

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 935**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/07** (2010.01)

**C12N 5/0797** (2010.01)

**A61K 35/30** (2015.01)

**C12N 5/0793** (2010.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2009 PCT/EP2009/066504**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2010 WO10063848**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2009 E 09764840 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2356218**

54 Título: **Método y medio para la diferenciación neural de células pluripotentes**

30 Prioridad:

**05.12.2008 EP 08305887**

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

**26.09.2017**

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET  
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR y  
ASSOCIATION FRANCAISE CONTRE LES  
MYOPATHIES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BENCHOUA, ALEXANDRA;  
PERRIER, ANSELME y  
AUBRY, LAETITIA**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 633 935 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método y medio para la diferenciación neural de células pluripotentes

### 5 Sector de la técnica

La invención se refiere a un método y a un medio para la diferenciación neural sincrónica de células pluripotentes, en particular de células pluripotentes humanas.

### 10 Estado de la técnica

Las células madre, en particular las células madre embrionarias humanas (células MEh), presentan dos ventajas debido a sus propiedades intrínsecas: en primer lugar pueden proporcionar una reserva casi ilimitada de células debido a su capacidad de autorrenovación, y en segundo lugar, tienen la capacidad de diferenciarse *in vitro* en cualquier linaje celular, incluyendo todos los tipos celulares de linajes neurales.

La producción de células neuronales y gliales a partir de células MEh promete ser una herramienta inestimable para el establecimiento de modelos celulares *in vitro* para el estudio de enfermedades neurológicas y psiquiátricas, así como para el desarrollo de estrategias basadas en terapias celulares para determinadas afecciones neurológicas.

La transición fenotípica de células madre a precursores neurales representa una etapa limitante y crítica del proceso de diferenciación neuronal y del posterior neuronal y glial. Sin embargo, a pesar de los muchos esfuerzos en el campo de la investigación, los actuales protocolos de inducción neural siguen siendo insatisfactorios porque, debido a la limitada eficacia de la etapa de selección, la población celular resultante a menudo es heterogénea y/o poco reproducible, y/o de obtención lenta. Además, la mayor parte de los protocolos existentes son incompatibles con la puesta en práctica de los procedimientos de "BPF" (buenas prácticas de fabricación) debido a que dependen de productos cuya composición exacta está mal definida (tal como el suero, productos de "suero de reemplazo", etc.) o debido a que necesitan una etapa de cocultivo con células alimentadoras de origen animal. Además, debido a la heterogeneidad de la población neural resultante, es necesaria una etapa inicial de clasificación o selección para seleccionar las células de interés antes de que sea posible la amplificación de los precursores neurales. En el mejor de los casos esta etapa requiere mucho tiempo y a menudo es nociva para las células.

Por lo tanto, aún existe en la técnica la necesidad de un método para la obtención de una población homogénea de precursores neurales a partir de células madre.

Los inventores han desarrollado un medio de cultivo celular y un método para la obtención de una población homogénea de precursores neurales utilizando dicho medio, que no necesita ninguna etapa de cultivo en presencia de productos de origen animal, el cual es compatible con las BPF y no necesita ninguna etapa de clasificación o selección.

### 40 Objeto de la invención

La invención se refiere a un medio de cultivo que comprende un inhibidor de la ruta de señalización de BMP (sigla del inglés: *bone morphogenetic protein*, proteína morfogénica ósea) y un inhibidor de la ruta de señalización de TGF/activina/nodal, como se define en las reivindicaciones.

La invención también se refiere a un método para la producción de una población de precursores neurales, en el que dicho método comprende la etapa de cultivar células pluripotentes con el medio de cultivo de la invención, como se define en las reivindicaciones.

### 50 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un medio de cultivo que comprende un inhibidor de la ruta de señalización de BMP y un inhibidor de la ruta de señalización de TGF/activina/nodal, como se define en las reivindicaciones.

La expresión "medio de cultivo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un medio líquido adecuado para el cultivo *in vitro* de células de mamífero. Normalmente, el medio de cultivo de la invención contiene:

- una fuente de carbono como sustrato energético, tal como glucosa, galactosa o piruvato de sodio;
- aminoácidos esenciales;
- vitaminas, tal como biotina, ácido fólico, B12...;
- al menos una purina y una pirimidina como precursores de ácidos nucleicos;
- sales inorgánicas;
- una molécula conocida por limitar el envejecimiento natural, tal como el selenio;
- un antioxidante, tal como glutatión reducido (GSH), ácido ascórbico o enzimas implicadas en la detoxificación

por especies reactivas de oxígeno, tal como la catalasa o la superóxido dismutasa.

- un precursor de fosfolípidos, tal como la colina, el inositol o un derivado del colesterol tal como la corticosterona;

- un ácido graso exclusivo, tal como ácido linoleico, ácido linolénico y/o ácidos lipóicos;

5 - una proteína de soporte, tal como la albúmina y/o la heparina;

- de forma opcional, otras proteínas o péptidos, tal como la insulina y/o la transferrina, y/o un agonista del receptor de IGF-1.

10 El medio de cultivo puede contener también tampones de pH para mantener el pH del medio en un valor adecuado para el crecimiento celular.

El medio de cultivo de la invención puede basarse en un medio disponible en el mercado tal como DMEM/F12 de Invitrogen o una mezcla de DMEM/F12 y Neurobasal en una proporción 1:1 (también de Invitrogen).

15 El medio de cultivo de la invención también puede comprender diversos complementos tales como el complemento B-27 (Invitrogen) y el complemento N2 (también de Invitrogen).

El complemento B27 contiene, entre otros constituyentes, SOD, catalasa y otros antioxidantes (GSH) y ácidos grasos exclusivos, tales como ácido linoleico, ácido linolénico y ácidos lipóicos.

20 El complemento N2 puede reemplazarse por el siguiente cóctel: transferrina (10 g/l), insulina (500 mg/l), progesterona (0,63 mg/l), putrescina (1611 mg/l) y selenita (0,52 mg/l).

El término "N2B27" se refiere al medio descrito en Ying *et al.*, 2003, en Lowell *et al.*, 2006 y en Liu Y *et al.*, 2006. N2B27 comprende los medios DMEM/F12 y Neurobasal en una proporción 1/1, el complemento N2 (1/100), el complemento B27 (1/50) y beta-mercaptoetanol (1/1000). Está disponible, por ejemplo, con la referencia SCS-SF-NB-02 de Stem Cell Sciences RU Ltd.

30 En una realización preferente, el medio de cultivo de la invención consiste esencialmente en medio N2B27, un inhibidor de la ruta de señalización de BMP y un inhibidor de la ruta de señalización de TGF/activina/nodal, como se define en las reivindicaciones.

Normalmente, el medio de cultivo de la invención no tiene suero y no tiene extracto de suero.

35 En una realización preferente, el medio de cultivo de la invención no tiene sustancias obtenidas de animales. En una realización preferente, el medio de cultivo de la invención consiste esencialmente en compuestos sintéticos, compuestos de origen humano y agua. De forma ventajosa, dicho medio de cultivo puede utilizarse para cultivar células de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación (en condiciones "BPF").

40 La expresión "inhibidor de la ruta de señalización de BMP", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto, natural o sintético, que da como resultado una activación disminuida de la ruta de señalización de BMP, que es la serie de señales moleculares generadas como consecuencia de la unión de cualquier miembro de la familia BMP (proteína morfogénica ósea) a un receptor de superficie celular. Normalmente, un inhibidor de la ruta de señalización de BMP provoca una disminución de los niveles de fosforilación de las proteínas Smad 1, 5 y 8 (Gazzeri y Minetti, 2007).

50 El experto en la materia sabe cómo evaluar si un compuesto dado es inhibidor de la ruta de señalización de BMP. Normalmente, se considera que un compuesto es inhibidor de la ruta de señalización de BMP si tras el cultivo de las células en presencia de dicho compuesto el nivel de Smad 1, 5 u 8 fosforiladas disminuye en comparación con las células cultivadas en ausencia de dicho compuesto. Los niveles de las proteínas Smad fosforiladas puede medirse mediante transferencia de Western utilizando anticuerpos específicos para la forma fosforilada de dichas proteínas Smad.

