

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 503**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2013 PCT/US2013/037781**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13173031**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2013 E 13790533 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2850203**

54 Título: **Características distintivas de superficie celular para aislar neuronas de cultivos celulares derivados de células madre pluripotentes**

30 Prioridad:

16.05.2012 US 201261647951 P

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

04.05.2018

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive, Mail Code 110
Franklin Lakes, New Jersey 07417-1880, US**

72 Inventor/es:

**CARSON, CHRISTIAN T.;
MARTIN, JODY y
VIDAL, JASON G.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 666 503 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

Características distintivas de superficie celular para aislar neuronas de cultivos celulares derivados de células madre pluripotentes

5

Campo de la invención

Esta invención se refiere a métodos y composiciones para el aislamiento de neuronas.

10

Antecedentes de la invención

Tanto las células madre embrionarias humanas (hESC) como las células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) tienen la capacidad de diferenciarse en células somáticas. Por tanto, la diferenciación de hESC y hiPSC ofrece una oportunidad para el desarrollo de tratamientos, el cribado de fármacos, el modelado de enfermedades y el reemplazo de tejidos. Sin embargo, el desarrollo de condiciones bien definidas para generar poblaciones puras de tipos celulares específicos es crítico para conseguir estos objetivos. Hay varios métodos de inducción neural que inducen cultivos celulares para formar células madre neurales (NSC) usando diferenciación espontánea, inducción química o células de alimentación estromales de ratón. Las NSC pueden aislarse de forma manual y propagarse como cultivos en monocapa durante muchos pasos. En principio, estas células pueden diferenciarse en neuronas y glía, proporcionando un suministro sin fin de células para ensayos *in vitro* e *in vivo*. Desafortunadamente, la robustez de estos métodos está impedida por la variabilidad de un lote a otro de las NSC aisladas. Además, la diferenciación de las NSC a menudo produce cultivos variables y heterogéneos de neuronas, glía y células indiferenciadas, lo que puede impedir las aplicaciones posteriores que requieren poblaciones celulares purificadas o definidas, tal como en ensayos *in vitro*, trasplante y micromatrices. Una posible solución a este problema es identificar marcadores de superficie celular expresados en NSC, glía y neuronas para definir y purificar distintos tipos celulares.

15

20

25

La expresión de marcadores de superficie celular se ha descrito para la identificación y aislamiento de muchos tipos de células neurales por clasificación de células activadas por fluorescencia FACS de tejido embrionario y adulto de múltiples especies. La glucoproteína CD133 es un marcador de células madre/progenitoras conocido en muchos tejidos y se ha usado para aislar NSC de cerebro humano. El resto de carbohidrato CD15, también conocido como antígeno-I embrionario específico de fase o LeX, se ha usado para aislar NSC y glía radial de la zona subventricular (SVZ) en ratones. CD184, un receptor acoplado a proteína G se usó satisfactoriamente en combinación con CD15 para aislar NSC del prosencéfalo embrionario y SVZ adulta de ratón. CD24 es una molécula de adhesión celular que se ha usado para aislar NSC de cerebro de ratón por FACS. Además, las células madre neurales y los progenitores neurales se han aislado de tejido cerebral humano usando promotores-indicadores genéticos de marcadores de células madre neurales.

30

35

Asimismo, se han hecho avances en la identificación y aislamiento de células neurales derivadas de hESC por FACS. Pruzsak *et al.*, (Stem Cells 25: 2257-2268, 2007) informó de que cultivos de hESC que se diferencian en linajes neurales pueden ensayarse en diferentes fases del desarrollo con marcadores de superficie celular y que las neuronas podrían enriquecerse usando un anticuerpo contra CD56 (NCAM). Los marcadores CD184⁺/CD326⁻ se han usado para purificar progenitores neurales con capacidad de diferenciación en neuronas a partir de hESC en diferenciación. Además, Peh *et al.* (Stem Cells Dev 18: 269-282, 2009) ha informado de que el enriquecimiento para NSC formadoras de neuroesferas a partir de cultivos de inducción neural de hESC se basaba en la expresión de CD133, CD15 y GCTM-2. Usando una estrategia similar, Golebiewska *et al.*, (Stem Cells 27: 1298-1308, 2009) usó CD133⁺/CD45⁻/CD340⁻ para aislar NSC de hESC en diferenciación. Pruzsak *et al.*, (2009) demostró la utilidad de CD24, CD15 y CD29 como código de marcadores superficiales para aislar distintas poblaciones celulares, incluyendo NSC y una población mixta de neuroblastos y neuronas a partir de cultivos de inducción neural de hESC.

40

45

50

Yuan *et al.*, (PLoS One. 2 de marzo de 2011; 6(3):e17540), describe métodos basados en características distintivas de superficie celular para aislar células madre neurales (NSC), cultivos de diferenciación neural de células madre pluripotentes por FACS. Los métodos se usaron para aislar una población de NSC que era CD184⁺/CD271⁻/CD44⁻/CD24⁺ de cultivos de inducción neural de hESC y células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC). Los métodos basados en características distintivas de superficie celular también se usaron para enriquecer NSC de múltiples sistemas de cultivo de inducción neural comunes. Yuan *et al.*, identificó además características distintivas de superficie celular para el aislamiento de neuronas y glía de cultivos aislados de cultivos de NSC aisladas. Una población de neuronas que era CD184⁺/CD44⁻/CD15BAJO/CD24⁺ y una población de glía que era CD184⁺/CD44⁺ se purificó posteriormente de cultivos aislados de NSC en diferenciación. El kit de aislamiento de células neurales Stemflow™ de BD (BD Biosciences, San José, CA) es un kit de reactivos diseñado para permitir el aislamiento de células madre neurales (NSC) derivadas de células madre pluripotentes humanas o el aislamiento de neuronas y células de la glía de NSC diferenciadas. Este método reduce la cantidad de viabilidad entre los aislamientos de NSC en oposición a los métodos tradicionales como el aislamiento manual, pero requiere la inducción y aislamiento de NSC antes del aislamiento y enriquecimiento de neuronas en un cultivo. Se necesitan métodos que proporcionen identificación y aislamiento de neuronas derivadas de una población celular heterogénea y que reduzcan las etapas implicadas en la identificación, aislamiento y enriquecimiento de neuronas.

55

60

65

Se divulgan células madre de la cresta neutra craneal y una condición de cultivo que mantiene su crecimiento en el documento WO 2011/041062 A1.

5 Shauna H. Yaun *et al.*: Plos one Public Library of Science, EE. UU., vol. 6, n.º 3, 1 de marzo de 2011 (01-03-03-2011) páginas e17540.1-e17540.16, XP002696784 es un artículo titulado "Cell surface marker signatures for the isolation of neural stem cells, Glia and Neurons derived from Human Pluripotent Stem Cells".

10 Bd Biosciences *et al.*: "Application Note Flow Cytometry and High-Content Imaging to Identify Markers of Monocyte-Macrophage Differentiation Application Note Flow Cytometry and High-Content Imaging to Identify Markers of Monoc", 17 de agosto de 2011 (17-08-2011), XP055362703, recuperado de Internet: URL:https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_Multicolor_MonocyteMacrophageDiff_AppNote.pdf. La tabla 2 de este documento enumera los anticuerpos para CD151, CD200, CD340, HLA-A,B,C y CD49f.

15 Sumario

La presente invención se menciona en las reivindicaciones.

20 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa un método de clasificación celular de la técnica anterior para el enriquecimiento de la glía y neuronas.

25 La figura 2 muestra un diagrama de flujo que representa etapas en una realización de esta invención.

La figura 3 ilustra una realización de la presente invención que es un método de clasificación celular para el enriquecimiento de neuronas sin la etapa intermedia de enriquecer células madre neurales (NSC).

30 La figura 4 representa un diagrama de flujo que muestra la estrategia de cribado de inmunofenotipado usado para identificar una característica distintiva de superficie celular para aislar neuronas derivadas de cultivos de células madre pluripotentes en diferenciación.

35 La figura 5A y B representan los perfiles de fluorescencia de marcadores intracelulares y marcadores de superficie celular candidatos identificados en el cribado de la estrategia de cribado de la figura 4.

La figura 6 ilustra la estrategia de selección usada para la identificación de neuronas para clasificación celular.

40 La figura 7 muestra una imagen de un cultivo de diferenciación neural antes de la clasificación, que ilustra la heterogeneidad del cultivo celular.

La figura 8 muestra una imagen de neuronas clasificadas a partir de un cultivo celular heterogéneo usando la característica distintiva de marcadores de superficie celular de la presente invención.

45 La figura 9A muestra una imagen de neuronas clasificadas teñidas para el marcador neuronal beta III-tubulina y el marcador de NSC nestina, que muestra que las células son muy puras. La figura 9B muestra el análisis de flujo semicuantitativo de cultivos neuronales clasificados antes y después de la clasificación.

50 Las figuras 10A-D muestran una serie de diagramas 2D e histogramas generados durante el análisis de citometría de flujo de neuronal diferenciadas.

Las figuras 11A-D muestran una serie de diagramas 2D generados durante el análisis de citometría de flujo de neuronas diferenciadas antes y después de la clasificación celular activada por fluorescencia.

55 Las figuras 12A-E muestran una serie de diagramas 2D e imágenes generadas durante el análisis de citometría de flujo de neuronas diferenciadas antes y después de la reducción magnética.

Descripción detallada

60 La invención divulga un método y el uso de un sistema que proporciona el aislamiento y purificación de neuronas derivadas directamente de cualquier población celular heterogénea tal como cultivos que contienen rosetas neurales de acuerdo con las reivindicaciones. Las rosetas neurales pueden derivar de poblaciones de células madre tales como células madre pluripotentes inducidas (hiPSC), células madre embrionarias (hEPSC) o cultivos de fibroblastos.

65 El método y uso del sistema se basan en los perfiles de expresión de diversas moléculas de adhesión celular que se examinaron en células madre pluripotentes, rosetas neurales, epitelio y neuronas.

De las moléculas investigadas se demuestra que uno o más de HLA-A, HLA-B, HLA-C, CD49f, CD340 o CD151 puede seleccionarse negativamente en combinación con la selección positiva de CD200 para identificar, aislar o enriquecer una población de neuronas de un cultivo celular. Determinados cambios en la expresión de una o más de estas moléculas pueden correlacionarse con la progresión de células desde una célula sin linaje comprometido hasta una célula comprometida a un linaje neural. Uno o más anticuerpos para estas moléculas HLA-A, HLA-B, HLA-C, CD49f, CD340 o CD151 en combinación con anticuerpos para CD200 proporciona la identificación, aislamiento y/o enriquecimiento de neuronas de cultivos de diferenciación neural de células madre pluripotentes. Los anticuerpos para HLA-A, HLA-B y HLA-C pueden ser un único anticuerpo que se une selectivamente a las tres proteínas, conocidas colectivamente como HLA-A,B,C.

Las definiciones y otra información, incluyendo protocolos y reactivos, que son conocidos en la técnica y que pueden ser útiles para comprender y poner en práctica la presente invención se proporcionan en las referencias citadas a lo largo de todo el documento, en particular, Yuan *et al.*, "Cell-Surface Marker Signatures For The Isolation of Neural Stem Cells, Glia and Neurons Derived from Human Pluripotent Stem Cells." PLoS One. 2 de marzo de 2011; 6(3):e17540 donde el análisis de inmunofenotipado basado en FACS e imágenes usando anticuerpos contra marcadores de superficie celular en células madre embrionarias humanas (hESC) vírgenes identificó características distintivas de superficie celular prospectivas para el aislamiento de glía y neuronas a partir de células madre neurales aisladas.

