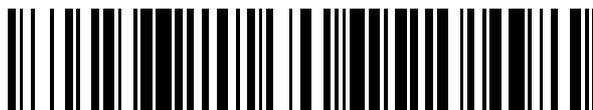


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 590**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4439 (2006.01)

A61K 35/30 (2015.01)

C12N 5/0793 (2010.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 31/343 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2012** **E 12382455 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018** **EP 2733205**

54 Título: **Neuronas motoras superiores corticoespinales, métodos y composiciones para diferenciar células madre neurales modulando la señalización del receptor de cannabinoides CB1 y usos de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.05.2018

73 Titular/es:

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
RED DE ENFERMEDADES
NEURODEGENERATIVAS CIBERNED (50.0%)
Centro Alzheimer Fundación Reina Sofía C/
Valderrebollo 5
28031 Madrid , ES y
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**GALVE-ROPERH, ISMAEL;
GUZMÁN PASTOR, MANUEL;
DÍAZ-ALONSO, JAVIER;
AGUADO SÁNCHEZ, TANIA y
PARAÍSO LUNA, JUAN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 670 590 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

Neuronas motoras superiores corticoespinales, métodos y composiciones para diferenciar células madre neurales modulando la señalización del receptor de cannabinoides CB₁ y usos de los mismos

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a métodos y composiciones para obtener una neurona motora superior corticoespinal a partir de células madre neurales. También se describen las neuronas motoras superiores corticoespinales obtenidas y usos de las mismas.

Antecedentes de la invención

- 10 La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es un trastorno devastador caracterizado por la degeneración de neuronas motoras. En particular, se ha mostrado extensamente la degeneración de neuronas motoras inferiores en ELA y trastornos relacionados, pero además también pueden verse afectadas las neuronas motoras superiores (Ozdinler *et al.*, 2011; Sach *et al.*, 2004). Las neuronas motoras superiores también están implicadas en otros trastornos motores neurodegenerativos (por ejemplo, esclerosis lateral primaria). A pesar de una intensa investigación, aún están por dilucidar por completo el origen y los mecanismos responsables de la neurodegeneración motora selectiva. Se han descrito mutaciones en diferentes genes incluyendo la superóxido dismutasa 1 (SOD1), proteína de unión a ADN de TAR 43 (TDP-43) y fus que imitan algunos de los aspectos de la patología (Bruijn *et al.*, 2004).

- 15 Los tratamientos aprobados actualmente para ELA (por ejemplo, riluzol) sólo son parcialmente eficaces y, por tanto, existe una necesidad imperiosa de enfoques terapéuticos alternativos. Los avances derivados del campo de investigación con células madre ha tenido éxito a la hora de definir protocolos para la generación de neuronas corticales funcionales a partir de células madre pluripotentes (PSC), particularmente a partir de células madre embrionarias (ME) y células madre pluripotentes inducidas (MPi) (Gaspard *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2012). Aunque la diferenciación de PSC en el linaje neuronal da como resultado la generación de neuronas corticales con características tanto de las neuronas de capa superior como inferior, la inducción de una población neuronal particular está limitada todavía a una fracción minoritaria de células. Por tanto, sólo un porcentaje de neuronas piramidales derivadas de PSC expresan marcadores característicos de capas corticales inferiores en las que están incluidas neuronas motoras corticoespinales.

- 20 La investigación en el campo de ELA ha dedicado la mayor parte de sus esfuerzos a la generación eficaz de neuronas motoras inferiores (NMI) a partir de PSC y, por tanto, se ha centrado en estrategias de neuralización ventral (Wichterle *et al.*, 2002; Chambers *et al.*, 2009). Esto puede lograrse mediante diferentes protocolos, entre ellos: (i) manipulación de señales del nicho neurogénico de MPi o ME que comprende la diferenciación de los cuerpos embrioides generados a partir de dichas células en neuronas motoras espinales tratándolas con ácido retinoico (RA) y un agonista de Sonic hedgehog (Shh), tal como purmorfamina (Dimos *et al.*, 2008; Karumbayaram *et al.*, 2009); y (ii) manipulación genética del programa de factores de transcripción de neuronas motoras que implica el uso de un sistema de inserción génica adenoviral que codifica factores de transcripción de inducción de neuronas motoras, por ejemplo neurogenina 2 (Ngn2), islote-1 (Isl-1) y LIM/proteína de caja homeótica 3 (Lhx3) (Hester *et al.*, 2011). En contraposición con la disponibilidad de protocolos bien definidos para la generación de NMI a partir de PSC (Chaddah *et al.*, 2011), en este momento no existen protocolos adecuados para la generación de neuronas motoras superiores (NMS).

- 25 Por tanto, existe una necesidad sentida desde hace mucho tiempo y continuada en la técnica de métodos para obtener neuronas motoras superiores corticoespinales a partir de células madre neurales.

Sumario de la invención

- 30 En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para obtener una neurona motora superior corticoespinal a partir de una célula madre neural, en el que dicho método comprende poner en contacto una célula madre neural en condiciones adecuadas para aumentar la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ en dicha célula y en condiciones para fomentar la dorsalización de dicha célula.

También se describe una neurona motora superior corticoespinal que puede obtenerse mediante el método de la invención y una población celular que comprende neuronas motoras superiores corticoespinales de la invención.

También se describe una composición farmacéutica que comprende una neurona motora superior corticoespinal de la invención o una población celular de la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.

- 35 También se describe el uso de una neurona motora superior corticoespinal de la invención o una población celular de la invención para evaluar un producto biológico, farmacológico y/o químico.

También se describe una neurona motora superior corticoespinal de la invención, una población celular de la invención o una composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento.

También se describe una neurona motora superior corticoespinal de la invención, una población celular de la

invención o una composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno motor neurodegenerativo.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición que comprende un agente que puede aumentar la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ en una célula madre neural y un agente adicional seleccionado de: a) un inhibidor de Sonic hedgehog y b) un inhibidor de Smad.

También se describe una célula madre neural aislada que tiene una pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁ o una población de neuronas que puede obtenerse mediante diferenciación *in vitro* a partir de una célula madre neural que tiene una pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁.

También se describe el uso de una célula madre neural aislada de la invención o una neurona de la invención como modelo para estudiar un trastorno motor neurodegenerativo o para detectar compuestos útiles en el tratamiento de un trastorno motor neurodegenerativo.

Descripción de las figuras

Figura 1. La inactivación del receptor CB₁ interfiere en la especificación de neuronas corticales de capa superior y profunda. Se realizó un análisis de inmunofluorescencia en ratones CB₁^{-/-} y camadas silvestres (WT, *wild-type*) en el día embrionario E16.5 para células Tbr1⁺, Satb2⁺, Ctip2⁺, Tbr1⁺Satb2⁺ y Ctip2⁺Satb2⁺. A, B: Fracción de células en diferenciación que expresan Tbr1 (A) y Satb2 (B) en ratones CB₁^{-/-} y WT (barras de color negro y blanco, respectivamente) cuantificada en áreas combinadas de igual tamaño y referida al número total de células (contratinción con Hoechst 33528). C, E: Cuantificación de la fracción de células neuronales que coexpresan Tbr1 con Satb2 (C) y Satb2 con Ctip2 (E), referida al número total de células (contratinción con Hoechst 33528) en la columna cortical de ratones WT y CB₁^{-/-} (columnas de color blanco y negro, respectivamente). D, G: Células Satb2⁺ y Ctip2⁺ cuantificadas en columnas corticales de 50 μm de anchura de los mismos ratones. F: Se realizó electroporación *in utero* de ratones E14.5-CB₁^{-/-} con el vector pCAG-GFP (GFP) y el vector pCAG-CB₁-GFP (CB₁-GFP) para volver a expresar el receptor CB₁ (barras de color negro y gris, respectivamente), y posteriormente se analizaron las cortezas cerebrales en el día embrionario E16.5. Se cuantificaron las células Satb2⁺ en la población celular GFP⁺ sometida a electroporación. n = 5 para cada grupo (A-E), n = 2 para cada grupo (F-G). *, p < 0,05; **, p < 0,01 frente a ratones de control.

Figura 2. La señalización del receptor CB₁ fomenta la diferenciación en neuronas Ctip2⁺. A, B: Se realizó un análisis de inmunofluorescencia en cultivos organotípicos corticales de embriones silvestres (WT) del día embrionario E13.5 tratados durante 3 días con vehículo (V), HU-210 5 μM, SR141716 (SR) 25 μM y una combinación de HU-210 5 μM y SR141716 25 μM (HU-210 + SR). Fracción de células positivas sólo para Ctip2 (A) y células Satb2⁺ (B) cuantificadas en las mismas condiciones y referidas al número total de células (contratinción con Hoechst 33528). C: Se transfectaron células madre neurales HiB5 con un constructo de indicador de luciferasa que contenía la secuencia de MAR A4 del locus Ctip2 junto con pCAG-CB₁ y pMSCV-Satb2. Se determinó la actividad Ctip2-luciferasa (actividad Luc.) 36 h después del tratamiento con vehículo (V), HU-210 50 nM, SR141716 (SR) 1 μM y una combinación de HU-210 50 nM y SR141716 1 μM (HU-210 + SR). *, p < 0,05; **, p < 0,01 frente a células tratadas con vehículo; ## p < 0,01 frente a células tratadas con HU-210. Los resultados corresponden a 4 experimentos independientes. u.a., unidades arbitrarias; MAR, región de unión a la matriz; Luc, luciferasa.

Figura 3. La manipulación de la expresión del receptor CB₁ controla la diferenciación de neuronas Ctip2⁺. A, B, E: Cultivos corticales primarios obtenidos de cortezas cerebrales silvestres (WT) del día embrionario E13.5 después de la electroporación *ex utero* con shControl (shC), shCB₁, pCAG y pCAG-CB₁ se permitió que se diferenciaban durante 7 días *in vitro*. Se identificó la expresión del receptor CB₁ en células sometidas a electroporación, con anticuerpo contra GFP. Se cuantificaron las células positivas sólo para Ctip2 en la subpoblación celular GFP⁺ sometida a electroporación después de la electroporación *ex utero* con shControl (shC) y shCB₁ (A), y con pCAG y pCAG-CB₁ (B). C: Se analizó la expresión del receptor CB₁ en células sometidas a electroporación (GFP⁺) en células derivadas de CB₁^{fl/fl} después de la electroporación con pCAG-GFP o pCAG-Cre-GFP de cortezas cerebrales CB₁^{fl/fl}. Se cuantificaron las células positivas sólo para Ctip2 en la subpoblación celular GFP⁺ sometida a electroporación. D: Se realizó la electroporación *in utero* de ratones CB₁^{fl/fl} de E12.5 con los vectores pCAG-GFP y pCAG-Cre-GFP, y posteriormente se analizaron las crías en P0. Se cuantificaron las células positivas sólo para Ctip2 que se sometieron a electroporación (Ctip2⁺ Satb2⁻ GFP⁺) y se muestra el número relativo con respecto a la población celular GFP⁺. n = 3 para cada grupo. E: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la desactivación del receptor CB₁ después de la transfección de shControl (shC) y shCB₁ en células P19. α-tub, α-tubulina; D.O., densidad óptica; u.a., unidades arbitrarias. Los resultados corresponden a 4 experimentos independientes. *, p < 0,05 frente a células sometidas a electroporación o crías de control. GFP, proteína fluorescente verde.

Figura 4. La proliferación de células progenitoras corticales no se ve afectada en ratones Nex-CB₁^{-/-} condicionales. Cuantificación de la proliferación de células progenitoras como células marcadas con BrdU en la zona ventricular/subventricular (ZV/ZSV) de ratones CB₁^{-/-} y camadas silvestres (WT) (A), y ratones Nex-CB₁^{-/-} y camadas CB₁^{fl/fl} (B), en el día embrionario E14.5. BrdU, 5-bromo-2'-desoxiuridina. **, p < 0,01 frente a ratones de control.

Figura 5. La señalización del receptor CB₁ regula la generación de neuronas Ctip2⁺ de capa profunda. A-D: Se

analizaron ratones Nex-CB₁^{-/-}, Dlx5/6-CB₁^{-/-} y FAAH^{-/-} y sus respectivas camadas silvestres (CB₁^{fl/fl} y WT) en P2 (A-C) y neuronas Ctip2⁺ cuantificadas en columnas corticales de 50 μm de anchura (n= 8 y 9; 2 y 3; y 2 y 3, respectivamente para cada grupo). También se analizaron camadas Nex-CB₁^{-/-} y WT en P8 (D; n= 4 para cada grupo). E: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de extractos nucleares obtenidos de cortezas cerebrales de P2 de ratones Nex-CB₁^{-/-} y FAAH^{-/-} en comparación con sus camadas silvestres correspondientes. Se cuantificaron los niveles relativos de proteína de Ctip2 y Satb2 después de la densitometría y se realizó el control de carga con anticuerpo anti-laminina B1. *, p < 0,05; **, p < 0,01 frente a secciones de ratones WT. WT, silvestre; P2, día posnatal 2; P8, día posnatal 8; D.O., densidad óptica; u.a., unidades arbitrarias.

Figura 6. Los ratones Thy1-YFP deficientes en CB₁ muestran alteraciones de neuronas de proyección subcerebral. Se obtuvieron somas fluorescentes de supuestas NMCE en la capa 5 de secciones sagitales de cortezas cerebrales de P21 mediante fluorescencia confocal de camadas Thy1-YFP:CB₁^{+/+} (CB₁^{+/+}) y Thy1-YFP:CB₁^{-/-} (CB₁^{-/-}) y se cuantificaron. n=2 y 3, respectivamente. *, p < 0,05. NMCE, neuronas motoras corticoespinales; P21, día posnatal 21; YFP: proteína fluorescente amarilla.

Figura 7. Los ratones deficientes en CB₁ muestran función motora corticoespinal alterada. A-C: Se analizaron ratones CB₁^{+/+}, Nex-CB₁^{-/-} y sus correspondientes camadas silvestres (WT y CB₁^{fl/fl}) en la prueba de la tarea de alcance de gránulos especializada. Se evaluaron habilidades motoras finas en los grupos de animales después de habituación a la jaula y entrenamiento. Se muestran el porcentaje de gránulos recuperados (A, B) y el número total de ensayos realizados durante la tarea especializada (C). D: Se evaluó la función motora no especializada y se calculó el porcentaje de gránulos recuperados. E-F: Se sometieron los ratones a la prueba de alcance de gránulos en escalera y se comparó la suma de gránulos recuperados de los escalones que suponen un desafío (desde 4-8) entre ratones CB₁^{-/-} o Nex-CB₁^{-/-} y sus camadas de control. G: Se cuantificó el porcentaje de éxito para cada escalón entre los diferentes genotipos. H: El número de gránulos que se alcanzaron en los escalones que no suponen un desafío 1 a 3 no difirió entre grupos. n=9 (CB₁^{+/+} y WT) y n=17 y 16 (Nex-CB₁^{-/-} y CB₁^{fl/fl}) para cada grupo. *, p < 0,05 **; p < 0,01 frente a camadas WT o CB₁^{fl/fl}; # p < 0,05 frente a camadas CB₁^{fl/fl}.

Figura 8. Caracterización conductual de ratones CB₁^{-/-} y Nex-CB₁^{-/-}. A: Conducta motora general en ratones CB₁^{-/-} y camadas WT. Se analizaron ratones adultos para determinar la deambulación en la prueba en campo abierto y para determinar la coordinación motora en la prueba de RotaRod. n= 9 para cada grupo. B: El análisis de retirada de parches confirma la función motora fina deficiente de los ratones Nex-CB₁^{-/-} en comparación con sus camadas CB₁^{fl/fl}. Se cuantificó el número de contactos requeridos para la retirada del parche, el tiempo de latencia para el primer contacto con el parche y el tiempo empleado por parche en cada genotipo. n= 16 y 17 para cada grupo. **, p < 0,01 frente a ratones CB₁^{fl/fl}. WT, silvestre; s, segundos.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que un agonista del receptor de cannabinoides CB₁ puede inducir la diferenciación de progenitores neurales piramidales corticales a células positivas sólo para Ctip2 (un marcador de neuronas motoras superiores corticoespinales), a la vez que disminuye el número de células Satb2⁺ (un represor para la generación de neuronas motoras superiores) de cultivos organotípicos. Estos resultados indican que un agonista del receptor de cannabinoides CB₁ es útil para obtener un cultivo enriquecido en neuronas motoras superiores corticoespinales a partir de células madre neurales. Los autores de la presente invención también hallaron que ratones deficientes en una enzima de degradación de endocannabinoides (ratones FAAH^{-/-}) mostraron un número aumentado de células Ctip2⁺ a través de la corteza cerebral. Por tanto, un inhibidor de una enzima de degradación de endocannabinoides también es útil para obtener un cultivo enriquecido en neuronas motoras superiores corticoespinales a partir de células madre neurales. Estos métodos se basan en la modulación de un receptor endógeno para mejorar la generación de neuronas corticoespinales y tienen la ventaja de que no requieren manipulación génica. También pueden usarse métodos que implican manipulación génica, tales como la modificación de una célula madre neural para aumentar la expresión del receptor de cannabinoides CB₁ por encima de los niveles basales o para disminuir la expresión de una enzima de degradación de endocannabinoides por debajo de los niveles basales. También se da a conocer la modificación de una célula madre neural para aumentar la actividad de una enzima de síntesis de endocannabinoides por encima de los niveles basales.

Las neuronas motoras superiores corticoespinales obtenidas mediante los métodos de la invención son útiles para evaluar un producto biológico, farmacológico y/o químico y también para el tratamiento de un trastorno motor neurodegenerativo.

Los autores de la presente invención también mostraron que ratones CB₁^{-/-} completos y ratones Nex-CB₁^{-/-} específicos de neuronas glutamatérgicas tienen alteraciones en la generación de neuronas motoras corticoespinales. Por tanto, las células madre neurales que tienen una pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁ y las neuronas obtenidas a partir de dichas células madre pueden usarse como modelo genético para estudiar trastornos motores neurodegenerativos superiores.

MÉTODOS PARA OBTENER UNA NEURONA MOTORA SUPERIOR CORTICOESPINAL DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para obtener una neurona motora superior corticoespinal

a partir de una célula madre neural, en el que dicho método comprende poner en contacto una célula madre neural en condiciones adecuadas para aumentar la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ en dichas células y en condiciones para fomentar la dorsalización de dichas células.

5 El término “neurona motora superior corticoespinal” o “NMS” se refiere a una neurona motora que se origina en la corteza cerebral y transporta información motora hasta la ruta común final, es decir, no es directamente responsable de estimular el músculo diana. Las neuronas motoras superiores corticoespinales controlan acciones voluntarias y se encuentran principalmente dentro de la capa V de la corteza primaria motora y somatosensorial. Estas neuronas conectan el cerebro al nivel apropiado en la médula espinal, punto desde el que continúan las señales nerviosas hasta los músculos por medio de las neuronas motoras inferiores. Puede identificarse una “neurona motora superior corticoespinal” de la invención por la expresión de los marcadores Sox5, Ctip2, Uchl1, Tmem117/diap3 y/o Cdh22 a nivel de transcrito y proteína mediante qPCR en tiempo real e inmunofluorescencia. Preferiblemente, los marcadores para una neurona motora superior corticoespinal son Sox5, Ctip2 y Uchl1, más preferiblemente Ctip2 y Uchl1.

15 El término “neurona motora inferior corticoespinal” o “NMI” se refiere a una neurona motora que conecta el tronco encefálico y la médula espinal a fibras musculares, llevando los impulsos nerviosos desde las neuronas motoras superiores hasta los músculos. Puede identificarse una “neurona motora inferior corticoespinal” por la expresión de los marcadores islote1 (Karumbayaram *et al.*, 2009), Hb9=MNx1, Lhx3 y/o ChAT (Hester *et al.*, 2011) a nivel de transcrito y proteína mediante qPCR en tiempo real e inmunofluorescencia.

La neurona motora superior corticoespinal de la invención se obtiene a partir de la diferenciación de células madre neurales.

20 El término “célula madre” se refiere a una célula que, mediante divisiones sucesivas puede dar lugar a células especializadas.

25 El término “célula madre neural”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula multipotente de autorrenovación que genera los principales fenotipos del sistema nervioso. Las células madre neurales se diferencian principalmente en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Las células madre neurales se identifican por la expresión de los marcadores nestina, musashi1, Sox2, CD133, vimentina y/o Notch. Las células madre neurales pueden aislarse de diversas áreas del cerebro adulto, incluyendo, sin limitación, el tejido estriado adulto, la zona subventricular (ZSV) del cerebro, el cerebelo y áreas no neurogénicas, tales como la médula espinal.

30 Dichas células madre neurales pueden derivarse de una célula madre pluripotente seleccionada de una célula madre embrionaria (ME) no humana y una célula madre pluripotente inducida (MPi). Por tanto, en una realización la célula madre neural se deriva de una célula madre pluripotente seleccionada de una célula madre embrionaria (ME) no humana y una célula madre pluripotente inducida (MPi).

La expresión “derivada”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a células madre neurales que se originan a partir de una célula madre pluripotente seleccionada de una célula madre embrionaria (ME) no humana y una célula madre pluripotente inducida (MPi).

35 El término “célula madre pluripotente” se refiere a una célula madre que tiene el potencial de diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales: endodermo (revestimiento interior del estómago, tracto gastrointestinal, los pulmones), mesodermo (músculo, hueso, sangre, sistema genitourinario) o ectodermo (tejidos epidérmicos y sistema nervioso). Las células madre pluripotentes pueden dar lugar a cualquier tipo de célula fetal o de adulto pero no pueden dar lugar a un organismo completo. Puede identificarse una “célula madre pluripotente” por la expresión de uno o más de los marcadores celulares Klf4, Sox2, Oct4, cMyc, Nanog y SSEA1. Una célula se considera una célula madre pluripotente cuando puede generar células de cualquiera de las tres capas germinales: endodermo, identificado por la expresión de alfa-fetoproteína; mesodermo (identificado por la expresión de desmina y/o alfa-actina de músculo liso) y ectodermo (identificado por la expresión de beta-tubulina III = Tuj1 y/o E a N-cadherina). Se conocen en la técnica ensayos para evaluar la pluripotencialidad de una célula (Paşca *et al.*, 2011; Dimos *et al.*, 2008). En el contexto de la presente invención, el término “célula madre pluripotente” incluye células madre embrionarias (ME) no humanas y células madre pluripotentes inducidas (MPi). En una realización preferida, la célula madre pluripotente se selecciona de una célula madre embrionaria (ME) no humana y una célula madre pluripotente inducida (MPi).