55 El inhibidor de la ruta de señalización de BMP puede ser un antagonista de BMP o una molécula que inhibe cualquier etapa aguas debajo de la ruta de señalización de BMP. El inhibidor de la señalización de BMP puede ser un compuesto natural o sintético. Cuando el inhibidor de la ruta de señalización de BMP es una proteína, esta puede ser una proteína purificada o una proteína recombinante, o una proteína sintética.

60 Se conocen en la técnica muchos métodos para la producción de proteínas recombinantes. El experto puede producir fácilmente dicha proteína a partir del conocimiento de la secuencia de una dada proteína o de la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína, utilizando técnicas de biología molecular y de bioquímica convencionales.

De acuerdo con la presente invención, el inhibidor de la ruta de señalización de BMP se selecciona del grupo que consiste en nogina y fragmentos de la misma que inhiben la ruta de señalización de BMP.

65

En una realización preferente, el inhibidor de la ruta de señalización de BMP es nogina. La nogina puede ser nogina murina (nogina de ratón, ejemplificada por el número de referencia de GenPept NP\_032737) o nogina humana (nogina humana, ejemplificada por el número de referencia de GenPept EAW94528). Puede ser purificada o recombinante. Puede estar en forma monomérica o dimérica.

5 Nogina recombinante puede adquirirse de R&D Systems o de Preprotech, o puede producirse utilizando técnicas convencionales, como se describe anteriormente.

10 Normalmente, nogina se añade al medio de cultivo de la invención en una concentración que varía de 100 a 600 ng/ml, preferentemente de 200 a 500 ng/ml, de 250 a 450 ng/ml, incluso más preferentemente a aproximadamente 400 ng/ml.

En otra realización, el inhibidor de la ruta de señalización de BMP se selecciona del grupo de Smad inhibidora 6 (I-Smad 6) y Smad inhibidora 7 (I-Smad 7).

15 La expresión "inhibidor de la ruta de señalización de TGF/activina/nodal", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto, natural o sintético, que da como resultado una activación disminuida de la ruta de señalización de TGF/activina/nodal, la cual es la serie de señales moleculares generadas como consecuencia de la unión de cualquier miembro de la familia TGF/activina/nodal a un receptor de superficie celular. Normalmente, un  
20 inhibidor de la ruta de señalización de TGF/activina/nodal provoca una disminución de los niveles de fosforilación de la proteína Smad 2 (Shi y Massagué, 2003).

El experto en la materia sabe cómo evaluar si un dado compuesto es un inhibidor de la ruta de señalización de TGF/activina/nodal. Normalmente, un compuesto se considera inhibidor de la ruta de señalización de  
25 TGF/activina/nodal si tras el cultivo de células en presencia de dicho compuesto el nivel de Smad 2 fosforilada está disminuido en comparación con las células cultivadas en ausencia de dicho compuesto. Los niveles de las proteínas Smad fosforiladas pueden medirse mediante transferencia de Western utilizando anticuerpos específicos para la forma fosforilada de dichas proteínas Smad.

30 El inhibidor de la ruta de señalización de TGF/activina/nodal puede ser un antagonista de TGF/activina/nodal o una molécula que inhibe cualquier etapa aguas debajo de la ruta de señalización de TGF/activina/nodal. El inhibidor de la señalización de TGF/activina/nodal puede ser un compuesto natural o uno sintético. Cuando el inhibidor de la ruta de señalización de TGF/activina/nodal es una proteína, esta puede ser una proteína purificada o una proteína recombinante, o una proteína sintética.

35 Los métodos para la producción de proteínas recombinantes son conocidos en la técnica. El experto puede producir dicha proteína a partir del conocimiento de la secuencia de una dada proteína o de la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína, utilizando técnicas de biología molecular y de bioquímica convencionales.

40 En una realización de la invención, el inhibidor de la ruta de señalización de TGF/activina/nodal se selecciona del grupo que consiste en SB431542, Lefty-A y Cerberus, y fragmentos de Lefty-A y Cerberus, que inhiben la ruta de señalización de TGF/activina/nodal.

45 En una realización preferente, el inhibidor de la ruta de señalización de TGF/activina/nodal es SB431542. SB431542 o hidrato de 4-(5-benzol[1,3]dioxol-5-il-4-piridinil-2-il-1H-imidazol-2-il)-benzamida, puede adquirirse de Tocris y Sigma. Normalmente, SB431542 se añade al medio de cultivo de la invención a una concentración que varía de 5 a 25  $\mu$ M, que varía preferentemente de 10 a 20  $\mu$ M, incluso más preferentemente a aproximadamente 20  $\mu$ M.

50 La invención también se refiere a un kit para el cultivo de células que comprende un inhibidor de la ruta de señalización de BMP y un inhibidor de la ruta de señalización de TGF/activina/nodal, como se describe anteriormente.

La invención también se refiere a un kit para el cultivo de células que comprende una base de medio (tal como el medio N2B27 definido anteriormente), un inhibidor de la ruta de señalización de BMP y un inhibidor de la ruta de  
55 señalización de TGF/activina/nodal, como se describe anteriormente.

En una realización particular de la invención, el inhibidor de la ruta de señalización de TGF/activina/nodal y el inhibidor de la ruta de señalización de BMP son moléculas distintas.

## 60 **Métodos de cultivo celular de la invención**

Otro aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para la producción de una población de precursores neurales, en el que dicho método comprende la etapa de cultivar células pluripotentes con el medio de cultivo como se describe anteriormente.

65

La etapa de cultivar células pluripotentes con el medio de cultivo de la invención se llevará a cabo durante el tiempo necesario requerido para la producción de precursores neurales. Normalmente, el cultivo de células pluripotentes con el medio de la invención se llevará a cabo durante al menos 5 días, preferentemente al menos 7 días, aún más preferentemente al menos 10 días.

5 Si es necesario, el medio de cultivo de la invención puede renovarse, de forma parcial o total, a intervalos regulares. Normalmente, el medio de cultivo de la invención puede reemplazarse cada dos días con medio de cultivo de la invención recién preparado, durante 10 días.

10 La expresión “células pluripotentes”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a células indiferenciadas que pueden dar origen a una diversidad de distintos linajes celulares. Normalmente, las células pluripotentes pueden expresar los siguientes marcadores oct4, SOX2, Nanog, SSEA 3 y 4, TRA 1/81, véanse las recomendaciones de la (International Stem Cell Initiative) Iniciativa Internacional de Células Madre, 2007.

15 En una realización, las células pluripotentes son células pluripotentes humanas.

En otra realización, las células pluripotentes son células pluripotentes de mamífero no humano.

En una realización, las células pluripotentes son células madre.

20 Normalmente, dichas células madre son células madre embrionarias.

Los ejemplos ilustrativos de células pluripotentes son las células madre embrionarias humanas (células MEh), tales como las descritas en la siguiente tabla:

25

línea	cariotipo	pase disponible	país de origen	origen
<b>SA01</b>	46XY	25	Suecia	Cellartis AB
<b>VUB01</b>	46XY	73	Bélgica	AZ-VUB Bruxel
<b>HUES 24,</b>	46XY	26	EE.UU	Harvard
<b>H1</b>	46XY, 20q11.21	26	EE.UU	Wicell research Institute
<b>H9</b>	46XX	27	EE.UU	Wicell research Institute
<b>WT3</b>	46XY	35	RU	UKSCB

En una realización, las células pluripotentes son células madre embrionarias no humanas, tales como las células madre de ratón.

30 En una realización, las células pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas (iPS, sigla del inglés *induced pluripotent stem cells*). Las células madre pluripotentes inducidas (células iPS) son un tipo de células madre pluripotentes obtenidas de forma artificial a partir de células no pluripotentes, normalmente una célula somática adulta, mediante la inducción de una expresión “forzada” de determinados genes. Las células iPS se produjeron por primera vez en 2006 a partir de células de ratón (Takahashi *et al.* Cell 2006 126: 663-76) y en 2007 a partir de células humanas (Takahashi *et al.* Cell 2007 131-861-72, Yu *et al.* Science 2007 318: 1917).

35 En una realización, las células pluripotentes contienen una mutación genética responsable de una enfermedad genética neurodegenerativa. De forma ventajosa, en esta realización, la población de precursores neurales obtenida a partir de dichas células pluripotentes también contiene dicha mutación y puede, por lo tanto, proporcionar un buen modelo celular de la enfermedad.

