAPI (Sigma) durante 3 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad;

(9) aclarar las células obtenidas en la etapa (8) tres veces en PBS durante 5 minutos cada vez;

(10) montar el portaobjetos que tiene las células obtenidas en la etapa (9) y observar las muestras mediante fotografía, un resultado de la misma puede observarse en la figura 5.

2. Determinación de la expresión de los genes marcadores de células madre neurales en células madre neurales inducidas (iNSC) mediante PCR en tiempo real

En primer lugar, se utilizó el reactivo Trizol (Takara) para extraer el ARN total de las células madre neurales

inducidas preparadas en el ejemplo 1, manual según la especificación proporcionada por el fabricante. A continuación, se utilizó el kit M-MLV (Takara) para someter el ARN total extraído a transcripción inversa, para obtener ADNc, y se utilizaron el kit SYBR® Premix Ex Taq® (Takara) y el instrumento PCR de cuantificación fluorescente ABI 7300 para someter el ADNc obtenido a PCR en tiempo real para determinar la expresión de los genes marcadores de células madre neurales, el resultado del cual se observa en la figura 5, en la que las secuencias de cebadores en la PCR en tiempo real se indican a continuación.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador (SEQ ID NO:)
PAX6-F	F ATGTGTGAGTAAAATTCTGGGCA (1)
PAX6-R	R GCTTACAACCTTCTGGAGTCGCTA (2)
SOX1-F	F CAGTACAGCCCCATCTCCAAC (3)
SOX1-R	R GCGGGCAAGTACATGCTGA (4)
NESTIN-F	F CTGGAGCAGGAGAAACAGG (5)
NESTIN-R	R TGGGAGCAAAGATCCAAGAC (6)
SOX2-F	F CCCAGCAGACTTCACATGT (7)
SOX2-R	R CCTCCCATTTCCTCGTTTT (8)
Nota: F: directo; R: inverso	

La figura 5 es una imagen que muestra el nivel de expresión de un gen marcador en células madre neurales en células madre neurales inducidas determinado mediante inmunofluorescencia y PCR en tiempo real, según una realización de la presente divulgación. Tal como se muestra en la figura 5, A y B son los resultados de la tinción de la inmunofluorescencia, A indica que las expresiones de Pax6 y nestina fueron positivas en iNSC, B indica que la expresión de Sox1 (B) fue positiva en iNSC; C es el resultado de la detección de la PCR en tiempo real, que muestra, respectivamente, los niveles de expresión de Sox2, Pax6, Sox1 y nestina en iNSC, en la que UC representa las células de orina, iPS son las células madre pluripotentes inducidas a partir de células exfoliadas de orina humana primaria.

3. Determinación de la capacidad de diferenciación de iNSC in vitro

Se colocó el portaobjetos recubierto con Matrigel en una placa de 24 pocillos, se unieron las esferas neurales de iNSC preparadas en el ejemplo 1 (células madre neurales inducidas) sobre el portaobjetos colocado en cada pocillo de la placa de 24 pocillos, se añadieron sobre las mismas 100 µl del medio para el cultivo de células madre neurales, se añadió 1 ml de un medio para la diferenciación neural a cada pocillo de la placa de 24 pocillos en el día siguiente, a continuación, las células se cultivaron durante 1 a 2 días, en el que el medio para la diferenciación neural comprende un medio DMEM/F2 complementado con el 1% de suplemento de N2 (Gibco), el 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA, Gibco), el 0,1% de heparina (Sigma) y neurotrofina básica (Peprotech), en el que la neurotrofina básica consistía en BDNF 10 ng/ml, GDNF 10 ng/ml, CNTC 10 ng/ml e IGF10 ng/ml. El medio para el cultivo de diferenciación neural se cambió cada dos días por la mitad del volumen en comparación con el del medio original para el cultivo de diferenciación neural. Se obtuvieron productos diferenciados in vitro de las células madre neurales inducidas después del cultivo de 2 semanas descrito anteriormente. A continuación, se detectaron mediante inmunofluorescencia las expresiones de los productos diferenciados obtenidos in vitro de las células madre neurales inducidas, tales como las proteínas Tuj, Map2, Dcx, TH, GABA, glutamina y GFAP, el resultado de la cual se puede observar en la figura 6. En detalle, las proteínas TH, GABA, glutamina y GFAP eran marcadores específicos para diferentes tipos de neuronas y células de la neuroglia, mediante los cuales se podían determinar los diferentes tipos de neuronas y células de la neuroglia obtenidos a partir de las células madre neurales inducidas a través de la diferenciación in vitro mediante la detección de las expresiones de las proteínas Tuj, Map2, Dcx, TH, GABA, glutamina y GFAP, respectivamente, en los productos diferenciados in vitro de las células madre neurales inducidas, mediante lo cual se puede determinar posteriormente la capacidad diferencial in vitro de células madre neurales inducidas.