La figura 1 representa una representación esquemática de métodos de la técnica anterior para la inducción y aislamiento de neuronas a partir de células madre, descrito en Yuan *et al.* Se cultivan poblaciones de células madre embrionarias humanas (hESC) vírgenes y se tratan para inducir la formación de rosetas neurales por tratamiento con inhibidor de SMAD (por ejemplo, SB431542, Nogina). Las células madre neurales entonces se aíslan de estas células de forma manual o por citometría de flujo con un conjunto de marcadores para la identificación y aislamiento de células madre neurales (NSC) en un medio de cultivo. Las NSC clasificadas se propagan durante muchos pases y se diferencian en cultivos mixtos de neuronas y glía después del tratamiento con un medio de diferenciación de neuronas que comprende factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y factor neurotrófico derivado de células de la glía (GDNF). Posteriormente se purificó una población de neuronas que era CD184⁺/CD44⁺/CD15^{LOW}/CD24⁺ y una población de glía que era CD184⁺/CD44⁺ a partir de cultivos derivados de NSC aisladas.

La figura 2 muestra las etapas donde progenitores neurales comprometidos a la formación de neuronas pueden identificarse y aislarse usando métodos de citometría de flujo y sin la purificación o aislamiento de las células madre neurales. La divulgación se refiere al cultivo de células que tienen capacidad de diferenciación neural. (por ejemplo, células madre pluripotentes (hiPSC), células madre embrionarias humanas (hEPSC) o cultivos de fibroblastos) 100. Estas células pueden inducirse para formar neuroepitelio, incluyendo rosetas neurales por cualquier medio conocido en la técnica, tal como tratamiento con uno o más inhibidores de SMAD, actividad de inducción derivada del estroma o métodos de cuerpos embrioides sin suero 110. El neuroepitelio formado por este u otros métodos puede tratarse además para inducir diferenciación adicional en neuronas, glía, astrocitos, etc. El tratamiento para inducir la diferenciación de neuronas a partir de esta mezcla heterogénea 120 puede incluir la incubación en un medio que comprende BDNF, GDNF y monofosfato de adenosina (AMP), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Las células tales como neuronas pueden identificarse y/o aislarse por el contacto con anticuerpos contra los marcadores seleccionados CD200, HLA-A, HLA-B, HLA-C, CD49f, CD151, CD340 o cualquier combinación de los mismos 130. Las células pueden seleccionarse o aislarse por ensayos de citometría de flujo 140.

Los marcadores biológicos útiles en los presente métodos son, en general, aquellos que son informativos del estado del sistema de desarrollo neural en respuesta a la inducción de diferenciación neural y pueden usarse ventajosamente con cultivos celulares derivados de una población celular heterogénea. Los marcadores biológicos que son informativos del estado de la ruta de desarrollo de neuronas, a modo de ejemplo y no de limitación, incluyen proteínas de superficie celular tales como CD200, HLA-A, HLA-B, HLA-C, CD49f, CD151 y CD340. Los marcadores biológicos también incluyen moléculas de ARN y ADN que codifican o son indicativas de otra manera de los marcadores proteínicos mencionados anteriormente. Las neuronas en un cultivo celular pueden identificarse por la detección de la presencia de CD200 en la muestra. Por ejemplo, por el contacto con anticuerpos marcados de forma fluorescente que se unen específicamente a CD200. La presencia de CD200 se mide además de la presencia de uno o más marcadores del grupo que comprende HLA-A, HLA-B, HLA-C, CD49f, CD151 y CD340 y combinaciones de los mismos, por ejemplo, HLA-A, HLA-B y/o HLA-C. Las neuronas pueden seleccionarse basándose en células que se clasifican como células CD200⁺ y también uno o más de HLA-A⁻, HLA-B⁻, HLA-C⁻, CD49f⁻, CD151⁻ o CD340⁻. Las células que son células CD200⁺ y también uno o más de HLA-A⁻, HLA-B⁻, HLA-C⁻, CD49f⁻, CD151⁻ o CD340⁻ se seleccionan, donde las células que son CD200⁺ pueden clasificarse como CD200⁺ y CD200^{alto}, excluyendo células que son CD200^{bajo}. Las neuronas pueden identificarse poniendo en contacto un cultivo celular con un primer anticuerpo que se une específicamente a CD200 y al menos un segundo anticuerpo que se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste en HLA-A, HLA-B o HLA-C, y al menos un tercer anticuerpo que se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste en CD49f, CD151 o CD340; y detectando células que son células CD200⁺ y también uno o más de HLA-A⁻, HLA-B⁻, HLA-C⁻ y también CD49f⁻, CD151⁻ o CD340⁻. Las neuronas también pueden detectarse seleccionando células que son células CD200⁺ y tienen expresión detectable, pero baja, de uno o más de HLA-A, HLA-B, HLA-C, CD49f, CD151 o CD340.

Las células en una muestra se identifican por el nivel de expresión de una o más proteínas sobre la superficie celular (por ejemplo, en algunos casos, se identifican células CD200⁺ en una muestra) detectando la intensidad de tinción de células teñidas con una sonda (por ejemplo, anticuerpo) que es específica para una proteína de superficie celular de interés (por ejemplo, CD200, HLA-A, HLA-B, HLA-C, CD49f, CD151, CD340, etc.). Los expertos en la materia entenderán que los niveles de expresión indicados reflejan cantidades detectables de la proteína marcadora sobre la superficie celular. Una célula que es negativa para la tinción (por ejemplo, CD200) (el nivel de unión de un reactivo específico de marcador no es detectablemente diferente de un control de isotipo coincidente) aún puede expresar cantidades mínimas del marcador y/o puede existir una cantidad mínima de intensidad de tinción que no se deba a la presencia de proteína (por ejemplo, tinción "de fondo"). Y aunque es habitual en la técnica hacer referencia a células como "positivas" (+) o "negativas" (-) para un marcador particular, los niveles de expresión reales no son rasgos cuantitativos. La cantidad de moléculas sobre la superficie celular puede variar en varios logaritmos, aunque aún puede caracterizarse como "positiva". Por ejemplo, el término "CD200⁺", como se usa en este documento, puede abarcar los términos CD200^{med} y CD200^{alto}, pero no abarca el término CD200^{bajo} o CD200.

La intensidad de tinción de las células puede controlarse por citometría de flujo, donde hay láseres que detectan los niveles cuantitativos de fluorocromo (que es proporcional a la cantidad de marcador de superficie celular unido por reactivos específicos, por ejemplo, anticuerpos). La citometría de flujo, o FACS, puede usarse también para separar poblaciones celulares basándose en la intensidad de unión a un reactivo específico, así como otros parámetros tales como el tamaño de las células y la dispersión de la luz. Aunque el nivel absoluto de tinción puede diferir con un fluorocromo y preparación de reactivo particulares, los datos pueden normalizarse a un control.

Para normalizar la distribución a un control, cada célula se registra como un punto de datos que tiene una intensidad particular de tinción. Estos puntos de datos pueden presentarse de acuerdo con una escala logarítmica, donde la unidad de medida es intensidad de tinción arbitraria. En un ejemplo, las células de tinción más brillante en una muestra pueden ser, como mucho, 4 logaritmos más intensas que las células no teñidas (es decir, "negativas"). Cuando se presenta de esta manera, está claro que las células que están en el logaritmo más alto de intensidad de tinción son "positivas" ("altas"), mientras que aquellas en la intensidad más baja son "negativas" o "bajas". Las células de tinción positiva "baja" tienen un nivel de tinción más brillante que el de un control de isotipo coincidente, pero no es tan intenso como las células de tinción más brillante normalmente encontradas en la población. De la intensidad más baja a la intensidad más brillante, las células pueden ser "negativas", "bajas", "med" (es decir, medianas) o "altas". Las células que son "med" o "altas" se consideran "positivas". En algunos casos, se usa "++" para indicar "alto" mientras se usa "+" para indicar "med", pero ambos niveles de intensidad se consideran "positivos".

Un control alternativo puede utilizar un sustrato o sustratos que tengan densidades y/o intensidades definidas de un marcador sobre la superficie, por ejemplo, una microesfera fabricada o línea celular, que proporciona el control positivo para uno más niveles de intensidad.

La medición de marcadores biológicos puede realizarse por cualquier técnica convencional. Las mediciones de moléculas marcadoras biológicas pueden incluir, por ejemplo, mediciones que indiquen la presencia, concentración, nivel de expresión o cualquier otro valor asociado con una molécula marcadora. Están disponibles diversas técnicas espectroscópicas para medir moléculas marcadoras biológicas, incluyendo espectroscopia UV, visible y de infrarrojos. Pueden usarse marcadores fluorescentes, marcadores radiactivos u otros marcadores fácilmente identificables y cuantificables para ayudar a la medición de las moléculas marcadoras. Los niveles de expresión de marcadores unidos a células pueden medirse por técnicas de citometría de flujo. La expresión de marcadores de superficie celular se ha descrito para la identificación y aislamiento de muchos tipos de células neurales por técnicas de imágenes tales como clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de tejido embrionario y adulto de múltiples especies. La citometría de flujo puede usarse para identificar y clasificar células usando métodos de esta invención. La citometría de flujo es una técnica para contar y examinar partículas microscópicas tales como células, suspendiéndolas en una corriente de líquido y capturando la luz que surge de cada célula según pasa a través de un rayo láser. Las moléculas de superficie celular a menudo mencionadas como moléculas "de grupo de diferenciación" (CD) pueden explotarse en citometría de flujo para caracterizar las poblaciones celulares. Por ejemplo, en clasificación celular activada por fluorescencia, se emplea un anticuerpo de diagnóstico (marcado con un fluoróforo) que se une a una molécula superficial (por ejemplo, una molécula CD) presente en y característica de la población celular en cuestión. Después de ello, se activa el fluoróforo (adherido al anticuerpo) por un rayo láser y se detecta la señal de fluorescencia por el citómetro de flujo. De esta manera, pueden usarse anticuerpos marcados de forma fluorescente para detectar y clasificar células que presentan una molécula CD específica (o conjunto de moléculas CD). Los fluoróforos para su uso con este o cualquier otro método de detección a modo de ejemplo y no de limitación incluyen isotiocianato de fluoresceína, alofocianina, peridina-clorofila-proteína, ficoeritrina y cianina 5, BB421 o cualquier otro fluoróforo que pueda conjugarse de forma covalente a un anticuerpo. Los sistemas de esta invención se definen en las reivindicaciones 13 y 14. Los citómetros de flujo que se utilizan en métodos y sistemas descritos en esta ocasión pueden configurarse para detectar señales bajas, medianas y altas desde los anticuerpos marcados de forma fluorescente. Los anticuerpos particulares utilizados junto con la intensidad de la señal pueden proporcionar un patrón específico de reconocimiento para identificar neuronas derivadas de un cultivo celular que puede comprender una población celular heterogénea.