50 El término “célula madre embrionaria” o “ME” se refiere a una célula madre pluripotente que puede derivarse del tejido epiblastico de la masa celular interna (MCI) de un blastocisto o embrión en fase temprana de mórula. Para el fin de la invención, las células madre embrionarias humanas no están abarcadas por el término “célula madre embrionaria”. Se define una “célula madre embrionaria” por la expresión de varios factores de transcripción y proteínas de superficie celular incluyendo, sin limitación, uno o más de los marcadores Oct4, Nanog, Sox2 y/o SSEA1. Las células madre embrionarias puede obtenerse a partir de la masa celular interna de blastocistos mediante métodos que conoce bien el experto en la técnica. Las células madre embrionarias requieren diferentes entornos para mantener un estado indiferenciado. Por ejemplo, se hacen crecer ME de ratón sobre una capa de gelatina como matriz extracelular para soporte y requieren la presencia del factor inhibidor de leucemia (LIF). Sin condiciones de cultivo óptimas o manipulación genética, las células madre embrionarias se diferenciarán

rápidamente. Las condiciones de cultivo para células ME se conocen en la técnica (Matise *et al.*, 2000).

El término “célula madre pluripotente inducida” o “MPI” se refiere a una célula pluripotente artificialmente derivada de una célula no pluripotente, normalmente una célula somática adulta, mediante la inducción de una expresión forzada de determinados genes. Se define una “célula madre pluripotente inducida” por la expresión de varios factores de transcripción incluyendo uno o más de Klf4, Sox2, Oct4 y cMyc. Las células MPI normalmente se derivan mediante transfección de determinados genes asociados a célula madre en células no pluripotentes, tales como fibroblastos adultos (Dimos *et al.*, 2008). Normalmente se logra la transfección a través de vectores virales, tales como retrovirus, y los genes transfectados incluyen Oct-3/4 (Pou5f1) y Sox2. Los genes adicionales incluyen determinados miembros de la familia de Klf (Klf1, Klf2, Klf4 y Klf5), la familia de Myc (c-myc, L-myc, N-myc), se ha identificado que Nanog y LIN28 aumentan la eficiencia de inducción. Después de 3-4 semanas, pequeños números de células transfectadas empiezan a volverse morfológica y bioquímicamente similares a células madre pluripotentes, y normalmente se aíslan a través de selección morfológica, tiempo de duplicación o a través de un gen indicador y selección con antibióticos. Se dan a conocer protocolos para el cultivo de MPI en Mochiduki y Okita, 2012.

Células no pluripotentes que pueden usarse para obtener MPI son, sin limitación, fibroblastos, queratinocitos y adipocitos. Estas células pueden obtenerse de un ser adulto mediante métodos bien conocidos en el estado de la técnica (Mochiduki y Okita, 2012).

La ventaja de usar MPI en vez de ME es que MPI porta el material genético del paciente. Por tanto, las neuronas motoras superiores corticoespinales obtenidas pueden ser autólogas, es decir proceden de células del mismo individuo que va a tratarse con las mismas, o cuyo estado individual va a estudiarse / modelarse.

La expresión “poner en contacto una célula madre neural en condiciones adecuadas para aumentar la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la incubación de dichas células en presencia de compuestos o agentes que producen un aumento de la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁. Ejemplos de tales agentes pueden ser, sin limitación, agonistas del receptor de cannabinoides CB₁, agentes que modifican la célula madre neural para aumentar la expresión del receptor de cannabinoides CB₁ por encima de los niveles basales, agentes que silencian una enzima de degradación de endocannabinoides, inhibidores de una enzima de degradación de endocannabinoides y agentes que aumentan la actividad de una enzima de síntesis de endocannabinoides por encima de los niveles basales.

El término “receptor de cannabinoides CB₁” o “receptor de cannabinoides tipo 1” se refiere a un receptor de cannabinoides acoplado a proteína G ubicado principalmente en el cerebro. Dicho término abarca el receptor de cannabinoides CB₁ de cualquier especie de mamífero, incluyendo pero sin limitarse a animales domésticos y de granja (vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores), primates y seres humanos. Preferiblemente, el receptor de cannabinoides CB₁ es humano. En la presente invención “receptor de cannabinoides CB₁ humano” se entiende como la proteína definida por la secuencia de la base de datos Swiss-Prot con el número de registro P21554 (versión del 3 de octubre de 2012).

El receptor de cannabinoides CB₁ activa múltiples rutas de transducción de señales intracelulares después de que se active por cannabinoides (Demuth y Molleman, 2006). Ejemplos de tales rutas de transducción de señales son la inhibición de la enzima adenilato ciclasa y la producción de AMPc, la activación de canales de potasio de rectificación interna (=Kir o IRK), la regulación de adenilil ciclasa, MAP cinasa, Ca (2+) intracelular y canales iónicos. En el contexto de la presente invención, la expresión “señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁” se refiere a impedir la represión mediada por Satb2 y el aumento de la actividad promotora de Ctip2, generando por tanto neuronas Ctip2⁺ Satb2⁻.

Un aumento de la señal mediada por el receptor CB₁, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un aumento del número de células Ctip2⁺ Satb2⁻ con respecto a los niveles basales de al menos el 5%, en al menos el 10%, en al menos el 15%, en al menos el 20%, en al menos el 25%, en al menos el 30%, en al menos el 35%, en al menos el 40%, en al menos el 45%, en al menos el 50%, en al menos el 55%, en al menos el 60%, en al menos el 65%, en al menos el 70%, en al menos el 75%, en al menos el 80%, en al menos el 85%, en al menos el 90%, en al menos el 95%, en al menos el 100%, en al menos el 110%, en al menos el 120%, en al menos el 130%, en al menos el 140%, en al menos el 150%, o más. Se realiza la cuantificación de células Ctip2⁺ Satb2⁻ mediante densitometría después de la inmunofluorescencia tal como se describe en la parte experimental de la presente invención.

En una realización preferida, el aumento de la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ implica poner en contacto dicha célula madre neural con un agonista del receptor de cannabinoides CB₁ y/o modificar dicha célula madre neural para aumentar la expresión del receptor de cannabinoides CB₁ por encima de los niveles basales.

La expresión “agonista del receptor de cannabinoides CB₁” se refiere a un compuesto que puede activar el receptor de cannabinoides CB₁ incluyendo ligandos, endocannabinoides producidos por el cuerpo de mamíferos tales como anandamida o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), cannabinoides vegetales (tales como THC, producido por la planta de cannabis) y cannabinoides sintéticos (tales como HU-210 o dronabinol). Ejemplos de agonistas del receptor de cannabinoides CB₁ que pueden usarse en esta invención son, sin limitación, endocannabinoides tales como anandamida, 2-araquidonoilglicerol (2-AG) y N-araquidonoil-dopamina; cannabinoides sintéticos tales como

araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA), HU-210, JWH-073 y WIN 55,212-2. También pueden usarse cannabinoides que actúan como agonista para ambos receptores CB₁ y CB₂ e incluyen, sin limitación, cannabinoides vegetales tales como cannabinoles, tetrahidrocannabinol (THC) y sus metabolitos 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol (11-OH-THC); cannabinoides sintéticos tales como levonantradol, dronabidol, AM-2201 (1-(5-fluoropentil)-3-(1-naftoil)indol), JWH-018 (1-pentil-3-(1-naftoil)indol) o AM-678; endocannabinoides tales como 2-araquidonil gliceril éter (2-AGE, éter de noladina), palmitoiletanolamida (PEA), anandamida o N-araquidonoiletanolamina o AEA y CP 55,940. En una realización preferida, el agonista del receptor de cannabinoides CB₁ es un agonista sintético, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en HU-210 y araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA); más preferiblemente es HU-210. HU-210 también se denomina 1,1-dimetilheptil-11-hidroxitetrahidrocannabinol.

Un ensayo para evaluar si un compuesto es un "agonista del receptor de cannabinoides CB₁" adecuado para la presente invención consiste en determinar un aumento del número de células positivas sólo para Ctip2 a la vez que disminuye el número de células Satb2⁺ en un cultivo organotípico cortical tal como se describe en la parte experimental de la presente invención. Un modo alternativo de evaluar la actividad de un agonista del receptor de cannabinoides CB₁ es someter a ensayo la capacidad de un antagonista del receptor CB₁ tal como SR141716A (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1995) o AM251 (Xi *et al.*, 2006) para revertir la acción producida por un agonista del receptor de cannabinoides CB₁.

La expresión "poner en contacto" se refiere a la incubación de la célula madre en presencia de dicho compuesto.

La generación de neuronas motoras corticoespinales puede aumentarse mediante manipulación genética del receptor de cannabinoides CB₁, es decir mediante técnicas de sobreexpresión génica convencionales. Por tanto, en una realización preferida, el aumento de la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ implica modificar dicha célula madre neural para aumentar la expresión del receptor de cannabinoides CB₁ por encima de los niveles basales.

La expresión "modificar dicha célula madre neural" se refiere a la introducción en dicha célula madre de un vector de expresión que codifica el receptor de cannabinoides CB₁ mediante métodos que conoce bien el experto en la técnica.

La expresión "niveles basales" se refiere al nivel de expresión de un gen en una célula normal en condiciones en las que no haya tenido lugar la manipulación de dicha célula.

La expresión "niveles de expresión" o sus equivalentes gramaticales, tal como se usa en el presente documento, significa una medición de la cantidad de ácido nucleico, por ejemplo ARN o ARNm, o proteína de un gen en una célula, o alternativamente, el nivel de actividad de un gen o una proteína en dicha célula. Se conocen bien en la técnica métodos para evaluar tal expresión.

El valor obtenido para los niveles de expresión de un ácido nucleico o una proteína del receptor de cannabinoides CB₁ en una célula modificada se compara entonces con los niveles basales de receptor de cannabinoides CB₁ en una célula no modificada. Esto permite detectar un aumento de la expresión del receptor de cannabinoides CB₁ por encima de los niveles basales. Un aumento de la expresión por encima de los niveles basales, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un cambio de expresión de un gen dado con respecto a los niveles basales de expresión de al menos el 5%, en al menos el 10%, en al menos el 15%, en al menos el 20%, en al menos el 25%, en al menos el 30%, en al menos el 35%, en al menos el 40%, en al menos el 45%, en al menos el 50%, en al menos el 55%, en al menos el 60%, en al menos el 65%, en al menos el 70%, en al menos el 75%, en al menos el 80%, en al menos el 85%, en al menos el 90%, en al menos el 95%, en al menos el 100%, en al menos el 110%, en al menos el 120%, en al menos el 130%, en al menos el 140%, en al menos el 150%, o más.

En otra realización, el aumento de la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ implica aumentar en la célula la actividad de una enzima de síntesis de endocannabinoides por encima de los niveles basales.

El término "enzima de síntesis de endocannabinoides", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una enzima que puede sintetizar endocannabinoides. En una realización preferida, la enzima de síntesis de endocannabinoides es diacilglicerol lipasa.

El término "diacilglicerol lipasa", "DAG lipasa", "DAGL" o "DGL" (E.C. 3.1.1) se refiere a una enzima implicada en la biosíntesis del endocanabinoide 2-araquidonoilglicerol. Cataliza la hidrólisis de diacilglicerol, liberando un ácido graso libre y monoacilglicerol. El término "diacilglicerol lipasa" abarca la diacilglicerol lipasa de cualquier especie de mamífero, incluyendo pero sin limitarse a animales domésticos y de granja (vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores), primates y seres humanos. Preferiblemente, la diacilglicerol lipasa es humana. Se conocen dos enzimas diacilglicerol lipasa humanas (DAGLA y DAGLB) codificadas por diferentes genes. En la presente invención "DAG lipasa humana" se entiende como la proteína DAGLA definida por la secuencia de la base de datos Swiss-Prot con el número de registro Q9Y4D2 (versión del 31 de octubre de 2012) o la proteína DAGLB definida por la secuencia de la base de datos Swiss-Prot con el número de registro Q8NCG7 (versión del 31 de octubre de 2012).

La actividad de una enzima de síntesis de endocannabinoides se somete a ensayo midiendo la cantidad de

endocannabinoide que se ha sintetizado por la enzima. El ensayo depende de la enzima y el endocannabinoide específicos implicados.

La expresión “niveles basales”, en el contexto de dicha realización, se refiere al nivel de actividad de una enzima de síntesis de endocannabinoides en una célula normal en condiciones en las que no haya tenido lugar la manipulación de dicha célula para aumentar la actividad de dicha enzima.

Un aumento de la actividad de una enzima de síntesis de endocannabinoides por encima de los niveles basales, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un aumento de los niveles de un endocannabinoide con respecto a los niveles basales de al menos el 5%, en al menos el 10%, en al menos el 15%, en al menos el 20%, en al menos el 25%, en al menos el 30%, en al menos el 35%, en al menos el 40%, en al menos el 45%, en al menos el 50%, en al menos el 55%, en al menos el 60%, en al menos el 65%, en al menos el 70%, en al menos el 75%, en al menos el 80%, en al menos el 85%, en al menos el 90%, en al menos el 95%, en al menos el 100%.

En una realización preferida, el aumento de la actividad de una enzima de síntesis de endocannabinoides se lleva a cabo modificando dicha célula para aumentar la expresión de una enzima de síntesis de endocannabinoides.

El aumento en la célula de la actividad de una enzima de síntesis de endocannabinoides puede lograrse mediante la introducción en dicha célula de un vector de expresión que codifica dicha enzima mediante métodos que conoce bien el experto en la técnica.

El valor obtenido para los niveles de expresión de un ácido nucleico o una proteína de enzima de síntesis de endocannabinoides en una célula modificada se compara con los niveles basales de la enzima de síntesis de endocannabinoides en una célula no modificada para detectar un aumento de la expresión de la enzima de síntesis de endocannabinoides por encima de los niveles basales. Un aumento de la expresión por encima de los niveles basales, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un cambio de expresión de un gen dado con respecto a los niveles basales de expresión de al menos el 5%, en al menos el 10%, en al menos el 15%, en al menos el 20%, en al menos el 25%, en al menos el 30%, en al menos el 35%, en al menos el 40%, en al menos el 45%, en al menos el 50%, en al menos el 55%, en al menos el 60%, en al menos el 65%, en al menos el 70%, en al menos el 75%, en al menos el 80%, en al menos el 85%, en al menos el 90%, en al menos el 95%, en al menos el 100%, en al menos el 110%, en al menos el 120%, en al menos el 130%, en al menos el 140%, en al menos el 150%, o más.

En otra realización, el aumento de la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ implica la disminución en la célula de la actividad de una enzima de degradación de endocannabinoides. En una realización preferida, la disminución de la actividad de una enzima de degradación de endocannabinoides se lleva a cabo modificando dicha célula con un agente que silencia dicha enzima y/o poniendo en contacto una célula madre neural con un inhibidor de dicha enzima de degradación de endocannabinoides.

El término “enzima de degradación de endocannabinoides”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una enzima que puede catabolizar endocannabinoides. En una realización preferida, la enzima de degradación de endocannabinoides se selecciona del grupo que consiste en hidrolasa de amida de ácido graso (FAAH) y monoacilglicerol lipasa (MAGL).

La actividad de una enzima de degradación de endocannabinoides se somete a ensayo midiendo la cantidad de endocannabinoide que se ha degradado por la enzima. El ensayo depende de la enzima y el endocannabinoide específicos implicados.

El término “hidrolasa de amida de ácido graso” o “FAAH” (EC 3.5.1.99) se refiere a un miembro de la familia de enzimas serina hidrolasas que es la principal enzima catabólica para una clase de lípidos bioactivos denominados amidas de ácido graso (FAA) que incluye el endocannabinoide anandamida (N-araquidonoiletanolamina). El término “FAAH” abarca la FAAH de cualquier especie de mamífero, incluyendo pero sin limitarse a animales domésticos y de granja (vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores), primates y seres humanos. Preferiblemente, la FAAH es humana. Se conocen dos enzimas FAAH humanas (FAAH-1 y FAAH-2) codificadas por diferentes genes. En la presente invención “FAAH humana” se entiende como la proteína FAAH-1 definida por la secuencia de la base de datos Swiss-Prot con el número de registro 000519 (versión del 3 de octubre de 2012) o la proteína FAAH-2 definida por la secuencia de la base de datos Swiss-Prot con el número de registro Q6GMR7 (versión del 3 de octubre de 2012). Los ejemplos de inhibidores selectivos de FAAH útiles en la presente invención incluyen, sin limitación, URB597, inhibidores basados en urea tales como PF-622, PF-750, PF-04457845 y PF3845. En una realización preferida, el inhibidor de la enzima FAAH es URB597. La inhibición de FAAH normalmente se somete a ensayo haciendo uso de un sustrato de anandamida radiomarcado (Nomura *et al.*, 2008), que genera etanolamina marcada libre, aunque también se han descrito métodos de CL-EM alternativos.

El término “monoacilglicerol lipasa” o “MAGL” (EC 3.1.1.23) se refiere a una enzima también conocida como MAG lipasa que es un miembro asociado a membrana de la superfamilia de serina hidrolasas. Es una enzima clave en la hidrólisis del endocannabinoide 2-araquidonoilglicerol. Convierte monoacilgliceroles en el ácido graso libre y glicerol. El término “MAGL” abarca la MAGL de cualquier especie de mamífero, incluyendo pero sin limitarse a animales domésticos y de granja (vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores), primates y seres

humanos. Preferiblemente, la MAGL es humana. En la presente invención “MAGL humana” se entiende como la proteína definida por la secuencia de la base de datos Swiss-Prot con el número de registro Q99685 (versión del 3 de octubre de 2012). Los ejemplos de inhibidores selectivos de MAGL incluyen, sin limitación, JZL184. En una realización preferida, el inhibidor de la enzima MAGL es JZL184. Habitualmente se detecta la actividad MAGL midiendo la liberación de ácido graso libre a partir de un sustrato de monoacilglicerol usando un sistema de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (Nomura *et al.*, 2008) o el sustrato radiomarcado 2-oleoil-[³H]-glicerol.

Una disminución de la actividad de una enzima de degradación de endocannabinoides, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un aumento de los niveles de un endocanabinoide con respecto a los niveles basales de al menos el 5%, en al menos el 10%, en al menos el 15%, en al menos el 20%, en al menos el 25%, en al menos el 30%, en al menos el 35%, en al menos el 40%, en al menos el 45%, en al menos el 50%, en al menos el 55%, en al menos el 60%, en al menos el 65%, en al menos el 70%, en al menos el 75%, en al menos el 80%, en al menos el 85%, en al menos el 90%, en al menos el 95%, en al menos el 100%. La generación de CSMN puede aumentarse disminuyendo la expresión de una enzima de degradación de endocannabinoides mediante manipulación genética. Por tanto, en una realización preferida, la disminución de la actividad de una enzima de degradación de endocannabinoides se lleva a cabo modificando la célula madre neural con un agente que silencia dicha enzima.

La expresión “modificar una célula madre neural” se refiere a la introducción en dicha célula madre de un ARNhc, un ARNip, un ácido nucleico antisentido o una ribozima mediante métodos que conoce bien el experto en la técnica.

La expresión “un agente que silencia dicha enzima” se refiere, tal como se usa en el presente documento, a un ARNhc, un ARNip, un ácido nucleico antisentido o una ribozima que puede disminuir la expresión de una enzima de degradación de endocannabinoides. Una enzima se silencia cuando se disminuye su expresión con respecto a los niveles basales de expresión en al menos el 5%, en al menos el 10%, en al menos el 15%, en al menos el 20%, en al menos el 25%, en al menos el 30%, en al menos el 35%, en al menos el 40%, en al menos el 45%, en al menos el 50%, en al menos el 55%, en al menos el 60%, en al menos el 65%, en al menos el 70%, en al menos el 75%, en al menos el 80%, en al menos el 85%, en al menos el 90%, en al menos el 95%, en al menos el 100%.

La expresión “niveles basales” se refiere al nivel de expresión de un gen en una célula normal en condiciones en las que no haya tenido lugar la manipulación de dicha célula.

La expresión “niveles de expresión” o sus equivalentes gramaticales, tal como se usa en el presente documento, significa una medición de la cantidad de ácido nucleico, por ejemplo ARN o ARNm, o proteína de un gen en una célula, o alternativamente, el nivel de actividad de un gen o una proteína en dicha célula.

Tal como entiende el experto en la técnica, los niveles de expresión del gen FAAH o MAGL pueden medirse determinando los niveles de expresión de ARNm de dichos genes o determinando los niveles de proteína codificados por dichos genes, es decir la proteína FAAH o MAGL.

Para medir los niveles de ARNm de los genes FAAH o MAGL, la célula puede tratarse para romper de modo físico, mecánico o químico estructuras celulares, para liberar componentes intracelulares en una disolución acuosa u orgánica para preparar ácidos nucleicos para análisis adicional. Los ácidos nucleicos se extraen de la muestra mediante procedimientos que conoce el experto usando reactivos disponibles comercialmente. Entonces se extrae el ARN de muestras congeladas o frescas mediante cualquiera de los métodos típicos en la técnica, por ejemplo, Sambrook, J., *et al.*, 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., vol. 1-3. Preferiblemente, se tiene cuidado para evitar la degradación del ARN durante el proceso de extracción.

