

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 745**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/07 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/079 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2010 PCT/KR2010/005892**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2011 WO11055899**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2010 E 10798707 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2502987**

54 Título: **Método eficiente y universal para inducir la diferenciación de células nerviosas a partir de células madre pluripotentes**

30 Prioridad:

06.11.2009 KR 20090107235

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

27.09.2018

73 Titular/es:

**S-BIOMEDICS (100.0%)
(Uil Venture Bldg., Seongsu-dong 2-ga)4, 28,
Seongsui-ro 26-gil, Seongdong-gu
Seoul 04797, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, DONG-WOOK y
KIM, DAE-SUNG**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 683 745 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método eficiente y universal para inducir la diferenciación de células nerviosas a partir de células madre pluripotentes

5

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a un método para inducir la diferenciación neural de células madre seleccionadas del grupo que consiste en células madre embrionarias humanas (hESC) y células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC). En más detalle, la presente invención se refiere a un método para inducir la diferenciación neural de células madre usando dorsomorfina y 4-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)benzamida.

15 Antecedentes de la técnica

Las BMP (proteínas morfogenéticas óseas) pertenecen a una subfamilia de la superfamilia de TGF-beta (factor de crecimiento transformante beta). La ruta del TGF-beta desempeña un papel central en diversas rutas de transducciones de señales que regulan el crecimiento y la diferenciación en vertebrados e invertebrados. La familia de TGF-beta está dividida en dos grupos principales; (a) grupo de BMP, y (b) grupo de TGF-beta/activina. Inicialmente, las BMP se han aislado como proteínas que inducen la formación de hueso y condrocito en un cuerpo, y después se encontró que tenían muchas actividades reguladoras durante la morfogénesis del desarrollo de vertebrados e invertebrados. Hasta ahora, se han identificado no menos de 30 tipos de BMP en una variedad de especies incluyendo *Drosophila* y *C. elegans* (Ducy P *et al.*, *The family of bone morphogenetic proteins. Kidney Int.*, 57 (6):2207-14 (2000)).

Aunque las BMP se encontraron primero como proteínas que inducen la formación de hueso y cartílago en un cuerpo, varias BMP tienen una actividad biológicamente crítica en varios tipos de células incluyendo células neurales. Por ejemplo, las BMP se asocian con crecimiento y diferenciación celular, apoptosis, formación de neuroectodermo y mesodermo, diferenciación del sistema nervioso (por ejemplo, testículos, órganos digestivos, riñón, pulmón, dientes, etc.) y la asimetría derecha-izquierda (Wozney JM *et al.* *The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. Eur J Oral Sci.*, 106: 160-6 (1998)).

La ruta de señalización de activina/nodal (miembro de la superfamilia de TGF- β) es esencial para retener la pluripotencia en células madre embrionarias humanas y células madre de epiblasto de ratón. Además, la ruta de señalización de activina/nodal es importante para desarrollar el mesodermo en vertebrados.

Las células madre son un nombre genérico para células indiferenciadas de una fase anterior a la diferenciación hacia cada célula que consiste en tejido, y después diferenciadas a células específicas por estímulos de diferenciación específicos. Comparadas con células diferenciadas con división celular detenida, las células madre tienen características de proliferación (expansión) capaces de producir células que se autorrenuevan a través de división celular, y también se pueden diferenciar en otros linajes por estímulos medioambientales o diferenciales debido al potencial de diferenciación en células específicas por estímulos de diferenciación, lo que sugiere que las células madre tiene plasticidad para la diferenciación.

Recientemente, las células madre se han enfocado enormemente en agentes celulares terapéuticos. Prácticamente, se han ejecutado activamente muchos estudios para células madre como agentes terapéuticos celulares para tratar numerosas enfermedades neurológicas causadas por daños a neuronas. En particular, las enfermedades de nervios craneales se han supuesto como la diana más adecuada para tratamiento de trasplante celular que otras enfermedades en los sentidos de que se espera que células externamente trasplantadas tengan supervivencia a largo plazo ya que el tejido de nervio craneal no muestra casi inmunorechazo a diferencia de otros tejidos.

En relación a esto, se ha intentado actualmente aplicar células madre para tratar un trastorno tal como ictus, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad desmielizante y lesión de la médula espinal (Isacon O, Deacon T, *Trends. Neurosci.*, 10: 477-482 (1997); Studer *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 1: 290-295 (1998)).

Mientras tanto, se ha demandado con urgencia una técnica para diferenciar las células madre a células específicas de una manera eficaz para aumentar la utilidad clínica de las células madre como agentes terapéuticos celulares.

El documento WO 2005/003320 divulga un método para la diferenciación neural de células madre, y en más detalle, un método para inducir que células madre se diferencien a células neurales que comprende las etapas de: (a) cultivar las células madre con factor de crecimiento de fibroblastos básico; (b) cultivar las células de la etapa (a) con factor de crecimiento de fibroblastos 8 y Sonic Hedgehog; (c) cultivar las células de la etapa (b) con factor neurotrófico derivado de cerebro; y (d) cocultivar las células de la etapa (c) con astrocitos. El documento WO 2004/093812 divulga que una nueva clase de compuestos que tiene una fórmula particular funciona como inductores potentes de neurogénesis en células madre embrionarias.

El documento WO 2004/05308 divulga un método para preparar células dopaminérgicas interrumpiendo la ruta de señalización de TGF- β en células madre.

5 Chambers y col. (2009) describe la conversión neural de células ES e iPS humanas por inhibición dual de la señalización de SMAD (Chambers et al. (2009) "Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling." Nat Biotechnol; 27(3):275-80).

10 Desafortunadamente, no se ha descrito todavía una tecnología con mayor eficacia para diferenciar todas las células madre a células específicas (en particular, células neurales).

Descripción detallada de la invención

15 Los presentes inventores han hecho estudios intensos para desarrollar un método para inducir de forma eficaz la diferenciación de células madre pluripotentes a células precursoras neurales de una manera muy eficaz. Como resultados, hemos descubierto un método para minimizar la probabilidad intrincada de que otros linajes celulares y células indiferenciadas estén contenidos en las células diferenciadas a partir de células madre y para inducir diferenciación neural directa de las células madre para reducir el desarrollo de teratoma que puede estar causado por el trasplante.

20 Según esto, es un objeto de esta invención proporcionar un método para inducir diferenciación neural de células madre.

25 Es otro objeto de esta invención proporcionar una composición para inducir la diferenciación neural de células madre.

Otros objetos y ventajas de la presente invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada junto con las reivindicaciones y dibujos adjuntos.

30 En un aspecto de esta invención, se proporciona un método para inducir la diferenciación neural de células madre seleccionadas del grupo que consiste en células madre embrionarias humanas (hESC) y células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC), que comprende las etapas de: (a) inhibir la ruta de señalización de BMP (proteína morfogenética ósea) y activina/nodal en células madre usando dorsomorfina y 4-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)benzamida; y (b) cultivar las células madre.

35 En otro aspecto de esta invención, se proporciona un uso de dorsomorfina y 4-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)benzamida para fabricar una composición para inducir la diferenciación neural de células madre seleccionadas del grupo que consiste en células madre embrionarias humanas (hESC) y células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC).

40 Los presentes inventores han hecho estudios intensos para desarrollar un método para inducir de forma eficaz la diferenciación de células madre pluripotentes a células precursoras neurales de una manera muy eficiente. Como resultados, hemos descubierto un método para minimizar la probabilidad intrincada de que otros linajes celulares y células indiferenciadas estén contenidos en las células diferenciadas a partir de células madre y para inducir diferenciación neural directa de las células madre para reducir el desarrollo de teratoma que puede estar causado por el trasplante.

45 El término "diferenciación neural dirigida de células madre" usado en el presente documento incluye no solo una diferenciación completa de células madre a células específicas, sino también que se formen células precursoras neurales en un estadio intermedio antes de la diferenciación completa. En otras palabras, el método de la presente invención para inducir una diferenciación dirigida de células madre no solo contribuye a una diferenciación completa de las células madre a células específicas de una manera eficaz, sino que también tiene una eficacia mucho mayor en la formación de precursores neurales a partir de células madre. Específicamente, el método descrito en el presente documento para formar precursores neurales usando inhibición de la ruta de señalización de BMP y activina/nodal no tiene limitación técnica y se puede usar junto con métodos convencionales para diferenciar precursores neurales de una manera muy eficaz.

50 Las células madre que se pueden diferenciar por la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en células madre embrionarias humanas (hESC) y células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC), y las células a las que se puede aplicar la presente invención tienen propiedades de células madre: (a) no diferenciación; (b) potencial para proliferación indefinida; y (c) capacidad de diferenciación a células específicas. Las células madre incluyen células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas. El término "células madre pluripotentes inducidas" usado en el presente documento se refiere a un tipo de células madre pluripotentes artificialmente derivadas de células no pluripotentes (por ejemplo, células somáticas) por inserción de un gen específico.