Los marcadores de superficie celular están relacionados con familias conocidas de proteínas. La glucoproteína CD200 es una proteína de membrana expresada por una amplia gama de tipos celulares. HLA-A, HLA-B, HLA-C, (indistintamente HLA-A,B,C) son moléculas de proteína HLA que componen el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). El MHC es una molécula de superficie celular codificada por una gran familia génica en todos los vertebrados. Los anticuerpos contra HLA-A,B,C son anticuerpos que se unen a HLA-A, HLA-B o HLA-C. Las moléculas MHC median interacciones de leucocitos, también llamados glóbulos blancos (WBC), que son células inmunitarias, con otros leucocitos o células corporales. Los anticuerpos contra CD49f se unen al producto proteínico ITGA6 que es la cadena alfa 6 de la integrina alfa. Las integrinas son proteínas de superficie celular integradas compuestas de una cadena alfa y una cadena beta. Los anticuerpos contra CD340 se unen a un miembro de la familia del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF) de tirosina cinasas receptoras. Los anticuerpos contra CD151 se unen a una glucoproteína de superficie celular que se sabe que forma complejos con integrinas y otras proteínas de la superfamilia de transmembrana 4.

La figura 3 ilustra esquemáticamente una población de células madre embrionarias humanas (hESC) vírgenes inducidas para formar rosetas neurales por inhibición de SMAD por SFEB de una manera similar a la de Yaun *et al.* Cualquier cultivo celular que pueda comprender neuroprogenitores o células destinadas a convertirse en neuronas puede tratarse con métodos y sistemas de esta invención. Los tipos celulares que pueden combinarse en métodos o sistemas de esta invención incluyen células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC), células madre embrionarias humanas (hESC) o cultivos de fibroblastos, rosetas neurales, neuronas y glía. Cuando las células para la inducción son rosetas neurales como en la figura 3, las células pueden tratarse con medio que inducirá la diferenciación neural (por ejemplo, BDNF, GDNF y/o dbAMPc) tal como la formación de neuronas o glía. El medio puede inducir reactivos tales como N2 o B27 o cualquier otro reactivo protocolo conocido en la técnica para inducir diferenciación neural. Una etapa intermedia de purificación, aislamiento o separación de células madre neurales no es necesaria en los métodos y sistemas de esta invención. Después del tratamiento para inducir la diferenciación, las neuronas pueden identificarse y/o aislarse poniendo en contacto el cultivo celular con anticuerpos que se unen selectivamente a CD200. Las neuronas se seleccionan poniendo en contacto las células con anticuerpos que se unen selectivamente a CD200 y uno o más anticuerpos se unen selectivamente a HLA-A, HLA-B HLA-C, CD49f, CD151, CD340 o cualquier combinación de los mismos. Los anticuerpos pueden detectarse y marcarse de forma discriminable por conjugación directa con un fluoróforo. La identificación puede ser por cualquier técnica de imágenes que pueda distinguir una señal fluorescente (por ejemplo, citometría de flujo). Los cultivos celulares pueden tratarse con sistemas de esta invención en cualquier momento después de la inducción de la diferenciación neural tal como después de 20, 25, 30 o 40 días para asegurar que las neuronas se identifican y/o aíslan. El método reduce de forma beneficiosa el tiempo hasta conseguir una población enriquecida en neuronas en un cultivo celular porque puede omitirse la etapa de aislamiento de NSC.

El método y uso del sistema de esta invención pueden usarse en combinación con técnicas convencionales de separación celular para preparar un cultivo celular enriquecido en neuronas. El enriquecimiento puede basarse en la selección de células que son $CD200^+$ o $CD200^{alto}$ o células que son $CD200^{med}$ y $CD200^{alto}$ (es decir, excluyendo células que son $CD200^{bajo}$). Los criterios de selección pueden basarse en la selección de una población celular que es $CD200^+$ o $CD200^{++}$ y también HLA-A,B,C, CD49f, CD151⁻ o CD340⁻, por ejemplo, $CD200^{++}/HLA-A,B,C$. La selección puede producirse por cualquier medio tal como mediante clasificación celular por citometría de flujo. Las células que son HLA-A,B,C⁺, CD49f⁺, CD151⁺ o CD340⁺, pueden clasificarse de forma magnética de una muestra celular. La selección magnética puede comprender poner en contacto el cultivo celular con un anticuerpo selectivo para HLA-A, HLA-B, HLA-C, CD49f, CD151, CD340 o cualquier combinación de los mismos, donde los anticuerpos se adhieren a una superficie que puede verse atraída o repelida por un campo magnético tal como una microesfera magnética. El anticuerpo específico para los marcadores comprende además una microesfera magnética tal como un material metálico ferroso. Preferiblemente, las microesferas magnéticas son micropartículas superparamagnéticas, aunque puede usarse cualquier tipo de microesfera magnética. La microesfera magnética puede adherirse al anticuerpo por cualquier medio. La microesfera magnética puede adherirse antes de la unión del anticuerpo al marcador de interés, o posterior a la formación del complejo celular-anticuerpo. En algunos casos, las microesferas magnéticas se adhieren antes de la formación del complejo. Cuando el complejo celular-anticuerpo tiene microesferas magnéticas y los anticuerpos son específicos para HLA-A, HLA-B, HLA-C, CD49f, CD151, CD340 o cualquier combinación de los mismos, la separación de dicho complejo del cultivo celular que comprende neuronas comprende preferiblemente poner en contacto el cultivo celular con un campo magnético de modo que el complejo celular-anticuerpo que tiene las microesferas magnéticas se retenga sustancialmente por el campo magnético y las neuronas no se retienen sustancialmente por el campo magnético. Un ejemplo de un campo magnético puede ser lana de acero magnetizada o un campo magnético en un citómetro de flujo. Las células restantes entonces pueden clasificarse selectivamente usando anticuerpos selectivos por CD200. La invención también incluye realizaciones en que la separación de un cultivo celular en una primera población celular que sustancialmente no tiene ninguna célula que sea positiva para HLA-A, HLA-B, HLA-C, CD49f, CD151, CD340 o cualquier combinación de los mismos y una segunda población que tiene población enriquecida para neuronas. La segunda población celular entonces puede seleccionarse para células $CD200^+$ o $CD200^{++}$ para enriquecimiento adicional. Los métodos de esta invención pueden producir valores de enriquecimiento del orden de 2, 4, 6 o 10 veces.

El método y uso del sistema de esta invención pueden usarse para herramientas de diagnóstico para el análisis de

tipos celulares neurales derivados de células del paciente. El enriquecimiento de tipos celulares neurales para el cribado de fármacos (o moléculas pequeñas) candidatos en tipos celulares neurales derivados de composiciones de cultivo celular heterogéneo tales como rosetas neurales, hPSC o células del paciente. Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran adicionalmente la presente invención.

5

Ejemplos

Ejemplo 1

10 Se obtuvieron cultivos de H9hESC de WiCell (Madison, WI), se expandieron las células, después se diferenciaron de la siguiente manera:

15 Día 1: Se generaron cuerpos embrioides (EB) por tratamiento con dispasa y se pusieron en medio de remplazo de suero de eliminación (KOSR) (medio convencional de hESC de WiCell sin bFGF) que contiene Y-27632 10 μ M (inhibidor de Rock), dorsomorfina 2,5 μ M, SB43152 10 μ M. Se usaron placas de 6 pocillos de baja adhesión y se añadieron 4 ml de medio por pocillo.

20 Día 2: Se retiró el inhibidor de Rock y las células se cambiaron a medio KOSR que contenía dorsomorfina 2,5 μ M, SB43152 10 μ M.

Día 4/5: Se sembraron los EB en placas recubiertas de matrigel en medio ITS [D-MEM/F-12 con Glutamax™ (Life Technologies™) + ITS 1X (BD™)] + dorsomorfina 2,5 μ M + SB43152 10 μ M. Se sembraron 4 ml de los EB en los pocillos y se añadieron 10 ml de medio ITS en una placa recubierta de 10 cm. Los EB se suministraron cada 2-3 días.

25

Día 10/11: Se cambió el medio celular a ITS.

Día 15/18[†]: Se cambió el medio a medio ITS + 20 ng/ml de FGF durante 24-48 horas. Se observó muerte celular y diferenciación de neuronas.

30

Día 18/20: Se usó herramienta de pase StemPro® EZPassage™ de Life Technologies para cortar cuadrados en cultivo. Los cuadrados se rasparon y sedimentaron. Se sembró un cultivo de 10 cm en dos matraces T150 que estaban recubiertos con poliornitina y laminina en medio D-MEM/F-12 con Glutamax™. El medio también contenía dbAMPc 1 μ M + 10 ng/ml de BDNF + 10 ng/ml de GDNF.

35

Día 40: Los cultivos se clasificaron y analizaron. La figura 4 describe la secuencia de trabajo de descubrimiento de inmunofenotipos de aislamiento de neuronas utilizados en esta ocasión. Los cultivos de inducción neural se tiñeron con el panel de cribado de marcadores de superficie de células humanas Lyoplate™ de BD para cribar los marcadores superficiales y después se tiñeron posteriormente con SOX1, SOX2, PAX6 y DCX para cribar las neuronas usando marcadores intracelulares. Finalmente, se analizó la población de expresión de marcadores de superficie celular para determinar novedosos marcadores de superficie celular para neuronas de una población heterogénea de células. El diagrama 2D (figura 5A) muestra la población DCX⁺Sox1⁻ y DCX⁺Sox1⁺ identificada como neuronas. Los cultivos de diferenciación se analizaron para ser capaces de aislar/enriquecer las neuronas. Los cuatro histogramas mostrados en la figura 5B muestran un muestreo de diversos marcadores identificados en el cribado que se expresan de forma diferente en las neuronas en comparación con las otras poblaciones.

Las neuronas se clasificaron con una boquilla de 100 μ m a aproximadamente 137,895 kPa (20 psi). Las células se tiñeron en medio basal y se recogieron en medio basal. La figura 6 muestra la estrategia de selección usada para clasificar neuronas de los cultivos de inducción neural. La ventana de adquisición neural se identificó de la siguiente manera, en dirección horaria desde el lado a mano izquierda superior: células P1⁻ basadas en dispersión de luz, células individuales P2⁺P3⁻ basadas en dispersión de luz y P4 se identificaron como neuronas basadas en la expresión de CD200 y HLA-A,B,C. También hay 2 diagrama adicionales que muestran la expresión de CD340 y CD184 de las células en la ventana de adquisición de neuronas P4 (CD200⁺/HLA-A⁻, HLA-B⁻, HLA-C⁻).

55 Las figuras 7 y 8 muestran una imagen de microscopía óptica de cultivos preclasificación y dos días posclasificación. Las neuronas de las que se ha tomado imagen en la imagen posclasificación son cuantitativamente muy puras basándose en el aspecto. Las estructuras de tipo rosquilla redonda observadas en la figura 7 son neuroepitelio que contienen NSC. Se identifican proyecciones neuronales surgiendo de las colonias neurales.

60 La figura 9A muestra una imagen de microscopía de fluorescencia de clasificación CD200⁺/HLA-A⁻, HLA-B⁻, HLA-C⁻, 7 días después de la clasificación. Las células se clasificaron y sembraron en placas de imágenes de 96 pocillos a ~50 000 células/pocillo y se cultivaron durante 7 días en medio D-MEM/F-12 con Glutamax™ que contenía N2 1X y B27 1X. Las neuronas se identifican por tinción de tubulina beta, las "células que no son neuronas" contaminantes se identifican por tinción de nestina y todos los núcleos celulares se identifican por tinción DAPI.

65

Los diagramas 2D mostrados en la figura 9B ilustran el análisis de los cultivos de células neurales inmediatamente

antes de la clasificación celular e inmediatamente después de la clasificación celular. La ventana de adquisición izquierda superior consiste en "células que no son neuronas" observadas por la tinción nestina⁺/DCX⁻. La ventana de adquisición en la derecha superior consiste en neuronas observadas por la tinción nestina⁺/DCX⁺. Los diagramas indican que los cultivos neuronales clasificados son aproximadamente un 60 % puros.