La figura 6 es una imagen que muestra las expresiones de diferentes marcadores específicos para diferentes tipos de neuronas y células de la neuroglia entre los productos de diferenciación in vitro derivados de las células madre neurales inducidas determinadas mediante inmunofluorescencia, según una realización de la presente divulgación. Tal como se muestra en la figura 6, A indica que las iNSC formaron espontáneamente una gran cantidad de neuronas y células de la neuroglia; B indica que las expresiones de Map2 y GABA fueron positivas en los productos diferenciados in vitro de las células madre neurales inducidas; C indica que las expresiones de Map2 y glutamina fueron positivas en los productos diferenciados in vitro de las células madre neurales inducidas; D indica que la expresión de TH fue positiva en los productos diferenciados in vitro de las células madre neurales inducidas; E indica que las expresiones de Tuj y GFAP (un marcador de astrocitos) fueron positivas en los productos diferenciados in vitro de las células madre neurales inducidas; F indica que las expresiones de Dcx y Tuj fueron positivas en los productos diferenciados in vitro de las células madre neurales inducidas.

Aplicación industrial

Un medio para la preparación de células madre neurales de la presente divulgación se puede aplicar para la

preparación, de manera eficaz, de la célula madre neural. Utilizando el medio para el cultivo de una célula somática, en particular, una célula somática que expresa un factor de regulación de la transcripción, se puede transdiferenciar, de manera eficaz, la célula somática en una célula madre neural en un tiempo muy acortado.

REIVINDICACIONES

1. Medio para la preparación de células madre neurales, **caracterizado por que** comprende:
un medio básico para el cultivo de una célula madre, y
5 un inhibidor que consiste en un inhibidor de GSK, un inhibidor de MEK, un inhibidor de TGF- β , un inhibidor de ROCK y un inhibidor de BMP.
2. Medio, según la reivindicación 1, en el que el medio básico es mTeSR1.
- 10 3. Medio, según la reivindicación 1, en el que el inhibidor comprende:
de aproximadamente 0,3 μ M a aproximadamente 30 μ M de inhibidor CHIR99021 de GSK,
de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 10 μ M de inhibidor PD0325901 de MEK,
de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 5 μ M de inhibidor A83-01 de TGF- β ,
15 de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 5 μ M de inhibidor tiazovivina de ROCK, y
de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 2 μ M de inhibidor DMH1 de BMP.
4. Procedimiento para la preparación de células madre neurales, **caracterizado por que** comprende:
20 cultivar células somáticas utilizando el medio, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,
en el que las células somáticas comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor de células
madre pluripotentes para inducir una transdiferenciación desde las células somáticas a las células madre neurales,
siendo el factor de células madre pluripotentes, como mínimo, uno seleccionado entre el grupo que comprende Oct4,
Sox2, Klf4 y miR302, y
25 en el que las células somáticas son células exfoliativas de orina humana.
5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que las células somáticas se obtienen mediante:
la centrifugación de orina humana para obtener un precipitado,
30 el cultivo del precipitado utilizando un medio para el cultivo de orina para obtener células exfoliativas de orina
humana primarias, y
la transformación de las células exfoliativas de orina humana primarias utilizando un vector que contiene una
secuencia de ácido nucleico que codifica el factor de células madre pluripotentes para obtener células somáticas,
siendo el factor de células madre pluripotentes, como mínimo, uno seleccionado entre el grupo que comprende Oct4,
35 Sox2, Klf4 y miR302.
6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que el vector contiene la secuencia de ácido nucleico que codifica
Oct4, Sox2, Klf4 y miR302.
- 40 7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que el vector comprende plásmidos que contienen la secuencia de
ácido nucleico que codifica cada uno de Oct4, Sox2, Klf4 y miR302, respectivamente.
8. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que las células exfoliativas de orina humana primarias se
transforman mediante transducción eléctrica.
- 45 9. Procedimiento, según la reivindicación 4, que comprende, además:
precultivar las células madre neurales utilizando un medio básico para obtener células madre neurales adherentes, y
cultivar las células madre neurales adherentes en un medio para células madre neurales, en el que el medio para
50 células madre neurales comprende un medio DMEM/F2 complementado con aproximadamente el 1% de
suplemento de N2, aproximadamente el 1% de aminoácidos no esenciales, aproximadamente el 0,1% de heparina,
aproximadamente 20 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico y 20 ng/ml de factor de crecimiento
epidérmico.