Puede llevarse a cabo la determinación de los niveles de ARNm de FAAH o MAGL mediante cualquier método conocido en la técnica tal como qPCR, transferencia de tipo Northern, inmunotransferencia por puntos de ARN, TaqMan®, métodos basados en etiquetas tales como análisis en serie de la expresión génica (SAGE) incluyendo variantes tales como LongSAGE y SuperSAGE, microalineamientos, amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), hibridación fluorescente *in situ*, incluyendo variantes tales como Flow-FISH, qFISH y FISH de doble fusión (D-FISH) tal como se describe en el documento WO2010030818, Femino *et al.* (Science, 1998, 280:585-590), Levsky *et al.* (Science, 2002, 297:836-840) o Raj *et al.* (PLoS Biology, 2006, 4:e309).

Para normalizar los valores de expresión de ARNm entre las diferentes muestras, es posible comparar los niveles de expresión del ARNm de interés en las muestras de prueba con la expresión de un ARN de control. Un “ARN de control”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un ARN cuyos niveles de expresión no cambian o sólo cambian en cantidades limitadas en células madre. Preferiblemente, el ARN de control es ARNm derivado de genes de mantenimiento y que codifican para proteínas que se expresan de manera constitutiva y llevan a cabo funciones celulares esenciales. Los ejemplos de genes de mantenimiento para su uso en la presente invención incluyen β -2-microglobulina, ubiquitina, proteína ribosómica 18-S, ciclofilina, GAPDH, PSMB4, tubulina y β -actina.

Los niveles de expresión de los genes FAAH o MAGL también puede medirse determinando los niveles de proteína codificados por dichos genes, es decir las proteínas FAAH o MAGL o variantes de las mismas. Prácticamente puede

usarse cualquier método convencional dentro del contexto de la presente invención para cuantificar los niveles de proteínas FAAH o MAGL tales como inmunotransferencia de tipo Western o inmunohistoquímica.

El valor obtenido para los niveles de expresión de un ácido nucleico o una proteína de FAAH o MAGL en una célula modificada se compara entonces con los niveles basales de FAAH o MAGL en una célula no modificada. Esto permite detectar una disminución de la expresión de FAAH o MAGL por debajo de los niveles basales. Una disminución de la expresión por debajo de los niveles basales, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un cambio de expresión de un gen dado con respecto a los niveles basales de expresión de al menos el 5%, en al menos el 10%, en al menos el 15%, en al menos el 20%, en al menos el 25%, en al menos el 30%, en al menos el 35%, en al menos el 40%, en al menos el 45%, en al menos el 50%, en al menos el 55%, en al menos el 60%, en al menos el 65%, en al menos el 70%, en al menos el 75%, en al menos el 80%, en al menos el 85%, en al menos el 90%, en al menos el 95%, en al menos el 100%. La disminución de la expresión de una enzima de degradación de endocannabinoides puede lograrse mediante un ácido nucleico. Puede usarse la tecnología de ARN de interferencia para interferir en la actividad de la enzima de degradación de endocannabinoides. Este enfoque puede utilizar, por ejemplo, ácidos nucleicos antisentido o ribozimas que bloquean la traducción de un ARNm específico, o bien mediante enmascaramiento de ese ARNm con un ácido nucleico antisentido o bien escindiéndolo con una ribozima. Para un análisis general de la tecnología antisentido, véase, por ejemplo, *Antisense DNA and RNA*, (Cold Spring Harbor Laboratory, D. Melton, ed., 1988). Si el inhibidor es un ácido nucleico, puede sintetizarse químicamente, producirse usando transcripción *in vitro*, etc.

La inhibición de genes que codifican para una enzima de degradación de endocannabinoides también puede ser útil. Tal inhibición puede lograrse mediante el uso de ARNip (ARN de interferencia pequeño), que es una clase de moléculas de ARN bicatenarias, de 20-25 nucleótidos de longitud con extremos 5' fosforilados y extremos 3' hidroxilados con dos nucleótidos de proyección que interfieren en la expresión de genes específicos con la secuencia de nucleótidos complementaria. La tecnología de interferencia de ARN (iARN) impide la expresión de genes usando moléculas de ARN pequeñas tales como ARN de interferencia pequeños (ARNip). Esta tecnología se aprovecha a su vez del hecho de que iARN es un mecanismo biológico natural para silenciar genes en la mayor parte de las células de muchos organismos vivos, que van de plantas a insectos y a mamíferos (McManus *et al.*, *Nature Reviews Genetics*, 2002, 3(10) pág. 737). La iARN impide que un gen produzca una proteína funcional garantizando que se destruye el producto intermedio molecular, es decir la copia de ARN mensajero del gen. Pueden usarse ARNip en forma desnuda e incorporarse en un vector como ARNhc, tal como se describe a continuación. También puede hacerse uso de aptámeros para inhibir específicamente la transcripción génica de un gen que codifica una enzima de degradación de endocannabinoides. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense 6.699.843. Pueden identificarse aptámeros útiles en la presente invención usando el proceso SELEX. Los métodos de SELEX se han descrito, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 5.707.796, 5.763.177, 6.011.577, 5.580.737, 5.567.588 y 5.660.985.

La inhibición de una enzima de degradación de endocannabinoides también puede lograrse mediante el uso de ARNhc (ARN en horquilla corto), que es una secuencia de ARN que produce un giro de horquilla apretado que puede usarse para silenciar la expresión génica diana mediante interferencia de ARN (iARN). La expresión de ARNhc en células se logra normalmente mediante la inserción de plásmidos o a través de vectores virales usando promotores de polimerasa II y polimerasa III.

Se han descrito ARNip en Brummelkamp *et al.*, *Science* 296; 550-553, 2002, Jaque *et al.*, *Nature* 418; 435-438, 2002, Elbashir S. M. *et al.* (2001) *Nature*, 411: 494-498, McCaffrey *et al.* (2002), *Nature*, 418: 38-39; Xia H. *et al.* (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010, Novina *et al.* (2002), *Nat. Med.* 8: 681-686, y la solicitud estadounidense n.º 20030198627.

En una realización preferida, el agente que silencia la enzima de degradación de endocannabinoides es un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en un ARN de interferencia pequeño (ARNip) y un ARN en horquilla corto (ARNhc) específico para el ARNm de dicha enzima.

La expresión "específico para el ARNm de dicha enzima", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de los ácidos nucleicos para unirse específicamente a su secuencia diana y no a otra secuencia. Se valida la especificidad realizando análisis de tipo BLAST, mediante el uso de controles negativos, y determinando los cambios en los niveles de ARNm de genes no relacionados.

Pueden activarse receptores CB₁ aumentando los niveles de endocannabinoides mediante inhibidores de sus enzimas de catabolización. Por tanto, en una realización preferida, la disminución de la actividad de una enzima de degradación de endocannabinoides se lleva a cabo poniendo en contacto una célula madre neural con un inhibidor de dicha enzima de degradación de endocannabinoides.

El término "inhibidor de una enzima de degradación de endocannabinoides" se refiere a un compuesto que puede inhibir una enzima que degrada agonistas endógenos de receptores de cannabinoides. Enzimas de degradación de endocannabinoides incluidas en la presente invención son hidrolasa de amida de ácido graso (FAAH) y monoacilglicerol lipasa (MAGL). En una realización preferida, la enzima de degradación de endocannabinoides se selecciona del grupo que consiste en hidrolasa de amida de ácido graso (FAAH) y monoacilglicerol lipasa (MAGL).

En una realización preferida, el inhibidor de MAGL es JZL184. En otra realización preferida, el inhibidor de FAAH es URB597.

Las condiciones de cultivo para obtener una neurona motora superior corticoespinal a partir de una célula madre neural se conocen en la técnica e implican el fomento de la dorsalización de la célula madre.

5 La expresión “condiciones para fomentar la dorsalización”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a condiciones adecuadas para formar tipos de células neurales dorsales. En general, el término dorsalización se aplica si en un sistema en desarrollo se introduce un cambio, lo que afecta a la posterior diferenciación del sistema de tal modo que se producen las estructuras dorsales a expensas de las ventrales. La dorsalización indica el cambio que conduce a la diferenciación de tejido neural, órganos de los sentidos, células de la cresta y melanóforos que se derivan normalmente de la parte dorsal del ectodermo.

Ejemplos de dichas condiciones de cultivo son medio definido por defecto y un inhibidor de Sonic hedgehog (ciclopamina) (Gaspard, *et al.*, 2008) o inhibición de Smad (Shi, *et al.* 2012). Por tanto, en una realización preferida, las condiciones para fomentar la dorsalización implican poner en contacto dicha célula madre neural con un agente de dorsalización seleccionado de: a) un inhibidor de Sonic hedgehog; y b) un inhibidor de Smad.

15 El término “agente de dorsalización” se refiere a un compuesto o una mezcla de compuestos que puede fomentar la dorsalización de la célula madre neural. Ejemplos de dichos agentes son, sin limitación, un inhibidor de Sonic hedgehog o un inhibidor de Smad.

20 El término “Sonic hedgehog (Shh)” se refiere al homólogo Sonic hedgehog y es uno de los ligandos en la familia de rutas de señalización de mamíferos denominados hedgehog. Desempeña un papel clave en la regulación en vertebrados de la organogénesis y organización del cerebro y controla la división celular de células madre adultas. Dicho término abarca Sonic hedgehog (Shh) de cualquier especie de mamífero, incluyendo pero sin limitarse a animales domésticos y de granja (vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores), primates y seres humanos. Preferiblemente, el Sonic hedgehog (Shh) es humano. En la presente invención “Sonic hedgehog humano (Shh)” se entiende como la proteína definida por la secuencia de la base de datos Swiss-Prot con el número de registro Q15465 (versión del 3 de octubre de 2012).

25 El término “inhibidor de Sonic hedgehog (Shh)” se refiere a un compuesto que puede inhibir la ruta de señalización de hedgehog uniéndose a Smoothened (Smo), que es la proteína que se somete a desrepresión cuando se une Shh a su receptor Patched (Ptch 1); seleccionando como diana directamente Shh; o inhibiendo la señalización de Shh de manera posterior a Smo. Ejemplos de inhibidores de Shh son, sin limitación, sal de sodio de N6,O2'-dibutiril-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico, AY 9944, KAAD-ciclopamina, ciclopamina, forskolina, GANT58, GANT61, JK184, HPI-1, HPI-3, jervina, SANT-1, GDC-0449, robotnikinina, IPI-926. En una realización preferida, el inhibidor de Sonic hedgehog es ciclopamina. Un inhibidor de Shh es un compuesto que reduce la ruta de señalización de hedgehog con respecto a los niveles basales en al menos el 5%, en al menos el 10%, en al menos el 15%, en al menos el 20%, en al menos el 25%, en al menos el 30%, en al menos el 35%, en al menos el 40%, en al menos el 45%, en al menos el 50%, en al menos el 55%, en al menos el 60%, en al menos el 65%, en al menos el 70%, en al menos el 75%, en al menos el 80%, en al menos el 85%, en al menos el 90%, en al menos el 95%, en al menos el 100%.

30 El aumento relativo de células que expresan Pax6 y la reducción relativa de los números de células que expresan Olig2 entre todos los precursores corresponderían a la dorsalización de la médula espinal ventral observada en ausencia de señalización de Shh (Ericson *et al.*, 1997).

Puede evaluarse la acción de un inhibidor de Sonic hedgehog determinando la inhibición de la expresión de Pax7 o Nkx2.2 (Briscoe *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2011) que son típicos de células ventrales.

35 El término “inhibidor de Smad”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que puede inhibir la señal mediada por la proteína Smad (*Small Mothers Against Decapentaplegic*). Tal inhibidor interfiere en una molécula diana o compuesto diana o proceso diana resultante (es decir reduce o elimina o suprime dicha molécula, compuesto o proceso diana). Las Smad son proteínas intracelulares que transducen señales extracelulares de ligandos del factor de crecimiento transformante beta al núcleo en el que activan la transcripción génica de TGF- β posterior. Ejemplos de inhibidores de Smad son, sin limitación, nogina, dorsomorfina, SB431542, LDN-193189, inhibidores que inhiben una ruta de señalización de cinasa de linfoma anaplásico tal como Lefty, activina y TGF-beta. En una realización preferida, se usa una combinación de dos o más inhibidores de Smad. En una realización más preferida, el inhibidor de Smad se selecciona del grupo que consiste en nogina, SB431542 y una combinación de los mismos.

40 Un inhibidor de Smad es un compuesto o una mezcla de compuestos que reduce la señal mediada por proteína Smad con respecto a los niveles basales en al menos el 5%, en al menos el 10%, en al menos el 15%, en al menos el 20%, en al menos el 25%, en al menos el 30%, en al menos el 35%, en al menos el 40%, en al menos el 45%, en al menos el 50%, en al menos el 55%, en al menos el 60%, en al menos el 65%, en al menos el 70%, en al menos el 75%, en al menos el 80%, en al menos el 85%, en al menos el 90%, en al menos el 95%, en al menos el 100%.

Puede identificarse un inhibidor de Smad útil para la presente invención detectando una disminución de la señal mediada por proteína Smad en células tratadas con el compuesto con respecto a células no tratadas.

NEURONAS MOTORAS SUPERIORES CORTICOESPINALES DE LA INVENCION

5 En otro aspecto, la divulgación se refiere a una neurona motora superior corticoespinal que puede obtenerse mediante un método de la invención.

El término "neurona motora superior corticoespinal" se ha definido en el primer aspecto de la invención. Las neuronas motoras superiores corticoespinales obtenidas mediante el método según la invención se caracterizan por mostrar una o más de las siguientes características:

- 10 – La expresión de los marcadores Sox5, Ctip2, Uchl1, Tmem117/diap3 y/o Cdh22 a nivel de transcrito y proteína mediante qPCR en tiempo real e inmunofluorescencia. Preferiblemente, los marcadores para una neurona motora superior corticoespinal son Sox5, Ctip2 y Uchl1, más preferiblemente Ctip2 y Uchl1.
- Su morfología de capa profunda típica (por ejemplo, una dendrita apical larga hacia las dendritas basales y la piamadre en la capa profunda 5 (Ideguchi *et al.*, 2010; Gaspard *et al.*, 2008; Eiraku *et al.*, 2008).

Los métodos de la presente invención permiten obtener un cultivo cortical enriquecido en células NMS.

15 Otro aspecto de la divulgación es una población celular que comprende neuronas motoras superiores corticoespinales que pueden obtenerse mediante un método de la invención. Preferiblemente, la población celular comprende al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de neuronas motoras superiores corticoespinales de la invención; más preferiblemente la población celular
20 comprende al menos el 80% de neuronas motoras superiores corticoespinales de la invención.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE LA INVENCION

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende una neurona motora superior corticoespinal de la invención, o una población celular de la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.

25 El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia normativa del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos, o la Farmacopea Europea, u otra Farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes tamponantes del pH. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una neurona motora superior corticoespinal o una población celular de neuronas motoras superiores corticoespinales de la invención preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador de modo que se proporcione la forma para la administración apropiada al sujeto. La formulación debe adaptarse al modo de administración. En una
30 realización preferida, las composiciones farmacéuticas son estériles y en una forma adecuada para la administración a un sujeto, preferiblemente un sujeto animal, más preferiblemente un sujeto mamífero, y lo más preferiblemente un sujeto humano.

La composición farmacéutica de la divulgación puede estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación sólidas, semisólidas y líquidas, tales como preparaciones liofilizadas, disoluciones o suspensiones líquidas, disoluciones inyectables e infusibles, etc. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica pretendidos.
40

La administración de las células o la población celular de la divulgación o la composición farmacéutica que comprende las mismas al sujeto que las necesita, puede llevarse a cabo por medios convencional. En una realización particular, dichas células o dicha población celular se administran al sujeto mediante un método que implica transferir las células al tejido deseado, o bien *in vitro* o bien *in vivo*, al tejido animal directamente. Las células pueden transferirse al tejido deseado mediante cualquier método apropiado, que variará generalmente según el tipo de tejido. Por ejemplo, pueden sembrarse células sobre el sitio deseado dentro del tejido para establecer una población, etc. Pueden transferirse células a sitios *in vivo* usando dispositivos tales como catéteres, trócares, cánulas, endoprótesis (que pueden sembrarse con las células), etc.
45

La composición farmacéutica de la divulgación puede usarse en una terapia de combinación. En una realización específica, se administra la terapia de combinación a un sujeto que necesita tratamiento, tal como un paciente que necesita reparación o regeneración de un tejido. En una realización, se usa la terapia de combinación junto con otros tipos de tratamientos para reparar o regenerar tejido neural. Según la realización anterior, las terapias de combinación de la invención pueden usarse antes de, de manera concurrente, o de forma posterior a la administración de las células de la invención.
50
55

USOS NO TERAPÉUTICOS DE LA INVENCION

5 La neurona motora superior corticoespinal o la población celular según la divulgación es útil como modelo para examinar y determinar fármacos activos. Esto permite minimizar el uso de pruebas con animales puesto que pueden someterse a ensayo compuestos *in vitro* con mayor fiabilidad. Además, si la neurona motora superior corticoespinal o la población celular de la invención es autóloga, pueden someterse a ensayo fármacos activos para un paciente específico.

Por tanto, otro aspecto de la divulgación se refiere al uso de una neurona motora superior corticoespinal de la invención, o una población celular de la invención, para evaluar un producto biológico, farmacológico y/o químico.

10 Los compuestos sometidos a ensayo pueden ser de carácter biológico, por ejemplo, sin limitación, anticuerpos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. También pueden someterse a ensayo productos con actividad farmacológica así como productos químicos con una actividad no farmacológica tales como toxinas.

USOS TERAPÉUTICOS DE LA INVENCION

15 Las neuronas motoras superiores corticoespinales de la divulgación son útiles para terapias de sustitución de células neurales. Dichas terapias se basan en la idea de que puede mejorarse la función neurológica perdida por una lesión o neurodegeneración mediante la introducción de nuevas células que pueden formar conexiones apropiadas y sustituir la función de las neuronas perdidas.

Por tanto, en otro aspecto la divulgación se refiere a una neurona motora superior corticoespinal de la invención, una población celular de la invención o una composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento.

20 En otro aspecto, la divulgación se refiere a una neurona motora superior corticoespinal de la invención, una población celular de la invención o una composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno motor neurodegenerativo. Alternativamente, la invención se refiere al uso de una neurona motora superior corticoespinal de la invención, una población celular de la invención o una composición farmacéutica de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno motor neurodegenerativo. Alternativamente, la divulgación se refiere a un método para el tratamiento en un sujeto de un trastorno motor neurodegenerativo que comprende la administración a dicho sujeto de una neurona motora superior corticoespinal, una población celular o una composición farmacéutica de la invención.

25 El término "sujeto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no se limita a, animales domésticos y de granja, primates y seres humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano de sexo masculino o femenino de cualquier edad o raza. En el contexto de la presente invención, el sujeto es un sujeto que padece una enfermedad neurodegenerativa o que corre el riesgo de padecer una enfermedad neurodegenerativa.

30 El término "tratar" o "tratamiento", tal como se usa en el presente documento, significa conseguir un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico quiere decirse la erradicación o mejora del trastorno subyacente que esté tratándose. Además, se consigue un beneficio terapéutico con la erradicación o mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con el trastorno subyacente de tal manera que se observa una mejora en el sujeto, a pesar de que el sujeto todavía puede estar afectado por el trastorno subyacente. Para un beneficio profiláctico, las composiciones pueden administrarse a un sujeto que corre el riesgo de desarrollar una enfermedad particular, o a un sujeto que notifica uno o más de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, aunque puede no haberse realizado un diagnóstico de esta enfermedad.

35 La expresión "trastorno motor neurodegenerativo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad en la que el sistema nervioso se deteriora de manera progresiva e irreversible y que afecta selectivamente a las neuronas motoras (o bien a las neuronas motoras superiores, o bien a las neuronas motoras inferiores o bien a ambas), las células asociadas con los movimientos voluntarios y musculoesqueléticos. Ejemplos de enfermedad motora neurodegenerativa, sin limitación, son esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis lateral primaria (ELP), atrofia muscular progresiva (AMP), parálisis bulbar progresiva (PBP), parálisis pseudobulbar y atrofia muscular espinal. En una realización preferida, el trastorno motor neurodegenerativo es esclerosis lateral amiotrófica (ELA). En otra realización preferida, el trastorno motor neurodegenerativo es esclerosis lateral primaria (ELP).

COMPOSICIONES DE LA INVENCION

50 El método de la invención implica incubar células en presencia de un agonista del receptor de cannabinoides CB₁ o un inhibidor de una enzima de degradación de endocannabinoides y al menos un agente de dorsalización. Por tanto, es el objeto de la presente invención proporcionar composiciones que comprenden dichos compuestos.

55 Por tanto, otro aspecto de la presente invención es una composición que comprende un agente que puede aumentar la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ en una célula madre neural y un agente adicional seleccionado de: a) un inhibidor de Sonic hedgehog y b) un inhibidor de Smad.

El término “composición”, tal como se usa en este aspecto, se refiere a una composición líquida estéril que contiene: i) un agonista del receptor de cannabinoides CB₁ y/o una enzima de degradación de endocannabinoides y ii) un agente de dorsalización seleccionado de un inhibidor de Sonic hedgehog y un inhibidor de Smad. Dichos componentes pueden constituir una única formulación. Alternativamente, la composición de la invención puede comprender los componentes formulados por separado, que se combinan antes del uso.