5 Ejemplo 2

La figura 10A muestra un resumen del proceso de cultivo y diferenciación celular. Se cultivaron H9hESC y se expandieron a partir de células obtenidas de WiCell (Madison, WI). Después se diferenciaron de la siguiente manera:

10 Día 7: Se generaron cuerpos embrioides (EB) con dispasa y se colocaron en medio KOSR (medio convencional de hESC de WiCell sin bFGF) que contiene Y-27632 10 μ M (inhibidor de Rock), dorsomorfin 2,5 μ M y SB43152 10 μ M. Se usaron placas de 6 pocillos de baja adhesión y se añadieron 4 ml de medio por pocillo.

15 Día 8: Se retiró el inhibidor de Rock y se cambió el medio a medio KOSR que contenía dorsomorfin 2,5 μ M, SB43152 10 μ M.

20 Día 10/11: Se sembraron los EB en placas recubiertas de matrigel en medio ITS [D-MEM/F-12 con GlutamaxTM (Life Technologies 105655018) + ITS 1X (n.º cat. BD 354351)] + dorsomorfin 2,5 μ M + SB43152 10 μ M. Se sembraron 4 ml de los EB en los pocillos y se añadieron 10 ml de medio ITS en una placa recubierta de 10 cm. Los EB se suministraron cada 2-3 días.

Día 15/11: Se cambió el medio celular a ITS.

25 Día 20/23: Se cambió el medio a medio ITS + 20 ng/ml de FGF durante 24-48 horas. Se observó muerte celular y diferenciación de neuronas.

30 Día 23/25: Usando la herramienta de pase StemPro® EZPassageTM de Life Technologies, se cortaron cuadrados en cultivo. Se sembró un cultivo de 10 cm en dos matraces T150 que estaban recubiertos con poliornitina y laminina en medio D-MEM/F-12 con GlutamaxTM que contenía N2 1X y B27 1X junto con dbAMPc 1 μ M + 10 ng/ml de BDNF + 10 ng/ml de GDNF.

Día 45: Los cultivos se clasificaron y analizaron.

35 Los cultivos de inducción neural se tiñeron con DCX y Sox1 para proporcionar controles intracelulares para diferenciación de neuronas. La figura 10B muestra el diagrama 2D que ilustra la estrategia de selección. La población DCX⁺Sox1⁻ y DCX⁺Sox1⁺ se definió como neuronas. Los histogramas superpuestos de los marcadores que se identificaron en el cribado se muestran en la figura 10C. Se identificó CD200 como marcador positivo para neuronas. Se identificaron HLA-A, HLA-B, HLA-C, CD151, CD340 y CD49f como marcadores negativos de células contaminantes en el cultivo. La expresión diferencial de estos marcadores puede permitir el aislamiento de neuronas. Los resultados de cotinción de CD200 con HLA-A, HLA-B, HLA-C o CD340 o CD49f para identificar una combinación de marcadores para la clasificación se muestran en diagramas 2D en la figura 10D.

45 Las figuras 11A-D muestran resultados del análisis de selección usado para clasificar neuronal de los cultivos de inducción neural. Los diagramas representados en la figura 11A muestran discriminación de dispersión usada para clasificar células basándose en la dispersión de luz para justificar la discriminación de dobletes, que asegura que se analizan las células individuales basándose en la dispersión de luz. Se usan diagramas CD200⁺/HLA-A/HLA-B/HLA-C⁻ para identificar neuronas basándose en la expresión de CD200 y HLA-A, HLA-B o HLA-C y se confirmó usando análisis de DCX/SOX2/Ki67. La figura 11B representa el análisis de flujo del cultivo neural antes de la clasificación. Las neuronas se identifican por la expresión de DCX y la ausencia de expresión de Sox2 y Ki-67 (DCX⁺Sox2⁻Ki67⁻). La figura 11C representa el análisis de flujo de células CD200⁺/HLA-A/HLA-B/HLA-C⁻ después de la clasificación celular de cultivos neuronales. Las neuronas se identifican por la expresión de DCX y la ausencia de expresión de Sox2 y Ki67 (DCX⁺Sox2⁻Ki67⁻). La figura 11D representa el análisis de flujo de células CD200⁺/HLA-A,B,C⁺ después de la clasificación celular de cultivos neuronales. Las neuronas se identifican por la expresión de DCX y la ausencia de expresión de Sox2 y Ki67 (DCX⁺Sox2⁻Ki67⁻).

Ejemplo 3

60 Se indujo la formación de neuronas como se describe anteriormente. El cultivo celular se puso en contacto con los siguientes anticuerpos; PE CD340, PE HLA-A,B,C y PE CD49f. Las células entonces se sometieron a reducción magnética. Se usó una nanopartícula magnética conjugada con un anticuerpo que se une a PE para unirse a los anticuerpos conjugados con PE que se usaron en el cultivo celular. Las nanopartículas magnéticas entonces se separaron de la solución celular colocándola cerca de un campo magnético. Las fracciones enriquecidas y reducidas entonces se analizaron por citometría de flujo y análisis de imágenes. El análisis de imágenes del cultivo neural antes (12A) y después (12B) de la reducción magnética se muestra en las figuras 12A y 12B. Los cultivos neuronales se disociaron, se tiñeron con anticuerpos conjugados y se sembraron en placas de imágenes de 96 pocillos y se

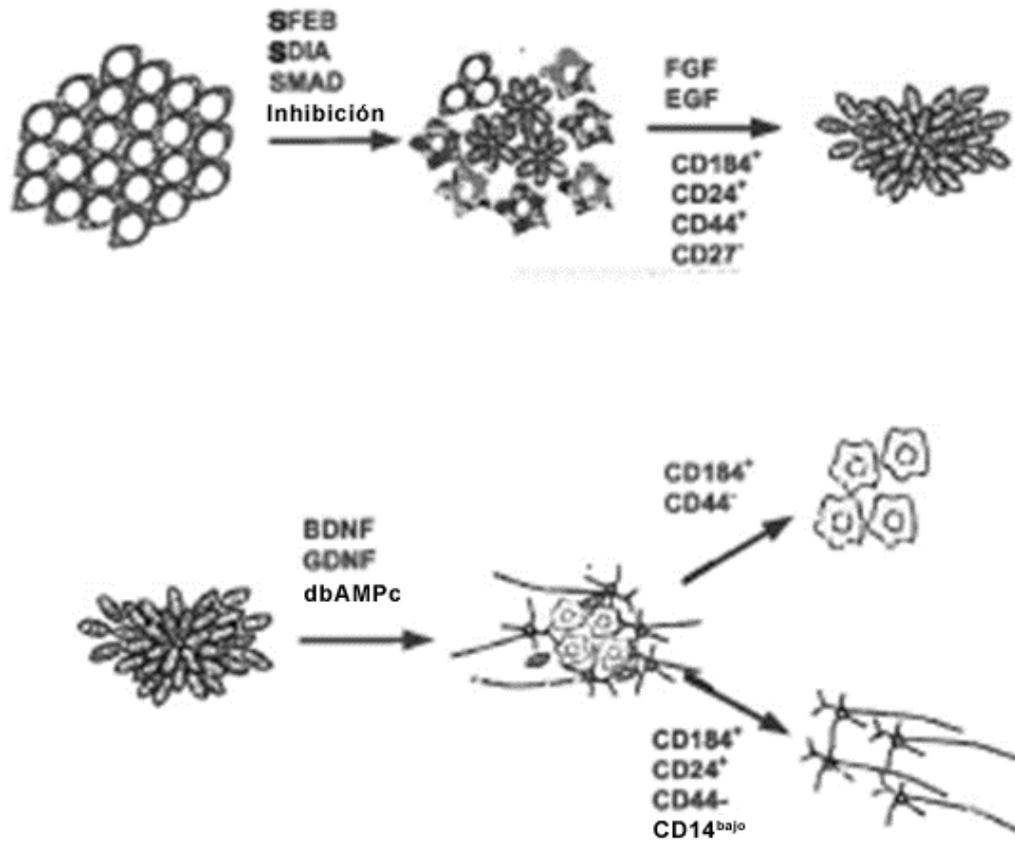
5 cultivaron durante 7 días. Las neuronas se identificaron por la expresión de Tuj1 y la ausencia de expresión de nestina y ki67 ($Tuj1^+/nestina^-/ki67^-$). Los núcleos se tiñen con DAPI. El análisis de flujo de la fracción reducida (figura 12C) muestra la población de neuronas que se identifica por la expresión de DCX y ausencia de expresión de Sox2 y Ki-67. Se muestran 2 diagramas de las muestras antes de la reducción (12D) y después de la reducción (12E). Las neuronas se identifican por la expresión de DCX y la ausencia de expresión de Sox2 y Ki67 ($DCX^+/Sox2^-/ki67^-$). El análisis de los datos indica que la reducción de células en un cultivo celular que comprende neuronas con anticuerpos marcados de forma magnética específicos para PE CD340, PE HLA-A,B,C y PE CD49f provocará un enriquecimiento de neuronas en un cultivo.

REIVINDICACIONES

1. Un método de distinción de neuronas en un cultivo celular, comprendiendo el método:
poner en contacto el cultivo celular con un primer anticuerpo que se une específicamente a CD200 y al menos un
5 segundo anticuerpo que se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste en HLA-A, HLA-B, HLA-C, CD49f, CD151 y CD340; y
detectar células que son células CD200⁺ y también muestran expresión baja a negativa de uno o más de HLA-A, HLA-B, HLA-C, CD49f, CD151 y CD340.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que el cultivo celular comprende células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC), células madre embrionarias humanas (hEPSC), células de la cresta neural, fibroblastos, células madre neurales o cualquier combinación de las mismas.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o 2 que tiene una o más de las siguientes características:
- en el que el cultivo celular se obtiene de una población heterogénea de células,
 - en el que el cultivo celular comprende rosetas neurales,
 - en el que el cultivo celular comprende epitelio neural.
- 20 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células CD200⁺ son CD200^{med} y CD200^{alto}.
- 25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el cultivo celular no ha experimentado una etapa de enriquecimiento de células madre neurales, y/o
en el que la etapa de detección de células se realiza mediante un citómetro de flujo.
- 30 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer y segundo anticuerpos están marcados de forma detectable y discriminable por conjugación directa con un fluoróforo, preferiblemente en el que el fluoróforo se selecciona del grupo que consiste en isotiocianato de fluoresceína, alofocianina, peridinina-clorofila-proteína, ficoeritrina, cianina 5 y BV421.
- 35 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además enriquecer la población de células que son células CD200⁺⁺ y también uno o más de HLA-A⁻, HLA-B⁻, HLA-C⁻, CD49f⁻, CD151⁻ o CD340⁻.
- 40 8. Un método de enriquecimiento del contenido de neuronas en un cultivo celular, que comprende:
inducir diferenciación neural en un cultivo celular que comprende epitelio neural para formar neuronas y glía;
poner en contacto el cultivo celular con un primer anticuerpo que se une específicamente a CD200 y al menos un
segundo anticuerpo que se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo de proteínas que consiste
45 en HLA-A, HLA-B, HLA-C, CD49f, CD151 y CD340; y
seleccionar por citometría de flujo las células que son células CD200⁺ y también uno o más de HLA-A⁻, HLA-B⁻,
HLA-C⁻, CD49f⁻, CD151⁻ o CD340⁻.
- 50 9. El método de la reivindicación 8 que tiene una o más de las siguientes características:
- en el que la formación de neuronas se induce directamente desde epitelio neural,
 - en el que las células que son CD200⁺ no son CD200^{bajo},
 - en el que el cultivo celular no experimenta una etapa de enriquecimiento de células madre neurales.
- 55 10. El método de la reivindicación 8 o 9, en el que el primer y segundo anticuerpos están marcados de forma detectable y discriminable por conjugación directa con un fluoróforo, preferiblemente en el que el fluoróforo se selecciona del grupo que consiste en isotiocianato de fluoresceína, alofocianina, peridinina-clorofila-proteína, ficoeritrina, BV421 y cianina 5.
- 60 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que el enriquecimiento del contenido de neuronas comprende:
poner en contacto las células de un cultivo celular con anticuerpos selectivos para al menos uno del grupo que consiste
en HLA-A, HLA-B, HLA-C[[]], CD49f, CD151 y CD340 para formar un complejo anticuerpo-célula en el que los
anticuerpos se adhieren a una superficie que puede verse atraída o repelida por un campo magnético; y
separar selectivamente dicho complejo anticuerpo-célula del cultivo celular por la aplicación de un campo magnético
65 a las células.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8-11 que tiene una o más de las siguientes características:
- en el que el primer y segundo anticuerpos son anticuerpos monoclonales marcados de forma fluorescente,
 - en el que el enriquecimiento es mayor de 4 veces,
 - en el que el segundo anticuerpo se une a HLA-A, HLA-B o HLA-C[[]], y, además

que comprende poner en contacto el segundo cultivo celular con un tercer anticuerpo que comprende CD49f, CD151 o CD340; y
seleccionar las células que son CD200⁺ y HLA-A⁻, HLA-B⁻ o HLA-C⁻, y también CD49f⁻, CD151⁻ o CD340⁻.