40

Normalmente, pueden emplearse líneas celulares que portan mutaciones de triplete que provocan las siguientes enfermedades neurodegenerativas:

Mutación de triplete	Enfermedad	Línea	Referencia
Huntingtina-CAG	Enfermedad de Huntington	VUB05	K. sermon, AZ-VUB Bruxel BÉLGICA
Ataxina7-CAG	Ataxia espinocerebelosa	SCA7	K. sermon, AZ-VUB Bruxel BÉLGICA
DMPK-CTG	Enfermedad de Steinert (DM1)	VUB03 VUB19 VUB24	K. sermon, AZ-VUB Bruxel BÉLGICA

45

La expresión "precursores neurales o células madre neurales", como se utiliza en el presente documento, se refiere a células que están comprometidas con el linaje neural y que pueden dar origen a cualquier célula del linaje neural incluyendo neuronas y células gliales. Normalmente, los precursores neurales expresan los siguientes marcadores: SOX1, SOX2, PAX6, Nestina, N-CAM (CD56), véase Tabar *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2008.

5 En una realización, la invención se refiere a un método *in vitro* para la obtención de precursores neurales que comprenden las etapas de:

- 10 - cultivar células pluripotentes, preferentemente células ME (madre embrionarias), en presencia de células alimentadoras;
- preparar agregados de dichas células pluripotentes, preferentemente células ME y preferentemente en presencia de un inhibidor de Rock, preferentemente Y27632;
- 15 - cultivar durante varias horas dichos agregados en placas de baja adherencia en ausencia de células alimentadoras, preferentemente entre 4 y 10 horas, más preferentemente entre 5 y 10 horas, aún más preferentemente durante aproximadamente 6 horas, para privar a dichas células pluripotentes, preferentemente células ME, de la influencia de las células alimentadoras;
- sembrar la suspensión en placas recubiertas con poliornitina y laminina en presencia de un inhibidor de Rock;
- reemplazar el medio cada dos días con el medio de la invención.

20 Los protocolos para el cultivo de células pluripotentes son conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede realizarse el cultivo de células MEh como se describe en (Amit *et al.*, 2000).

La expresión "células alimentadoras" se refiere a la capa de células, normalmente fibroblastos de ratón inactivados, que se utilizan para sustentar el crecimiento de células ME. Por ejemplo, las células alimentadoras pueden ser las de la línea STO disponible de la ATCC.

La invención también divulga una población de precursores neurales que se pueden obtener mediante un método como se define anteriormente.

30 De forma ventajosa, la población de precursores neurales es homogénea, es decir, no es necesario realizar ninguna clasificación o selección para aislar los precursores neurales de otras células contaminantes. Normalmente, la población de células madre neurales tiene una pureza de al menos el 95 %, preferentemente el 99 %, aún más preferentemente el 100 %.

35 La invención también describe un método para la obtención de una población de neuronas, en el que dicho método comprende las etapas de:

- a. producir una población de precursores neurales de acuerdo con el método descrito anteriormente;
- 40 b. estabilizar una población homogénea de células madre neurales
- c. diferenciar dicha población de células madre neurales en neuronas.

La etapa que consiste en la diferenciación de células madre neurales en neuronas se puede llevar a cabo de acuerdo con técnicas conocidas para los expertos (véase, por ejemplo, Sun *et al.*, 2008).

45 Por ejemplo, los precursores neurales pueden dar como resultado células madre neurales mediante la transferencia a un medio que comprende Factor de Crecimiento Epitelial (EGF), Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2 (FGF2) y Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF), seguido de la siembra en placas recubiertas con poliornitina/laminina y el cultivo en presencia de BDNF.

50 La invención también describe una población de neuronas que se puede obtener mediante el método descrito anteriormente.

El término "neurona", como se utiliza en el presente documento, se refiere a células del linaje neural posmitóticas completamente diferenciadas. Las neuronas expresan los siguientes marcadores: tubulina beta-3 (antígeno TUJ1), Proteína Asociada a Microtúbulos 2 (MAP2), antígeno HuC/D.

Normalmente, la población de neuronas tiene una pureza de al menos el 40 %, preferentemente el 50 %, aún más preferentemente el 60 %.

60 La presente invención también describe una composición farmacéutica que comprende la población de precursores neurales o la población de neuronas como se describe anteriormente. En general, la composición farmacéutica puede incluir uno o más vehículos, aditivos, antibióticos, conservantes, adyuvantes, diluyentes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables y/o aprobados. Tales sustancias auxiliares pueden ser agua, solución salina, glicerol, etanol, agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH o similares. Los vehículos adecuados normalmente son moléculas grandes, que se metabolizan lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos,

agregados lipídicos o similares. La composición farmacéutica puede contener aditivos adicionales tales como manitol, dextrano, azúcar, glicina, lactosa o polivinilpirrolidona, u otros aditivos tales como antioxidantes o gas inerte, estabilizantes o proteínas recombinantes (por ejemplo, seroalbúmina humana), adecuados para la administración *in vivo*.

5 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra indeseable cuando se administran a un mamífero, en especial a un ser humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación o formulación auxiliar, sólido, semisólido o líquido no tóxico de cualquier tipo.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a una población de precursores neurales de la invención o una población de neuronas como se describe anteriormente, para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa o el daño cerebral.

15 La invención también describe un método para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa o el daño cerebral que comprende la etapa de administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de una población de precursores neurales de la invención o de una población de neuronas como se describe anteriormente, a un paciente que lo necesite.

20 En el contexto de la invención, el término “que trata” o “tratamiento”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a un método dirigido a retrasar o prevenir el inicio de una patología, a invertir, aliviar, inhibir, frenar o detener la progresión, empeoramiento o deterioro de los síntomas de la patología, a producir la mejora de los síntomas de la patología y/o a curar la patología.

25 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “cantidad farmacéuticamente eficaz” se refiere a cualquier cantidad de precursores neurales o de neuronas de acuerdo con la invención (o una población de los mismos o una composición farmacéutica de los mismos) que sea suficiente para conseguir el fin pretendido.

30 Las pautas posológicas y de administración eficaces se pueden determinar fácilmente mediante las prácticas médicas adecuadas a base de la naturaleza de la patología del sujeto, y dependerán de varios factores que incluyen, pero sin limitación, el grado de los síntomas de la patología y el grado de daño o de degeneración del tejido u órgano de interés, y de las características del sujeto (por ejemplo, edad, peso corporal, género, salud general y similares).

35 Para terapia, los precursores neurales, las neuronas y las composiciones farmacéuticas pueden administrarse a través de la vía intracerebral. Los expertos en la materia pueden optimizar de una manera conocida la dosis y la cantidad de administraciones.

40 En un aspecto, la enfermedad neurodegenerativa o daño cerebral se selecciona del grupo que consiste en retinopatía, enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelosa, enfermedad de Steinert, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer e isquemia cerebral, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, traumatismo craneoencefálico.

45 Aún otro aspecto de la invención divulga un método para explorar compuestos que tienen un efecto neuroprotector y/o neurotóxico, en el que dicho método comprende las etapas de:

- a) cultivar una población de precursores neurales o una población de neuronas, como se ha definido anteriormente, en presencia de un compuesto de prueba;
- 50 b) comparar la supervivencia de las células cultivadas en la etapa a) con la de una población de precursores neurales o una población de neuronas como se define anteriormente, cultivada en ausencia de dicho compuesto de prueba.

55 El término “neurotóxico” se refiere a un compuesto que provoca una disminución de la supervivencia de los precursores neurales o de las neuronas. Se considera que un compuesto tiene un efecto neurotóxico si la cantidad de células viables cultivadas en presencia de dicho compuesto es inferior a la cantidad de células viables cultivada en ausencia de dicho compuesto.

60 El término “neuroprotector” se refiere a un compuesto que da como resultado un aumento de la supervivencia de los precursores neurales o de las neuronas. Se considera que un compuesto tiene un efecto neuroprotector si la cantidad de células viables cultivadas en presencia de dicho compuesto es mayor que la cantidad de células viables cultivadas en ausencia de dicho compuesto. Normalmente, el efecto neuroprotector puede ensayarse en ausencia de factores neurotróficos. Como alternativa, el efecto neuroprotector puede ensayarse en presencia de un fármaco neurotóxico conocido. Los fármacos neurotóxicos conocidos incluyen, pero sin limitación,

65 La invención se ilustrará adicionalmente a través de los siguientes ejemplos y figuras.

**Descripción de las figuras**

**FIGURA 1: Diferenciación neural en N2B27 “solamente”**

- 5           **A-** Análisis por FACS de la eficacia de conversión neural obtenida tras 8 días en N2B27 para 4 líneas celulares de MEh representativas.  
**B-** Análisis por FACS de la composición del cultivo completo tras 8 días de diferenciación para dos celulares de MEh representativas, H9 y Hues 24.  
10           **C-** Caracterización de la población comprometida con distintos destinos mediante cuantificación por PCRq de los niveles de los transcritos de marcadores conocidos de tejidos extraembrionarios, las capas embrionarias primitivas mesodermo y endodermo.