Un agente que puede aumentar la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ en una célula madre neural es un agente que puede aumentar el número de células Ctip2⁺ Satb2⁻ con respecto a los niveles basales en al menos el 5%, en al menos el 10%, en al menos el 15%, en al menos el 20%, en al menos el 25%, en al menos el 30%, en al menos el 35%, en al menos el 40%, en al menos el 45%, en al menos el 50%, en al menos el 55%, en al menos el 60%, en al menos el 65%, en al menos el 70%, en al menos el 75%, en al menos el 80%, en al menos el 85%, en al menos el 90%, en al menos el 95%, en al menos el 100%, en al menos el 110%, en al menos el 120%, en al menos el 130%, en al menos el 140%, en al menos el 150%, o más. Se realiza la cuantificación de células Ctip2⁺ Satb2⁻ mediante densitometría después de la inmunofluorescencia tal como se describe en la parte experimental de la presente invención.

En una realización preferida, el agente que puede aumentar la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ es un agonista del receptor de cannabinoides CB₁ y/o un inhibidor de una enzima de degradación de endocannabinoides.

Los términos “inhibidor de Sonic hedgehog”, “agonista del receptor de cannabinoides CB₁”, “inhibidor de una enzima de degradación de endocannabinoides”, e “inhibidor de Smad” se han definido previamente en el contexto del primer aspecto de la invención. Todas las realizaciones aplicables al primer aspecto de la invención también son aplicables a la composición de la invención.

En una realización preferida, el inhibidor de Sonic hedgehog es ciclopamina. En otra realización preferida, el inhibidor de Smad se selecciona de nogina, SB431542 y una combinación de los mismos. En otra realización preferida, el agonista del receptor de cannabinoides CB₁ es un agonista sintético, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en HU-210 y araquidonil-2'-cloroetilamina (ACEA), más preferiblemente HU-210. En otra realización preferida, el inhibidor de una enzima de degradación de endocannabinoides se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de hidrolasa de amida de ácido graso (FAAH) y un inhibidor de monoacilglicerol lipasa (MAGL), preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en URB594 y JZL184.

CÉLULAS MADRE NEURALES DE LA INVENCION, NEURONAS OBTENIDAS MEDIANTE DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE DICHAS CÉLULAS MADRE Y USOS DE LAS MISMAS

Los autores de la presente invención han hallado que ratones completos CB₁^{-/-} y ratones específicos de neuronas glutamatérgicas Nex-CB₁^{-/-} presentan alteraciones en la generación de neuronas motoras corticoespinales, dando como resultado de ese modo una alteración de la función motora especializada en ratones adultos. Por tanto, pueden usarse células madre neurales que tienen una pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁ y las neuronas obtenidas a partir de dichas células madre como modelo para estudiar trastornos motores neurodegenerativos (Maekawa *et al.*, 2004).

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula madre neural aislada que tiene una pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁.

En el contexto de este aspecto, el término “aislada” se refiere a una célula madre neural que se encuentra fuera del cuerpo animal o humano.

La expresión “pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁” se refiere a una disminución completa o parcial de la función del receptor de cannabinoides CB₁. Una pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una disminución de la expresión de los marcadores neuronales de capa profunda Fezf2 y Ctip2 y el marcador neuronal corticofugo Sox5 con respecto a los niveles basales de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 100%. Además, una pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁ se refiere a un aumento de la expresión del factor de transcripción de capa superior Satb2 con respecto a los niveles basales en al menos el 5%, en al menos el 10%, en al menos el 15%, en al menos el 20%, en al menos el 25%, en al menos el 30%, en al menos el 35%, en al menos el 40%, en al menos el 45%, en al menos el 50%, en al menos el 55%, en al menos el 60%, en al menos el 65%, en al menos el 70%, en al menos el 75%, en al menos el 80%, en al menos el 85%, en al menos el 90%, en al menos el 95%, en al menos el 100%, en al menos el 110%, en al menos el 120%, en al menos el 130%, en al menos el 140%, en al menos el 150%, o más. Se realiza la cuantificación de dichos marcadores mediante densitometría después de inmunofluorescencia, qPCR, inmunotransferencia de tipo Western tal como se describe en la parte experimental de la presente invención. Los términos “célula madre neural” y “receptor de cannabinoides CB₁” se han definido previamente en el contexto del primer aspecto de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a una población de neuronas que puede obtenerse mediante diferenciación

in vitro a partir de una célula madre neural que tiene una pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁.

La población de neuronas obtenida mediante diferenciación *in vitro* a partir de una célula madre neural que tiene una pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁ puede identificarse mediante una disminución de la expresión de los marcadores Fezf2, Ctif2 y Sox5 y un aumento de la expresión del marcador Satb2 con respecto a una neurona obtenida mediante diferenciación *in vitro* a partir de una célula madre neural que tiene un receptor de cannabinoides CB₁ funcional. Dichos marcadores pueden identificarse mediante qPCR en tiempo real o inmunofluorescencia.

Las condiciones de cultivo para diferenciar una neurona de una célula madre neural que tiene una pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁ son condiciones de cultivo típicas conocidas en la técnica e implican el fomento de la dorsalización de la célula madre (Gaspardt, *et al.*, 2008; Shi, *et al.*, 2012).

En una realización preferida, la pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁ se debe a una deleción parcial o completa o a una mutación en el receptor de cannabinoides CB₁.

La expresión “deleción parcial”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la pérdida de al menos el 0,5%, el 1%, el 5%, el 10%, el 20%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 99% de los nucleótidos que forman la secuencia de nucleótidos de un gen.

La expresión “deleción completa”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la pérdida del 100% de los nucleótidos que forman la secuencia de nucleótidos de un gen.

El término “mutación”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un cambio en una secuencia de ácido nucleico. Dicha mutación incluye, pero no se limita a, sustitución (es decir, intercambio de uno o más nucleótidos por otros), inversión (es decir, se invierte un segmento de ADN dentro de un gen, para ello son necesarias dos rotaciones de 180°, una para invertir la secuencia y la otra para mantener la polaridad del ADN), translocación (es decir, cambia de posición de un segmento de un gen para estar en otro sitio diferente del mismo gene o en otro sitio del genoma), e inserciones o deleciones de nucleótidos (es decir, la adición de uno o más nucleótidos (inserciones o adiciones) o la pérdida de uno o más nucleótidos (deleciones) que tienen como consecuencia cambios en el marco de lectura, produciéndose un error de lectura durante la traducción que va de la formación de proteínas no funcionales a la ausencia de dicha proteína).

La generación de receptores de cannabinoides CB₁ que carecen de su función se realiza usando técnicas de ingeniería genética, por ejemplo mediante mutagénesis dirigida al sitio o técnicas de deleción génica que se conocen bien en la técnica. Véanse Brown T, “Gene Cloning” (Chapman & Hall, Londres, GB, 1995); Watson R, *et al.*, “Recombinant DNA”, 2ª ed. (Scientific American Books, Nueva York, NY, EE.UU., 1992); Alberts B, *et al.*, “Molecular Biology of the Cell” (Garland Publishing Inc., Nueva York, NY, EE.UU., 2008); Innis M, *et al.*, Eds., “PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications” (Academic Press Inc., San Diego, CA, EE.UU., 1990); Erlich H, Ed., “PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification” (Stockton Press, Nueva York, NY, EE.UU., 1989); Sambrook J, *et al.*, “Molecular Cloning. A Laboratory Manual” (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU., 1989); Bishop T, *et al.*, “Nucleic Acid and Protein Sequence. A Practical Approach” (IRL Press, Oxford, GB, 1987); Reznikoff W, Ed., “Maximizing Gene Expression” (Butterworths Publishers, Stoneham, MA, EE.UU., 1987); Davis L, *et al.*, “Basic Methods in Molecular Biology” (Elsevier Science Publishing Co., Nueva York, NY, EE.UU., 1986), Schleef M, Ed., “Plasmid for Therapy and Vaccination” (Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, DE, 2001).

Alternativamente, la célula madre neural que tiene una pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁ puede derivarse de MPI obtenidas de pacientes que padecen un trastorno motor neurodegenerativo.

Las deleciones genéticas de receptores CB₁ provocan alteraciones en el desarrollo del fascículo corticoespinal. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere al uso de una célula madre neural aislada que tiene una pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁ o una población de neuronas que puede obtenerse mediante diferenciación *in vitro* a partir de dicha célula madre neural como modelo para estudiar un trastorno motor neurodegenerativo, preferiblemente esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis lateral primaria.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una célula madre neural aislada que tiene una pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁ o una población de neuronas que puede obtenerse mediante diferenciación *in vitro* a partir de dicha célula madre neural para detectar compuestos útiles en el tratamiento de un trastorno motor neurodegenerativo, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis lateral primaria.

En resumen, la presente divulgación tiene como objetivo:

[1]. Un método *in vitro* para obtener una neurona motora superior corticoespinal a partir de una célula madre neural, en el que dicho método comprende poner en contacto una célula madre neural en condiciones adecuadas para aumentar la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ en dicha célula y en condiciones para fomentar la dorsalización de dicha célula.

- 5 [2]. El método según [1], en el que el aumento de la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ implica poner en contacto dicha célula madre neural con un agonista del receptor de cannabinoides CB₁ y/o modificar dicha célula madre neural para aumentar la expresión del receptor de cannabinoides CB₁ por encima de los niveles basales y/o aumentar en la célula la actividad de una enzima de síntesis de endocannabinoides por encima de los niveles basales.
- [3]. El método según [2], en el que el agonista del receptor de cannabinoides CB₁ es un agonista sintético.
- [4]. El método según [3], en el que el agonista sintético del receptor de cannabinoides CB₁ se selecciona del grupo que consiste en HU-210 y araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA).
- [5]. El método según [4], en el que el agonista sintético del receptor de cannabinoides CB₁ es HU-210.
- 10 [6]. El método según [1] a [5], en el que el aumento de la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ implica la disminución en la célula de la actividad de una enzima de degradación de endocannabinoides.
- [7]. El método según [6], en el que dicha disminución de la actividad de una enzima de degradación de endocannabinoides se lleva a cabo modificando dicha célula con un agente que silencia dicha enzima y/o poniendo en contacto una célula madre neural con un inhibidor de dicha enzima de degradación de endocannabinoides.
- 15 [8]. El método según [7], en el que el agente que silencia la enzima de degradación de endocannabinoides es un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en un ARN de interferencia pequeño (ARNip) y un ARN en horquilla corto (ARNhc) específicos para el ARNm de dicha enzima.
- [9]. El método según [6] a [8], en el que la enzima de degradación de endocannabinoides se selecciona del grupo que consiste en hidrolasa de amida de ácido graso (FAAH) y monoacilglicerol lipasa (MAGL).
- 20 [10]. El método según [7] a [9], en el que el inhibidor de monoacilglicerol lipasa es JZL184.
- [11]. El método según [7] a [9], en el que el inhibidor de hidrolasa de amida de ácido graso es URB597.
- [12]. El método según [1] a [11], en el que la célula madre neural se deriva de una célula madre pluripotente seleccionada de una célula madre embrionaria (ME) no humana y una célula madre pluripotente inducida (MPi).
- 25 [13]. El método según [1] a [12], en el que las condiciones para fomentar la dorsalización implican poner en contacto dicha célula madre neural con un agente de dorsalización seleccionado de: a) un inhibidor de Sonic hedgehog; y b) un inhibidor de Smad.
- [14]. El método según [13], en el que el inhibidor de Sonic hedgehog es ciclopamina.
- [15]. El método según [13], en el que el inhibidor de Smad se selecciona del grupo que consiste en nogina, SB431542 y una combinación de los mismos.
- 30 [16]. Una neurona motora superior corticoespinal que puede obtenerse mediante un método según [1] a [15].
- [17]. Una población celular que comprende neuronas motoras superiores corticoespinales según [16].
- [18]. Una composición farmacéutica que comprende una neurona motora superior corticoespinal según [16] o una población celular según [17], y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 [19]. Uso de una neurona motora superior corticoespinal según [16], o una población celular según [17], para evaluar un producto biológico, farmacológico y/o químico.
- [20]. Una neurona motora superior corticoespinal según [16], una población celular según [17] o una composición farmacéutica según [18] para su uso como medicamento.
- [21]. Una neurona motora superior corticoespinal según [16], una población celular según [17] o una composición farmacéutica según [18] para su uso en el tratamiento de un trastorno motor neurodegenerativo.
- 40 [22]. Una neurona motora superior corticoespinal, una población celular o una composición farmacéutica para su uso según [21], en la que el trastorno motor neurodegenerativo se selecciona del grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y esclerosis lateral primaria (ELP).
- [23]. Una composición que comprende un agente que puede aumentar la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ en una célula madre neural y un agente adicional seleccionado de: a) un inhibidor de Sonic hedgehog y b) un inhibidor de Smad.
- 45 [24]. La composición según [23], en la que el inhibidor de Sonic hedgehog es ciclopamina.
- [25]. La composición según [23] o [24], en la que el inhibidor de Smad se selecciona del grupo que consiste en

nogina, SB431542 y una combinación de los mismos.

[26]. La composición según [23] a [25], en la que el agente que puede aumentar la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ es un agonista del receptor de cannabinoides CB₁ y/o un inhibidor de una enzima de degradación de endocannabinoides.

5 [27]. La composición según [26], en la que el agonista del receptor de cannabinoides CB₁ es un agonista sintético.

[28]. La composición según [27], en la que el agonista sintético del receptor de cannabinoides CB₁ se selecciona del grupo que consiste en HU-210 y araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA).

[29]. La composición según [28], en la que el agonista sintético del receptor de cannabinoides CB₁ es HU-210.

10 [30]. La composición según [26] a [29], en la que el inhibidor de una enzima de degradación de endocannabinoides se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de hidrolasa de amida de ácido graso (FAAH) y un inhibidor de monoacilglicerol lipasa (MAGL).

[31]. La composición según [30], en la que el inhibidor de monoacilglicerol lipasa es JZL184.

[32]. La composición según [30], en la que el inhibidor de hidrolasa de amida de ácido graso es URB597.

[33]. Una célula madre neural aislada que tiene una pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁.

15 [34]. Una población de neuronas que puede obtenerse mediante diferenciación *in vitro* a partir de una célula madre neural que tiene una pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁.

[35]. Una célula madre neural aislada según [33] o una población de neuronas según [34] en la que la pérdida de función del receptor de cannabinoides CB₁ se debe a una delección parcial o completa o a una mutación en el receptor de cannabinoides CB₁.

20 [36]. Uso de una célula madre neural aislada o una población de neuronas según [33] a [35] como modelo para estudiar un trastorno motor neurodegenerativo.

[37]. Uso de una célula madre neural aislada o una población de neuronas según [33] a [35] para detectar compuestos útiles en el tratamiento de un trastorno motor neurodegenerativo.

25 [38]. Uso según [36] o [37] en el que el trastorno motor neurodegenerativo se selecciona del grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis lateral primaria.

La invención se describe a continuación mediante los siguientes ejemplos, que deben considerarse meramente como ilustrativos y en ningún caso limitativos del alcance de la presente invención.

Ejemplos

Las siguientes abreviaturas se usan en la parte experimental:

30 2AG: 2-araquidonoilglicerol

BrdU, 5-bromo-2'-desoxiuridina

Receptor CB₁: receptor de cannabinoides tipo 1

COUP-TF: factor de transcripción de promotor en el sentido de 5' de ovoalbúmina de pollo

CP: placa cortical

35 CRE: Cre recombinasa

NMCE: neurona motora corticoespinal

Ctip2: proteína 2 de interacción con COUP-TF

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

Dil: 1,1'-diotadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina

40 DsRed: proteína fluorescente roja de *Discosoma sp.*

E16.5: día embrionario 16,5

eCB: endocannabinoide

- F1: primera generación filial
- FAAH: hidrolasa de amida de ácido graso
- Fezf2: proteína 2 de tipo dedo de zinc embrionaria de prosencéfalo
- GFP: proteína fluorescente verde
- 5 IgG: inmunoglobulina G
- IZ: zona intermedia
- Ldb2: proteína 2 de unión a dominio LIM
- MAR: región de unión a la matriz
- P2: día posnatal 2
- 10 P8: día posnatal 8
- P21: día posnatal 21
- PBS: solución salina tamponada con fosfato
- PKC γ : proteína cinasa C γ
- Satb2: proteína 2 de unión rica en AT especial
- 15 Sox5: factor de transcripción 5 de caja SRY (región determinante del sexo Y)
- Tbr1: proteína 1 cerebral de caja T
- Tbr2: proteína 2 cerebral de caja T o eomesodermina
- Thy1: timidilato sintasa 1
- ZV/SZV: zona ventricular/subventricular
- 20 WT: silvestre
- YFP: proteína fluorescente amarilla

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

- 25 Los siguientes materiales fueron donados amablemente: anticuerpo anti-receptor CB₁ (K. Mackie, Indiana University, Bloomington, IN), ratones FAAH^{-/-} (B. Cravatt, Scripps Institute, San Diego, CA), pCAG-DsRed (M. Nieto, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España), constructos p β galact con las secuencias MAR A2 a A5 del promotor de Ctip2 y el vector de expresión pMSCV-Satb2 (R. Grosschedl, Max Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics, Friburgo, Alemania) y HU-210 [(6aR,10aR)-3-(1,1-dimetilheptil)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-hidroxi-6,6-dimetil-6Hdibenzo[b,d]piran-9-metanol] (R. Mechoulam, Hebrew University, Jerusalén, Israel). Los anticuerpos
- 30 monoclonal de rata anti-BrdU, policlonal de conejo anti-Ctip2, anti-Tbr1, anti-Tbr2 y monoclonal de ratón anti-Satb2 eran de Abcam (Cambridge, R.U.). También se usaron anticuerpos policlonal de conejo anti-CB₁ (Institute of Frontier Medical Sciences, Kioto, Japón), monoclonal de ratón anti-CRE (Covance), monoclonal de ratón anti-GFP (Invitrogen) y policlonal de pollo anti-GFP (Millipore).

Animales

- 35 Los diseños y procedimientos experimentales los aprobó el Comité de investigación en animales de la Universidad Complutense según la Directiva 86/609/EU de la Comisión Europea. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales y su sufrimiento a lo largo de todos los experimentos. Se mantuvieron los ratones en condiciones convencionales, manteniendo las camadas en jaulas de cría, a una temperatura constante (20 \pm 2°C) en ciclo de luz/oscuridad de 12 h con alimento y agua a voluntad. La generación y el genotipado de ratones CB₁^{-/-},
- 40 CB₁^{f/f;Nes-Cre}, CB₁^{f/f;Dlx5/6-Cre} y FAAH^{-/-} y sus respectivos controles de camadas se han notificado previamente y se realizaron en consecuencia (Cravatt *et al.*, 2001; Marsicano *et al.*, 2003; Monory *et al.*, 2007; Massa *et al.*, 2010). Se obtuvieron ratones Thy1-eYFP (línea H) de The Jackson Laboratory [B6.Cg-Tg(Thy1-YFP-H)2Jrs/J] y se cruzaron con ratones CB₁^{-/-}. Se cruzó la generación F1 heterocigota de nuevo con ratones CB₁^{-/-}. Se obtuvieron tejidos de ratón de cualquier sexo durante el apareamiento programado tal como se evalúa mediante tapón vaginal.
- 45 Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Se procesaron cortes coronales de cerebro (10 μm) tal como se describió previamente (Mulder *et al.*, 2008), y se identificaron las capas mediante sus densidades celulares diferenciadas tal como se visualiza mediante Hoechst 33528 (Sigma) y contratinción con β -III-tubulina. Tras el bloqueo con suero de cabra al 5%, se incubaron las secciones de cerebro durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios indicados. Un observador independiente obtuvo imágenes de fluorescencia confocal de una manera ciega, y se obtuvieron todas las cuantificaciones a partir de un mínimo de 6 secciones de series de 1 en 10 por ratón. Se realizó la inmunofluorescencia de secciones corticales a lo largo del eje rostral a caudal, y se realizaron las cuantificaciones en el área mediolateral de secciones rostromediales que corresponden a la corteza motora/somatosensorial. Se determinó la especificación de capa piramidal en E16.5, P2 y P8 en una columna cortical de 50 μm de ancho dividida en 10 intervalos de igual tamaño, desde la superficie ventricular hasta la zona marginal. Se analizaron al menos 2 columnas corticales independientes por sección, y se calculó el promedio de los resultados (figuras 1, 2, 5 y 7). Se cuantificaron las células positivas para los correspondientes marcadores e hicieron referencia al número de células total en el intervalo identificado mediante Hoechst 33528.

Inmunohistoquímica de PKC γ

Se realizó inmunohistoquímica de PKC γ en secciones sagitales de 100 μm de grosor. Tras la permeabilización, la extinción de las actividades peroxidasa endógenas y el bloqueo con suero de cabra, se incubaron secciones en flotación libre con anticuerpo de conejo anti-PKC γ (Santa Cruz Biotechnology) y se procesaron según las instrucciones del fabricante con anticuerpo de cabra biotilado anti-IgG de conejo 1:500 y con complejo de avidina-peroxidasa biotilado (ABC Standard Vectastain ABC kit; Vector Laboratories). Se montaron las secciones teñidas, y se capturaron imágenes de campo brillante a partir de un microscopio vertical Olympus BX51 usando una cámara CCD Olympus DP70.

Hibridación *in situ*

Se obtuvieron secciones coronales en parafina (10 μm) de cabezas en los días embrionarios E12.5, 13.5, 14.5 y 16.5, se desparafinaron y se procesaron para la hibridación *in situ* tal como se describió previamente (Monory *et al.*, 2007). Se amplificó la ribosonda Clim1 (secuencia de referencia del National Center for Biotechnology Information NM_010698.3) para la hibridación *in situ* con los siguientes cebadores:

directo ACCCTCATTCCCCGTTATT (SEQ ID NO: 1), e

inverso TGGCTCTCCTACCACCATC (SEQ ID NO: 2).

PCR cuantitativa en tiempo real

Se aisló ARN usando el kit RNeasy Plus (Qiagen). Se obtuvo ADNc con Transcriptor (Roche). Se realizaron ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real usando la mezcla maestra FastStart con Rox (Roche), y se obtuvieron sondas del Universal Probe Library Set (Roche). Se ejecutaron las amplificaciones en un sistema de PCR en tiempo real 7900 HT-Fast (Applied Biosystems). Se ajustó cada valor usando los niveles de ARN 18S y β -actina como referencia.