- 5
13. Uso de un sistema para la identificación de neuronas en una población de células, comprendiendo el sistema:
- 10 un primer anticuerpo que se une específicamente a CD200;
un segundo anticuerpo que se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo de proteínas que
consiste en HLA-A, HLA-B y HLA-C;
un tercer anticuerpo que se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo de proteínas que
consiste en CD49f, CD151 y CD340;
una muestra celular; y
15 un citómetro de flujo configurado para identificar células que son CD200⁺ y uno o más de HLA-A⁻, HLA-B⁻ o
HLA-C⁻, y también uno o más de CD49f⁻, CD151⁻ o CD340⁻.



TÉCNICA ANTERIOR

Figura 1

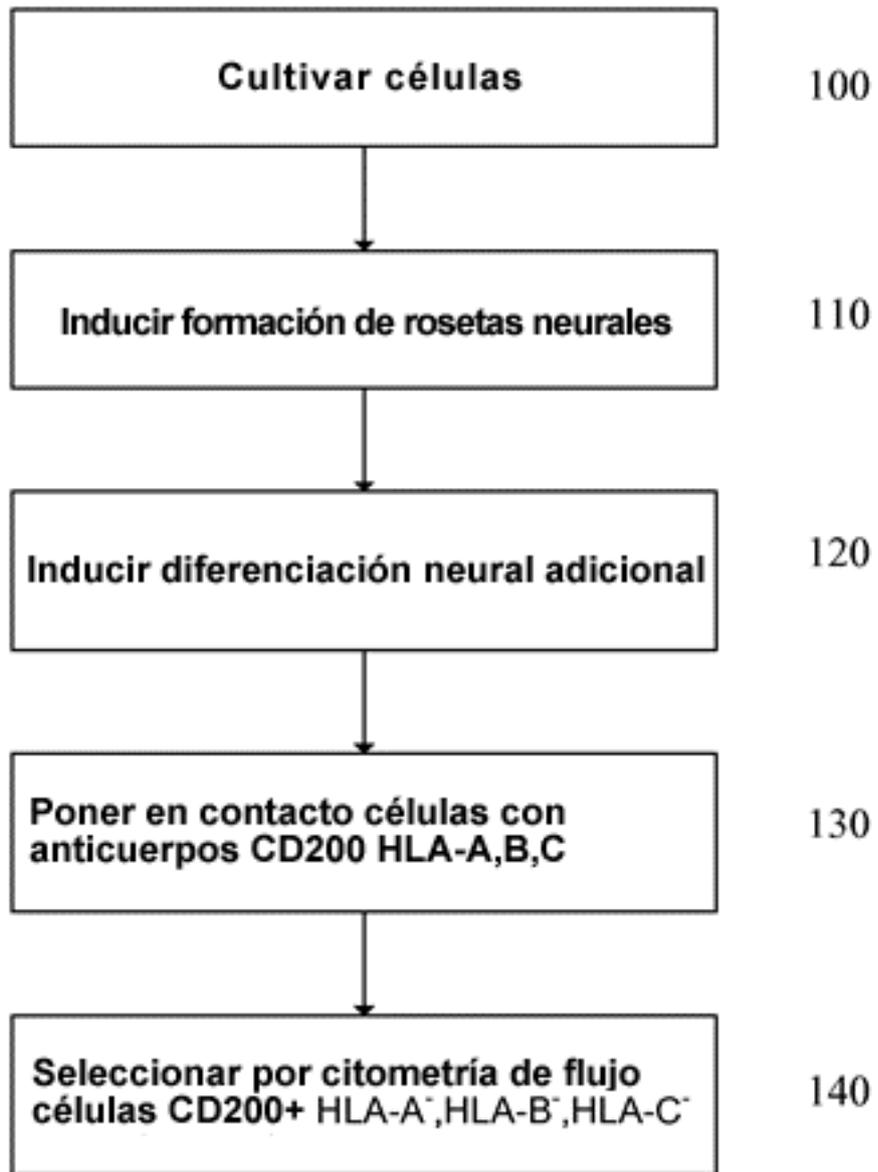


Figura 2

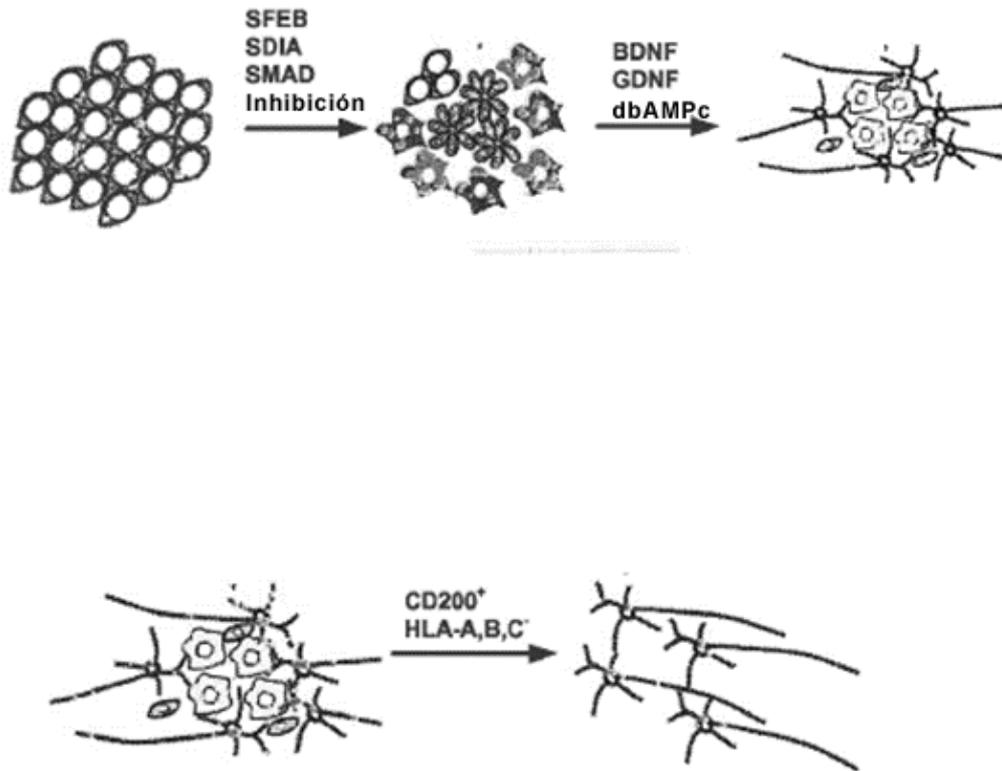


Figura 3

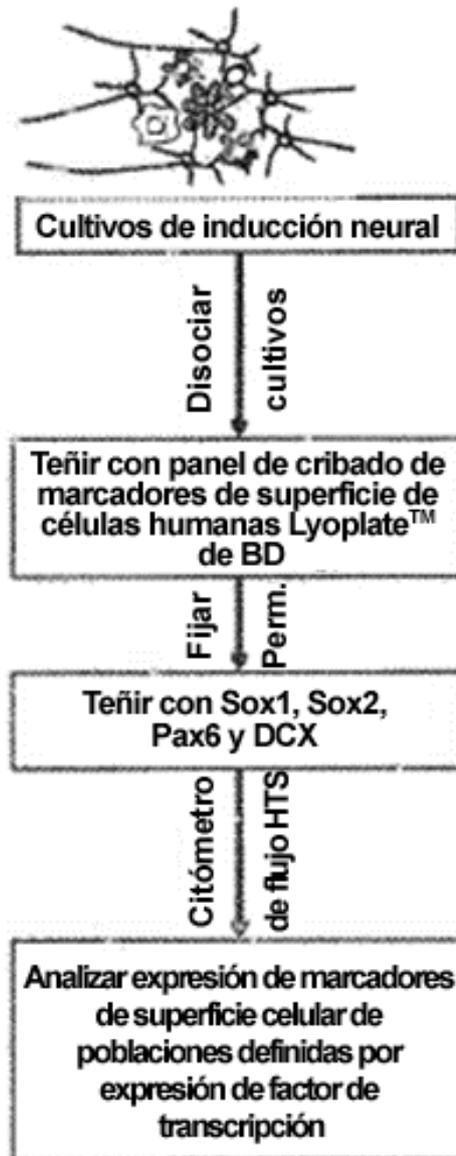


Figura 4

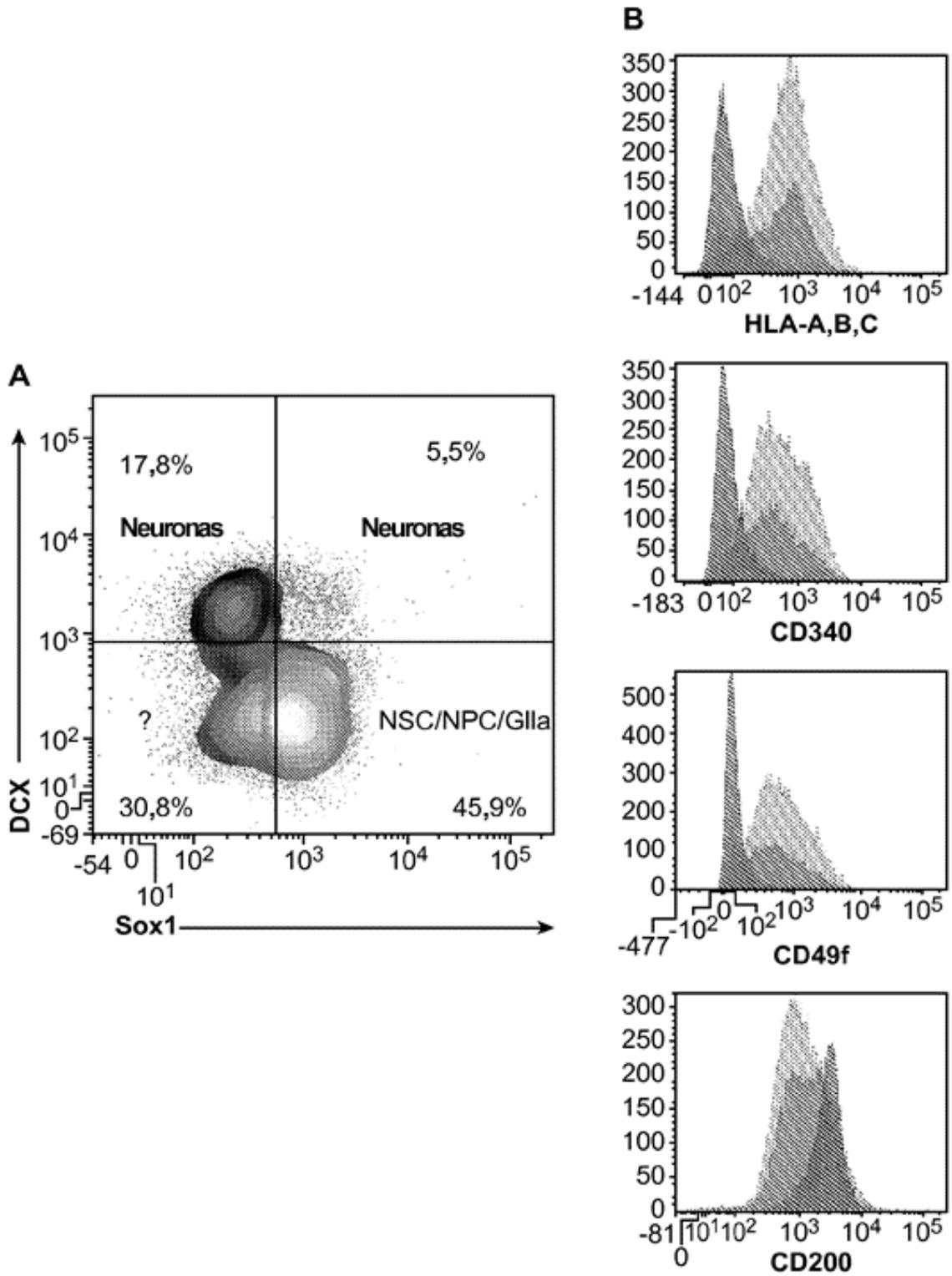