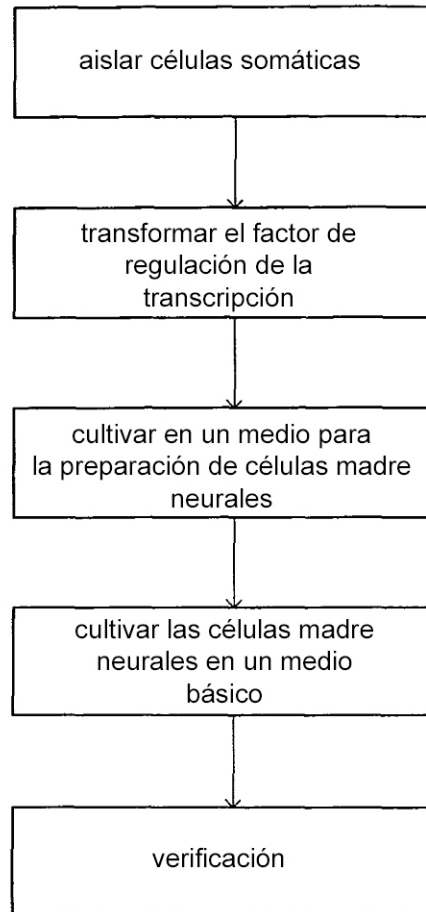


Fig.1

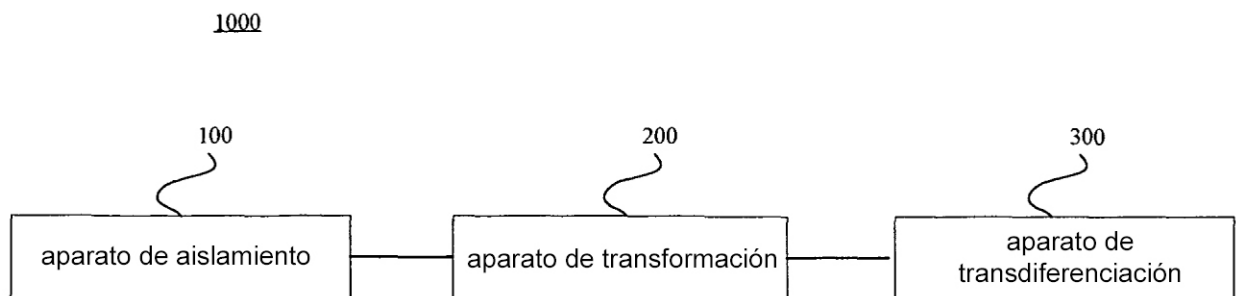


Fig.2

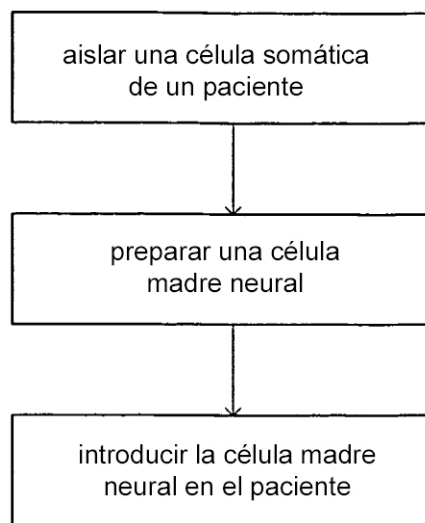


Fig.3