Electroporación *ex vivo* e *in utero*

Se realizaron experimentos de electroporación *ex vivo* en E13.5 o E14.5 tal como se describió previamente (Mulder *et al.*, 2008) usando los vectores de expresión pCAG-GFP y pCAGCB $_1$ -GFP, o se sometieron a electroporación shControl y shCB $_1$ con pGFP-V-RS de ratón (Origene) y se cultivaron las células disociadas tal como se describe a continuación. Además, se sometieron a electroporación cortezas cerebrales CB $_1^{fl/fl}$ con pCAG-GFP o pCAG-Cre-GFP (Addgene). Además, se realizaron electroporaciones *in utero* en E13.5 o E14.5 con DsRed y pCAG-CB $_1$ -GFP y (respectivamente) y se analizaron en E16.5 (figura 1F). Se realizaron experimentos de electroporación *in utero* con pCAG-CRE-GFP y plásmidos de control de pCAG desde E12.5 hasta P0 en ratones CB $_1^{fl/fl}$ preñados (figura 3D).

Cultivos de células corticales piramidales y organotípicas

Se cultivaron progenitores neurales corticales a partir de cortezas cerebrales disecadas aisladas en E13.5. Se disociaron mecánicamente las células y se sembraron en placas recubiertas con polilisina y laminina tras la electroporación *ex utero* y la disección del área cortical sometida a electroporación (positiva para verde rápido). Se evaluó el fenotipo neuronal tras 7 días *in vitro* mediante la cuantificación de la expresión de Ctip2 y Satb2 en células GFP $^+$ a partir de ≥ 10 campos de visión/cubreobjeto seleccionados aleatoriamente tras la contratinción celular con Hoechst 33528 en células manipuladas farmacológica y genéticamente. Además, se realizaron experimentos de regulación farmacológica en cortes de cerebro WT.

Ensayos de actividad de promotores génicos

Se usó la línea de células madre neurales HiB5 (Renfranz *et al.*, 1991) tras la transfección transitoria con 0,75 μg del indicador A4- o A3-MAR-pfosluc del promotor de Ctip2, 0,5 μg de pCAG-CB $_1$ -GFP, 0,25 μg de pMSCVSatb2 y 0,02 μg de luciferasa derivada de *Renilla* como control de transfección interno con Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Se

realizó actividad luciferasa dirigida por promotor transcripcional usando el sistema de ensayo Dual-Luciferase Reporter Promega (Madison, WI, EE.UU.) y la actividad luciferasa derivada de *Renilla* como control de transfección interno en un luminómetro Lumat LB9507 (Berthold Technologies). Se realizaron experimentos de control con un exceso de expresión de Satb2 que podía bloquear eficazmente la actividad de Ctip2-indicador (datos no mostrados).

5 Análisis conductual

Se analizaron ratones $CB_1^{-/-}$ y $Nex-CB_1^{-/-}$ y sus respectivas camadas silvestres (WT y $CB_1^{fl/fl}$) a las 8 semanas de edad con edad media apareada entre grupos. Los animales se sometieron a prueba siempre durante la misma fase de luz y se aclimataron a la sala de pruebas durante al menos 30 min. Se grabaron en vídeo todas las pruebas para su análisis posterior y cuantificación de doble ciego. Se privó de comida a los ratones la noche antes del día de pruebas (llegando a ser el peso corporal al final de la prueba el $92,6 \pm 2,2\%$ del peso corporal inicial). Se realizaron pruebas motoras especializadas y tareas de retirada de parches según protocolos establecidos (Tomassy *et al.*, 2010). En resumen, se usó una caja de alcance de plexiglás (20 cm de largo x 8 cm de ancho x 20 cm de alto), con una rendija vertical de 1 cm de ancho en el lado frontal de la caja. Los animales tenían que alcanzar el gránulo de alimento agradable (gránulos de alimento saborizados con sacarosa de precisión sin polvo de 20 mg (Bio Serv., NJ, EE.UU.) de un estante (4 cm de ancho x 8 cm de largo) en frente de la rendija vertical. Se habituaron los ratones a los gránulos saborizados con sacarosa durante 3 días consecutivos antes de las pruebas, que consistían en 3 fases: habituación, alcance no especializado y alcance especializado. En la fase de habituación (2 sesiones), se colocaron los ratones en la jaula de pruebas y se dispersaron 10 gránulos sobre el suelo. La sesión terminó cuando los ratones se habían comido todos los gránulos o habían transcurrido 10 min. Para la prueba de alcance no especializado, se colocaron gránulos de alimento uno a uno sobre el estante dentro de la distancia de alcance de la lengua del ratón. La prueba terminó cuando se comieron 10 gránulos o habían transcurrido 4 min. En la prueba de alcance especializado, se colocaron gránulos de alimento uno a uno sobre el estante alejados 1,5 cm de la rendija, de modo que los ratones tenían que usar sus extremidades delanteras para alcanzarlos. Se puntuó el agarre y la recuperación de un gránulo como un éxito, y se puntuó el desplazamiento de un gránulo sin recuperación como un error. La prueba terminó en el plazo de 6 min. Los resultados se representan como porcentaje de éxito [(éxitos totales/ensayos totales) x 100]. La ausencia de alteraciones fenotípicas en ratones $CB_1^{-/-}$ y $Nex-CB_1^{-/-}$ en la tarea no especializada se usó como control de que la supresión del receptor CB_1 *per se* no interfiere con la prueba influyendo en factores diferentes de la función corticoespinal. Se realizó un análisis complementario de la alteración motora en ratones $CB_1^{-/-}$ usando la prueba de alcance en escaleras (Campden Instruments Ltd., R.U.). Esta prueba permite la medición del alcance de las patas coordinado en ratones. El sistema está formado por dos escaleras con 8 escalones cada uno sobre los que pueden colocarse 2 gránulos de alimento de recompensa. La prueba consistió en tres fases: entrenamiento, alcance no especializado y alcance especializado. Se realizó la habituación a gránulos de alimento saborizados con sacarosa durante 3 días consecutivos, y entonces se habituaron los ratones al aparato durante 2 días colocando algunos gránulos a lo largo del corredor central y las escaleras. En 5 días de entrenamiento consecutivo, se llenaron ambas escaleras con 2 gránulos por escalera, y se desafió a los ratones a que alcanzaran los gránulos que se habían colocado exclusivamente en las escaleras durante 10 min. En 2 sesiones de prueba adicionales, se desafió a los animales a que alcanzaran gránulos colocados en los 5 escalones inferiores, lo que necesitaba el uso de una pata para alcanzarlos (obsérvese que los 3 escalones superiores pueden alcanzarse con la lengua, y por tanto no son útiles para evaluar la capacidad de alcance con la pata especializada). Finalmente, se realizó la prueba de retirada de parches para medir el rendimiento motor especializado evaluando la capacidad del ratón para retirar un trozo de parche adhesivo colocado en cada pata trasera tal como se describió previamente (Tomassy *et al.*, 2010). Se colocaron parches adhesivos en cada pata trasera del ratón, y se colocó el animal en una jaula de alojamiento normal y se grabó en vídeo. La prueba terminó cuando ambos parches se habían retirado o habían transcurrido 4 minutos. Se determinó el tiempo de latencia para el primer contacto de la nariz con el parche, proporcionando así una evaluación general del estado sensorial. Se midió la capacidad de retirada de parches especializada calculando el número medio de contactos hasta que se había retirado cada parche adhesivo. Los resultados mostrados corresponden al promedio de dos pruebas. Se realizó la caracterización de la actividad motora general, la exploración y la coordinación en dispositivos ActiTrack y RotaRod tal como se describió previamente (Blazquez *et al.*, 2011).

50 Marcaje con Dil

Se realizó el marcaje de los tractos corticoespinales con el colorante de carbocianina lipófilo Dil (1,1'-diotadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina; Invitrogen) en los cerebros de ratones $Nex-CB_1^{-/-}$ y $CB_1^{fl/fl}$ en P2. Se recogió un monocristal de Dil en una punta pulida al fuego de una micropipeta de vidrio rota y se insertó en la presunta corteza motora. Se incubaron los cerebros que contenían Dil en PBS 10 mM pH 7,4/azida de sodio al 0,1% a 50°C en la oscuridad durante 4 semanas. Se cortaron los cerebros incrustados en agar al 3% a 100 μ m en el plano sagital, se contratiñeron con DAPI y se montaron con PBS. Se visualizaron las proyecciones de axones usando un instrumento Axiomager M1 de Carl Zeiss con objetivos Zeiss de 5X / 0,16 (aumentos/apertura numérica). Se obtuvieron imágenes confocales usando un sistema 510 de Carl Zeiss con lente objetivo de 10X / 0,45 de apertura numérica (aire).

60 Análisis de datos y estadística

Los resultados mostrados representan las medias \pm E.E.M., y el número de experimentos se indica en cada caso. Se

realizó el análisis estadístico mediante ANOVA de una o dos vías, según fuese apropiado. Se realizó un análisis a posteriori mediante la prueba de Student-Neuman-Keuls.

EJEMPLO 1

El receptor de cannabinoides CB₁ regula la especificación de neuronas de la capa cortical

5 Inicialmente, se determinó el impacto de la inactivación del receptor CB₁ en el desarrollo cortical analizando el grosor cortical de capas CB₁^{-/-} y silvestres (WT). Los ratones CB₁^{-/-} mostraban ventrículos agrandados en el día posnatal 2 (P2), de acuerdo con las alteraciones descritas inducidas por el bloqueo farmacológico del receptor CB₁ *in utero* (Mulder *et al.*, 2008). Era evidente una reducción del grosor cortical total en P2 en ratones CB₁^{-/-} (grosor cortical total, 527 ± 26 μm en ratones WT frente a 475 ± 15 μm en ratones CB₁^{-/-}; p<0,05), lo que podía atribuirse a una reducción del grosor de capa profunda pero no de capa superior (grosor cortical de capa superior y profunda, 174 ± 26 y 352 ± 28 μm en ratones WT frente a 172 ± 5 y 302 ± 20 μm en ratones CB₁^{-/-}; p<0,05 para el grosor cortical de capa profunda; n = 6 para cada grupo). Estos resultados respaldan un papel significativo del receptor CB₁ en el control del tamaño de la población progenitora y plantean la cuestión de si la señalización del receptor CB₁ ejerce una función selectiva en la diferenciación de las poblaciones neuronales de las diferentes capas corticales. Debido a que Tbr1 es un factor de transcripción de caja T expresado de manera temprana que promueve la especificación de capa profunda y las proyecciones de neuronas corticocorticales (Hevner *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2011), se analizaron en primer lugar neuroblastos Tbr1⁺ posmitóticos a lo largo de la corteza cerebral en desarrollo en ratones deficientes en receptor CB₁. La cuantificación de células Tbr1⁺ en intervalos de igual tamaño en E16.5 mostró que estas células posmitóticas se acumulaban de manera anómala en intervalos profundos de la placa cortical de ratones CB₁^{-/-} en comparación con capas WT (figura 1A; imágenes de inmunofluorescencia no mostradas). Además, la distribución de neuronas que expresan el marcador neuronal de capa superior Satb2 también se vio afectada y, en particular, se expandieron células Satb2⁺ en los intervalos inferiores 2-3 (figura 1B). El análisis de marcadores dobles mostró además que la delección del receptor CB₁ aumentó el número de células que coexpresan Tbr1 y Satb2 (figura 1C). Satb2 es un represor bien conocido de Ctip2, un marcador de capa 5b selectivo de neuronas de proyección subcerebral, y esta acción represiva de Satb2 promueve la identidad de neuronas de proyección callosa (Alcamo *et al.*, 2008). Para investigar el impacto de la delección de CB₁ en el desarrollo de poblaciones de células neuronales Satb2⁺ y Ctip2⁺, se entremezclaron células Satb2⁺ en cortezas cerebrales CB₁^{-/-} en E16.5 entre células Ctip2⁺, y fue evidente un aumento del número de células que coexpresaban ambos marcadores durante la inactivación del receptor CB₁ (figura 1E). El número de células Satb2⁺ en la columna cortical total aumentó significativamente (figura 1D), y en consecuencia se redujeron células Ctip2⁺ en ratones CB₁^{-/-} en comparación con capas WT (figura 1G).

Considerando la expresión alterada de marcadores de especificación neuronal inducida mediante la supresión genética de CB₁, se realizó análisis de expresión génica de factores de transcripción seleccionados implicados en la regulación de la corticogénesis. La inactivación del receptor CB₁ alteró la expresión de determinantes que se sabe que están implicados en la especificación de destino y el desarrollo de neuronas corticales de capa profunda y superior. Por tanto, la deficiencia del receptor CB₁ disminuyó la expresión de los marcadores neuronales de capa profunda Fezf2 y Ctip2 (niveles de ARNm relativos: 0,55 ± 0,07 frente a 1,00 ± 0,15 en cortezas cerebrales WT y 0,47 ± 0,06 frente a 1,00 ± 0,13 en cortezas cerebrales WT, p<0,05 y p<0,01, respectivamente; n = 4 para cada grupo) (Arlotta *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008) y el marcador neuronal corticofugo Sox5 (niveles de ARNm relativos: 0,50 ± 0,05 frente a 1,00 ± 0,11 en cortezas cerebrales WT, p<0,05) (Lai *et al.*, 2008). A la inversa, los niveles del factor de transcripción de capa superior Satb2 estaban regulados por incremento en cortezas cerebrales CB₁^{-/-} (niveles de ARNm relativos: 2,65 ± 0,15 frente a 1,00 ± 0,23 en cortezas cerebrales WT, p<0,05). Para validar el papel del receptor CB₁ en la expresión correcta de marcadores de especificación neuronal de capa superior/profunda, se realizó una estrategia de ganancia de función dirigida a rescatar la expresión del receptor CB₁ en antecedentes CB₁^{-/-} mediante electroporación *in utero* de un vector de expresión pCAG-CB₁-GFP. De manera importante, la reexpresión del receptor CB₁ redujo la expansión de células Satb2⁺ que se produjo en intervalos profundos de cortezas cerebrales CB₁^{-/-}, y por tanto redujo el número de células GFP⁺Satb2⁺ (figura 1F).

EJEMPLO 2

El receptor de cannabinoides CB₁ controla la especificación de neuronas de capa profunda a través de la regulación del equilibrio Ctip2-Satb2

50 Se estudió adicionalmente el papel del receptor CB₁ en la regulación de la especificación neuronal de capa profunda analizando los cambios en el eje Ctip2-Satb2 en cultivos organotípicos corticales de ratones WT E13.5. El tratamiento con HU-210, un agonista sintético del receptor CB₁, aumentó el número de células positivas sólo para Ctip2 pero disminuyó el número de células Satb2⁺ (figuras 2A-2B). El antagonista selectivo para receptor CB₁, SR141716 [*N*-piperidino-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-3-pirazolcarboxamida] impidió la inducción de diferenciación neuronal a células Ctip2⁺ mediante HU-210 y su efecto inhibitorio sobre la diferenciación de células Satb2⁺. Debido a que Satb2 regula negativamente la expresión de Ctip2 mediante unión a secuencias de MAR en el promotor de Ctip2 (Alcamo *et al.*, 2008; Britanova *et al.*, 2008), se realizaron ensayos con indicador luciferasa para diferentes regiones MAR del promotor de Ctip2 en la línea neural de células madre HiB5. Se transfectaron de manera transitoria células HiB5 con constructos de luciferasa bajo el control de los sitios de unión a Satb2 A4 o A3 del promotor de Ctip2 junto con vectores de expresión para CB₁ y Satb2. El tratamiento con HU-210 aumentó la

actividad de A4-fosluc (figura 2C), y el bloqueo del receptor CB₁ con SR141716 previno este efecto. Asimismo, HU-210 aumentó la actividad de A3-fosluc (datos no mostrados). Por tanto, la actividad del receptor CB₁ previene el efecto represor de Satb2 sobre el promotor de Ctip2, aumentando de ese modo su actividad.

5 Para evaluar directamente el papel del receptor CB₁ en la diferenciación neuronal de capa profunda, se sometieron a electroporación cortezas cerebrales de ratón E13.5 cuando la generación de NMCE es máxima (Tomassy *et al.*, 2010), con un vector GFP⁺, y se desactivó o sobreexpresó el receptor CB₁ con ARN en horquilla corto (shCB₁) y pCAG-CB₁, respectivamente. Se obtuvieron cultivos corticales mediante disociación y se permitió que se diferenciaron durante 7 días *in vitro*. La manipulación eficaz de la expresión del receptor CB₁ en estas condiciones se evaluó mediante inmunofluorescencia de CB₁ y GFP (imágenes de inmunofluorescencia no mostradas). Además, se validó el efecto de shCB₁ mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western (figura 3E) y PCR en tiempo real. shCB₁ redujo los niveles de ARNm y proteína de CB₁ en comparación con shControl (niveles de proteína CB₁ relativos en shControl y shCB₁, 1,00 ± 0,13 y 0,59 ± 0,15, p < 0,01; niveles de ARNm de CB₁ relativos en shControl y shCB₁, 1,00 ± 0,23 y 0,46 ± 0,17, p<0,01). La caracterización por inmunofluorescencia de poblaciones neuronales entre la población GFP⁺ sometida a electroporación tras la diferenciación reveló que la regulación por disminución del receptor CB₁ disminuyó la generación de células positivas sólo para Ctip2 (figura 3A), mientras que la sobreexpresión del receptor CB₁ aumentó las células Ctip2⁺ (figura 3B). Además, se realizó la supresión de CB₁ mediante electroporación *ex utero* de cerebros de los ratones CB₁^{fl/fl} preñados en E13.5 con un vector de expresión de Cre recombinasa. Usando esta estrategia para lograr una pérdida de función aguda del receptor CB₁, se observó también una diferenciación de Ctip2⁺ reducida de células corticales en comparación con células CB₁^{fl/fl} (figura 3C). Para validar además los resultados derivados de la manipulación del receptor CB₁ *ex utero*, se realizó electroporación *in vivo in utero* con los plásmidos pCAG-Cre-GFP y pCAG-GFP, y se analizaron crías en P0. De manera notable, la supresión del receptor CB₁ *in utero* disminuyó la diferenciación neuronal Ctip2⁺ en comparación con cortezas cerebrales CB₁^{fl/fl} de control (figura 3D). Estos resultados respaldan que la actividad del receptor CB₁ se requiere para la expresión apropiada del determinante neuronal de capa profunda Ctip2.

25 EJEMPLO 3

El receptor de cannabinoides CB₁ regula independientemente la proliferación de progenitores y la diferenciación neuronal

Debido a que la pérdida de función del receptor CB₁ va seguida por alteraciones en la especificación neuronal durante el desarrollo cortical (presente estudio) y también se sabe que el receptor CB₁ se expresa en células progenitoras, en la que dirige la proliferación de progenitores de ZV/SZV de una manera autónoma de células (Aguado *et al.*, 2005; Mulder *et al.*, 2008), una hipótesis plausible sería que la regulación mediada por el receptor CB₁ de la especificación neuronal era una consecuencia directa de su papel en la generación de progenitores. Para investigar las supuestas relaciones entre los cambios en la proliferación de progenitores corticales y la especificación neuronal, se compararon ratones mutantes totales completos CB₁^{-/-} con ratones mutantes específicos del sistema glutamatérgico Nex-CB₁^{-/-}. En estos últimos mutantes, CB₁ se deletiona selectivamente en neuronas glutamatérgicas del telencéfalo dorsal (Monory *et al.*, 2006). Se describió que la expresión de Cre recombinasa bajo el control de las secuencias reguladoras Nex selecciona como diana selectivamente neuronas de la corteza cerebral en desarrollo en vez de progenitores corticales (Wu *et al.*, 2005). Sin embargo, se desconoce el impacto de la delección Nex-CB₁^{-/-} condicional durante el desarrollo cortical. Ratones completos CB₁^{-/-} mostraban proliferación de progenitores reducida en la corteza cerebral en desarrollo (Aguado *et al.*, 2005), mientras que no eran evidentes diferencias en la proliferación de células progenitoras entre ratones CB₁^{fl/fl} y Nex-CB₁^{-/-} (figuras 4A y 4B). El análisis de inmunofluorescencia mostró que la expresión de Cre en el día embrionario E14.5 se producía en áreas posmitóticas en la corteza cerebral en desarrollo más allá del borde basal de la SZV, tal como se identifica mediante el patrón de expresión de su marcador Tbr2 (datos no mostrados). Experimentos de hibridación *in situ* en diferentes fases demostraron que los ratones Nex-CB₁^{-/-} conservaban la expresión de CB₁ en fases proliferativas tempranas en células de ZV/SZV y sólo los neuroblastos posmitóticos perdían su expresión en el día embrionario E16.5 (datos no mostrados). De acuerdo con la noción de que el receptor de CB₁ regula la diferenciación neuronal independientemente de sus acciones sobre el conjunto de células progenitoras, el aumento observado de células Satb2⁺ en CB₁^{-/-} no podía atribuirse a su expresión aberrante en células progenitoras apicales o basales (datos no mostrados). Estos hallazgos demostraron que el uso combinado de ratones condicionales Nex-CB₁^{-/-} y completos CB₁^{-/-} permite discriminar entre las acciones del receptor CB₁ en poblaciones de progenitores neurales en ZV/SZV y la regulación mediada por el receptor CB₁ de células neuronales posmitóticas en diferenciación.