60 En general, se ha aceptado en la técnica que las células madre pluripotentes inducidas son equivalentes a células madre pluripotentes (por ejemplo, células madre embrionarias), dado que las células madre pluripotentes inducidas

tienen las características de: (a) expresión génica y de proteínas de células madre; (b) metilación cromosómica; (c) tiempo de duplicación; (d) formación de embrión; (e) formación de teratoma; (f) formación de quimera variable; (g) hibridoma; y (h) diferenciación.

5 Como se demuestra en los ejemplos posteriormente, es una de las ventajas de la presente invención proporcionar un protocolo de diferenciación universal que se puede aplicar a todos los tipos de células madre incluyendo células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas.

10 Según el método descrito en el presente documento, la ruta de señalización de BMP y activina/nodal se bloquea para la diferenciación neural de células madre.

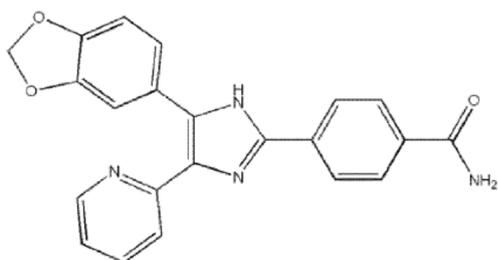
15 Una sustancia para bloquear la ruta de señalización de BMP incluye varios inhibidores de la ruta de señalización de BMP que conocen los expertos en la materia. El término "un inhibidor de la ruta de señalización de BMP" usado en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe preferiblemente BMP en sí misma o la unión de BMP a un receptor de BMP. El inhibidor de la ruta de señalización de BMP utilizado en la presente invención incluye dorsomorfin.

20 Para bloquear la ruta de señalización de BMP de células madre en la presente invención, una concentración adecuada de dorsomorfin está en un intervalo de preferiblemente 1-20 μM , más preferiblemente 3-10 μM , y lo más preferiblemente, 4-6 μM .

25 Una sustancia para inhibir la ruta de señalización de activina/nodal puede incluir varios inhibidores de la ruta de señalización de activina/nodal que conocen los expertos en la materia. El término "ruta de señalización de activina/nodal" usado en el presente documento se refiere a la ruta de señalización de activina y/o la ruta de señalización de nodal. El término "un inhibidor para la ruta de señalización de activina/nodal" usado en el presente documento significa una sustancia que inhibe preferiblemente activina/nodal en sí mismo o la unión de activina/nodal a un receptor de activina/nodal. El inhibidor de la ruta de señalización de activina/nodal utilizado en la presente invención es 4-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)benzamida. El tratamiento con el compuesto mencionado anteriormente es más eficaz que el tratamiento con proteína.

30 Para inhibir la ruta de señalización de activina/nodal de células madre en la presente invención, una concentración adecuada de 4-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)benzamida está un intervalo de preferiblemente 1-50 μM , más preferiblemente de 5-30 μM , mucho más preferiblemente 8-20 μM , y los más preferiblemente, 9-11 μM .

35 La anteriormente descrita 4-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)benzamida está representada por la siguiente fórmula 1:



(1)

40 En la descripción detallada de la presente invención, el compuesto representado por la fórmula 1 se puede usar de forma intercambiable con SB431542.

45 Según una forma de realización preferible, la etapa (a) se realiza cultivando las células madre durante la embriogénesis o un proceso de cultivo de embriones formados, e incluye además la etapa en la que se forman los embriones en los que el neuroectodermo está muy desarrollado por la etapa (a).

50 Según una forma de realización preferible, la etapa (b) para cultivar incluye además las etapas de: (b-1) proliferación de células precursoras neurales cultivando en presencia de bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico) los embriones en los que el neuroectodermo está muy desarrollado; (b-2) inducir células precursoras de dopamina cultivando las células precursoras neurales en presencia de Sonic hedgehog (Shh) y FGF 8 (factor de crecimiento de fibroblastos 8); y (b-3) formar neuronas dopaminérgicas cultivando las células precursoras de dopamina en presencia de factor de crecimiento neurotrófico derivado de glía (GDNF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y ácido ascórbico.

55

Preferiblemente, la concentración de bFGF añadido en la etapa para proliferar los precursores neurales se utiliza en un intervalo de 5-100 ng/ml, más preferiblemente 10-50 ng/ml, mucho más preferiblemente 15-30 ng/ml, y lo más preferiblemente, 19-21 ng/ml.

5 Preferiblemente, la concentración de Sonic hedgehog añadido en la etapa para proliferar los precursores dopaminérgicos se utiliza en un intervalo de 50-500 ng/ml, más preferiblemente 100-300 ng/ml, mucho más preferiblemente 150-250 ng/ml, y lo más preferiblemente, 190-210 ng/ml.

10 La concentración de FGF8 añadido en la etapa para proliferar los precursores dopaminérgicos se utiliza en un intervalo de 10-300 ng/ml, más preferiblemente 50-100 ng/ml, mucho más preferiblemente 80-150 ng/ml, y lo más preferiblemente, 90-110 ng/ml.

15 Preferiblemente, la concentración de BDNF añadido en la etapa para formar las neuronas dopaminérgicas se utiliza en un intervalo de 5-100 ng/ml, más preferiblemente 10-80 ng/ml, mucho más preferiblemente 15-50 ng/ml, y lo más preferiblemente, 19-21 ng/ml.

20 Preferiblemente, la concentración de GDNF añadido en la etapa para formar las neuronas dopaminérgicas se utiliza en un intervalo de 5-100 ng/ml, más preferiblemente 10-80 ng/ml, mucho más preferiblemente 15-50 ng/ml, y lo más preferiblemente, 19-21 ng/ml.

La concentración de GDNF añadido en la etapa para formar las neuronas dopaminérgicas se utiliza en un intervalo de 50-500 ng/ml, más preferiblemente 100-300 ng/ml, mucho más preferiblemente 150-250 ng/ml, y lo más preferiblemente, 190-210 ng/ml.

25 Según una forma de realización preferible, la expresión de *Sox1*, *Pax6*, y *nestina* está muy aumentada en la diferenciación neural de células madre en la presente invención comparado con esas tratadas sin dorsomorfina y 4-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)benzamida

30 Según una forma de realización preferible, la expresión de *Id1*, *Id3*, *GCM1* y *GATA2* se reduce significativamente en la diferenciación neural de células madre en la presente invención comparado con esas tratadas sin dorsomorfina y 4-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)benzamida.

35 Según la presente invención, puede ser posible diferenciar varias células madre (por ejemplo, células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas) a nivel similar de neuronas dopaminérgicas.

Las células neurales obtenidas por la presente invención se pueden aplicar a tratar trastornos neurodegenerativos, por ejemplo, incluyendo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad desmielizante y esclerosis lateral amiotrófica.

40 Las características y ventajas de esta invención se resumen como sigue:

- (a) La presente invención proporciona un método y una composición para inducir diferenciación neural de células madre.
- 45 (b) La presente invención permite que dos tipos de células madre se diferencien de forma eficaz en células precursoras neurales independientemente de métodos convencionales para la diferenciación de células madre incluyendo cultivo flotante y cultivo adherente.
- (c) Además, puesto que las células precursoras neurales inducidas por la presente invención se pueden diferenciar en células específicas (por ejemplo, neuronas dopaminérgicas) u oligodendrocitos de una manera más eficaz, se pueden aplicar para el tratamiento de enfermedades nerviosas incurables (por ejemplo, enfermedad de Parkinson o lesión de la médula espinal) y además proporcionar datos fundamentales sobre desarrollo de nuevos fármacos.

Breve descripción de los dibujos

55 Las figuras 1a-1d representan los resultados de examinar la propensión a la diferenciación de un total de 6 líneas de hESC (H9, Miz-hES4 y 6, SNU-hES3 y 16, CHA-hES3) y 3 líneas de iPSC humanas (BJ1-iPS12, MSC-iPS2-3, dHif-iPS2-2) usando qRT-PCR. La figura 1a representa los niveles de expresión de neuroectodermo representativo (*Sox1*), y la figura 1b represente los niveles de mesodermo representativo (*Brachyury*). La figura 1c y la figura 1d representan los niveles de expresión de endodermo representativo (*GATA4*) y marcador de no diferenciación (*Oct4*), respectivamente. El eje y representa medias \pm e.e.m de nivel de expresión relativo de cada gen sobre el menor (designado arbitrariamente como 1) entre las líneas celulares ensayadas. La significación estadística se estimó usando la prueba ANOVA (análisis de varianza) unidireccional con múltiples comparaciones entre las líneas. Para reducir una tasa de error de tipo I, se aplicó la corrección de Bonferroni como post hoc. Símbolo: Miz6, Miz-hES6; Miz4, Miz-hES4; SNU3, SNU-hES3; SNU16, SNU-hES16; CHA3, CHA-hES3; B31-12, B31-iPS12; MSC2-3, MSC-iPS2-3; dHif2-2, dHif-iPS2-2.