**FIGURA 2: Efecto de Nogina y de SB431542 sobre la diferenciación neural de células MEh**

- 15           **A-** Análisis por FACS de la composición del cultivo completo tras 8 días de diferenciación en N2B27 solo o completado con Nogina, SB431542 o ambos (NFS).  
**B-** Cuantificación por PCRQ de los transcritos específicos de células ME (Oct4 y Nanog) y de precursores neurales tempranos (PAX6 y SOX1) para cada condición de diferenciación.

**FIGURA 3: Robustez de la eficacia del medio NFS sobre la diferenciación neural de células MEh**

- 20           **A-** Comparación de la eficacia de los medios N2B27 y NFS sobre la diferenciación neural mediante análisis por FACS (análisis línea por línea).  
**B-** Resumen de la línea MEh, en el que se ha utilizado de forma satisfactoria el medio NFS (promedio de las cuatro líneas).  
25

**FIGURA 4: Obtención, amplificación y diferenciación terminal de células madre neurales procedentes de una estructura tipo tubo neural obtenida tras la diferenciación de células MEh en medio NFS**

- 30           **A-** Resumen del protocolo de obtención de la población estable y homogénea de células madre neurales  
**B a D-** Morfologías típicas que pueden observarse tras la transferencia de células precursoras neurales (células PNE) obtenidas por diferenciación en medio NFS, en un medio de amplificación de células madre neurales (CMN). **B-** Tras 2 días, las CMN comienza a migrar desde las estructuras de tipo tubo neural (rosetas). **C-** Población homogénea de CMN obtenida tras un dos pases. **D-** Neuronas post mitóticas obtenidas tras 2 semanas de privación de las CMN de EGF y actividades mitogénicas del FGF.  
35

**FIGURA 5: Diferenciación de las células madre pluripotentes inducidas (iPS) en células madre neurales (CMN) en medio NFS**

- 40           Panel izquierdo: Las iPS tratadas durante 10 días con medio NFS conducen a estructuras de tipo neural y a células madre neurales (CMN).  
Panel derecho: Morfología de las CMN obtenidas de iPS en el pase 1.

**Ejemplo**

45           **Materiales y métodos**

**Medios y citocinas**

- 50           El medio N2B27 se describió en Ying *et al.*, 2003. N2B27 era una mezcla de DMEM-F12/Neurobasal 1:1, complemento N2 (1:100<sup>0</sup>), complemento B27 (1:50<sup>0</sup>), ambos obtenidos de Invitrogen. NFS estaba compuesto de N2B27, Nogina (intervalo de concentración entre 200 ng y 500 ng/ml, de RD Systems o Preprotech), SB431542 (entre 10 y 20 µM, de Tocris), FGF2 5 ng/ml (Preprotech). El inhibidor de Rock Y27632 era de Calbiochem, el EGF y el BDNF eran de RD systems.  
55

**Cultivo de células ME humanas (ejemplo ilustrativo)**

- 60           Las células ME humanas (Hues 24, XY y H9, XX, WiCell Research Institute) se mantuvieron sobre una capa de fibroblastos de ratón inactivados (línea STO de la ATCC). Las células MEh se cultivaron en DMEM/F12/Glutamax complementado con suero de reemplazo knockout (KSR) al 20 %, aminoácidos no esenciales 1 mM, 2-mercaptoetanol 0,55 mM y FGF2 humano recombinante 10 ng/ml (todo de Invitrogen). Los cultivos se alimentaron de forma diaria y se pasaron de forma manual cada 5-7 días. Las células se utilizaron entre los pasajes 40 y 60.

**Cultivo de células iPS**

La línea de células madre pluripotentes inducidas GMO3862 se obtuvo en el laboratorio de acuerdo con la técnica de reprogramación descrita en Takahashi *et al.* 2007. Brevemente, los fibroblastos se transdujeron con vectores retrovéricos que expresan c-myc, Oct-4, Sox2 y Klf4.

**Inducción neural utilizando medio NFS**

Para realizar la inducción neural utilizando medio NFS se utilizaron cultivos de células ME humanas o cultivos de iPS que alcanzaban el 70-80 % de confluencia. Las colonias se cortaron en trozos y se desprendieron de forma manual en medio N2B27 o NFS completado con el inhibidor de Rock Y27632 (10  $\mu$ M, Calbiochem). Los agregados se transfirieron durante 6 h a una placa de Petri de baja adherencia para privarlos de forma completa de la influencia de los alimentadores. Para finalizar, la suspensión de MEh o iPS se sembraron en placas de cultivo prerrecubiertas con poliornitina y laminina (2  $\mu$ g/ml, Sigma), en el mismo medio, a una proporción de 1:1. El día después y cada dos días, se cambió el medio por medio NFS sin Y27632.

**Obtención de células madre neurales y diferenciación terminal en neuronas**

Diez días después de la inducción en medio NFS, los precursores neurales se transfirieron a un medio de amplificación compuesto de N2B27, EGF/FGF2 (10 ng/ml) y BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro, 20 ng/ml) sin pasarllos, para permitir que las células madre neurales (CMN) migren fuera de las estructuras neuroepiteliales. Cuando el cultivo de CMN estaba en confluencia completa, las células se pasaron utilizando tripsina y se resembraron sobre poliornitina/laminina a una proporción de 1:2 en medio EGF/FGF2/BDNF. La diferenciación terminal en neuronas se indujo sembrando las CMN sobre poliornitina/laminina a una densidad de 50.000 células/cm<sup>2</sup> en N2B27 + BDNF (sin EGF y FGF2). Dos semanas después de la diferenciación terminal se realizaron análisis.

**Análisis por FACS**

Las células se recogieron utilizando tripsina y se fijaron con PFA al 2 % durante 15 minutos a 4 °C. La permeabilización se realizó utilizando PBS/solución de saponina al 0,1 %, 10 min a TA. La misma solución se utilizó después para diluir los anticuerpos primarios como sigue: anticuerpo monoclonal de ratón para OCT4 unido a ficoeritrina (oct4-PE, 1:10<sup>0</sup>, BD Biosciences) y anticuerpo policlonal anti-SOX2 de conejo (1:500<sup>0</sup>, Chemicon). Las células se expusieron a la mezcla de anticuerpos primarios, 45 minutos a TA. Se realizó una incubación adicional con anticuerpos secundarios anti-conejo unidos a AlexaFluo 488 durante, 30 minutos a TA, para detectar los anticuerpos frente a SOX2 no conjugados. El análisis de FACS se realizó utilizando un citómetro de flujo FACScalibur™ de Becton Dickinson.

**Inmunocitoquímica (ICQ)**

Las células se fijaron con PFA al 4 % durante 15 min a 4 °C, después se permeabilizaron utilizando una solución de PBS/Triton X100 al 0,3 %, 10 min a TA. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó como sigue: una noche a 4 °C en PBS/TX100: policlonal anti-PAX6 de conejo (1:800<sup>0</sup>, Covance), policlonal anti-SOX2 de conejo (1:1000<sup>0</sup>), monoclonal anti-OCT4 de ratón (1:200<sup>0</sup>, Santa-cruz biotech), monoclonal anti-CitoKeratina 18 de ratón (1:50<sup>0</sup>, Abcam), monoclonal de ratón anti-PAX3 (1:50<sup>0</sup>, RD Systems), monoclonal de ratón anti-TUJ1 y monoclonal de ratón Anti-MAP2 (1:1000<sup>0</sup>, ambos de Covance). Se aplicó la contratinción con anticuerpos secundarios de AlexaFluor y DAPI durante 1 h a temperatura ambiente. La detección se realizó utilizando un microscopio Invertido Zeiss.