EJEMPLO 4

Desarrollo deficiente de neuronas Ctip2⁺ de capa profunda en ausencia del receptor de cannabinoides CB₁

55 Para evitar las posibles interacciones confusas con la proliferación de progenitores alterada que se produce en ratones CB₁^{-/-}, se investigó el desarrollo de neuronas Ctip2⁺ de capa profunda en ratones Nex-CB₁^{-/-}. El número de células Ctip2⁺ en P2 a lo largo de la placa cortical se redujo en ratones Nex-CB₁^{-/-} en comparación con sus camadas WT (figura 5A). De importancia, este efecto era todavía evidente en P8 (figura 5D). La acción reguladora directa del receptor CB₁ en la especificación del linaje piramidal se confirmó analizando ratones Dlx5/6-CB₁^{-/-}, que carecen de CB₁ en neuronas gabaérgicas del prosencéfalo (Monory *et al.*, 2006). La delección del receptor CB₁ en el linaje

gabaérgico no interfirió con la generación de células Ctip2⁺ (figura 5B). Corroborando una supuesta acción reguladora del tono de eCB en la especificación de capa cortical, los ratones deficientes en hidrolasa de amida de ácido graso (FAAH), una enzima principal que degrada eCB, mostraban un aumento del número de células Ctip2⁺ y, por tanto, un fenotipo opuesto a ratones Nex-CB1^{-/-} (figura 5C). Además, la hibridación *in situ* para Clim1 (Ldb2), un factor de transcripción que marca neuronas de proyección subcerebral de la capa 5 (Azim *et al.*, 2009), reveló una reducción intensa de neuronas Clim1⁺ en ratones Nex-CB1^{-/-} (datos no mostrados). Además, el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de extractos nucleares de cortezas cerebrales Nex-CB1^{-/-} mostró niveles de proteína Ctip2 reducidos en relación con la expresión de Satb2, mientras que se observó lo opuesto en extractos corticales FAAH^{-/-} (figura 5E).

10 EJEMPLO 5

El receptor de cannabinoides CB₁ regula el desarrollo de neuronas de proyección subcerebral

Se encontraron proyecciones corticofugales aberrantes durante la delección de CB₁. El análisis de microscopía de inmunofluorescencia de la molécula de adhesión de células neurales L1 reveló déficits de proyecciones subcorticales en ratones P2 CB₁^{-/-} y Nex-CB₁^{-/-}, pero no en ratones Dlx5/6-CB₁^{-/-} (datos no mostrados). El límite corticoestriatal de ratones Nex-CB₁^{-/-} mostraba trayectorias axonales alteradas y, en la zona intermedia (IZ), eran evidentes fascículos desorganizados y agrandados (datos no mostrados). Para investigar el papel del receptor CB₁ en proyecciones axonales subcerebrales, se realizaron experimentos de electroporación *in utero* con pCAG-DsRed en ratones CB₁^{-/-} en el día embrionario E13.5, y se analizaron las proyecciones DsRed⁺ en el día embrionario E16.5. La naturaleza corticoespinal de los axones marcados con DsRed se confirmó mediante la inmunoreactividad de Ctip2⁺ mostradas por somas DsRed⁺. En embriones silvestres (WT), los axones marcados que se proyectan expresaban el receptor CB₁ y mostraban trayectorias rectas, mientras que se observaron profundas alteraciones de los axones DsRed⁺ exploradores en la IZ de ratones deficientes en CB₁ (imágenes no mostradas). Para confirmar de manera más precisa la naturaleza exacta de estas alteraciones de proyecciones subcorticales, se realizó análisis de inmunohistoquímica de proteína cinasa C_γ (PKC_γ), porque esta proteína está presente en tractos corticoespinales. Similar al patrón aberrante de inmunofluorescencia de L1, eran evidentes trayectorias axonales anómalas de tractos marcados con PKC_γ en la unión corticoestriatal en P8 en ratones Nex-CB₁^{-/-} en comparación con capas silvestres. Aunque no se observaron alteraciones importantes del tracto corticoespinal en el rombencéfalo posterior de Nex-CB₁^{-/-}, estos animales tenían proyecciones de NMCE aberrantes a medida que los axones atravesaban la protuberancia, alcanzando esas proyecciones la médula espinal de una manera notablemente menos organizada. No se muestran imágenes inmunohistoquímicas.

Para atribuir inequívocamente un papel para el receptor CB₁ en el desarrollo de neuronas subcerebrales de la capa 5, los inventores aprovecharon los ratones Thy1-YFP-H, en los que se produce la expresión de la proteína fluorescente bajo el control del promotor específico neural del gen de Thy1 selectivamente en neuronas de proyección de la capa 5, permitiendo por tanto la visualización de los tractos corticoespinales (Feng *et al.*, 2000; Tomassy *et al.*, 2010). Se cruzaron ratones CB₁^{-/-} y Thy1-YFP-H para estudiar la especificación y el desarrollo de neuronas corticoespinales y tractos axonales en ausencia del receptor CB₁. En P21, era evidente una reducción significativa de somas marcados fluorescentemente en la capa cortical 5 (figura 6), mientras que no se observaron cambios en el hipocampo (datos no mostrados). La delección del receptor CB₁ indujo un fenotipo aberrante de neuronas de proyección subcerebral similar al que se observó mediante inmunohistoquímica de PKC_γ. Por tanto, eran visibles axones desencaminados mientras atravesaban la cápsula interna en la unión corticoestriatal en ratones CB₁^{-/-}:Thy1-YFP-H, los axones que alcanzaban la protuberancia se redujeron y los restantes mostraban alteraciones de fasciculación. Finalmente, de acuerdo con un papel del receptor CB₁ en el desarrollo de neuronas de proyección subcerebral, el trazado con Dil anterógrado de la corteza motora de ratones Nex-CB₁^{-/-} confirmó la existencia de fibras desencaminadas que se ramificaban de los tractos y se desviaban de su trayectoria normal en la unión corticoestriatal. No se muestran imágenes inmunohistoquímicas.

EJEMPLO 6

El receptor de cannabinoides CB₁ regula la función de neuronas motoras corticoespinales

La disminución de la población de células Ctip2⁺ y la alteración de las proyecciones axonales subcerebrales observadas en ratones CB₁^{-/-} motivó a los inventores a investigar si estas alteraciones de las proyecciones de NMCE dan como resultado una función motora cortical defectuosa. La evaluación de la tarea de alcance de gránulos especializada, que es dependiente de la conectividad mediada por NMCE (Tomassy *et al.*, 2010), reveló que ratones CB₁^{-/-} adultos tenían una alteración notable de la función motora fina (figura 7A). El número total de ensayos realizados durante la tarea especializada no fue significativamente diferente entre los dos grupos de ratones, y la actividad motora no especializada no se vio afectada tampoco (figuras 7C y 7D), indicando por tanto la selectividad de los déficits de función motora especializada. La observación de que la actividad motora general, incluyendo la distancia total recorrida, el tiempo de reposo y los movimientos rápidos (prueba ActiTrack), así como la coordinación motora (prueba RotaRod), no diferían entre ratones CB₁^{-/-} y WT (figura 8A), proporcionó respaldo adicional para esta selectividad. Además, y junto con los hallazgos neuroanatómicos descritos anteriormente, los déficits en la actividad motora especializada observados en ratones CB₁^{-/-} se recapitulaban en ratones Nex-CB₁^{-/-} (figura 7B).

Se obtuvo una validación adicional del fenotipo de función motora especializada anómala hallado en animales $CB_1^{-/-}$ usando la prueba de escaleras, que también refleja la actividad motora fina y es útil para evaluar la alteración motora tras lesiones corticales (Brooks y Dunnett, 2009). Ratones $CB_1^{-/-}$ y $Nex-CB_1^{-/-}$ tenían un peor rendimiento que sus respectivas camadas WT en su capacidad para agarrar los gránulos de alimento más difíciles (escalones 4-8) (figuras 7E, 7F y 7G). Además, la recuperación de gránulos que no suponían un reto en la prueba de escaleras (escalones 1-3) no era diferente entre genotipos (figura 7H), confirmando por tanto la alteración selectiva de la actividad motora fina. Finalmente, también se usó la prueba de retirada de parches, que también evalúa la función sensoriomotora. Los ratones $Nex-CB_1^{-/-}$ eran significativamente menos eficaces que sus camadas WT en la retirada de un trozo de cinta adhesiva de sus patas traseras, tal como se demostró por el mayor número de contactos requeridos para la retirada del parche (figura 8B, izquierda). Esta disminución del rendimiento de ratones $Nex-CB_1^{-/-}$ en la retirada de parches reflejaba una alteración de la función motora fina en vez de una percepción alterada del parche, tal como indica la cuantificación del tiempo de latencia para el primer intento de retirar el parche y el tiempo total empleado retirando el parche, que no era significativamente diferente entre ambos genotipos (figura 8B, centro y derecha).

15 CONCLUSIONES

El receptor CB_1 , al prevenir la represión mediada por $Satb2$, aumentó la actividad del promotor de $Ctip2$ y la generación de neuronas $Ctip2^+$.

Una determinación del destino neurogénico desequilibrada hallada en ratones completos $CB_1^{-/-}$ y en ratones específicos de neuronas glutamatérgicas $Nex-CB_1^{-/-}$ indujo alteraciones manifiestas en la generación de neuronas motoras corticoespinales y la conectividad subcerebral, dando como resultado de ese modo una alteración de la función motora especializada en ratones adultos. La delección genética de receptores CB_1 en ratones $Thy1-YFP-H$ provocó alteraciones en el desarrollo del tracto corticoespinal.

El receptor CB_1 se requiere para la generación de neuronas corticales de capa profunda, específicamente de neuronas motoras superiores corticoespinales, acoplando señales de endocannabinoides del nicho neurogénico al eje $Ctip2/Satb2$ proneurogénico intrínseco, dictando por tanto una especificación de neuronas de proyección subcerebral y función motora corticoespinal apropiadas en la edad adulta.

Bibliografía citada

- Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzman M, Galve-Roperh I (2005) The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J* 19:1704-1706.
- 30 Alcaro EA, Chirivella L, Dautzenberg M, Dobrev G, Farinas I, Grosschedl R, McConnell SK (2008) $Satb2$ regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Neuron* 57:364-377.
- Arlotta P, Molyneaux BJ, Chen J, Inoue J, Kominami R, Macklis JD (2005) Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* 45:207-221.
- 35 Azim E, Shnyder SJ, Cederquist GY, Sohur US, Macklis JD (2009) $Lmo4$ and $Clim1$ progressively delineate cortical projection neuron subtypes during development. *Cereb Cortex* 19 Suppl 1:i62-69.
- Blazquez C *et al.* (2011) Loss of striatal type 1 cannabinoid receptors is a key pathogenic factor in Huntington's disease. *Brain* 134:119-136.
- Briscoe J, Sussel L, Serup P, Hartigan-O'Connor D, Jessell TM, Rubenstein JLR, Ericson J (1999) Homeobox gene $Nkx2.2$ and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signaling. *Nature* 398(6728): 622-7.
- 40 Britanova O, de Juan Romero C, Cheung A, Kwan KY, Schwark M, Gyorgy A, Vogel T, Akopov S, Mitkovski M, Agoston D, Sestan N, Molnar Z, Tarabykin V (2008) $Satb2$ is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex. *Neuron* 57:378-392.
- Brooks SP, Dunnett SB (2009) Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci* 10:519-529.
- 45 Buijn, LI, Miller, TM, Cleveland, DW (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27: 723-749.
- Chaddah MR, Dickie BG, Lyall D, Marshall CJ, Sykes JB, Buijn LI (2011) Meeting report of the International Consortium of Stem Cell Networks' Workshop Towards Clinical Trials Using Stem Cells for Amyotrophic Lateral Sclerosis/Motor Neuron Disease. *Amyotroph Lateral Scler* 12(5): 315-317.
- 50 Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L (2009) Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 27(3):275-280.
- Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH (2001) Supersensitivity to

- anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9371-9376.
- Chen B, Wang SS, Hattox AM, Rayburn H, Nelson SB, McConnell SK (2008) The *Fezf2-Ctip2* genetic pathway regulates the fate choice of subcortical projection neurons in the developing cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:11382-11387.
- Demuth DG, Molleman A (2006) Cannabinoid signaling. *Life Sci* 78(6):549-563.
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321(5893):1218-1221.
- Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yonemura S, Matsumura M, Wataya T, Nishiyama A, Muguruma K, Sasai Y (2008) Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* 3(5):519-32.
- Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, van Heyningen V, Jessell TM, Briscoe J (1997) *Pax6* controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded. *Cell*. 90(1): 169-80.
- Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28:41-51.
- Gaspard, N, Bouschet, T, Hourez, R, Dimidschstein, J, *et al.* (2008) An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature* 455(7211):351-357.
- Han W, Kwan KY, Shim S, Lam MM, Shin Y, Xu X, Zhu Y, Li M, Sestan N (2011) *TBR1* directly represses *Fezf2* to control the laminar origin and development of the corticospinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:3041-3046.
- Hester ME, Murtha MJ, Song S, Rao M, Miranda CJ, Meyer K, Tian J, Boulting G, Schaffer DV, Zhu MX, Pfaff SL, Gage FH, Kaspar BK (2011) Rapid and efficient generation of functional motor neurons from human pluripotent stem cells using gene delivered transcription factor codes. *Mol Ther* 19(10):1905-1912.
- Hevner RF, Shi L, Justice N, Hsueh Y, Sheng M, Smiga S, Bulfone A, Goffinet AM, Campagnoni AT, Rubenstein JL (2001) *Tbr1* regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* 29:353-366.
- Ideguchi M, Palmer TD, Recht LD, Weimann JM (2010) Murine embryonic stem cell-derived pyramidal neurons integrate into the cerebral cortex and appropriately project axons to subcortical targets. *J Neurosci* 30(3):894-904.
- Karumbayaram S, Novitsch BG, Patterson M, Umbach JA, Richter L, Lindgren A, Conway AE, Clark AT, Goldman SA, Plath K, Wiedau-Pazos M, Kornblum HI, Lowry WE (2009) Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem cells* 27(4):806-811.
- Lai T, Jabaudon D, Molyneaux BJ, Azim E, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD (2008) *SOX5* controls the sequential generation of distinct corticofugal neuron subtypes. *Neuron* 57:232-247.
- Maekawa S, Al-Sarraj S, Kibble M, Landau S, Parnavelas J, Cotter D, Everall I, Leigh PN (2004) Cortical selective vulnerability in motor neuron disease: a morphometric study. *Brain* 127:1237-1251.
- Mangelsdorf DJ, Umehara K, Kliewer SA, Borgmeyer U, Ong ES, Evans RM (1991) A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* 66(3):555-61.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutierrez SO, van der Stelt M, Lopez-Rodriguez ML, Casanova E, Schutz G, Zieglerberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302:84-88.
- Massa F, Mancini G, Schmidt H, Steindel F, Mackie K, Angioni C, Oliet SH, Geisslinger G, Lutz B (2010) Alterations in the hippocampal endocannabinoid system in diet-induced obese mice. *J Neurosci* 30:6273-6281.
- Matise MP, Auerbach W, Joyner AL (2000) Production of targeted embryonic stem cell clones in: Joyner A.L. (ed.)- *Gene Targeting, a practical approach*, 2nd edition. The Practical Approach Series, Oxford University Press.
- Mochizuki Y, Okita K (2012) Methods for iPS cell generation for basic research and clinical applications. *Biotechnol J*, 7(6):789-97.
- Monory K, Blaudzun H, Massa F, Kaiser N, Lemberger T, Schutz G, Wotjak CT, Lutz B, Marsicano G (2007) Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *PLoS Biol* 5:e269.
- Monory K *et al.* (2006) The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* 51:455-466.

- Mulder J, Aguado T, Keimpema E, Barabas K, Ballester Rosado CJ, Nguyen L, Monory K, Marsicano G, Di Marzo V, Hurd YL, Guillemot F, Mackie K, Lutz B, Guzman M, Lu HC, Galve-Roperh I, Harkany T (2008) Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8760-8765.
- 5 Nomura DK, Blankman JL, Simon GM, Fujioka K, Issa RS, Ward AM, Cravatt BF, Casida JE (2008) Activation of the endocannabinoid system by organophosphorus nerve agents. *Nat Chem Biol* 4(6):373-8.
- Ozdinler PH, Benn S, Yamamoto TH, Guzel M, *et al.* (2011) Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G(3)A transgenic ALS mice. *J Neurosci*, 31(11): 4166-4177.
- 10 Paşca SP, Portmann T, Voineagu I, Yazawa M, Shcheglovitov A, AM, Cord B, Palmer TD, Chikahisa S, Nishino S, Bernstein JA, Hallmayer J, Geschwind DH, Dolmetsch RE (2011) Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome. *Nat Med*, 17(22):1657-62.
- Renfranz PJ, Cunningham MG, McKay RD (1991) Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell*, 66(4):713-29.
- 15 Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Alonso R, Shire D, Congy C, Soubrié P, Brelière JC, Le Fur G (1995) Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci*, 56(23-24):1941-7.
- Sach M, Winkler G, Glauche V, Liepert J, Heimbach B, Koch MA, Büchel C, Weiller C (2004) Diffusion tensor MRI of early upper motor neuron involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 127: 340-350.
- 20 Shi, Y, Kirwan, P, Smith, J, Robinson, HP, *et al.* (2012) Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat Neurosci*, 15(3): 477-486, S471.
- Tomassy GS, De Leonibus E, Jabaudon D, Lodato S, Alfano C, Mele A, Macklis JD, Studer M (2010) Area-specific temporal control of corticospinal motor neuron differentiation by COUP-TFI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:3576-3581.
- 25 Wang H, Lei Q, Oosterveen T, Ericson J, Matise MP (2011) Tcf/Lef repressors differentially regulate Shh-Gli target gene activation thresholds to generate progenitor patterning in the developing CNS. *Development*, 138(17):3711-21.
- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM (2002) Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 110(3):385-97.
- 30 Wu SX, Goebbels S, Nakamura K, Kometani K, Minato N, Kaneko T, Nave KA, Tamamaki N (2005) Pyramidal neurons of upper cortical layers generated by NEX-positive progenitor cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:17172-17177.
- Xi ZX, Gilbert JG, Peng XQ, Pak AC, Li X, Gardner EL (2006) Cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251 inhibits cocaine-primed relapse in rats: role of glutamate in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 26(33):8531-6.

35 **Lista de secuencias**

- <110> Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) Universidad Complutense de Madrid
- <120> NEURONAS MOTORAS SUPERIORES CORTICOESPINALES, MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA DIFERENCIAR CÉLULAS MADRE NEURALES MODULANDO LA SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE CANNABINOIDES CB₁ Y USOS DE LOS MISMOS
- 40 <130> P8325EP00
- <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 45 <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

ES 2 670 590 T3

<220>

<223> cebador directo Clim1

<400> 1

accctcattc cccgttatt

19

5 <210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> cebador inverso Clim1

<400> 2

tggtctctcct accaccatc

19

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para obtener una neurona motora superior corticoespinal a partir de una célula madre neural, en el que dicho método comprende poner en contacto una célula madre neural en condiciones adecuadas para aumentar la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ en dicha célula y en condiciones para fomentar la dorsalización de dicha célula y en el que las condiciones adecuadas para aumentar la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ implican un aumento del número de células Ctip2⁺ Satb2⁻ con respecto a los niveles basales de al menos el 5% e implican:
 - (i) poner en contacto dicha célula madre neural con un agonista del receptor de cannabinoides CB₁ seleccionado del grupo que consiste en anandamida, 2-araquidonoilglicerol (2-AG), N-araquidonoil-dopamina, araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA), HU-210, JWH-073, WIN 55,212-2, cannabinoil, tetrahidrocannabinol (THC), 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol (11-OH-THC), levonantradol, dronabinol, AM-2201 (1-(5-fluoropentil)-3-(1-naftoil)indol), JWH-018 (1-pentil-3-(1-naftoil)indol), AM-678, 2-araquidonil gliceril éter (2-AGE, éter de noladina), palmitoiletanolamida (PEA) y CP 55,940; y/o
 - (ii) introducir en dicha célula madre neural un vector de expresión que codifica el receptor de cannabinoides CB₁ para aumentar la expresión del receptor de cannabinoides CB₁ por encima de los niveles basales, y/o
 - (iii) introducir en dicha célula madre neural un vector de expresión que codifica una enzima de síntesis de endocannabinoides para aumentar en la célula la actividad de una enzima de síntesis de endocannabinoides por encima de los niveles basales, y/o
 - (iv) introducir en dicha célula madre neural un agente que silencia una enzima de degradación de endocannabinoides seleccionada del grupo que consiste en un ARNhc, un ARNip, un ácido nucleico antisentido y una ribozima y/o poner en contacto dicha célula madre neural con un inhibidor de dicha enzima de degradación de endocannabinoides, y

en el que las condiciones para fomentar la dorsalización de dicha célula implican poner en contacto dicha célula madre neural con un agente de dorsalización seleccionado de:

 - a) un inhibidor de Sonic hedgehog seleccionado del grupo que consiste en 3',5'-monofosfato cíclico, sal de sodio de N₆O₂'-dibutiril-adenosina, AY 9944, KAAD-ciclopamina, ciclopamina, forskolina, GANT58, GANT61, JK184, HPI-1, HPI-3, jervina, SANT-1, GDC-0449, robotnikinina e IPI-926; y
 - b) un inhibidor de Smad seleccionado del grupo que consiste en nogina, dorsomorfina, SB431542, LDN-193189, Lefty, activina, TGF-beta y combinaciones de los mismos.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el agonista del receptor de cannabinoides CB₁ se selecciona del grupo que consiste en HU-210 y araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA).
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la enzima de síntesis de endocannabinoides es diacilglicerol lipasa.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enzima de degradación de endocannabinoides se selecciona del grupo que consiste en hidrolasa de amida de ácido graso (FAAH) y monoacilglicerol lipasa (MAGL).
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el inhibidor de la enzima de degradación de endocannabinoides se selecciona del grupo que consiste en URB597, PF-622, PF-750, PF-04457845, PF3845 y JZL184.
6. Método según la reivindicación 5, en el que el inhibidor de la enzima de degradación de endocannabinoides se selecciona del grupo que consiste en JZL184 y URB597.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el inhibidor de Sonic hedgehog es ciclopamina y/o el inhibidor de Smad se selecciona del grupo que consiste en nogina, SB431542 y una combinación de los mismos.
8. Composición que comprende un agente que puede aumentar la señal mediada por el receptor de cannabinoides CB₁ en una célula madre neural, en la que dicho aumento implica un aumento del número de células Ctip2⁺ Satb2⁻ con respecto a los niveles basales de al menos el 5%, seleccionándose dicho agente del grupo que consiste en:
 - (i) un agonista del receptor de cannabinoides CB₁ seleccionado del grupo que consiste en anandamida, 2-araquidonoilglicerol (2-AG), N-araquidonoil-dopamina, araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA), HU-210, JWH-073, WIN 55,212-2, cannabinoil, tetrahidrocannabinol (THC), 11-hidroxi- Δ^9 -

tetrahidrocannabinol (11-OH-THC), levonantradol, dronabinol, AM-2201 (1-(5-fluoropentil)-3-(1-naftoil)indol), JWH-018 (1-pentil-3-(1-naftoil)indol), AM-678, 2-araquidonil gliceril éter (2-AGE, éter de noladina), palmitoiletanolamida (PEA) y CP 55,940; y/o

(ii) un inhibidor de una enzima de degradación de endocannabinoides

- 5 y un agente de dorsalización seleccionado de:
- a) un inhibidor de Sonic hedgehog seleccionado del grupo que consiste en 3',5'-monofosfato cíclico, sal de sodio de N₆,O₂'-dibutiril-adenosina, AY 9944, KAAD-ciclopamina, ciclopamina, forskolina, GANT58, GANT61, JK184, HPI-1, HPI-3, jervina, SANT-1, GDC-0449, robotnikinina e IPI-926; y
- 10 b) un inhibidor de Smad seleccionado del grupo que consiste en nogina, dorsomorfina, SB431542, LDN-193189, Lefty, activina, TGF-beta y combinaciones de los mismos.
9. Composición según la reivindicación 8, en la que el agonista del receptor de cannabinoides CB₁ se selecciona del grupo que consiste en HU-210 y araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA).
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 y 9, en la que el inhibidor de una enzima de degradación de endocannabinoides se selecciona del grupo que consiste en URB597, PF-622, PF-750, PF-04457845, PF3845 y JZL184.
- 15 11. Composición según la reivindicación 10, en la que el inhibidor de una enzima de degradación de endocannabinoides se selecciona del grupo que consiste en JZL184 y URB597.
12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en la que el inhibidor de Sonic hedgehog es ciclopamina y/o el inhibidor de Smad se selecciona del grupo que consiste en nogina, SB431542 y una combinación de los mismos.
- 20 13. Uso *in vitro* de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para obtener una neurona motora superior corticoespinal a partir de una célula madre neural.