Las figuras 2a-2b representan los resultados de reducir la diferenciación neural de células madre por tratamiento de DM que inhibe de forma eficaz la cascada de señalización de BMP endógena. Cuatro días después de la diferenciación espontánea en presencia o ausencia de DM, se midió el nivel de expresión de varios marcadores desde EB por qRT-PCR. La figura 2a muestra que los niveles de expresión de los genes *Id1* e *Id3*, indicadores de actividad señalizadora de BMP, disminuyeron por el tratamiento de DM (0,1-5 μ M) de una manera dependiente de la dosis. Se usó un μ g/ml de nogina como control positivo. La figura 2b representa que los niveles de expresión de marcadores neuroectodérmicos (*Pax6* y *Nestina*) aumentaron el día 4 de tratamiento de DM. El eje y de los gráficos representa el nivel de expresión relativo de cada gen después de tratamiento con DM o nogina comparado con tratamiento con DMSO (dimetilsulfóxido). Símbolo: DM, dorsomorfina; NOG, nogina (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado con el grupo control, prueba ANOVA).

La figura 3 es un resultado de inhibir la diferenciación de hECS (H9) a trofoblastos por modulación de las rutas de señalización tanto de BMP como de activina/nodal. Se cultivaron EB durante 10 días con o sin DM (5 μ M) y SB431542 (5-10 μ M) y se examinó el nivel de expresión de dos marcadores representativos de trofoblastos (GATA2 y GCM1) por qRT-PCR.

Las figuras 4a-4c representan que la inhibición de las rutas de señalización tanto de BMP como de activina/nodal fomenta significativamente la diferenciación de hECS (H9) a linaje neuroectodérmico, además de inducir diferenciación a neuronas. Después de cultivar durante 4 días con o sin DM (5 μ M) y SB431542 (5-10 μ M), los EB se adherieron a una placa de cultivo y se cultivaron adicionalmente en medio de inducción neural (medio N2 suplementado con bFGF 20 ng/ml) durante 6 días. H9 y Miz-hES6 se desarrollaron hasta aproximadamente el 90% de colonias numerosas con una estructura de roseta neural (figuras 4a-4b). Por el contrario, el 2,6-25,5% de las colonias desarrolladas de células Miz-hES4, BJI-iPS12 y MSC-iPS2-3 tenían varias formas celulares no neurales con una estructura de roseta neural. Estos resultados demuestran que la propensión a la diferenciación de hPSC se mantiene todavía después de realizar un protocolo de diferenciación por inducción, así como diferenciación espontánea (panel superior en la figura 4a). Sorprendentemente, el tratamiento químico (DM y SB431542) a EB durante 4 días lleva a la inducción eficaz e igual de la formación de roseta neural en la mayoría de las colonias de células usadas en los experimentos (panel inferior en la figura 4a). Las estructuras de roseta neural se inmunotifieron con anticuerpo anti-nestina (verde) y anti-Sox1 (rojo) (véase una foto insertada en BJI-iPS12 en la figura 4a). La figura 4b representa un porcentaje de colonias con estructura de roseta neural después de la diferenciación neural de 5 líneas celulares de hPSC en presencia o ausencia de DM y SB431542. La figura 4c es qRT-PCR que representa que la expresión de los marcadores de neuroectodermo (*Sox1*, *Pax6* y *nestina*) están significativamente aumentados en células Miz-hES4, BJI-iPS12 y MSC-iPS2-3 químicamente tratadas (DM+SB431542) comparadas con células tratadas con vehículo (DMSO) en la inducción de diferenciación. Por el contrario, la expresión de marcadores de endodermo, mesodermo, trofoblasto y no diferenciación se redujo en células Miz-hES4, BJI-iPS12 y MSC-iPS2-3 químicamente tratadas (DM+SB431542) comparadas con células tratadas con vehículo (DMSO). El aumento en veces relativo de la expresión génica en el grupo químicamente tratado (DM+SB431542) sobre el grupo tratado con vehículo (DMSO) se representó en una escala logarítmica. Al menos se llevaron a cabo tres experimentos (Barra de escala: 20 μ m).

Las figuras 5a-5c muestran la diferenciación eficaz de NP producidos por la inhibición de la ruta de BMP y activina/nodal a neuronas DA. La figura 5a representa esquemáticamente un protocolo de diferenciación hacia neurona DA. La figura 5b muestra que el número de neuronas Tuj1 y TH positivas (que expresan una tirosina hidroxilada que sintetiza dopamina) está notablemente aumentado en el grupo químicamente tratado (DM+SB431542) comparado con el grupo tratado con vehículo (DMSO) usando análisis inmunocitoquímicos. La figura 5c representa el aumento marcado en células neurales Tuj1-positivas a partir de las células iPSC humanas (MSC-iPS2-3) tratadas con (DM+SB431542) (50,7 \pm 2,2% de células totales) comparado con las células tratadas con vehículo (DMSO) (2,6 \pm 0,5% de las células totales). El número de células de cada grupo tratado con (DM+SB431542) y vehículo (DMSO) es 17.711 y 9.233, que se calcula de tres experimentos independientes. La mayoría de las células Tuj1-positivas (49,5 \pm 6,8%) son neuronas TH⁺. las neuronas TH⁺ casi no se detectaron en el grupo control tratado con DMSO (** $p < 0,01$; barra de escala: 50 μ m).

Las figuras 6a-6d muestran la diferenciación de hECS (H9) a linaje neuroectodérmico por modulación de las rutas de señalización tanto de BMP como de activina/nodal. La figura 6a representa que la expresión de marcadores neuroectodérmicos (*Sox1*, y *nestina*) está aumentada después de cultivar EB en medio EB tratado con DM durante 10 días mientras que la expresión de marcadores de mesodermo (*Brachyury* y *Cerberus*), endodermo (*GATA4* y *AFP*) y no diferenciación (*Oct4* y *Nanog*) está inhibida. La figura 6b es un análisis inmunocitoquímico que muestra que células indiferenciadas (doble positivo para *Oct4* y *SSEA4*) y células de endodermo (positivas para *AFP*; puntas de flecha rojas) se detectan en una porción de EB tratados con DM 10 μ M durante 10 días. La figura 6c muestra que la expresión de marcadores neurales estaba notoriamente aumentada por tratamiento tanto con DM como SB431542 durante 10 días, mientras que la expresión de marcadores de otros linajes e indiferenciadas estaba significativamente reducida. La figura 6d es un análisis inmunocitoquímico que muestra que la expresión de *Pax6* y *nestina* está aumentada en células tratadas con (DM+SB431542) comparada con EB tratados con DMSO. El eje y en el gráfico de la figura 6a y 6c representa el cambio en veces en expresión génica entre muestras tratadas químicamente y control de tres experimentos independientes. DM y SB indican dorsomorfina y SB431542, respectivamente. barra de escala, 100 μ m.

Las figuras 7a-7b representan los resultados de inducir diferenciación neural de varias líneas celulares de hPSC que tienen propensión a la diferenciación por inhibición de las rutas de señalización tanto de BMP como actina/nodal. La figura 7a es un gráfico que representa que la expresión de marcadores de neuroectodermo está marcadamente aumentada en líneas celulares de hPSC químicamente tratadas (DM+SB431542), mientras que la expresión de marcadores de endodermo, mesodermo, trofoblasto e indiferenciada estaban significativamente reducidos en células tratadas con vehículo (DMSO). El eje y es una escala logarítmica que muestra medias \pm e.e.m del aumento en veces relativo de la expresión génica entre células tratadas con moléculas pequeñas y tratadas con vehículo (DMSO) (designado arbitrariamente como 1). La figura 7b es fotografías de secciones de EB de 4 líneas de hPSC (H9, Miz-hES6, BJ1-iPS12, y MSC-iPS2-3) inmunoteñidas con anticuerpo anti-*nestina*. DM y SB indican dorsomorfina y SB431542, respectivamente. Barra de escala, 100 μ m.

La figura 8 es un análisis de inmunotinción que muestra que se recogen NPC de células madre embrionarias humanas (Miz-hES6) y células madre pluripotentes inducidas humanas (BJ1-iPS12) por ruta de señalización de BMP y ruta de señalización de activina/nodal, respectivamente, induciendo diferenciación de NPC a neuronas (Tuj1-positivas), células de neuroglia (GFAP-positivas) y oligodendrocitos (O4-positivos). Barra de escala, 25 μ m.

La presente invención se describirá ahora en más detalle mediante ejemplos. Sería obvio para los expertos en la materia que se pretende que estos ejemplos sean ilustrativos.