FIG. 5

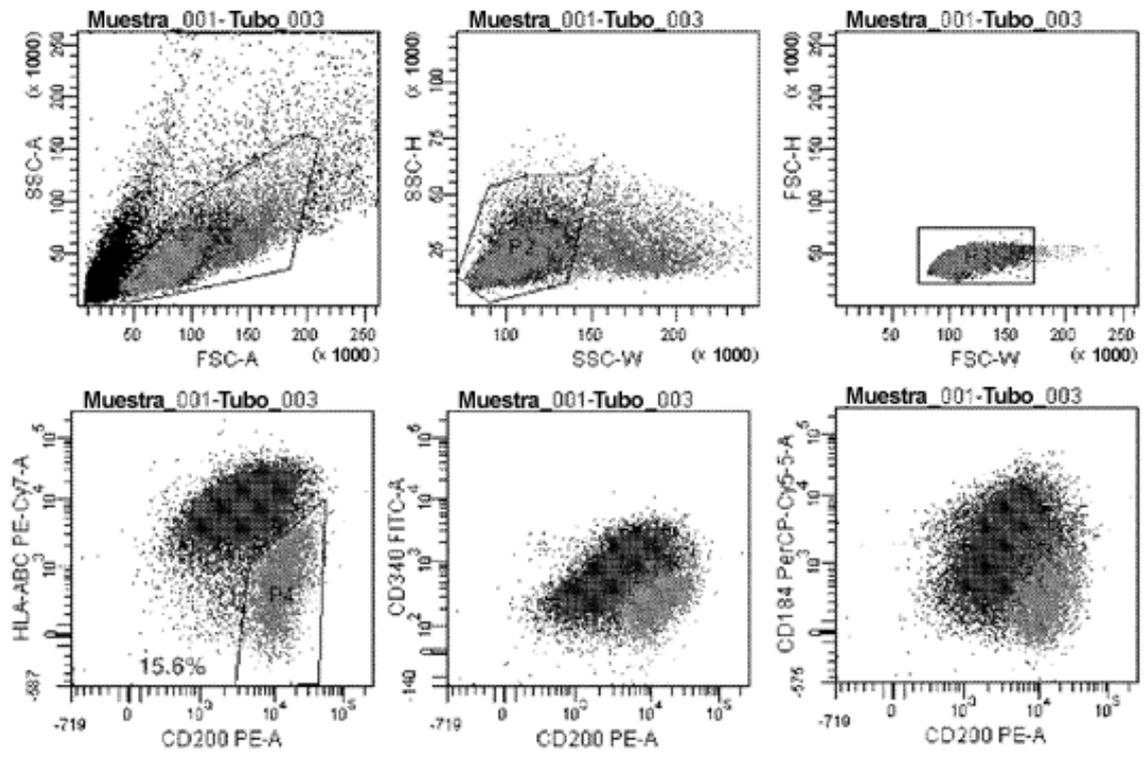


Figura 6

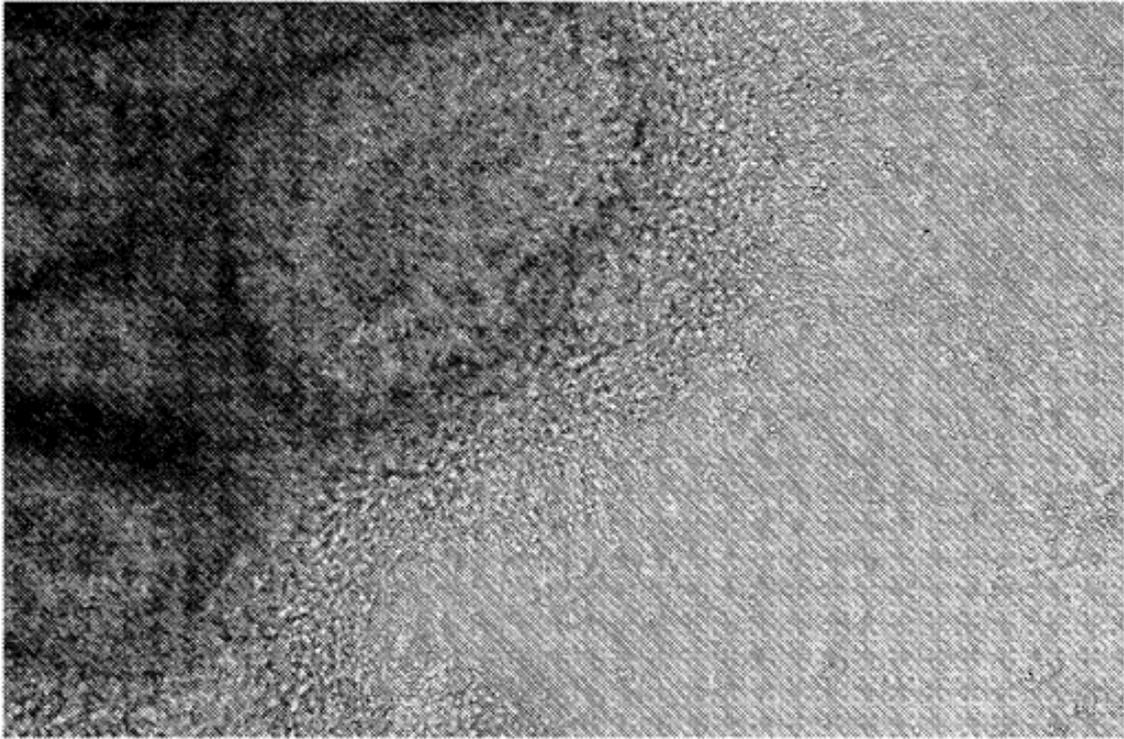


Figura 7

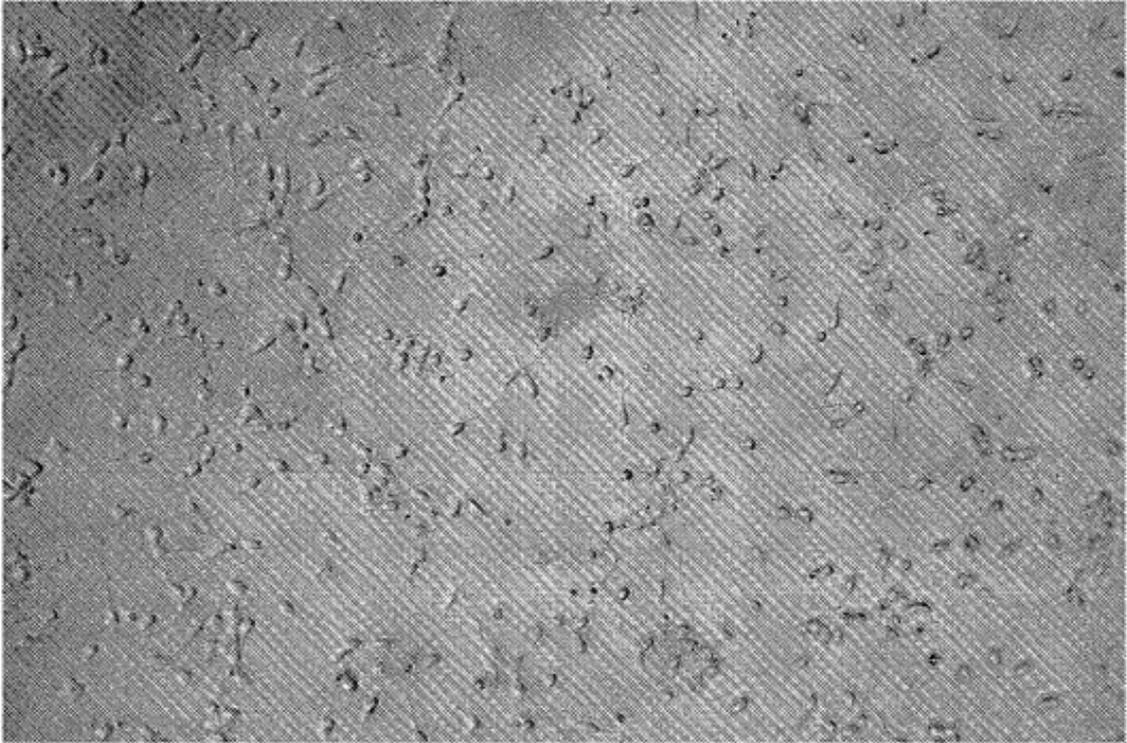


Figura 8

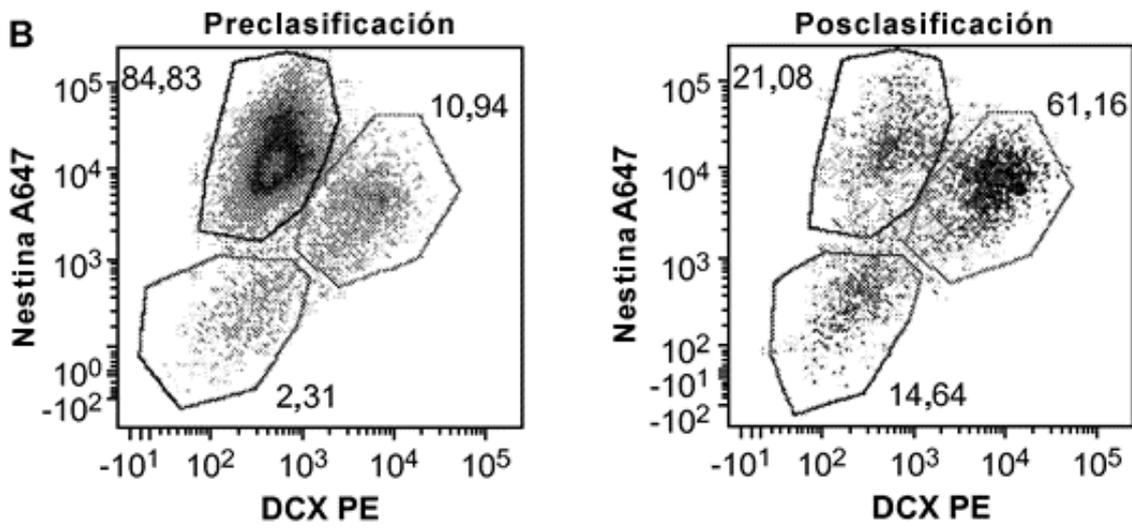
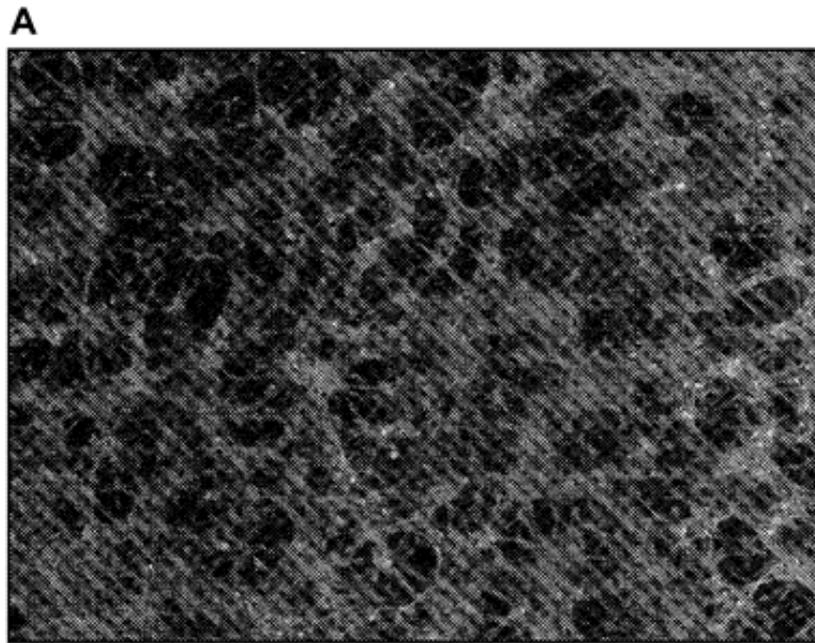


FIG. 9

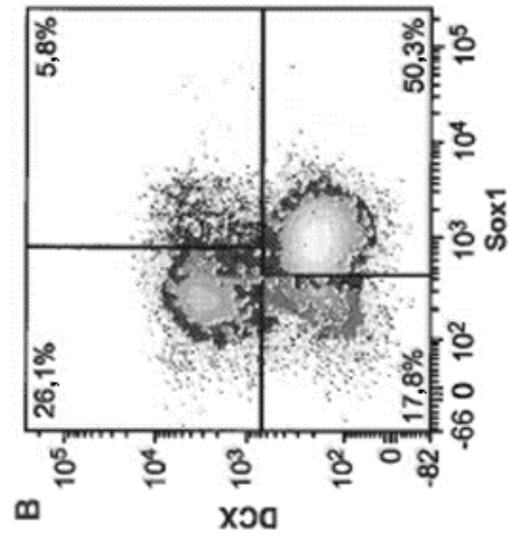
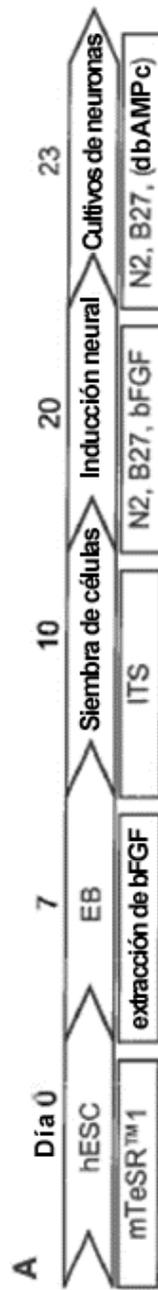


FIG. 10

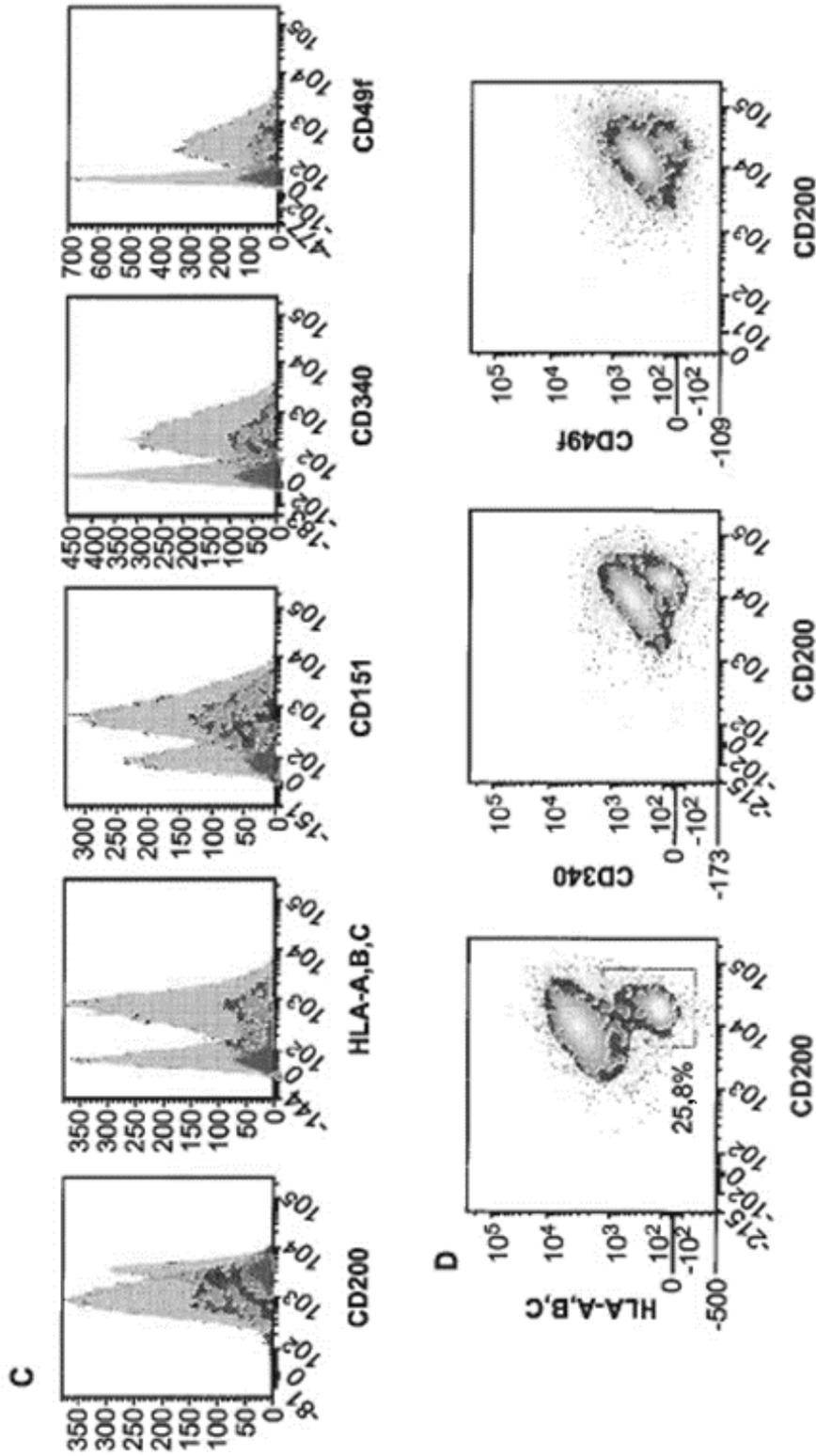


FIG. 10 (continuación)