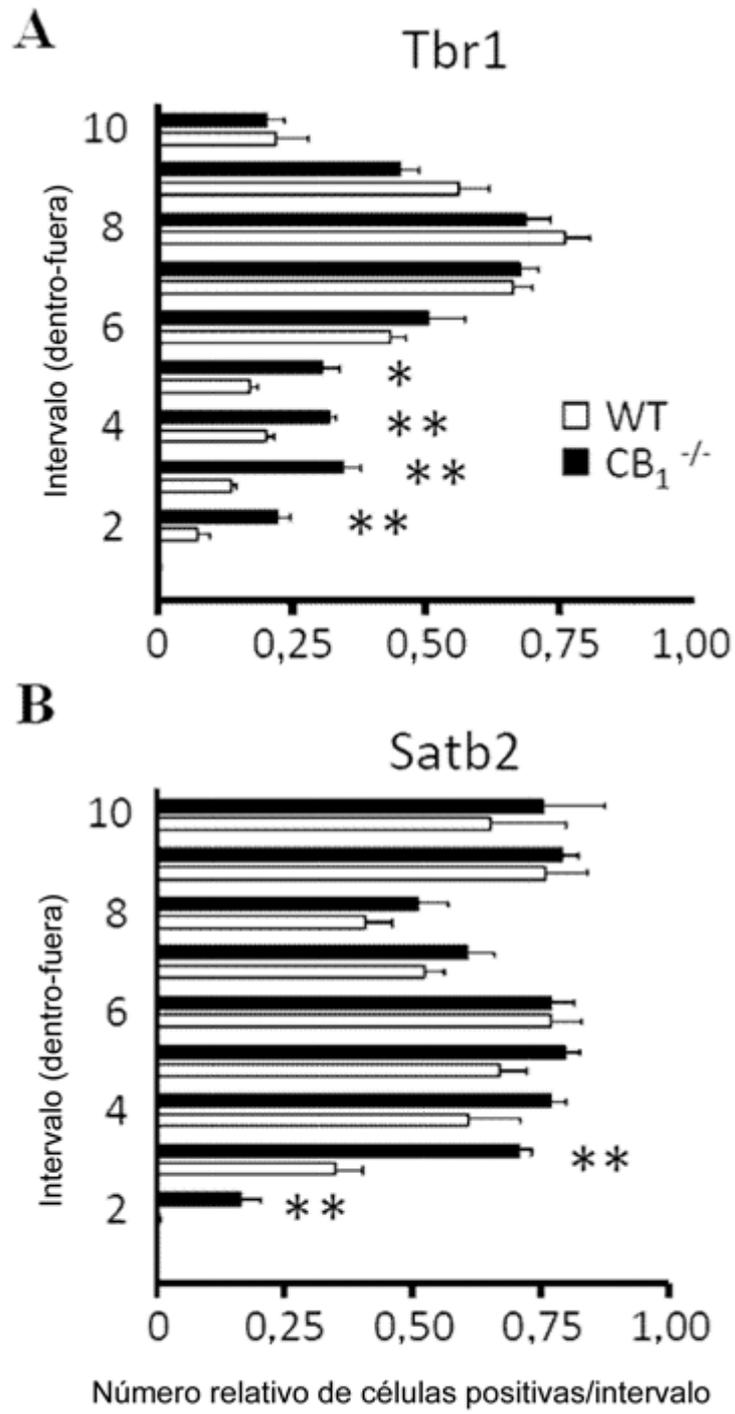


FIG. 1

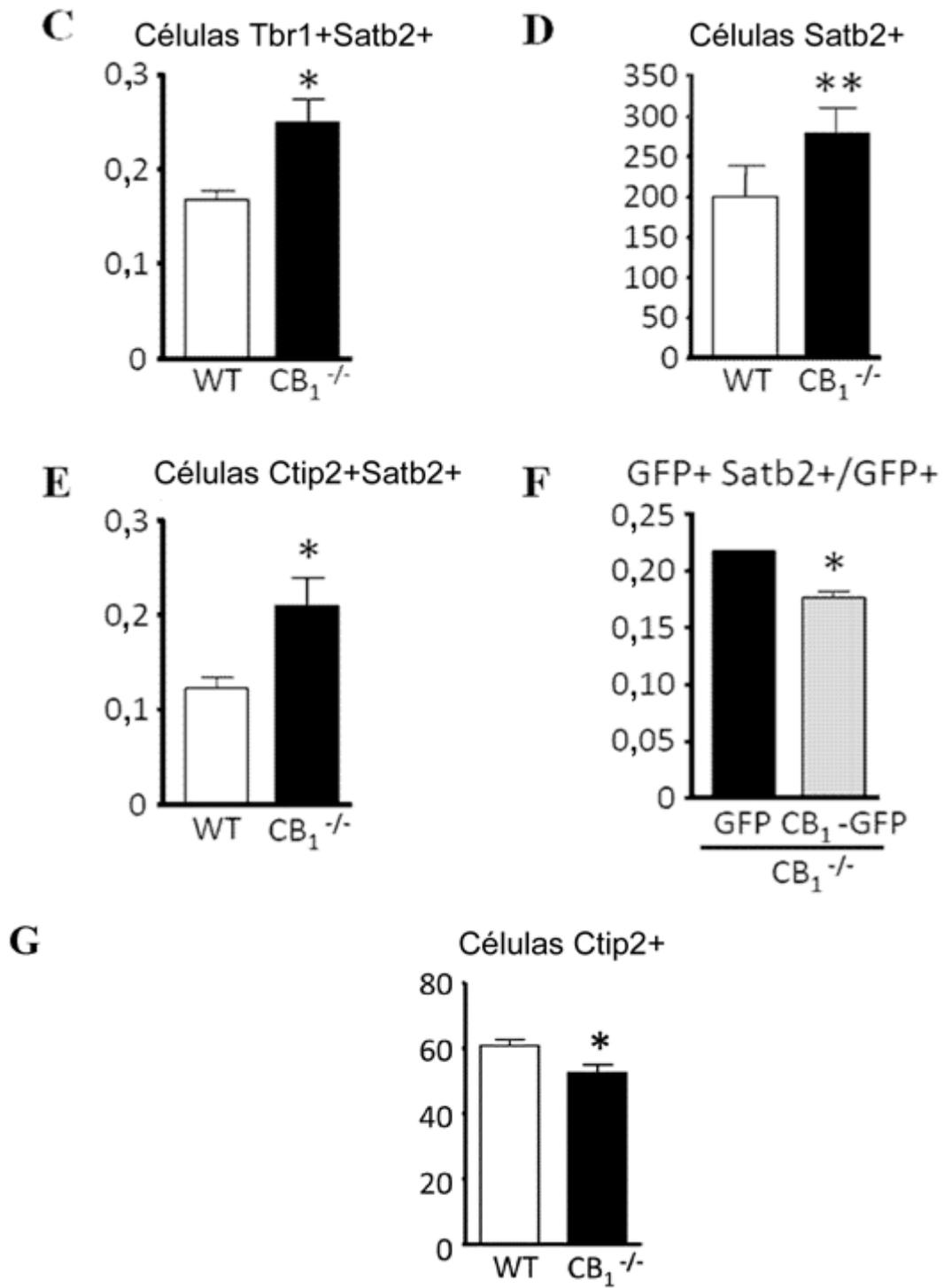


FIG. 1

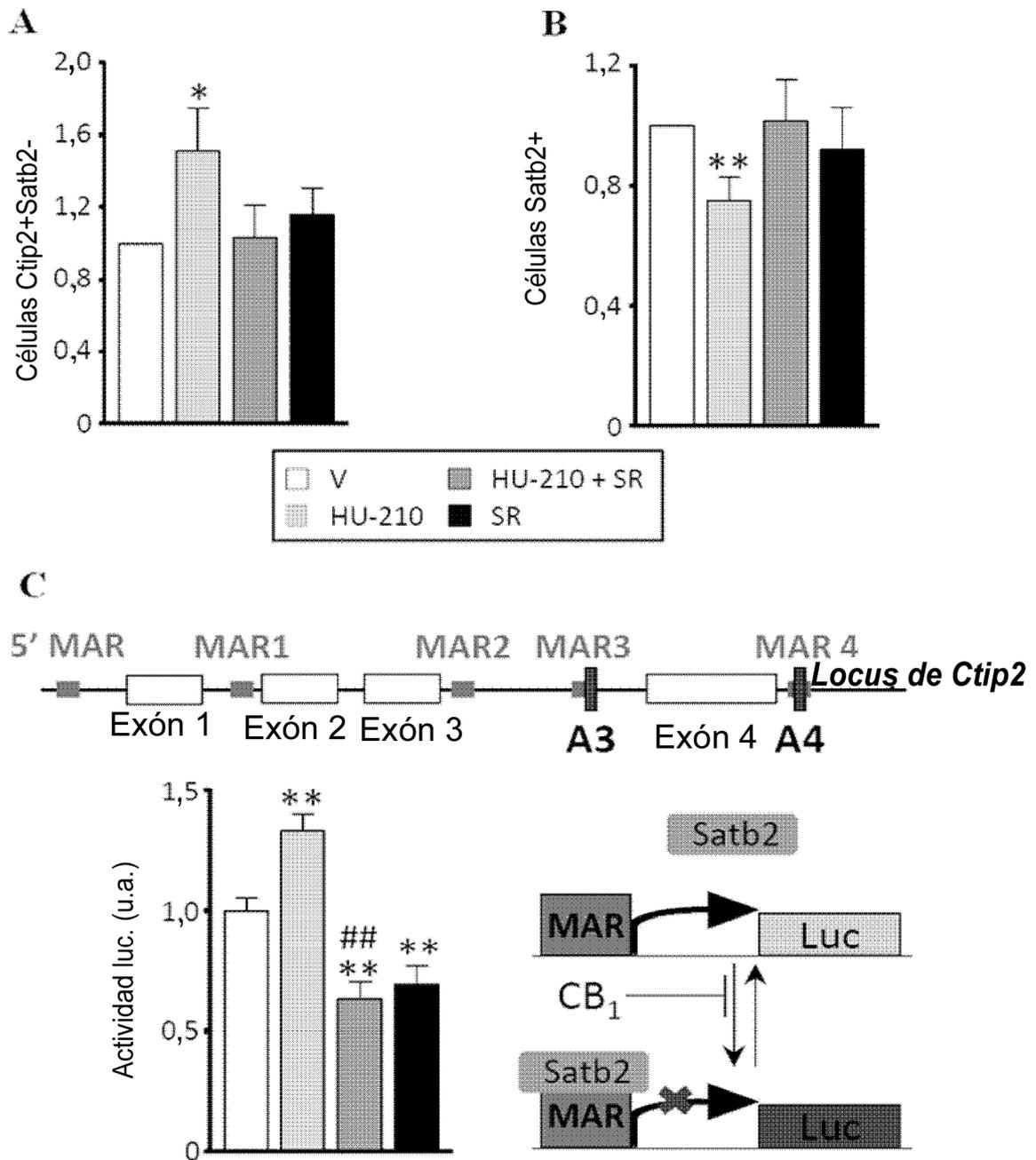


FIG. 2

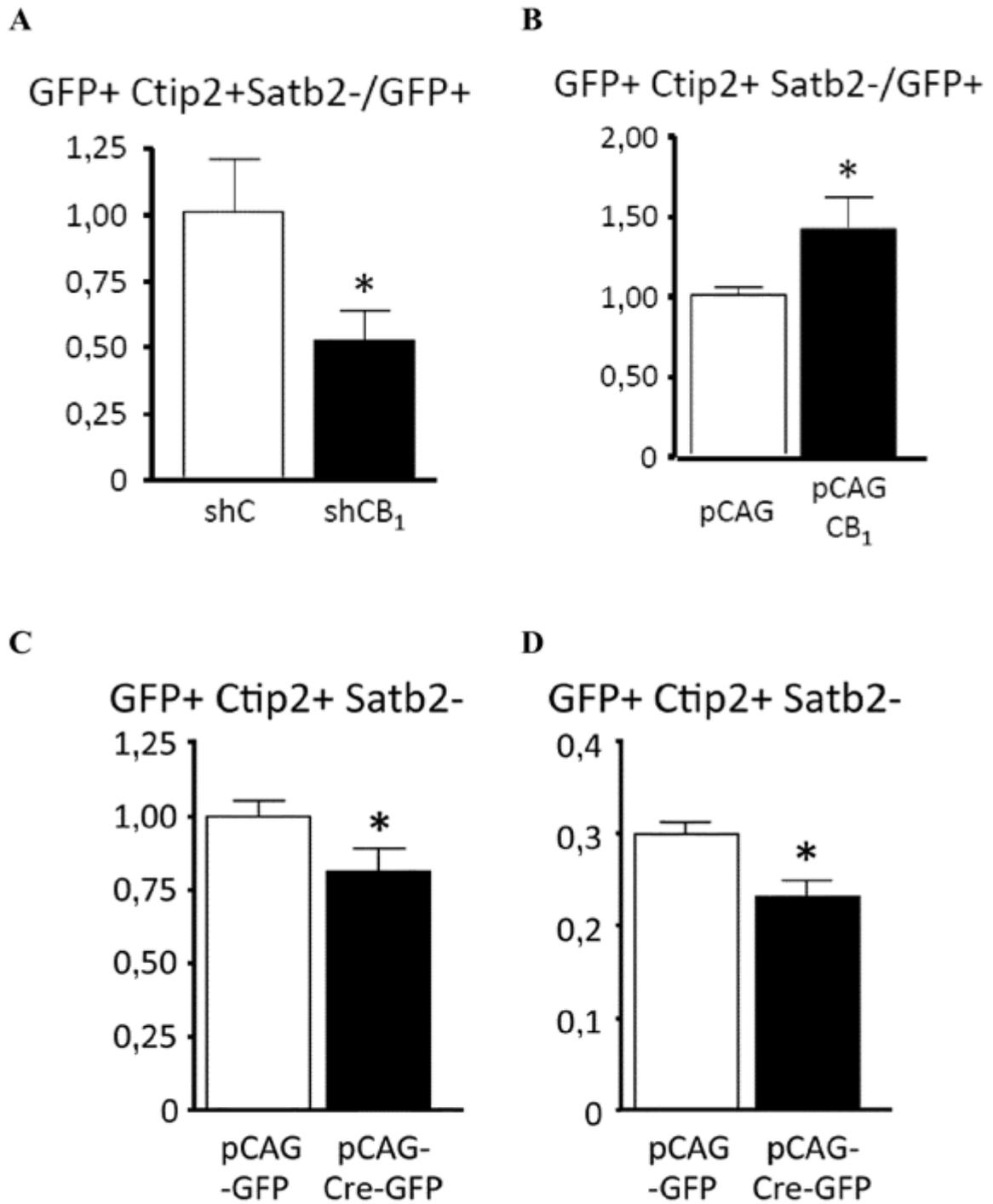
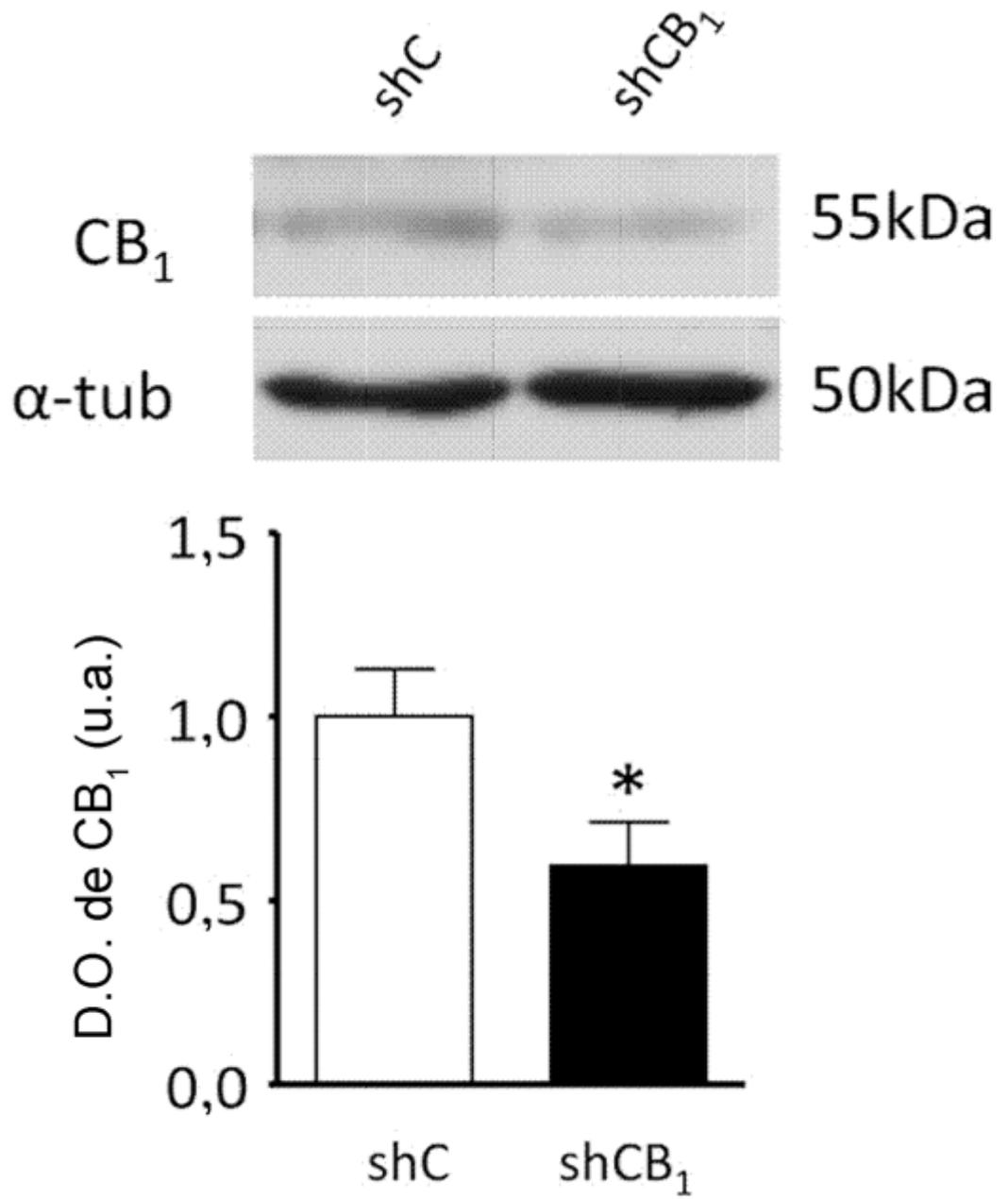