Ejemplos

Materiales y métodos

Cultivo de hESC (no ilustrativo del objeto reivindicado) y hiPSC

Las 6 líneas de hESC usadas en este estudio, H9 (P31-45, WiCell Inc, Madison, EE UU), Miz-hES4 (P67-75) y Miz-hES6 (P34-45) (MizMedi Hospital, Seúl, Corea), CHA-hES3 (P88-93, CHA Hospital, Seúl, Corea), SNU-hES3 (P30-36) y SNU-hES16 (P71-76) (Hospital de la Universidad Nacional de Seúl, Seúl, Corea), se cultivaron rutinariamente en medio DMEM-F12 suplementado con KSR al 20% (sustituto de suero knockout; Invitrogen, Carlsbad, EE UU), aminoácidos no esenciales 1x (Invitrogen), beta-mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma St. Louis, EE UU), y 4 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; Invitrogen, EE UU). La mayoría de las líneas celulares hESC se hicieron crecer sobre la capa de fibroblastos embrionarios de ratón mitóticamente detenidos (MEF; MCTT; Seúl), excepto las líneas celulares SNU-hES3 y SNU-hES16 que se cultivaron en células soporte STO (ATCC, Manassas, EE UU). Las colonias de hESC se transfirieron a una capa de células soporte reciente cada 5-7 días por pase mecánico como se ha descrito previamente [1]. Tres iPSC humanas, dH1f-iPS2-2, MSC-iPS2-3, y BJ1-iPS12 [2] eran del laboratorio del Dr. George Daley en la Facultad de Medicina de Harvard y se cultivaron en las mismas condiciones que las hESC (Véase, *Nature*, 451 (7175): 141-6 (2008); *Nat Protoc.*, 3 (7): 1180-6 (2008)).

Diferenciación espontánea de hPSC a células neurales

La formación de EB (cuerpos embrioides) a partir de colonias de hESC y hiPSC se inició separando las colonias de las células soporte por tratamiento de 2 mg/ml de colagenasa de tipo IV (Invitrogen, EE UU) durante 30 min y transferencia de las colonias a placas Petri que contienen medio de cultivo de hESC normal sin bFGF (medio EB). Para examinar el efecto de dorsomorfina (DM) (también conocida como compuesto C; Sigma, EE UU) y SB431542 (Calbiochem, San Diego, CA, EE UU) en la diferenciación espontánea, varias concentraciones de DM y SB431542 se añadieron en el medio EB durante el cultivo de EB de 10 días con cambio de medio cada 2 días. La expresión de varios marcadores se analizó por qRT-PCR e inmunocitoquímica.

Diferenciación espontánea de hPSC a neuronas DA (dopaminérgicas)

Después de la diferenciación espontánea durante 10 días, las células precursoras neurales (NPC) formadas en los EB se expandieron en cultivo en suspensión en medio N2 (DMEM-F12 & suplemento N2 1x, Invitrogen) que contenía bFGF (20 ng/ml, Invitrogen) durante 8-10 días adicionales, con cambio de medio en días alternos. Las NPC expandidas se trituraron después con pipeteo suave y se sembraron en cubreobjetos recubiertos con Matrigel (BD Scientific, Bedford, EE UU) a una densidad de $0,5-2 \times 10^6$ células/cm². Después de ello, las células precursoras de DA se cultivaron durante 8 días en medio N2 suplementado con medio N2 que contenía 500 ng/ml de Sonic hedgehog (Shh; R&D Systems, Minneapolis, MN, EE UU) y 100 ng/ml de FGF8 (factor de crecimiento de fibroblastos 8; R&D Systems). Para la maduración dopaminérgica, las células precursoras de DA se pusieron en medio DMEM/F12 suplementado con N2 1x, factor neurotrófico derivado de glía (GDNF; R&D Systems) 20 ng/ml, factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF; R&D Systems) 20 ng/ml y ácido ascórbico (Sigma) 200 μ M.

Diferenciación neural dirigida de hPSC

La diferenciación dirigida de hPSC en células de linaje neural se realizó usando el método previamente descrito con modificaciones menores [3]. Brevemente, los EB se cultivaron en suspensión durante 4 días en medio EB con y sin DM

5 μ M y SB431542 5-10 μ M, y después se cultivaron en placa recubierta de Matrigel en medio N2 suplementado con bFGF 20 ng/ml durante 6 días adicionales. Se analizaron muestras por recuento de colonias, inmunocitoquímica y qRT-PCR.

5 **Inmunotinción y análisis cuantitativo**

Las células se fijaron en solución de paraformaldehído al 4%/PBS durante 10 min. Los EB también se fijaron en el mismo fijador durante 1 h, se crioprotegieron con sacarosa al 20%, se congelaron en compuesto O.T.C. (Tissue Tek, Torrance, EE UU), y se hicieron secciones a un espesor de 10 μ m con un criostato. Las secciones se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1%/PBS (para marcadores intracelulares), se bloquearon con suero de burro normal al 5% (Calbiochem, CA, EE UU) durante 1 h a temperatura ambiente, y después se trataron con anticuerpos primarios a 4°C durante la noche. Los anticuerpos primarios usados en nuestro estudio fueron como sigue: Oct4 (dilución 1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa-Cruz, CA, EE UU); SSEA4 (dilución 1:500; Santa Cruz Biotechnology); Sox1 (dilución 1:200; Millipore, Billerica, MA, EE UU); Pax6 (dilución 1:200; DSHB, Iowa, IA, EE UU); Nestina (dilución 1:1000; Millipore); α -fetoproteína (AFP; dilución 1:100; Santa Cruz Biotechnology); Tuj1 (dilución 1:1000; Covance, Berkeley, CA, EE UU); GFAP (dilución 1:300; Millipore), O4 (dilución 1:200; R&D systems) y tirosina hidroxilasa (TH; dilución 1:500, Millipore; o 1:300, Pelfreez, Rogers, AR, EE UU). Después de la incubación con el anticuerpo primario, los anticuerpos secundarios etiquetados con fluorescencia (Alexa-Fluor®-488 o 594) apropiados (Molecular Probes, Eugene, OR, EE UU) se usaron para visualización. Las células se trataron con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol; Vector, Burlingame, CA, EE UU) durante 5 min durante el procedimiento de tinción para visualizar los núcleos. Las imágenes celulares se capturaron con microscopio Olympus IX17 y cámara digital DP71, y se analizaron mediante Image-Pro Plus ver 5.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE UU). La evaluación cuantitativa se realizó por recuento de células o colonias inmunomarcadas de tres experimentos independientes. Los valores se expresaron como medias \pm e.e.m. Se usó la prueba de la t de Student o la prueba ANOVA unidireccional usando el software SPSS versión 12.0 para determinar la significación estadística.

RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) y análisis de datos

Se extrajeron ARN totales usando un kit de purificación de ARN total Easy-Spin® (iNtRON Biotechnology, Seúl, Corea) según las instrucciones del fabricante y después 1 μ g de los ARN totales se sometieron a transcripción inversa con el kit de síntesis de ADNc Power (iNtRON Biotechnology). Se realizó qRT-PCR usando SYBR Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) y la reacción se llevó a cabo usando el sistema de tiempo real My-iQ o CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE UU) en las siguientes condiciones: (etapa 1) 1 min a 95°C; (etapa 2) 40 ciclos de 20 s a 95°C, 20 s a 63°C y 20 s a 72°C; (etapa 3) extensión final durante 1 min a 72°C. Se recogieron valores de expresión (valores Ct) de genes marcadores específicos y se normalizaron según los de β -actina. A continuación, los niveles de expresión normalizados de los marcadores se compararon entre muestras químicamente tratadas y muestras control tratadas con vehículo según el método $\Delta\Delta$ Ct [4]. Todos los datos se confirmaron mediante al menos tres experimentos independientes. Las secuencias de los cebadores se enumeran en la tabla 1.

40 **Tabla 1**

Gen	Secuencia del cebador (5'→3')	
Id-1 ²⁰	Directo	ggtgcgctgtctgtctgag (SEQ ID NO:1)
	Inverso	ctgatctcgccggttgagg (SEQ ID NO:2)
Id-3 ²⁰	Directo	ctggacgacatgaaccactg (SEQ ID NO:3)
	Inverso	gtagtctgatgacgcgctgta (SEQ ID NO:4)
Sox1	Directo	gagattcatctcaggattgagattcta (SEQ ID NO:5)
	Inverso	ggcctactgtaatctttctccac (SEQ ID NO:6)
Pax6	Directo	gcggaagctgcaaagaaata (SEQ ID NO:7)
	Inverso	tttggctgctagtctttctcg (SEQ ID NO:8)
Nestina	Directo	tgcggtactgaaaagttc (SEQ ID NO:9)
	Inverso	aggctgagggacatcttgag (SEQ ID NO:10)
Brachyury	Directo	aggtaccaaccctgagga (SEQ ID NO:11)
	Inverso	gcagggtgattgtcagaataggt (SEQ ID NO:12)
Cerberus ²¹	Directo	acagtgcccttcagccagact (SEQ ID NO:13)
	Inverso	acaactactttttcacagccttctgt (SEQ ID NO:14)
AFP	Directo	tgcaaacgatgaagcaagag (SEQ ID NO:15)
	Inverso	aacaggcctgagaaatctgc (SEQ ID NO:16)
GATA4	Directo	gtcatctcactacgggcaca (SEQ ID NO:17)
	Inverso	cttcagggccgagaggac (SEQ ID NO:18)
Sox17	Directo	ggcgcagcagaatccaga (SEQ ID NO:19)
	Inverso	ccacgactgcccagcat (SEQ ID NO:20)
GCM1 ²²	Directo	ctctgaagctcatccctgcc (SEQ ID NO:21)
	Inverso	tggacgccttctggaagac (SEQ ID NO:22)
GATA2 ²²	Directo	agaaccgaccactcatcaagcc (SEQ ID NO:23)
	Inverso	tgctcttggactgttgagac (SEQ ID NO:24)

Oct4	Directo	tgggctcgagaaggatgtg (SEQ ID NO:25)
	Inverso	gcatagtcgctgcttgatcg (SEQ ID NO:26)
Nanog	Directo	ccaacatcctgaacctcagc (SEQ ID NO:27)
	Inverso	gctattctcggccagttgt (SEQ ID NO:28)
B-actina	Directo	gctctttccagccttcctt (SEQ ID NO:29)
	Inverso	ctctgcatcctgtcagcaa (SEQ ID NO:30)

Los superíndices indican referencia contenida en los ejemplos de la presente invención.