**50 PCRq en tiempo real.**

Se aisló el ARN total utilizando el Kit RNeasy Mini (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se transcribió de forma inversa un total de 500 ng de ARN a ADNc con SuperScript III (Invitrogen) utilizando cebadores aleatorios. La Q-PCR en tiempo real se realizó con SYBR Green como sonda en un sistema LC480 Real-Time (Roche). La cuantificación se realizó con una línea de detección umbral (valor Ct). El Ct de cada gen diana se normalizó frente a la ciclofilina como gen constitutivo. Se utilizó el método de 2- $\Delta\Delta$ Ct para determinar el nivel relativo de expresión de cada gen. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  ETM. Las secuencias de los cebadores se enumeran a continuación:

NA NOG F	ctccatgaacatgcaacctg (SEQ ID NO: 1)
NA	ctcgctgattaggctccaac (SEQ ID NO: 2)
NOG R	
oct 4F	cttgctgcagaagtgggtggaggaa (SEQ ID NO: 3)
oct 4R	ctgcagtgtgggtttcgggca (SEQ ID NO: 4)

So x1 F	gatgcacaactcggagatca (SEQ ID NO: 5)
So x1 R	gtccttcttgagcagcgtct (SEQ ID NO: 6)
Pa x6 F	gccagcaacacacctagtca (SEQ ID NO: 7)
Pa x6 R	tgtgagggctgtgtctgttc (SEQ ID NO: 8)

## Resultados

### 5 **La eficacia de diferenciación neural en N2B27 es altamente variable dependiendo de la línea de células MEH utilizada. (ejemplo ilustrativo)**

En primer lugar los inventores observaron la eficacia de la diferenciación neuronal obtenida solo retirando del medio de cultivo cualquiera de las señales instructivas conocidas para los destinos celulares alternativos. Los inventores utilizaron el medio N2B27, un medio definido desarrollado anteriormente para inducir diferenciación neural de células madre embrionarias tanto de ratón como de ser humano, en un sistema de cultivo en monocapa adherente (Ying *et al.*, 2003; Lowell *et al.*, 2006). Para analizar de forma consistente la diferenciación de varias líneas de células MEH sin tratamiento previo, los inventores desarrollaron un protocolo de recuento sistemático en donde las células se tiñeron utilizando anticuerpos frente a los factores de transcripción OCT4 y SOX2 y después realizaron análisis utilizando la tecnología de FACS. Las células que expresaban tanto OCT4 como SOX2 se consideraron como células madre embrionarias mientras que las células que expresaban solo SOX2 se recontaron como células neurales. Las células totalmente negativas o que expresaban solo OCT4 se designaron como diferenciadas en otro tipos de tejido o capas. El análisis por FACS se realizó en 4 líneas celulares de MEH (Hues 24, H9, VUB01, SA01), 8 días tras la siembra en placa sobre laminina en N2B27. Se obtuvo diferenciación neural con todas las líneas celulares, pero la eficacia de diferenciación se mostró altamente variable dependiendo de la línea celular utilizada, variando del 33,84 % para la línea SA01 al 82,33 % para la línea VUB01 (Figura 1-A). Esto indicó que la simple retirada de los factores instructivos del medio de cultivo de los cultivos en monocapa de células ME no es suficiente para inducir de forma óptima el compromiso al linaje neural.

Después, los inventores decidieron caracterizar adicionalmente el cultivo obtenido tras 8 días de diferenciación en medio N2B27. La cuantificación por FACS y los análisis por inmunocitoquímica se realizaron en dos líneas celulares representativas, H9 y Hues 24 (Figura 1 B). Estas líneas se escogieron porque su potencial de diferenciación estaba en el intervalo intermedio y porque eran representativas de cada sexo, siendo H9 una línea femenina y siendo Hues 24 una línea masculina. Para cada línea celular se detectaron células ME resistentes a la diferenciación (OCT4+/SOX2+/PAX6-) próximas a las células neurales (Oct4-/SOX2+/PAX6+) (el 22,56 % para la línea H9 y el 18,43 % para la línea Hues24). Además, una parte significativa del cultivo consistió en células comprometidas a destinos alternativos (el 30,05 % para la línea H9, el 13,95 % para la línea Hues24). Para caracterizar estos tipos alternativos de diferenciación, se cuantificaron mediante PCRq marcadores de expresión de las tres capas germinales primitivas y de un tejido extraembrionario (Figura 1C). No se detectaron marcadores del endodermo primitivo (SOX17 y FOXA1) o del mesodermo primitivo (Brachyury y FLK1), lo que indicó que las células no se comprometieron hacia otras capas embrionarias primitivas. Por el contrario, estaban presentes niveles marcados de transcritos de 2 marcadores de tejidos extraembrionarios, CDX2 y Eomes. Considerados en su conjunto, los análisis cualitativo y cuantitativo mostraron que la población final de células obtenida tras la diferenciación de las MEH como una monocapa adherente en N2B27 está compuesta de una mezcla de precursores neurales, de células ME indiferenciadas y de células de origen extraembrionario.

### 40 **Los inhibidores de BMP y de TGFbeta (Nogina y SB431542) no tienen efectos redundantes complementarios sobre la inducción de la diferenciación neural a partir de células MEH. (ejemplo ilustrativo)**

Para explicar esta heterogeneidad, los inventores formularon la hipótesis de que, a pesar de la ausencia de señales instructivas procedentes del medio, pueden existir estimulaciones autocrinas y paracrinas de rutas intracelulares en los pequeños agregados/colonias de células ME, que sean suficientes para mantener la autorrenovación o inducir la diferenciación extraembrionaria. Debido a que la presencia concomitante de células ME indiferenciadas y de tejido extraembrionario puede ser un distintivo típico de la activación persistente de SMAD, los inventores se centraron en las dos rutas conocidas por inducir tales activaciones: la ruta de TGF beta, también conocida como la ruta Activina/Nodal y la ruta de BMP.

En primer lugar los inventores investigaron la consecuencia de una inhibición farmacológica de la ruta de TGF beta mediante SB431542, un producto químico conocido por bloquear de forma específica la activación de SMAD dependiente del receptor Activina/Nodal. Esta molécula ha mostrado aumentar la expresión de marcadores neuroectodérmicos como Nestina y NCAM, en un sistema basado en la formación de cuerpos embrionarios. Un tratamiento de ocho días de la monocapa de células adherente con SB431542 en N2B27 no aumentó de forma robusta la expresión de marcadores neurales tempranos como PAX6 y SOX1, cuando se midió mediante PCRq, o la proporción de células neurales (Oct4-/PAX6+), cuando se cuantificó por FACS (Figura 2). Sin embargo, este tratamiento indujo una diferenciación drástica de las ME a un destino alternativo que no se debió a una inducción aumentada de los tejidos extraembrionarios, como se muestra por los análisis de PCRq de los transcritos de CDX2 y

Eomes, o a un compromiso *de novo* con una de las otras capas embrionarias primitivas, dado que no se detectó la expresión de los 2 marcadores de mesodermo FLK1 y Brachyury, y de 2 marcadores de endodermo, SOX17 y FOXA1. Por el contrario, las células comprometidas con los otros dos tipos de progenie procedentes del ectodermo primitivo, concretamente células de la cresta neural (PAX3+/SOX10+) y queratinocitos (que expresan las

5 Citoqueratinas 8 y 18), se detectaron tanto mediante el análisis de los niveles de cada transcrito mediante PCRq como por la exploración de la expresión de PAX3 y CK18 por ICQ. Esto indicó que SB431542, y la más general inhibición de la ruta TGF beta, no estimuló de forma específica la diferenciación neuronal, pero es necesario para inducir la diferenciación de las células ME y para estimular su entrada en el linaje del ectodermo primitivo.

10 En paralelos, los inventores investigaron el impacto de la inhibición de la ruta de BMP por su inhibidor natural Nogina (Figura 2). Si un tratamiento de 8 días con Nogina de la monocapa adherente inducía un leve aumento de la expresión de los marcadores neurales (PCRq) y del porcentaje de células neurales (análisis por FACS), el principal efecto de esta citocina era un bloqueo completo de la diferenciación de las células MEh en un destino alternativo al del linaje neural. Como resultado, junto a las células neurales, se mantuvo en el cultivo después de 8 días de

15 tratamiento un gran número de células ES que expresaban los factores de transcripción Oct4 y NANOG. No se detectaron ni por análisis de PCRq ni por ICQ células diferenciadas en tejidos extraembrionarios, mesodermo, endodermo, queratinocitos o células de la cresta neural. Dado que el bloqueo individual de la ruta de BMP parece actuar principalmente como un bloqueante del destino no neuronal, pero no es suficiente por sí mismo para desencadenar la diferenciación de las MEh, los inventores decidieron combinar este efecto "restrictivo" con el efecto

20 "diferenciado" de SB431542.