FIG. 3

E**FIG. 3**

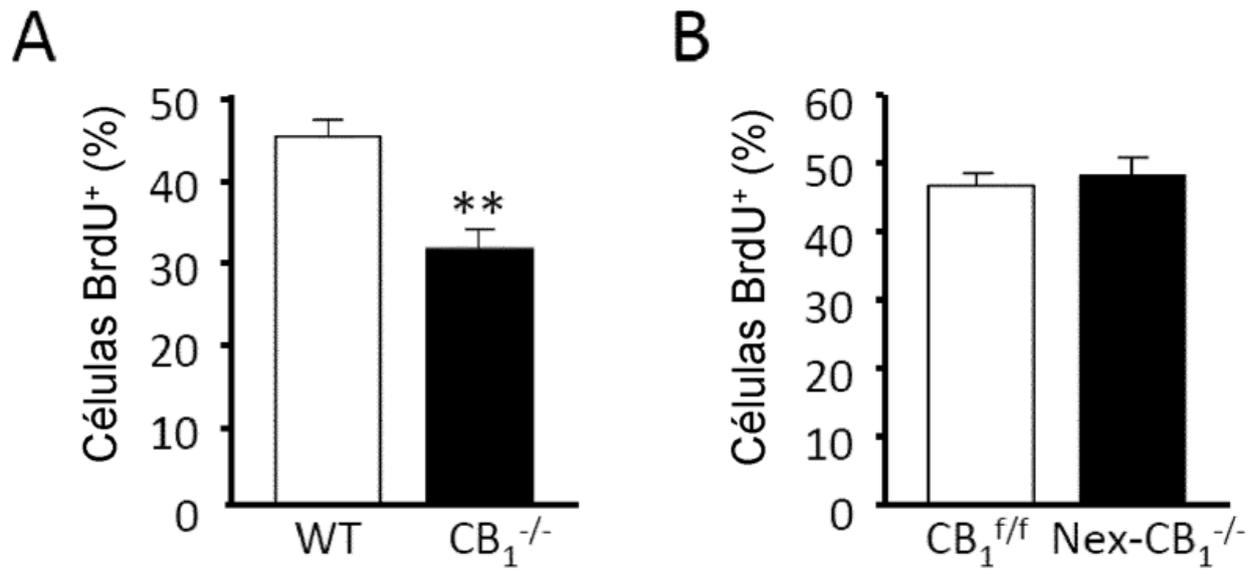


FIG. 4

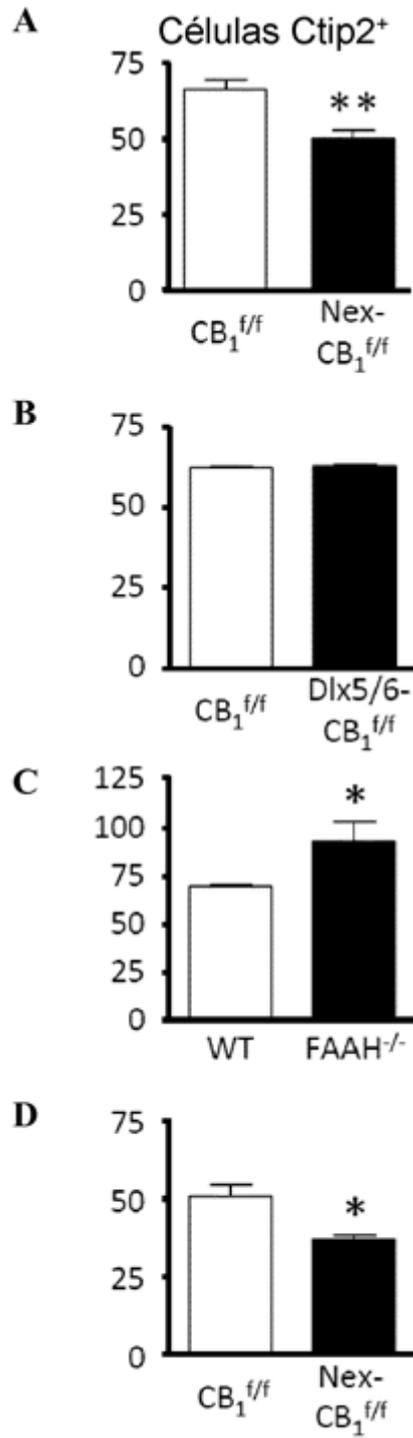


FIG. 5

E

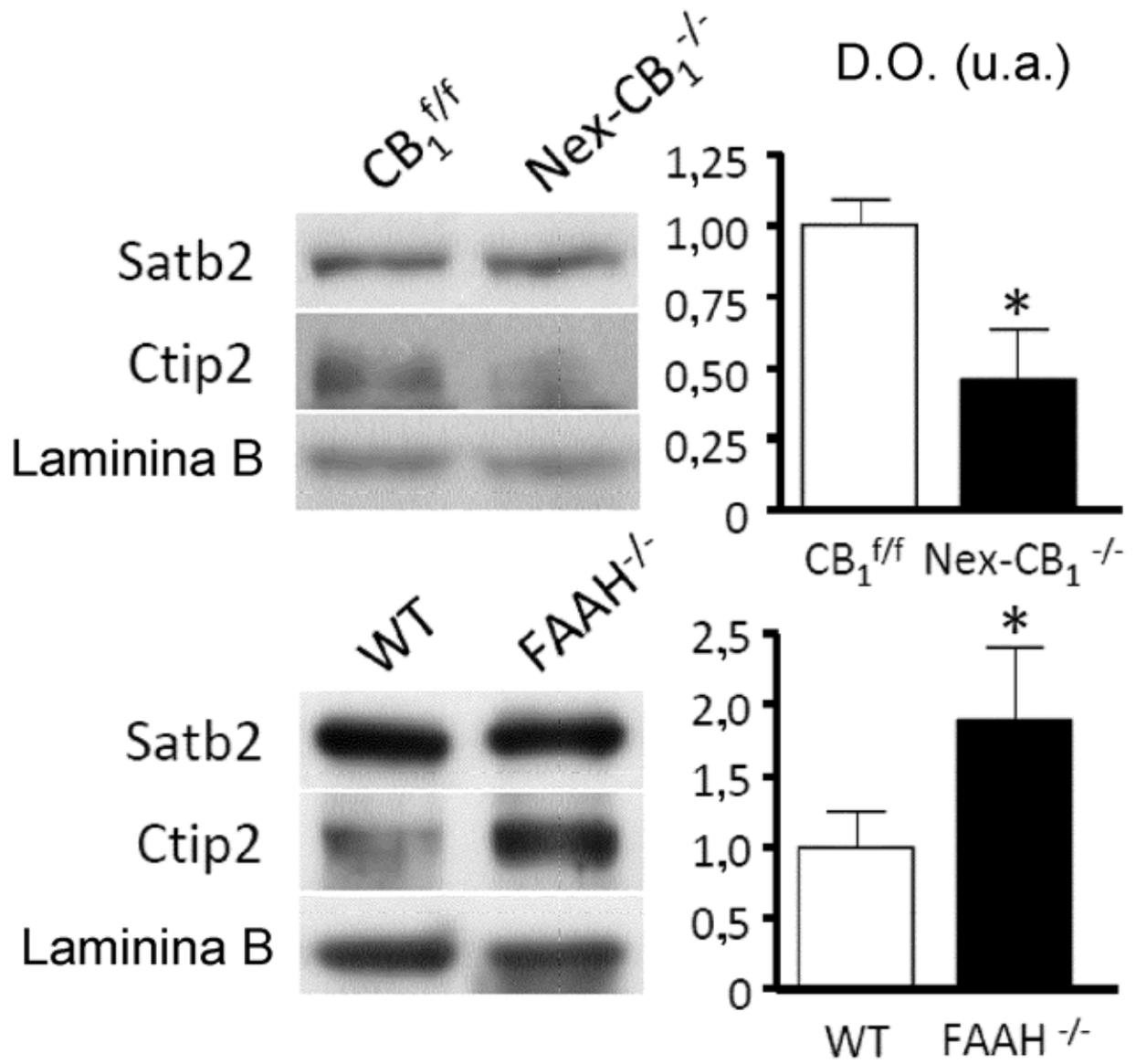


FIG. 5

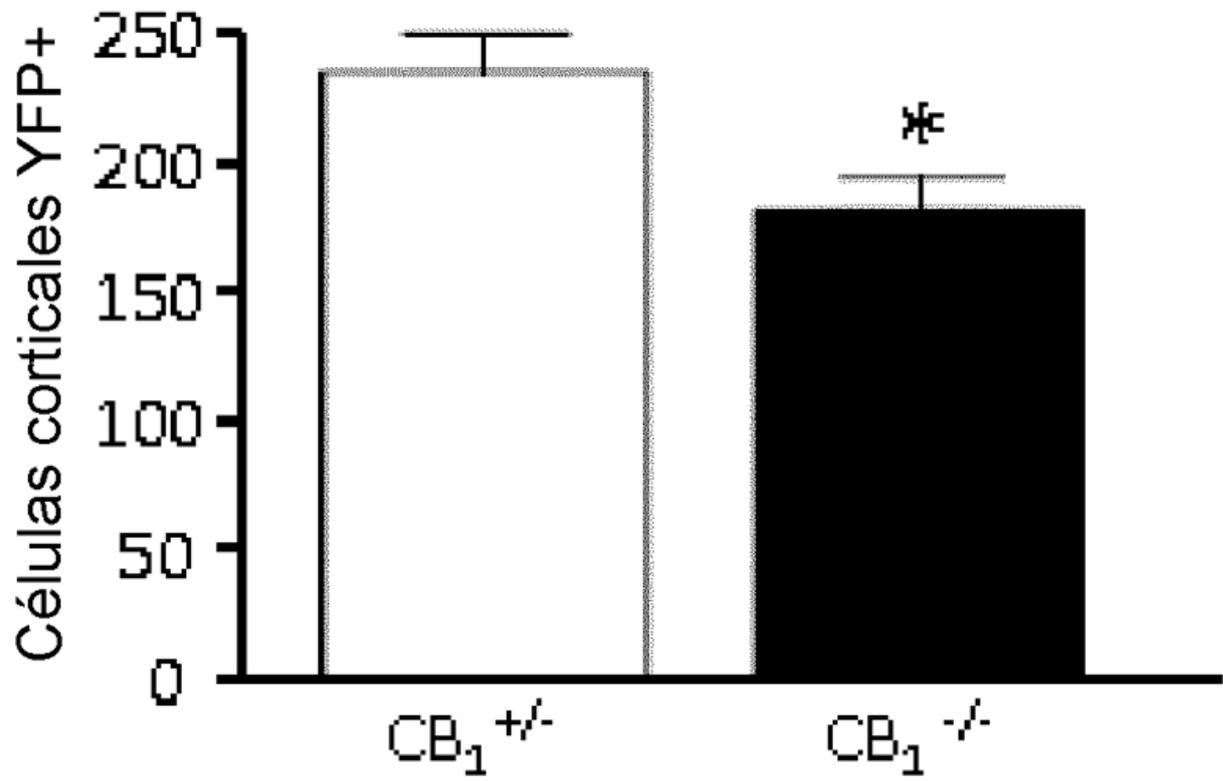


FIG. 6

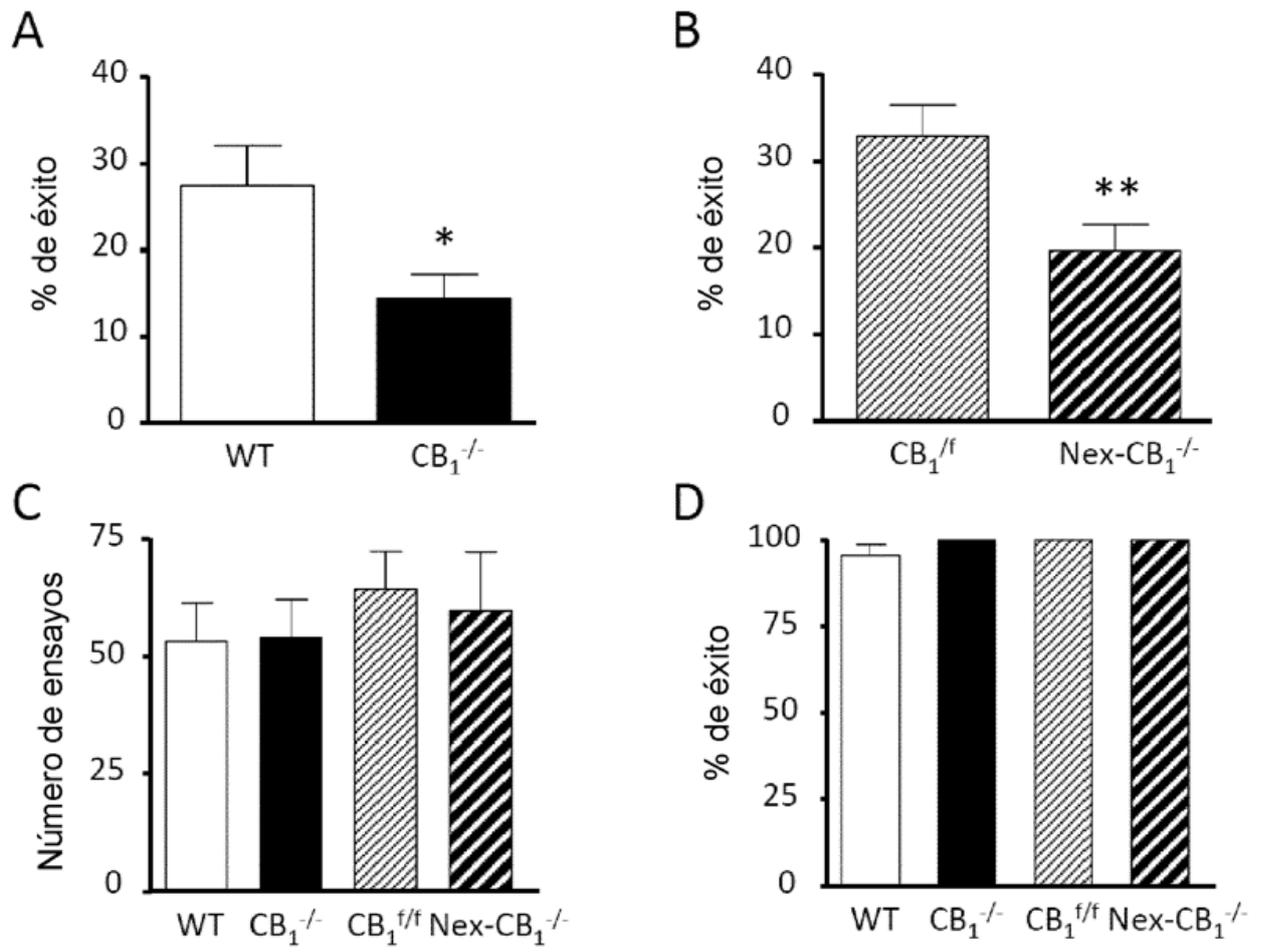


FIG. 7

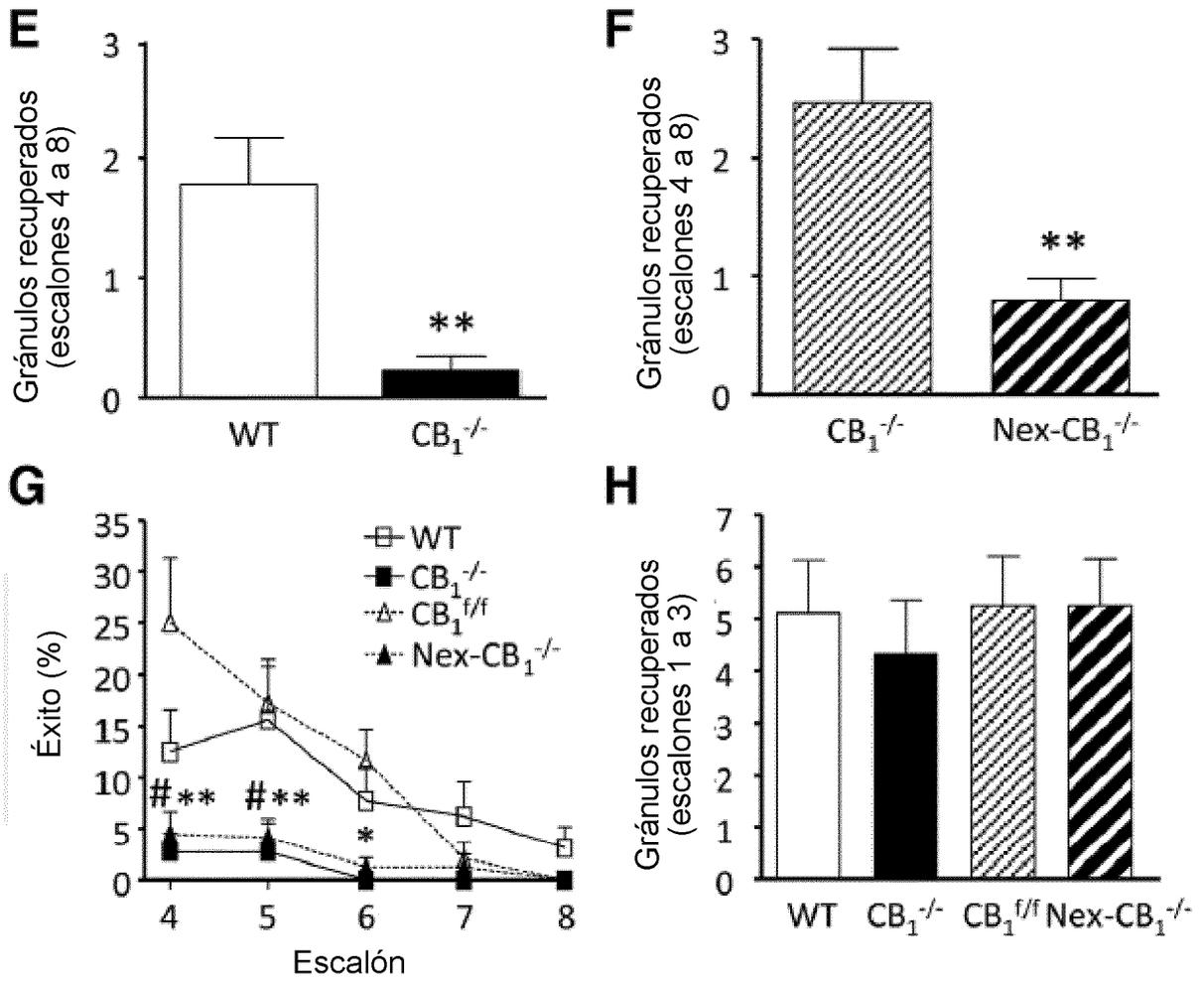


FIG. 7

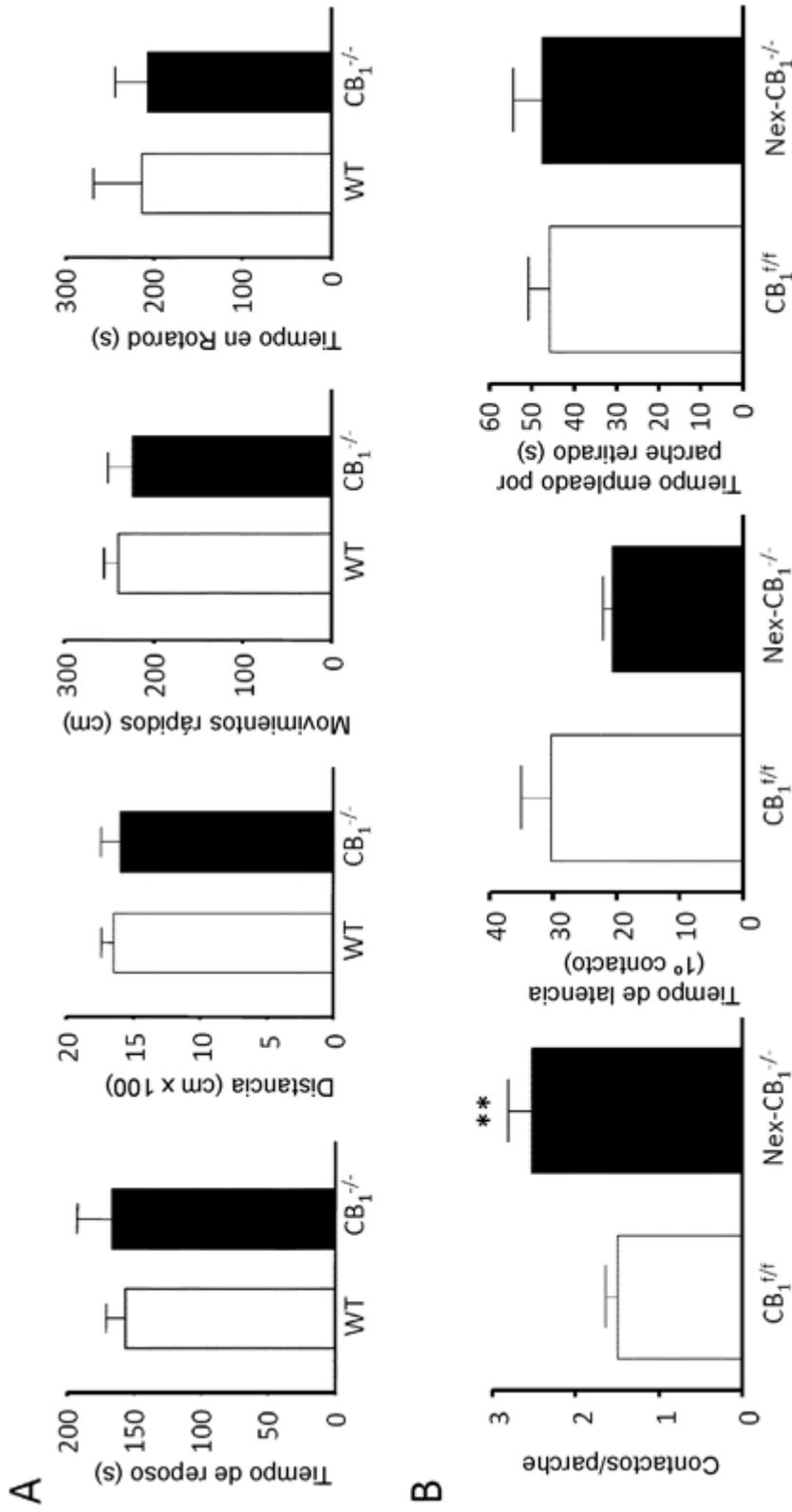


FIG. 8