Resultados

5 Para aplicaciones terapéuticas, la diferenciación eficaz de hPSC (es decir, hESC y iPSC humanas) a tipos celulares deseables específicos es un prerrequisito. Un artículo reciente demostró que cada línea de hESC tiene su propia inclinación de diferenciación hacia linajes celulares específicos [5]. También se pudieron detectar diferencias significativas en la propensión a la diferenciación entre 6 líneas de hESC (no ilustrativo del objeto reivindicado) generadas por 4 instituciones. Además, notamos que 3 líneas de iPSC humanas derivadas de diferentes tipos celulares somáticos también retenían su propio potencial para diferenciarse en linajes celulares específicos (Fig. 1). Puesto que esta propensión innata con frecuencia afectaría de forma negativa a la diferenciación en linajes celulares deseados, todas las líneas de hESC y iPSC podrían necesitar ser examinadas para su propensión a la diferenciación de modo que se puedan elegir líneas celulares apropiadas para cada aplicación terapéutica. Puesto que este proceso de cribado es laborioso, lleva mucho tiempo, y es costoso, sería de gran beneficio si hay una manera de inducir la diferenciación de todas la hPSC a un linaje celular específico de interés, independientemente de su propensión a la diferenciación original. Como un experimento de prueba de principio, pretendimos establecer un protocolo universal que dirige todas las líneas de hPSC con varias propensiones a la diferenciación hacia el linaje neural (es decir, la formación de precursores neurales (NP)). Nuestra estrategia para generar tal protocolo tan ampliamente aplicable para diferenciación neural era manipulando rutas de señalización implicadas de forma crítica en inducción neural embrionaria con pequeñas moléculas.

25 Para iniciar la diferenciación, fragmentos de colonias de hESC H9 mecánicamente cortados se cultivaron en suspensión como cuerpos embrioides (EB). Normalmente, los EB hechos crecer en una condición de diferenciación espontánea que no contienen ningún factor de crecimiento inductor de linaje dan baja eficiencia de diferenciación neural, aunque la eficiencia varía dependiendo de la propensión a la diferenciación de cada línea de hESC. En un intento de fomentar la diferenciación neural a costa de otros linajes celulares, primero determinamos bloquear la ruta de señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP) durante la formación de EB. Se sabe que la inhibición de la señalización de BMP desempeña un papel en la inducción neural durante el desarrollo embrionario temprano [6, 7]. Para este fin, se usó dorsomorfina (DM), un antagonista de BMP de molécula pequeña selectivo [8], en lugar de nogina, un inhibidor de BMP polipeptídico, ya que las moléculas pequeñas son más fácilmente accesibles a las células dentro de los EB [9]. Primero confirmamos la eficacia de DM mostrando que un tratamiento de 4 días de EB con DM (0,1-5 μ M) disminuía el nivel de expresión de los genes *Id1* e *Id3*, los indicadores de la actividad señalizadora de BMP, de una manera dependiente de la dosis (Fig. 2a). A continuación, encontramos que el tratamiento con DM aumentó los marcadores neurales tal como *Pax6* y *nestina* en EB en diferenciación de forma dependiente de la dosis, lo que indica que la inhibición de la ruta de señalización de BMP con DM fomenta la diferenciación de hESC H9 hacia el linaje neural (Fig. 2b).

40 Para investigar si la inhibición de la ruta de BMP induce suficientemente la diferenciación neural y al mismo tiempo reduce la diferenciación a lo largo de otros linajes, los efectos de DM en el cambio de destino de hESC se examinaron más estrechamente. En este experimento, se cultivaron EB en medio de diferenciación espontánea que contenía DM (1 y 5 μ M) durante 10 días y se examinó la expresión de marcadores representativos de tres capas germinales, así como de hESC no diferenciadas por RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) e inmunocitoquímica (Figs. 1). El tratamiento con DM durante la formación de EB significativamente aumentó la expresión se marcadores neurales (*Sox1* y *nestina*) de forma dependiente de la dosis, mientras que los marcadores para mesodermo (*Brachyury*, *Cerberus*), endodermo (alfa-fetoproteína (AFP), *GATA4*) y hESC indiferenciadas (*Oct4* y *Nanog*) estaban reducidos (figs. 1a-1d). Sin embargo, algunos marcadores endodérmicos (es decir, AFP) y de células indiferenciadas (es decir, *Oct4* y *SSEA4*) todavía se detectaron (Figs. 1b-1d). Estos resultados implican que bloquear la ruta de BMP sola no es suficiente para producir una población muy pura de células neurales que tiene contaminación mínima de células endodérmicas, mesodérmicas e indiferenciadas restantes. Esta conclusión nos motivó a buscar rutas de señalización adicionales cuya inhibición aumentaría además la diferenciación de hESC hacia el linaje neural. Se sabe que la ruta de activina/nodal desempeña un papel central durante el desarrollo embrionario temprano induciendo la diferenciación endodérmica y mesodérmica [10], mientras que suprime la diferenciación en el linaje neuroectodérmico [11, 12]. Además, artículos recientes demostraron que la señalización de activina/nodal también es importante para mantener la capacidad de célula madre ("stemness") de las hESC [13, 14]. Por tanto, postulamos que bloquear la señalización de activina/nodal dirigiría la diferenciación de hESC más favorablemente hacia neuroectodermo con reducción de los otros linajes y células indiferenciadas.

Basado en esta idea, probamos si bloquear la señalización de activina/nodal además de la inhibición de la ruta de BMP produciría inducción adicional de células neurales con reducción de las otras células no deseadas a un nivel mínimo. Cuando se cultivaron los EB en el medio de diferenciación espontánea que contenía tanto SB431542 (5 o 10 μM), un inhibidor específico de la señalización de activina/nodal, como DM (5 μM), la expresión de marcadores neurales (Sox1, Pax6 y nestina) estaba significativamente aumentada, mientras que marcadores tanto endodérmicos (AFP y GATA4) como mesodérmicos (Brachyury y Cerberus) estaban drásticamente reducidos (Figs. 1b-1c). De forma más importante, los marcadores para células pluripotentes indiferenciadas (Oct4 y Nanog) también estaban muy reducidos (Fig. 1d). El aumento de células neurales en este experimento también se confirmó por inmunocitoquímica (Fig. 1d).

La expresión de marcadores de trofoblasto (GATA2 y GCM1) también estaba disminuida por la inhibición de bien la ruta de BMP sola (tratamiento con DM) o tanto la ruta de BMP como activina/nodal (tratamiento DM+SB431542) (Fig. 3). Este resultado está en línea con el artículo previo que bloquear la ruta de activina/nodal produce la diferenciación de hESC a trofoblastos solo cuando la ruta de BMP es activa [15].

De forma acumulativa, nuestros datos sugerían que la inducción neural eficiente y exclusiva de hPSC requeriría la inhibición de las rutas de señalización tanto de BMP como de activina/nodal. Estos resultados están en línea con el trabajo reciente que muestra que se requiere la supresión simultánea y continua de la señalización de BMP y activina/nodal para la inducción neural en el desarrollo del embrión de *Xenopus* [16].

La siguiente pregunta es si el tratamiento simultáneo de DM y SB431542 podría dirigir los destinos de líneas tanto de hESC como de iPSC hacia el linaje neural, independientemente de su propensión a la diferenciación innata. Para este fin, los EB generados de 9 líneas de hPSC (6 líneas de hESC (no ilustrativo del objeto reivindicado) y 3 líneas de iPSC humanas) se trataron tanto con DM (5 μM) como SB431542 (10 μM) durante el proceso de diferenciación espontánea. Nuestros análisis por qRT-PCR demostraron que el tratamiento con DM y SB431542 aumentó significativamente la inducción neural con reducción concomitante de células de otros linajes (Fig. 2a). De forma interesante, los aumentos en veces de expresión de marcador neural entre células control (células tratadas con vehículo (DMSO)) y tratadas con (DM+SB431542) eran mucho mayores en las líneas celulares que tenían inclinación a la diferenciación innata desfavorable hacia el destino neural tal como células Miz-hES4, SNU-hES3, SNU-hES16, CHA-hES3, y BJ1-iPS12 (Fig. 1a y Fig. 2a). Los análisis inmunocitoquímicos también demostraron claramente que más células expresaban nestina, un marcador de precursor neural, cuando se suprimían las rutas de señalización tanto de BMP como de activina/nodal (Fig. 2b). No hemos detectado ninguna célula indiferenciada después de tratamiento de DM+SB por inmunocitoquímica (datos no mostrados).