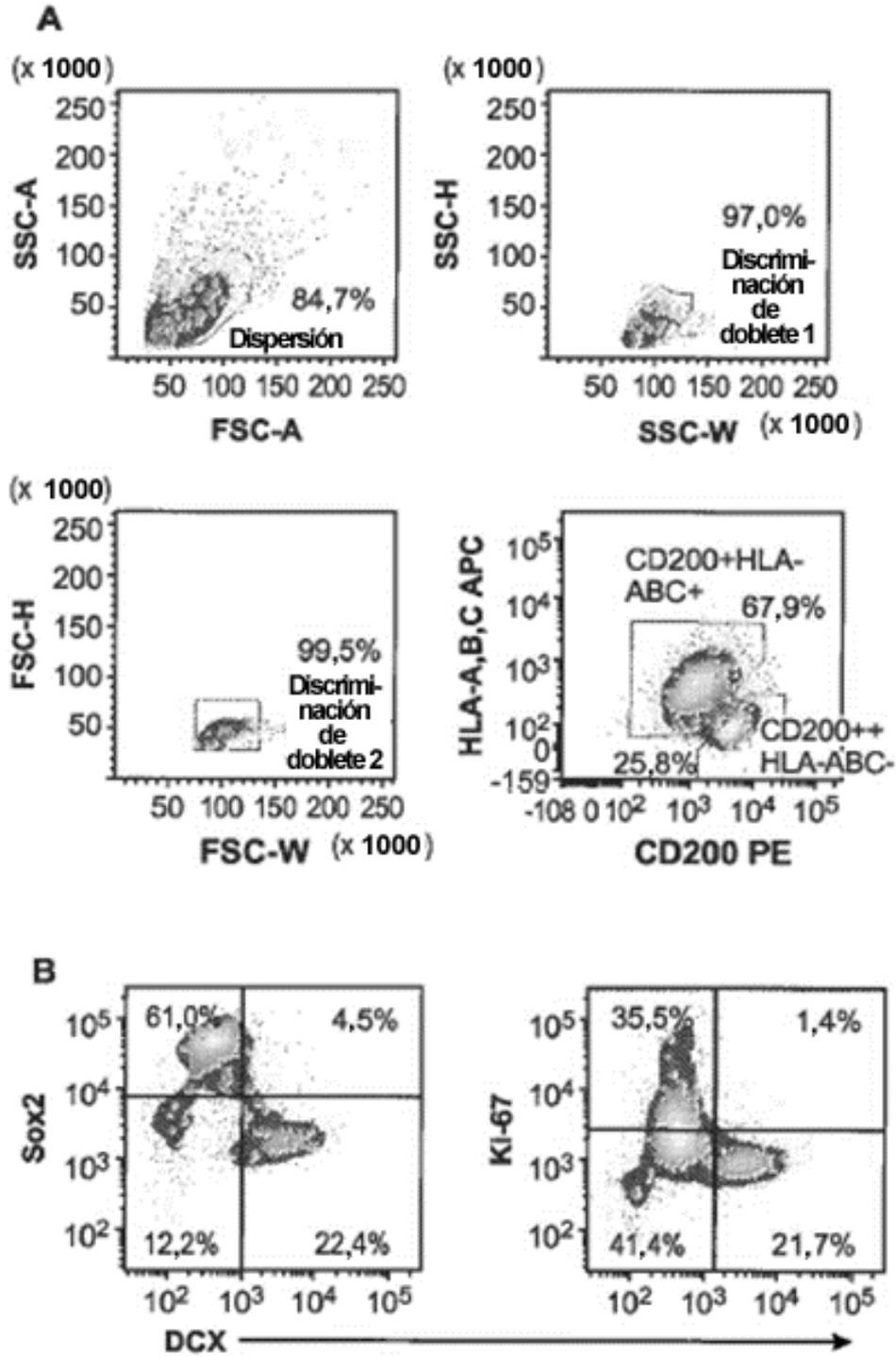


FIG. 11

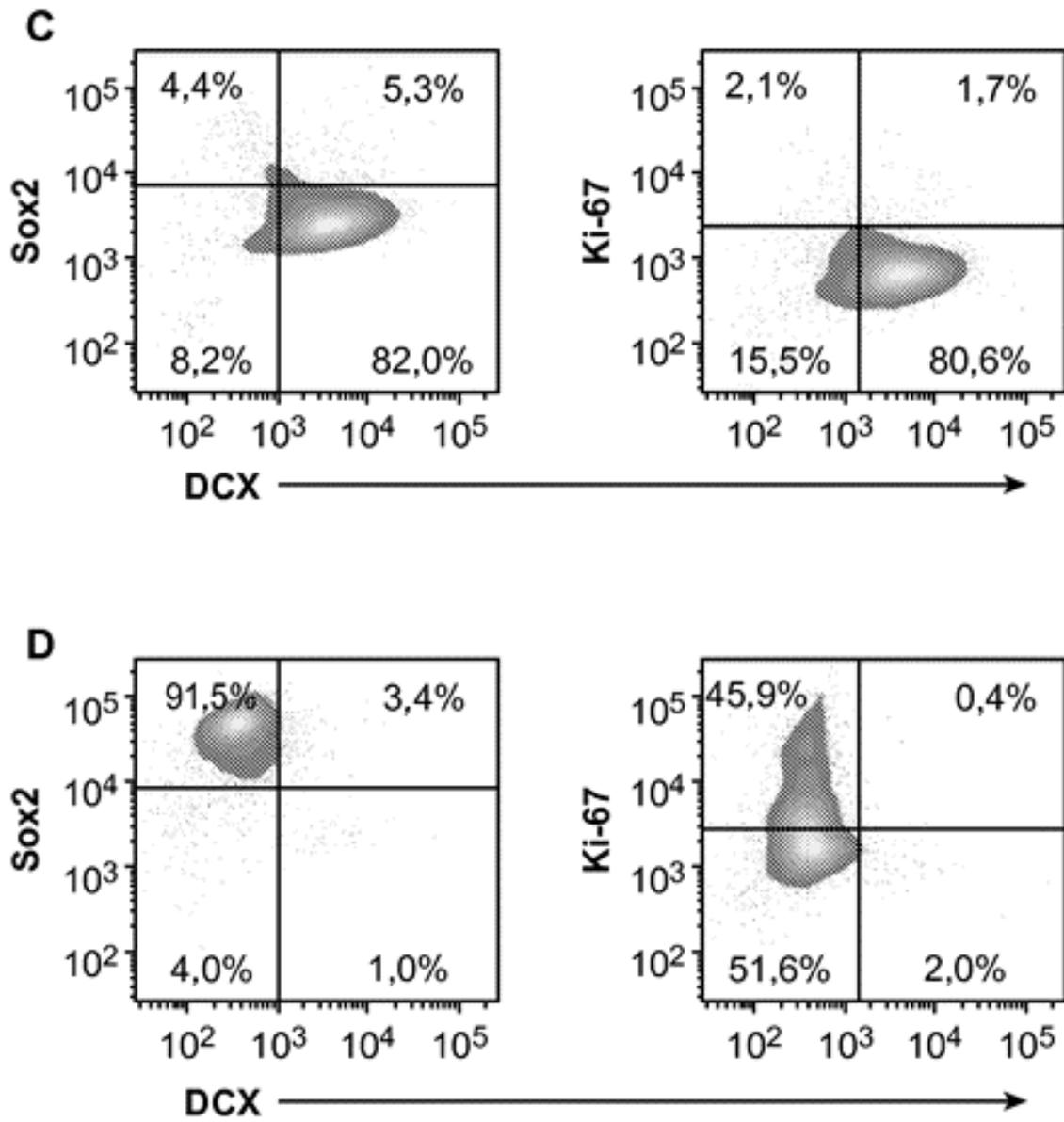


FIG. 11 (continuación)

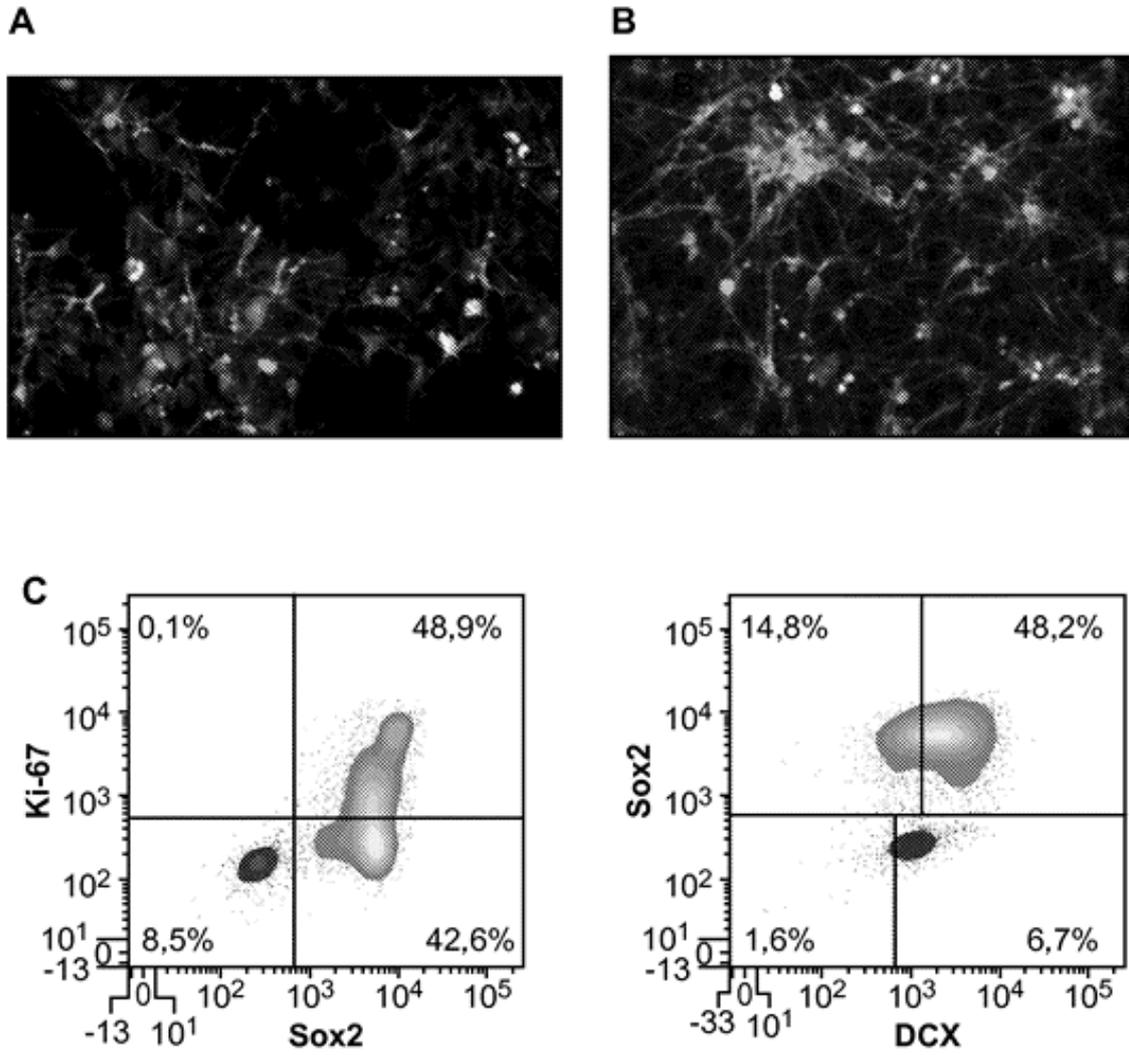


FIG. 12

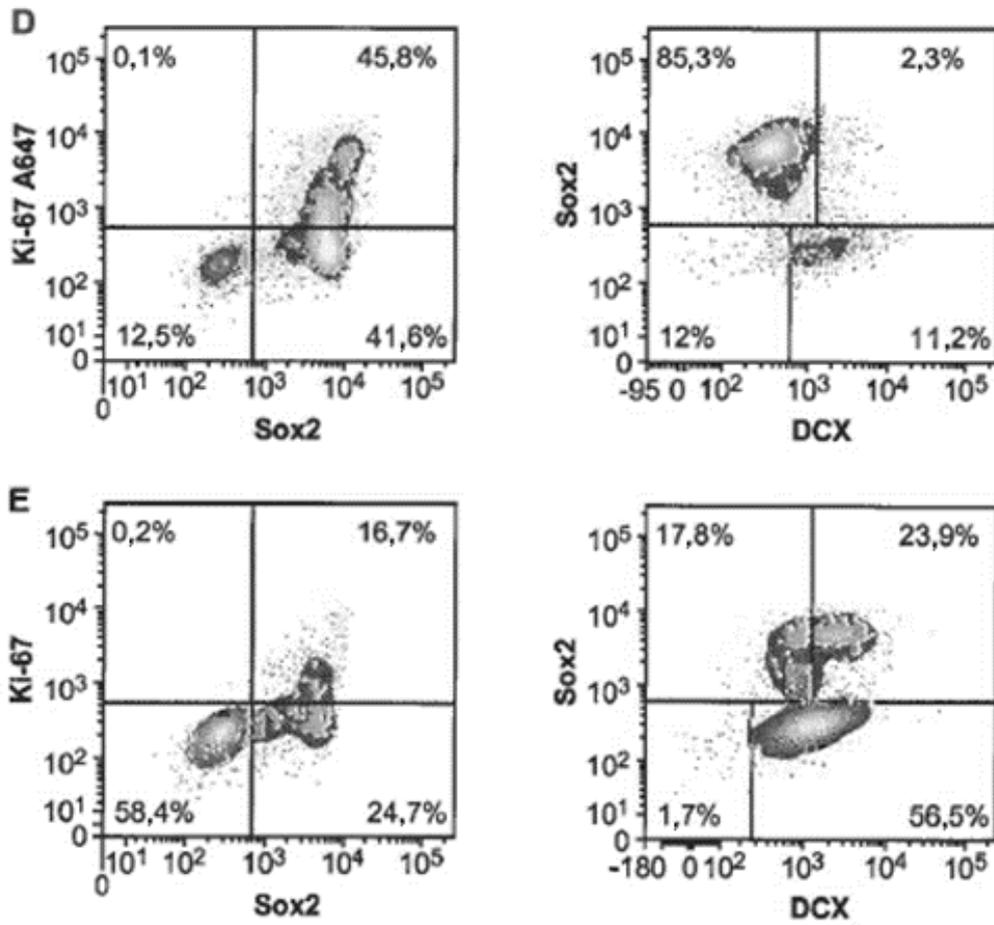


FIG. 12 (continuación)