Quando se combinaron los dos inhibidores (Figura 2), los inventores observaron una diferenciación neural robusta y sincronizada de las células MEh dado que se detectó por FACS (Oct4-/SOX2+) más del 90 % de células comprometidas con el linaje neural. Los análisis cualitativos mediante ICQ han mostrado que el cultivo estaba

25 organizado de forma homogénea en estructuras de tipo tubo neural o "rosetas" compuestas de células que expresaban el marcador de placa neural PAX6. De acuerdo con estas observaciones cualitativas, el tratamiento combinado indujo la expresión más elevada de transcritos de dos marcadores de compromiso neural, PAX6 y SOX1, medida por PCRq. Se detectaron niveles mínimos de marcadores de compromiso para destinos alternativos del ectodermo primitivo. Considerados en su conjunto, estos resultados indicaron que la combinación de dos inhibidores

30 (medio NFS) era necesaria para inducir una diferenciación sincronizada y eficaz de células ME en precursores neurales. Hasta la fecha, el medio NFS se analizó en un total de 10 líneas de MEh, incluyendo líneas que portan de forma natural mutaciones causantes de enfermedades monogénicas con la misma eficacia, es decir, más del 90 % de células neurales tras 8-10 días de diferenciación.

### 35 **Esta sincronización permite la obtención directa de células madre neurales sin la necesidad de clasificación o selección**

Una vez que se obtuvieron las células precursoras neurales (PAX6+/SOX1+/SOX2+) (tras 8-10 días de diferenciación), las estructuras de tipo tubo neural se transfirieron a otro medio definido más apropiado para iniciar

40 su amplificación y la estabilización adicional como "células madre" neurales (CMN, Figura 4A). Este medio se describió anteriormente (Conti *et al.*, 2005) y sus propiedades de amplificación se basaron en el uso de una combinación de dos mitógenos, concretamente EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico) y FGF2 (Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2) y la adición optativa del factor de supervivencia BDNF (factor de crecimiento obtenido del cerebro). Tras dos días, las células madre neurales comenzaron a migrar desde las estructuras en roseta y

45 comenzaron a ser morfológicamente identificables (Figura 1 B). Cuando alcanzó la confluencia, el cultivo se pasó utilizando tripsina para desprender las células y se sembró sobre sustratos de poliornitina/laminina, en una proporción de 1 en 2. Tras 2 o 3 pases se obtuvo una población de células madre neurales estable y homogénea. Estas células expresaban los mismos marcadores que las descritas en la bibliografía para las células madre neurales obtenidas de células MEh utilizando métodos alternativos o células de tipo de la glía radial obtenidas de

50 fetos, como SOX2, Nestina y Blbp. Para ensayar su potencial para dar lugar a neuronas, las CMN se sembraron en placa a baja densidad (habitualmente entre 50.000 y 100.000 células/cm<sup>2</sup>) sobre sustratos de poliornitina/laminina, en medio N2B27 + BDNF 20 ng/ml. El crecimiento de las neuritas comienza al cabo de las 24 horas después de la retirada de los factores de proliferación y las neuronas son claramente identificables tras 4 días. La tasa más alta de diferenciación se obtiene tras aproximadamente 10 días (más del 60 % de toda la población). El cultivo resultante

55 está compuesto de una mezcla de neuronas inhibitoras GABAérgicas y de excitadoras glutamatérgicas sin identidad regional definida. Los inventores también observaron la diferenciación espontánea de CMN en astrocitos positivos para GFAP (sigla del inglés *glial fibrillary acidic protein*, proteína fibrilar ácida de la glía), lo que demostró que las células madre neuronales eran multipotentes.

60 Como se muestra en la Figura 5, las CMN también se obtuvieron tras la diferenciación de las células iPS en medio NFS.

### Referencias

65 A lo largo de la presente solicitud diversas referencias describen el estado de la técnica al que pertenece la invención.

- Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol.* 15 de Nov de 2000; 227(2): 271-8.
- 5 Conti L, Pollard SM, Gorba T, Reitano E, Toselli M, Biella G, Sun Y, Sanzone S, Ying QL, Cattaneo E, Smith A. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol.* Sep de 2005; 3(9): e283.
- 10 Gazzo E, Minetti C. Potential drug targets within bone morphogenetic protein signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol.* Jun de 2007; 7(3): 325-33.
- International Stem Cell Initiative. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol.* Jul de 2007; 25(7): 803-16.
- 15 Liu Y, Song Z, Zhao Y, Qin H, Cai J, Zhang H, Yu T, Jiang S, Wang G, Ding M, Deng H. A novel chemical-defined medium with bFGF and N2B27 supplements supports undifferentiated growth in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 21 de Jul de 2006; 346(1): 131-9.
- 20 Lowell S, Benchoua A, Heavey B, Smith AG. Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biol Mayo* de 2006; 4(5)
- Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 13 de Jun de 2003; 113(6): 685-700.
- 25 Sun Y, Pollard S, Conti L, Toselli M, Biella G, Parkin G, Willatt L, Falk A, Cattaneo E, Smith A. Long-term tripotent differentiation capacity of human neural stem (NS) cells in adherent culture. *Mol Cell Neurosci.* Jun de 2008; 38(2): 245-58
- 30 Tabar V, Panagiotakos G, Greenberg ED, Chan BK, Sadelain M, Gutin PH, Studer L. Migration and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells in the rat brain. *Nat Biotechnol.* Mayo de 2005; 23(5): 601-6.
- Takahashi K. y Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 25 de Agos de 2006; 126(4): 663-76
- 35 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. *Cell.* 30 de Nov de 2007; 131 (5): 861-72.
- 40 Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol.* Feb de 2003; 21(2): 183-6.
- 45 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 21 de Dic de 2007; 318(5858): 1917-20.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> INSERM
- 50 <120> Método y medio para la diferenciación neural de células pluripotentes
- <130> BIO08655 BENCHOUA
- <160> 8
- 55 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 20
- 60 <212> ADN
- <213> artificial
- <220>
- <223> Cebador
- 65 <400> 1