Además de sus efectos durante la diferenciación espontánea, DM y SB431542 también aumentaron la generación de células neurales cuando se usaron con un protocolo de diferenciación directa que se había diseñado para inducir la diferenciación neural de hESCs13 (Fig. 4) [17]. Se mostró que los precursores neurales generados en nuestros experimentos retenían la multipotencia para convertirse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Fig. 8).

En conjunto, estos resultados sugerían que la inclinación a la diferenciación significativamente diferente entre líneas de hESC e iPSC se podría superar de forma eficiente por la modulación simultánea de las rutas de señalización de BMP y activina/nodal se usara un protocolo de diferenciación espontánea o directa: en ambas condiciones, todas las hPSC estaban destinadas de forma eficiente al linaje neural.

Para examinar si los NP generados por bloqueo simultáneo de las señales de BMP y activina/nodal retienen la capacidad de convertirse en un subtipo neural especificado, intentamos la diferenciación adicional en neuronas de dopamina (DA) mediante la modificación de protocolos existentes (Fig. 5) [18, 19]. Los análisis inmunocitoquímicos mostraron aumento marcado en el número de células neurales Tuj1-positivas de las células iPSC humanas (MSC-iPS2-3) tratadas con (DM+SB431542) ($50,7 \pm 2,2\%$ de las células totales) comparado con las células tratadas con vehículo ($2,6 \pm 0,5\%$ de las células totales) (Figs. 5b-5h). Una porción significativa ($49,5 \pm 6,8\%$) de las células Tuj1 positivas eran neuronas TH⁺. Estos datos indicaban que las células neurales generadas por la modulación de la señalización de BMP y activina/nodal también retienen la capacidad para diferenciarse en un tipo neural específico tal como neuronas de DA.

En resumen, mostramos en este artículo que las hPSC con una variedad de propensión a la diferenciación se pueden diferenciar de forma eficiente al linaje neural mediante la modulación de las rutas de BMP y activina/nodal. Este estudio sugiere que la modulación de rutas de señalización puede ser capaz de superar el potencial de diferenciación innato de hESC e iPSC humanas. Esto simplificaría la necesidad para generar múltiples líneas de iPSC independientes de pacientes en necesidad de terapia de sustitución de células.

Referencias

1. Oh, S. K. et al. *Stem Cells* 23, 605-609 (2005).
2. Park, I. H. et al. *Nature* 451, 141-146 (2007).
3. Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Br, O. & Thomson, J. A. *Nat. Biotechnol* 19, 1129-1133 (2001).
4. Pfaffl, M. W. *Nucleic Acids Res* 29, e45 (2001).

5. Osafune, K. et al. *Nat. Biotechnol.* 26, 313-315 (2008).
6. Wilson, S. I & Edlund, T. *Nat. Neurosci. Supl.*, 1161-1168 (2001).
7. Mu, I. & Brivanlou, A. H. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 271-280 (2002).
8. Yu, P. B. et al. *Nat. Chem. Biol.* 4, 33-41 (2008).
- 5 9. Ding, S. & Schultz, P. *Nat. Biotechnol.* 22, 833-840 (2004).
10. Schier, A. F. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 589-613 (2003).
11. Vallier, L., Reynolds, D. & Pedersen, R. A. *Dev Biol.* 275, 403-421 (2004).
12. Camus, A., Perea-Gomez, A., Moreau, A. & Collignon, J. *Dev Biol.* 295, 743-755 (2006).
13. Vallier, L., Alexander, M. & Pedersen, R. A. *J. Cell. Sci.* 118, 4495-4509 (2005).
- 10 14. Xiao, L., Yuan, X. y Sharkis, S. *J. Stem Cells* 24, 1476486 (2006).
15. Wu, J. et al. *J. Biol. Chem.* 283, 249915002 (2008).
16. Chang, C. & Harland, R. M. *Development* 134, 3861-3872 (2007).
17. Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Br. O. & Thomson, J. A. *Nat. Biotechnol.* 19, 1129-1133.
18. Cho, M. S. et al. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 3392-3397 (2008).
- 15 19. Yan, Y. et al. *Stem Cells* 23, 781-790 (2005).
20. Xu, R. H. et al. *Nat Methods* 2, 185-190 (2005).
21. Kroon, E. et al. *Nat Biotech* 26, 443-452 (2008).
22. Xiao, L., Yuan, X. y Sharkis, S. *J. Stem Cells* 24, 1476486 (2006).

20 **Lista de secuencias**

<120> Método eficiente y universal para la diferenciación neural de células madre pluripotentes

<160> 30

25

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 19

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador F de Id-1

35

<400> 1

ggtgcgctgt ctgtctgag

19

<210> 2

40

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> Cebador R de Id-1

<400> 2

ctgatctcgc cgttgagg

18

<210> 3

50

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55

<223> Cebador F de Id-3

<400> 3

ctggacgaca tgaaccactg

20

60

<210> 4

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador R de Id-3

<400> 4
gtagtcgatg acgcgctgta
20

10 <210> 5
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador F de Sox1

<400> 5
gagattcattc tcaggattga gattcta
20 27

<210> 6
<211> 24
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador R de Sox1

30 <400> 6
ggcctactgt aatcttttct ccac
24

<210> 7
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador F de Pax6

40 <400> 7
gcggaagctg caaagaaata
20

<210> 8
<211> 21
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador R de Pax6

50 <400> 8
tttggtgct agtctttctc g
21

55 <210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador F de nestina
 5 <400> 9
 tgcgggctac tgaaaagtcc
 20
 <210> 10
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador R de nestina
 15 <400> 10
 aggctgaggg acatcttgag
 20
 <210> 11
 <211> 19
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador F de Brachyury
 <400> 11
 aggtacccaa ccctgagga
 19
 30 <210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador R de Brachyury
 <400> 12
 gcaggtgagt tgtcagaata ggt
 23
 40 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador F de Cerberus
 <400> 13
 50 acagtgcctc tcagccagac t
 21
 <210> 14
 <211> 25
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador R de Cerberus

<400> 14
acaactactt tttcacagcc ttcgt
25

5 <210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador F de AFP

<400> 15
tgcaaacgat gaagcaagag
20

15 <210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador R de AFP

<400> 16
aacaggcctg agaaatctgc
25 20

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador F de GATA4

35 <400> 17
gtcatctcac tacgggcaca
20

<210> 18
<211> 18
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador R de GATA4

45 <400> 18
cttcagggcc gagaggac
18

<210> 19
50 <211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> Cebador F de Sox17

<400> 19

ggcgcagcag aatccaga
 18
 <210> 20
 <211> 18
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador R de Sox17
 10 <400> 20
 ccacgacttg cccagcat
 18
 <210> 21
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador F de GCM1
 <400> 21
 ctctgaagct catcccttgc c
 21
 25 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador R de GCM1
 <400> 22
 tggacgcctt cctggaaaga c
 21
 35 <210> 23
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador F de GATA2
 <400> 23
 agaaccgacc actcatcaag cc
 45 22
 <210> 24
 <211> 23
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador R de GATA2
 55 <400> 24
 tgctcttctt ggacttggtg gac
 23

<210> 25
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador F de Oct4

 <400> 25
 tgggctcgag aaggatgtg
 10
 19

 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 15
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador R de Oct4
 20
 <400> 26
 gcatagtcgc tgcttgatcg
 20

 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 25
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador F de Nanog
 30
 <400> 27
 ccaacatcct gaacctcagc
 20

 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 35
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador R de Nanog
 40
 <400> 28
 gctattcttc ggccagttgt
 20

 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 45
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador F de beta-actina
 50
 <400> 29
 gctcttttcc agccttcctt
 20
 55
 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador R de beta-actina

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para inducir la diferenciación neural de células madre seleccionadas del grupo que consiste en células madre embrionarias humanas (hESC) y células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC), que comprende las etapas de:
- 10 (a) inhibir la ruta de señalización de BMP (proteína morfogenética ósea) y activina/nodal en la células madre usando dorsomorfina y 4-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)benzamidina; y
(b) cultivar las células madre.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en donde la etapa (b) comprende además las etapas de: (b-1) hacer proliferar células precursoras neurales cultivando en presencia de bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico) las células madre obtenidas en la etapa (a) en las que el neuroectodermo está muy desarrollado; (b-2) inducir células precursoras de dopamina cultivando las células precursoras neurales en presencia de Sonic hedgehog (Shh) y FGF 8 (factor de crecimiento de fibroblastos 8); y (b-3) formar neuronas dopaminérgicas cultivando las células precursoras de dopamina en presencia de factor de crecimiento neurotrófico derivado de glía (GDNF), factor de crecimiento neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y ácido ascórbico.
- 20 3. El método según la reivindicación 1, en donde la expresión de *Sox1*, *Pax6* y *nestina* está mucho más aumentada en las células madre de la etapa (b) comparadas con las tratadas sin dorsomorfina y 4-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)benzamidina.
- 25 4. El método según la reivindicación 1, en donde la expresión de *Id1*, *Id3*, *GCM1* y *GATA2* están significativamente reducidas en las células madre de la etapa (b) comparadas con las tratadas sin dorsomorfina y 4-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)benzamidina.
- 30 5. Un uso de dorsomorfina y 4-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)benzamidina para fabricar una composición para inducir diferenciación neural de células madre seleccionadas del grupo que consiste en células madre embrionarias humanas (hESC) y células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC).