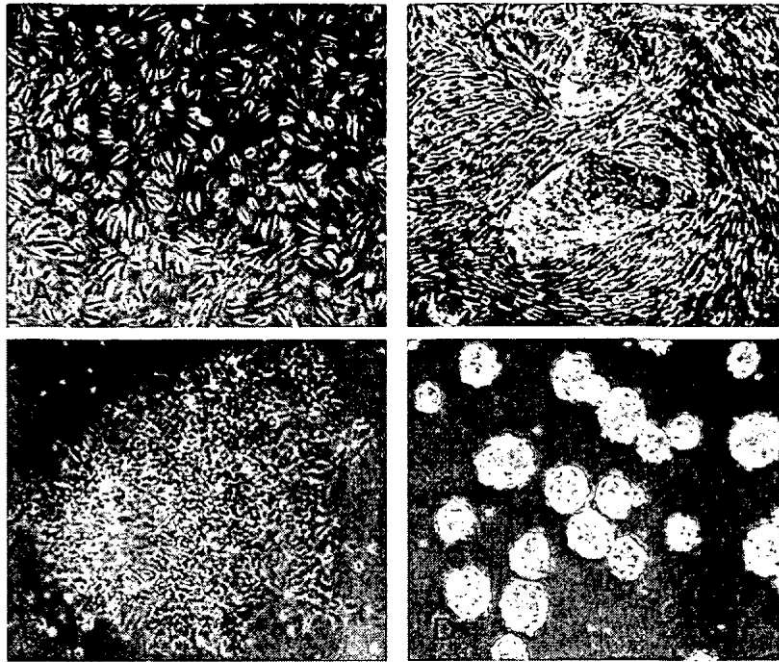


Fig.4

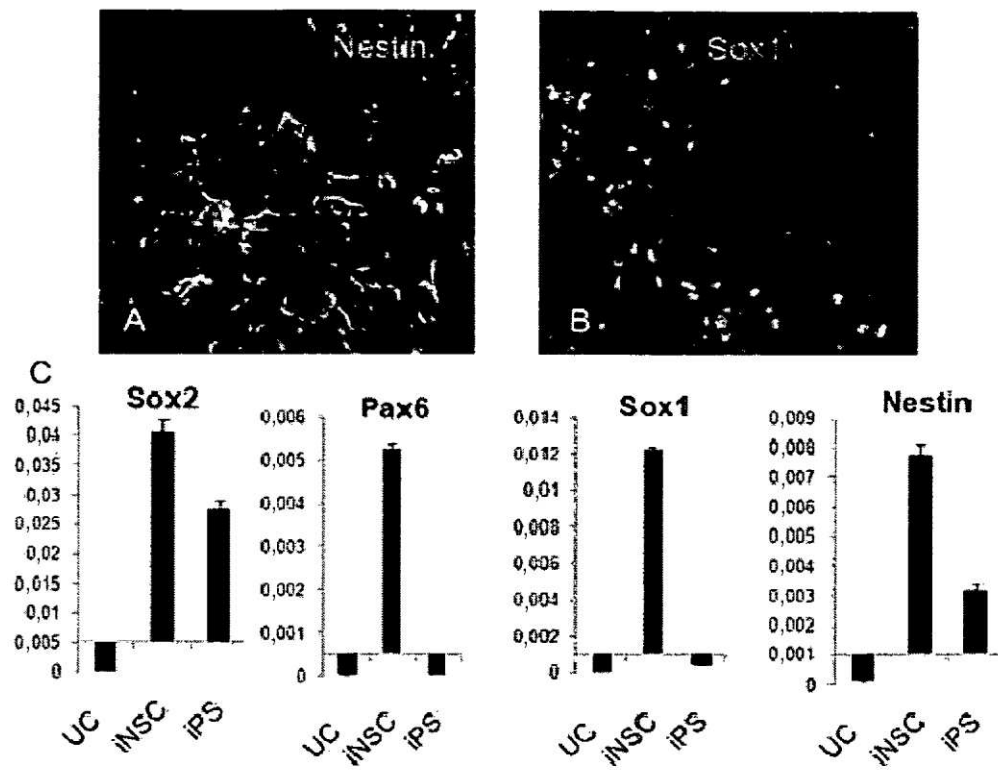


Fig.5

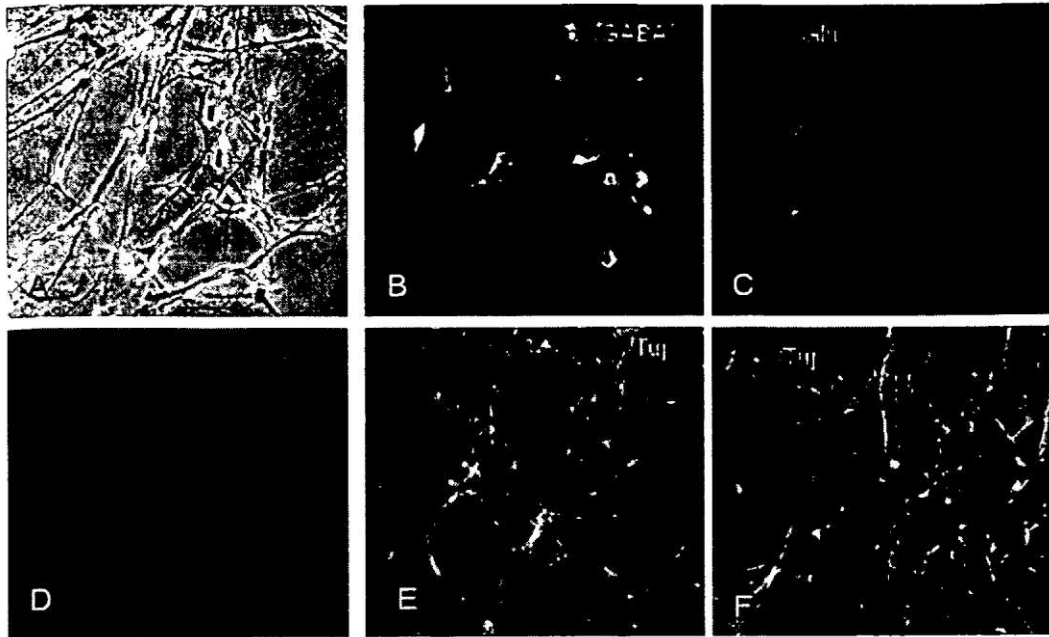


Fig.6