ES 2 633 935 T3

ctccatgaac atgcaacctg 20

5 <210> 2  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> artificial

10 <220>  
<223> Cebador

<400> 2  
ctcgctgatt aggctccaac 20

15 <210> 3  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> artificial

20 <220>  
<223> Cebador

<400> 3  
cttgctgcag aagtggtgg aggaa 25

25 <210> 4  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> artificial

30 <220>  
<223> Cebador

35 <400> 4  
ctgcagtgtg ggttcgggc a 21

40 <210> 5  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<223> Cebador

45 <400> 5  
gatgcacaac tcggagatca 20

50 <210> 6  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<223> Cebador

55 <400> 6  
gtccttcttg agcagcgtct 20

60 <210> 7  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<223> Cebador

65 <400> 7

# ES 2 633 935 T3

gccagcaaca cacctagtca 20

<210> 8

<211> 20

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

10 <223> Cebador

<400> 8

Tgtgagggct gtgtctgttc 20

**REIVINDICACIONES**

1. Un medio de cultivo que comprende:
- 5 a) nogina o fragmentos de la misma que inhiben la ruta de señalización de BMP; y  
b) un inhibidor de la ruta de señalización del Factor de Crecimiento Transformante (TGF)/activina/nodal seleccionado del grupo que consiste en SB431542, Lefty-A y Cerberus, y fragmentos de Lefty-A y Cerberus que inhiben la ruta de señalización de TGF/activina/nodal.
- 10 2. Un medio de cultivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho medio de cultivo comprende adicionalmente:
- 15 a) una fuente de carbono;  
b) aminoácidos esenciales;  
c) vitaminas;  
d) una purina y una pirimidina;  
e) sales inorgánicas;  
f) selenio;  
g) un antioxidante;
- 20 h) un precursor de fosfolípidos;  
i) un ácido graso exclusivo; y  
j) una proteína de soporte.
- 25 3. Un método *in vitro* para la producción de una población de precursores neurales, en el que dicho método comprende la etapa de cultivar células pluripotentes con el medio de cultivo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
- 30 4. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dichas células pluripotentes son células pluripotentes humanas.
5. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que dichas células pluripotentes son células madre.
- 35 6. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dichas células madre son células madre embrionarias.
7. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que dichas células pluripotentes son células pluripotentes inducidas (IPS).
- 40 8. Un kit para el cultivo de células que comprende:
- 45 a) nogina o fragmentos de la misma que inhiben la ruta de señalización de BMP; y  
b) un inhibidor de la ruta de señalización del Factor de Crecimiento Transformante (TGF)/activina/nodal seleccionado del grupo que consiste en SB431542, Lefty-A y Cerberus, y fragmentos de Lefty-A y Cerberus, que inhiben la ruta de señalización de TGF/activina/nodal.
9. Un kit para el cultivo de células de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende adicionalmente una base de medio.
- 50 10. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en el que dichas células pluripotentes se cultivan con el medio como se define en la reivindicación 1 o 2 durante al menos 5 días.
- 55 11. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en el que dichas células pluripotentes se cultivan con el medio como se define en la reivindicación 1 o 2 durante al menos 7 días.
12. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en el que dichas células pluripotentes se cultivan con el medio como se define en la reivindicación 1 o 2 durante al menos 10 días.

Figura 1

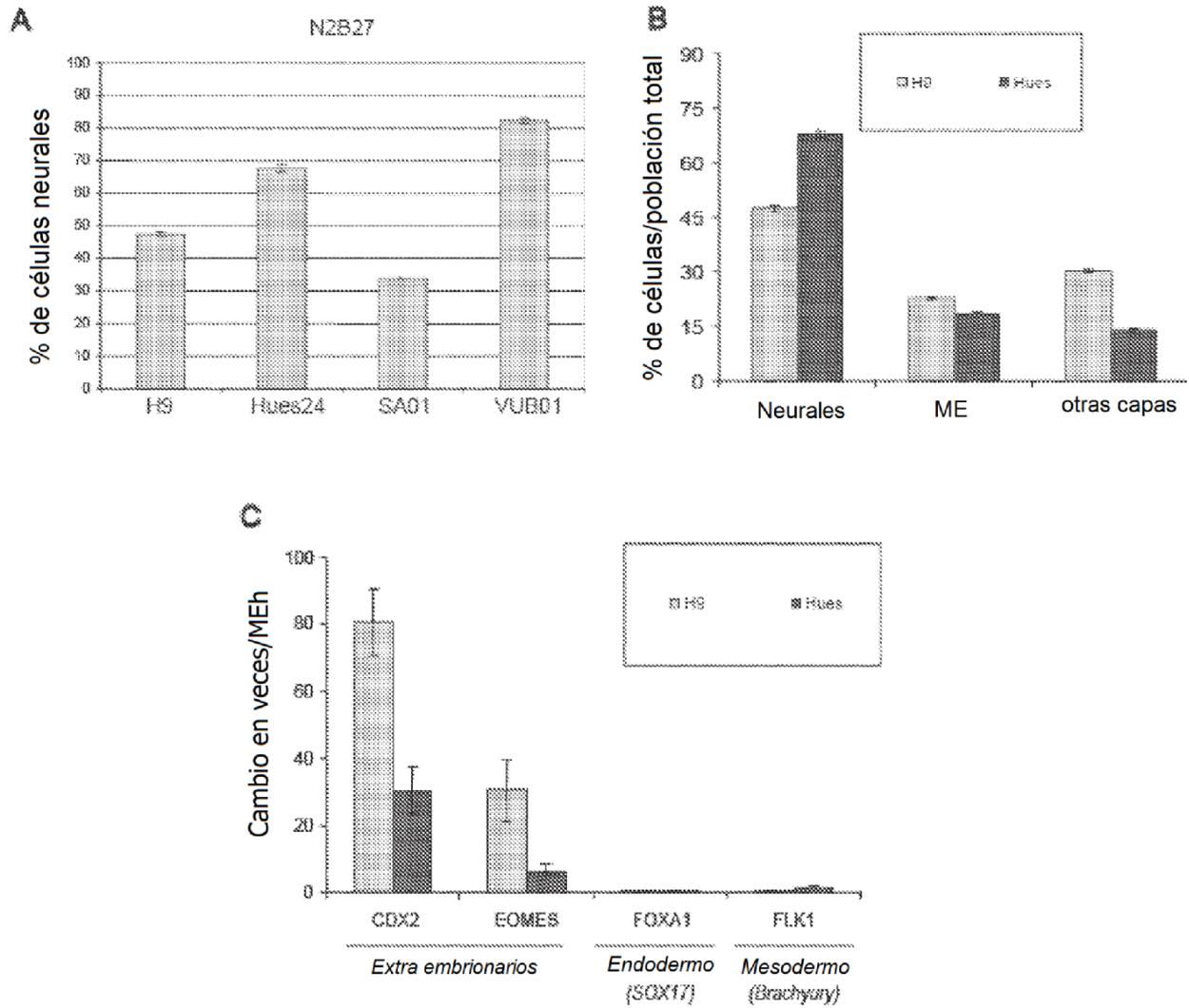
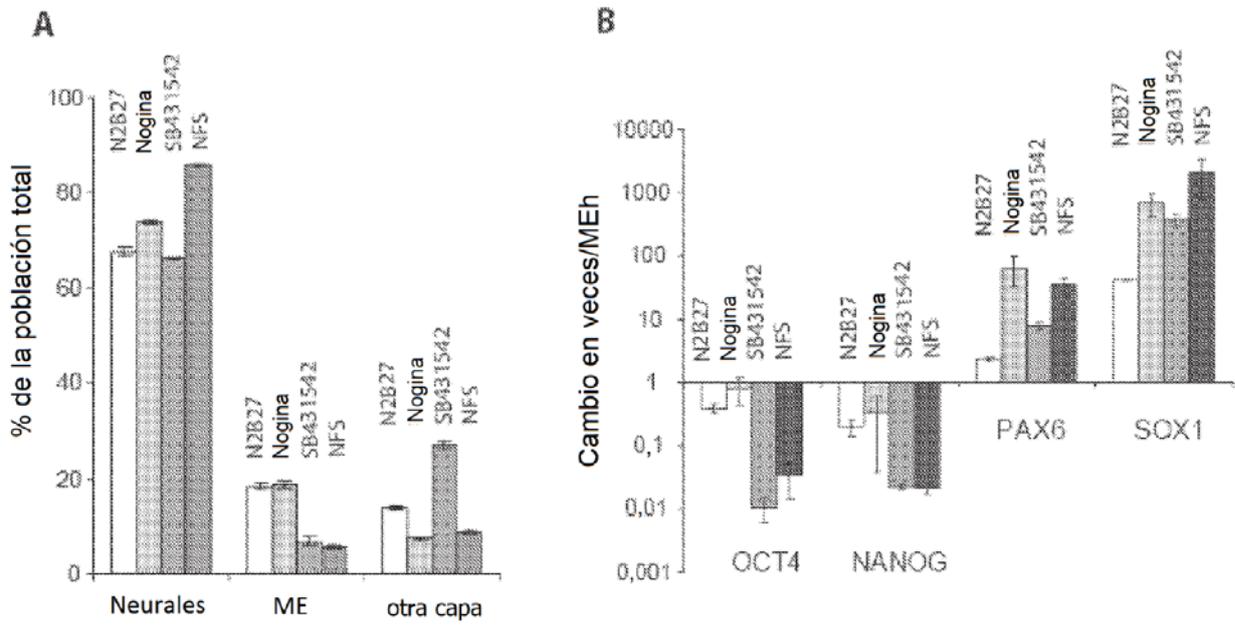