Fig. 1a

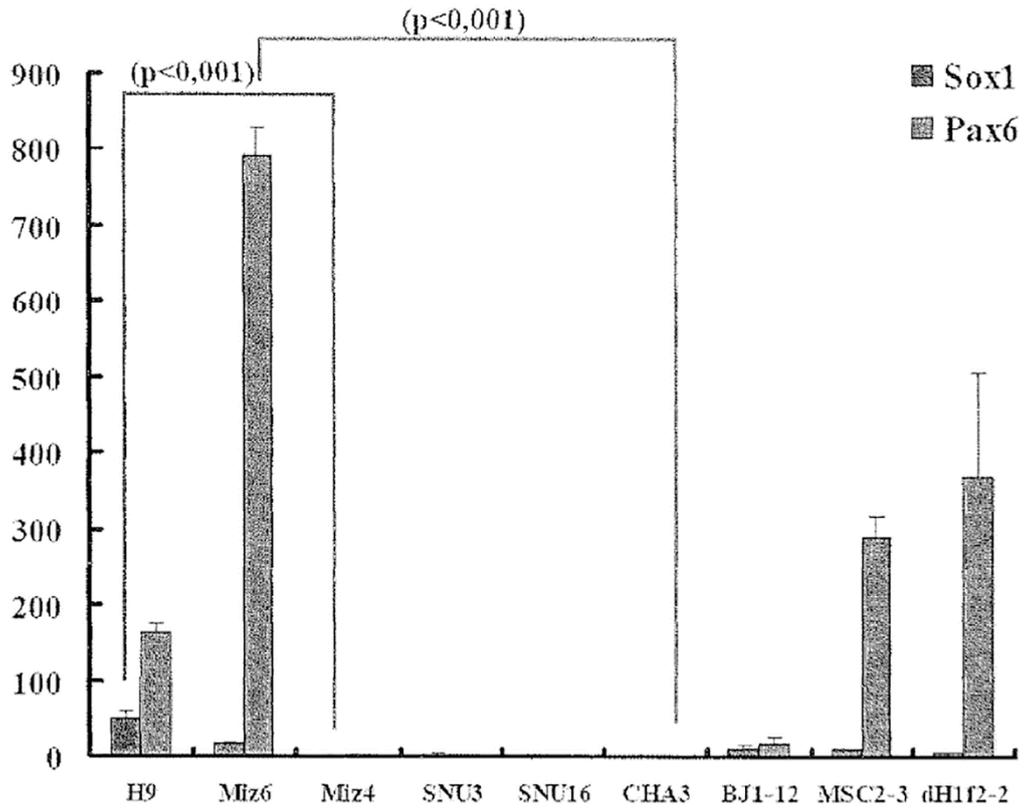


Fig. 1b

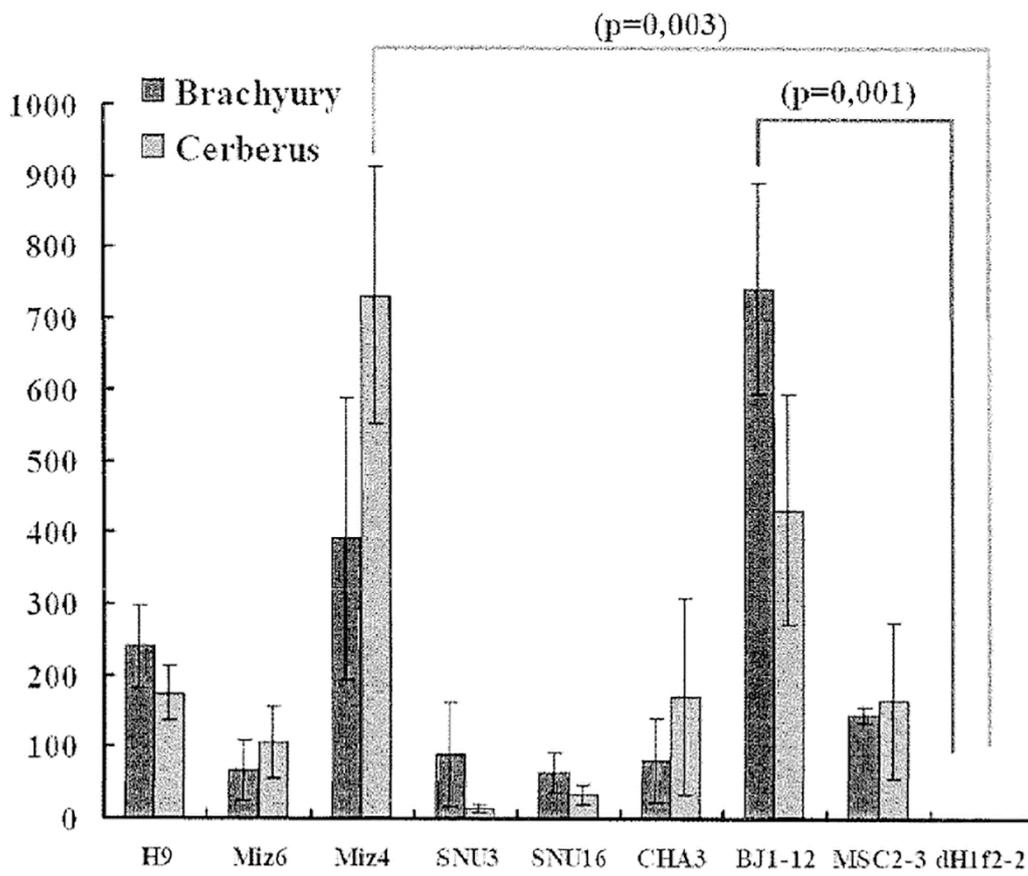


Fig. 1c

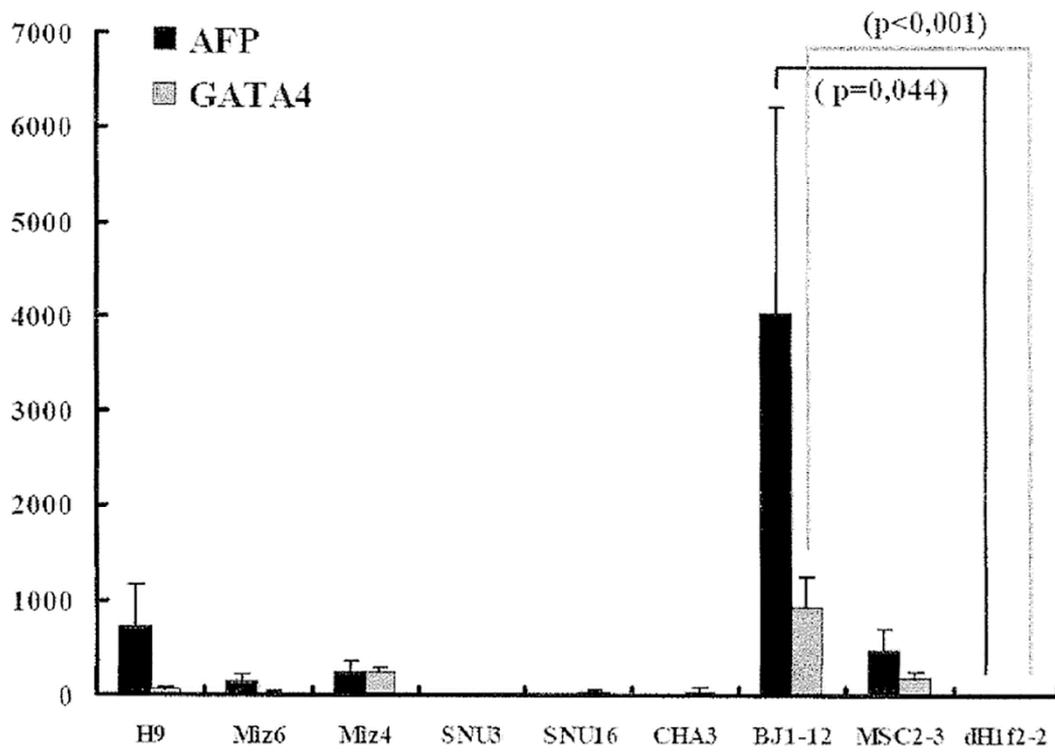