Figura 2



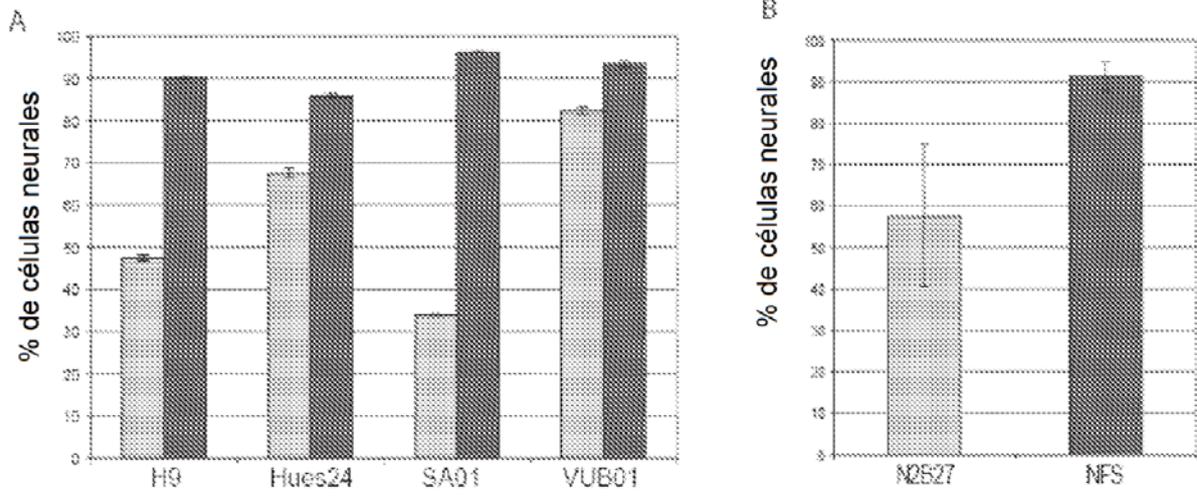
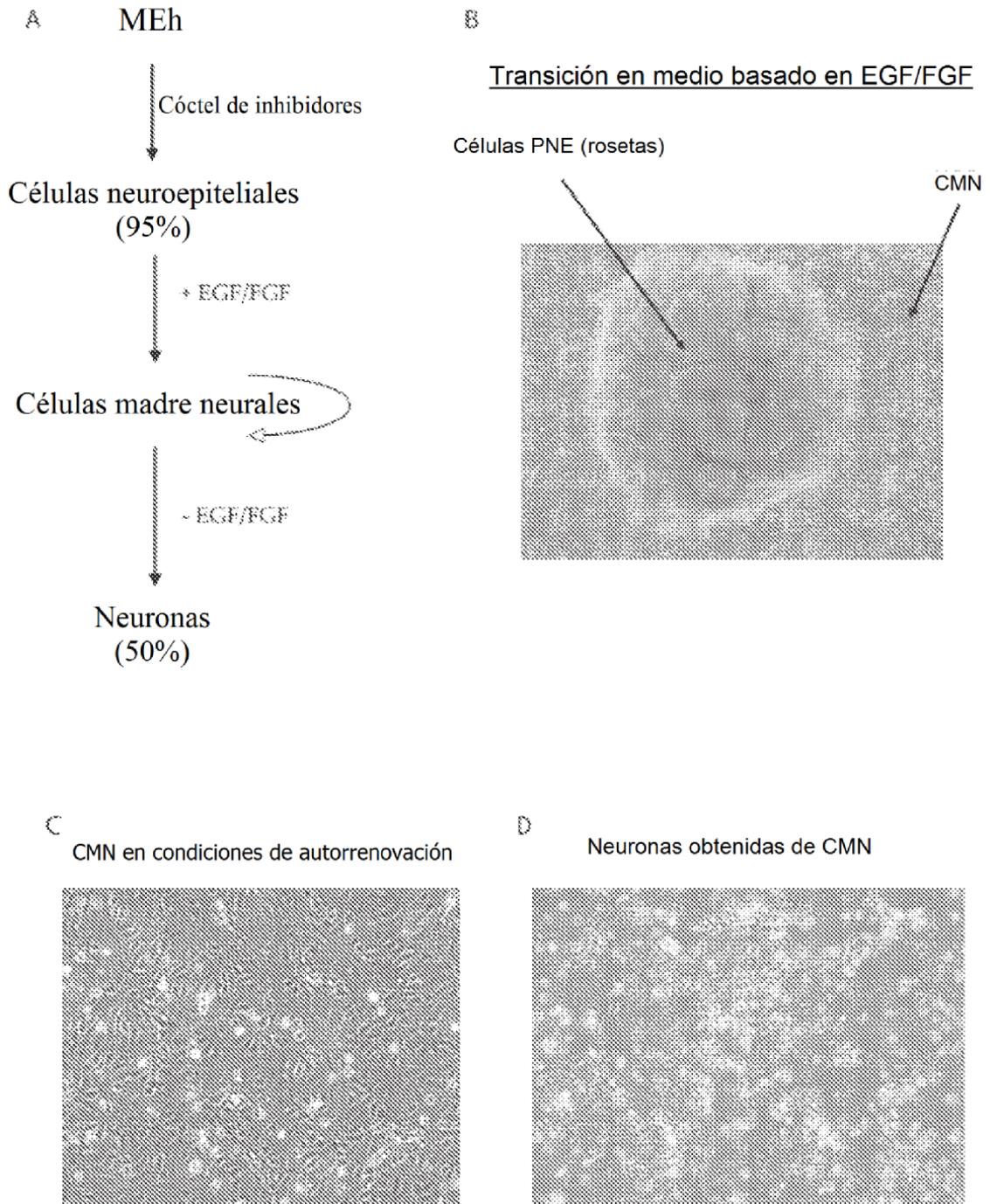
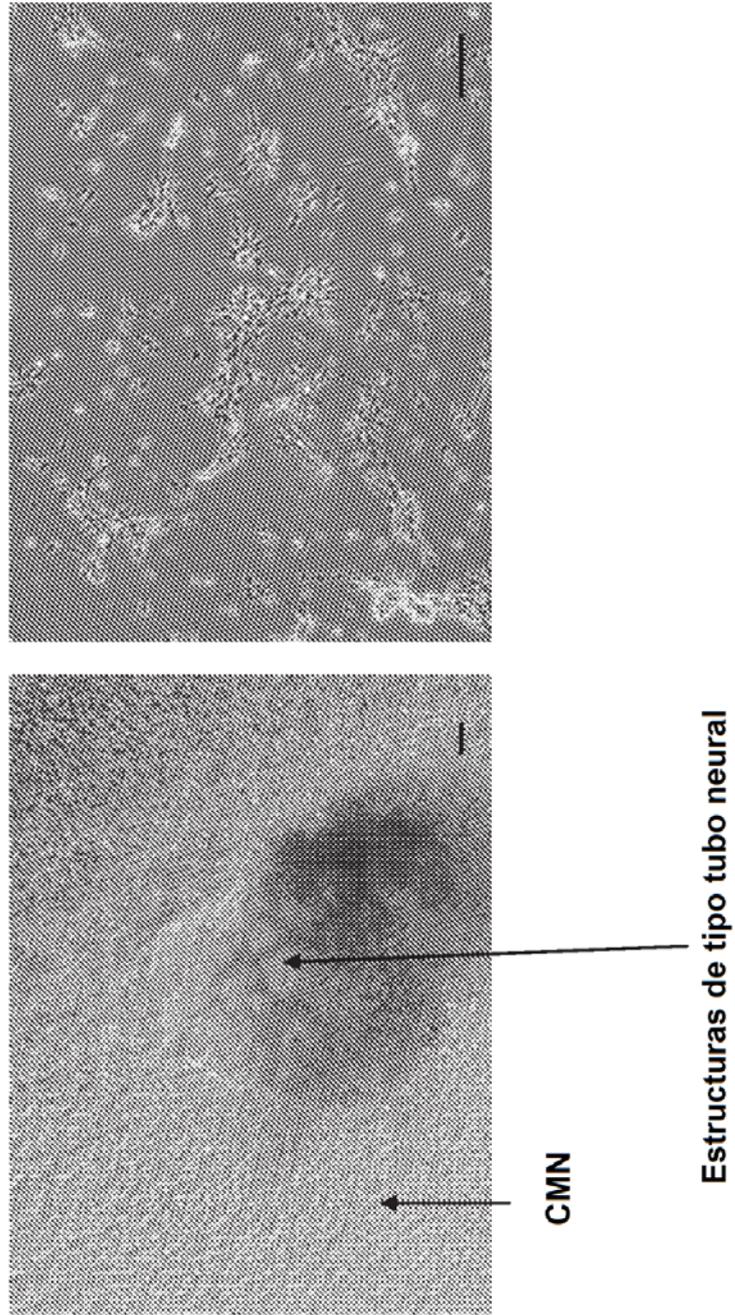


Figura 3



**Figura 4**



**Figura 5**