Fig. 1d

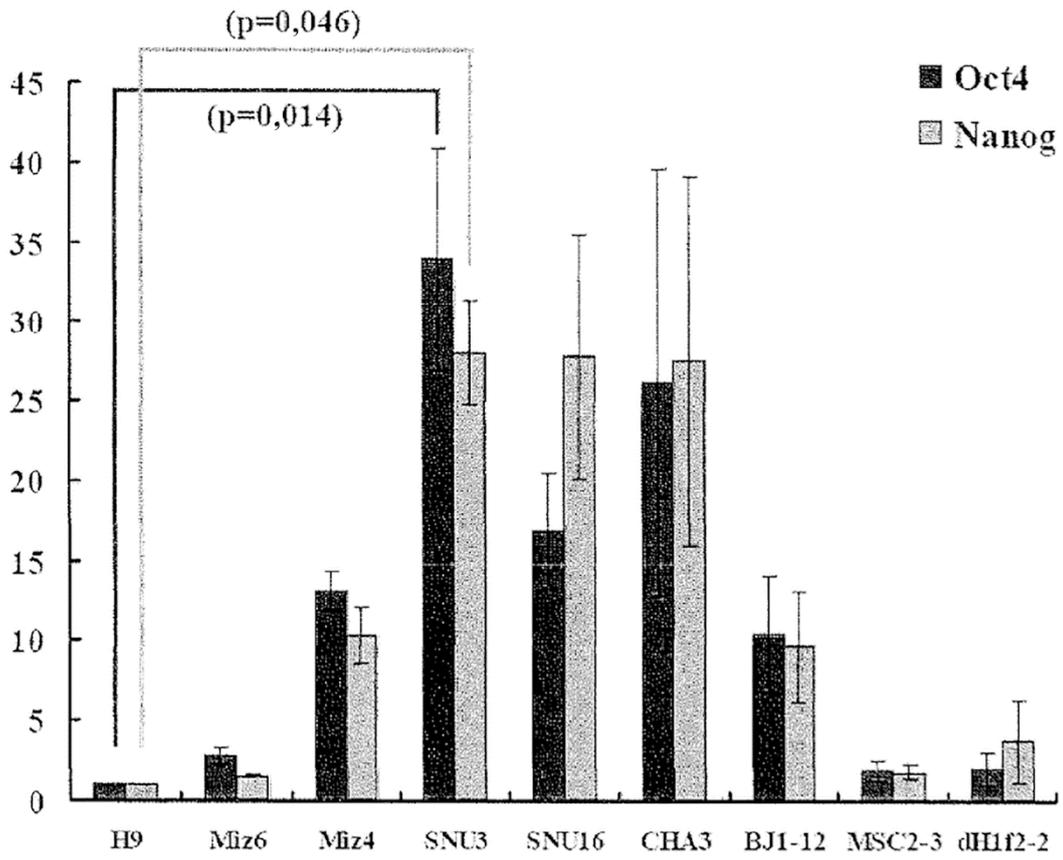


Fig. 2a

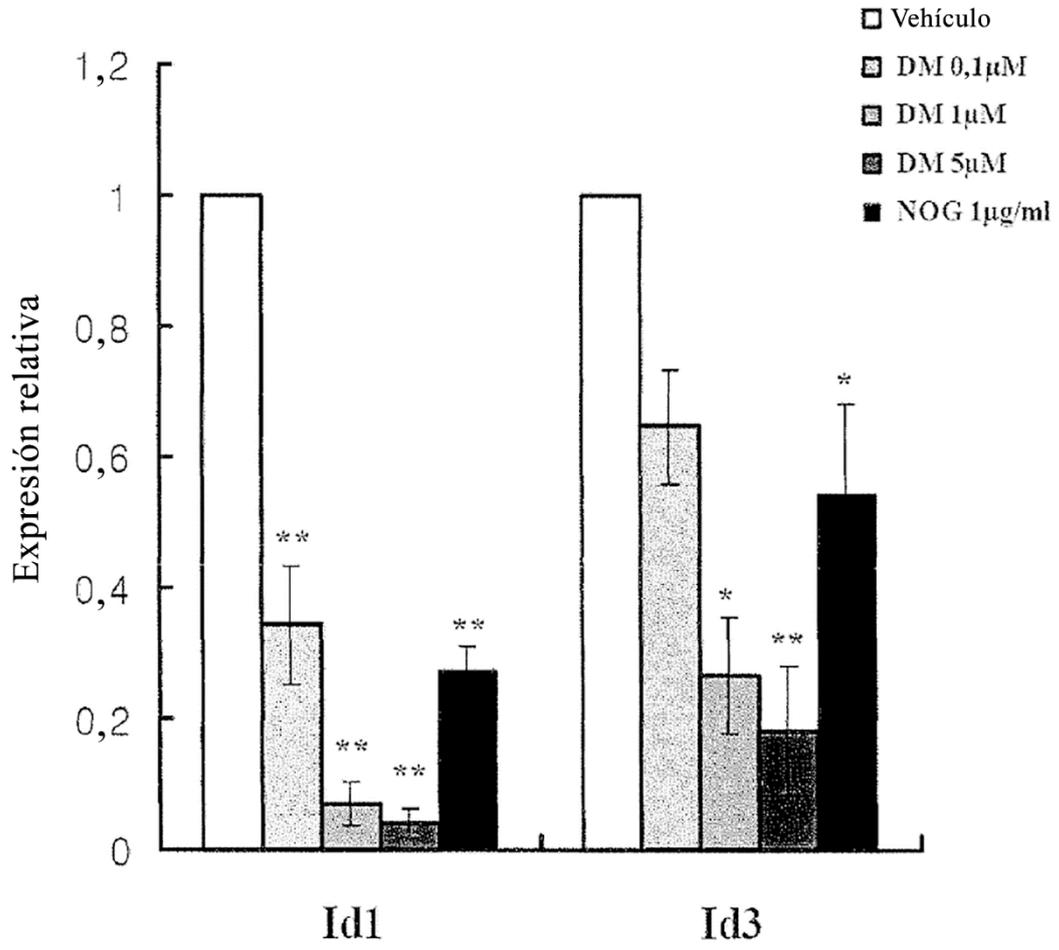


Fig. 2b

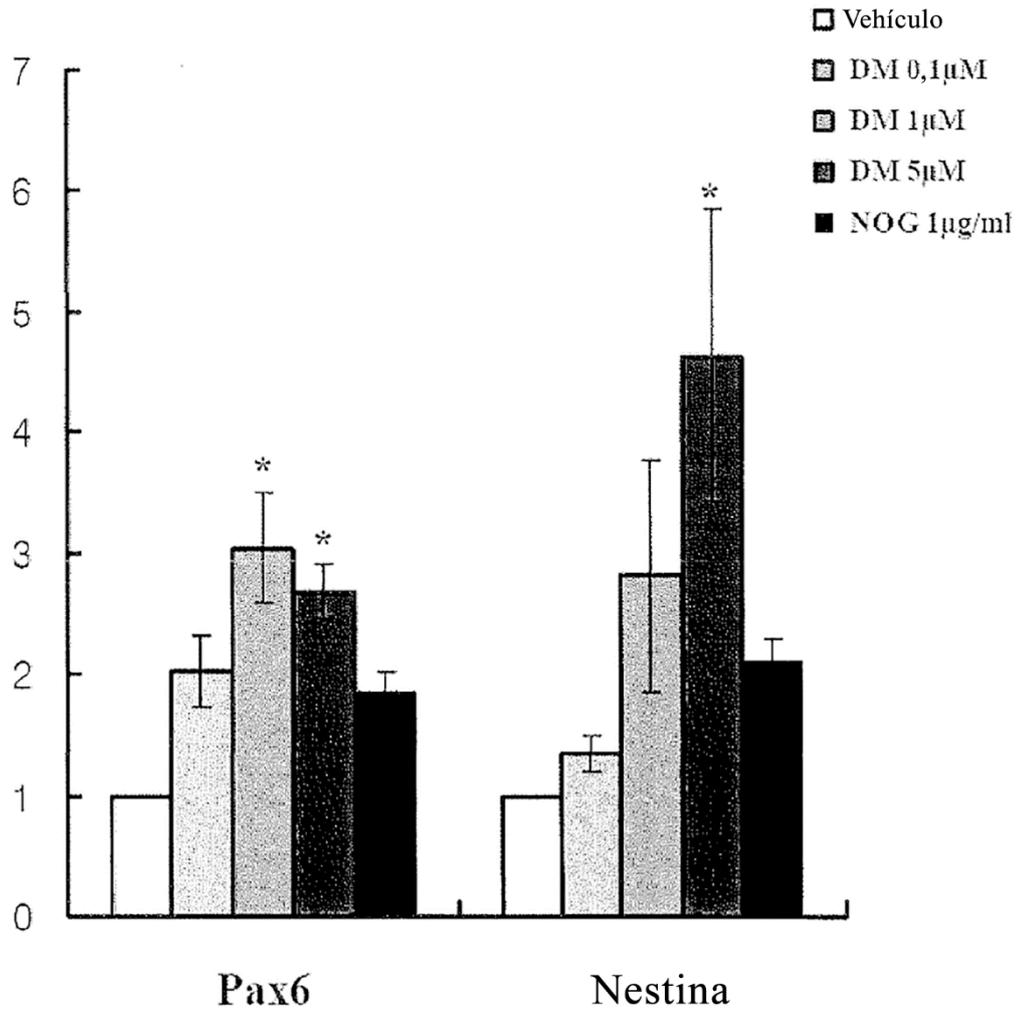


Fig. 3

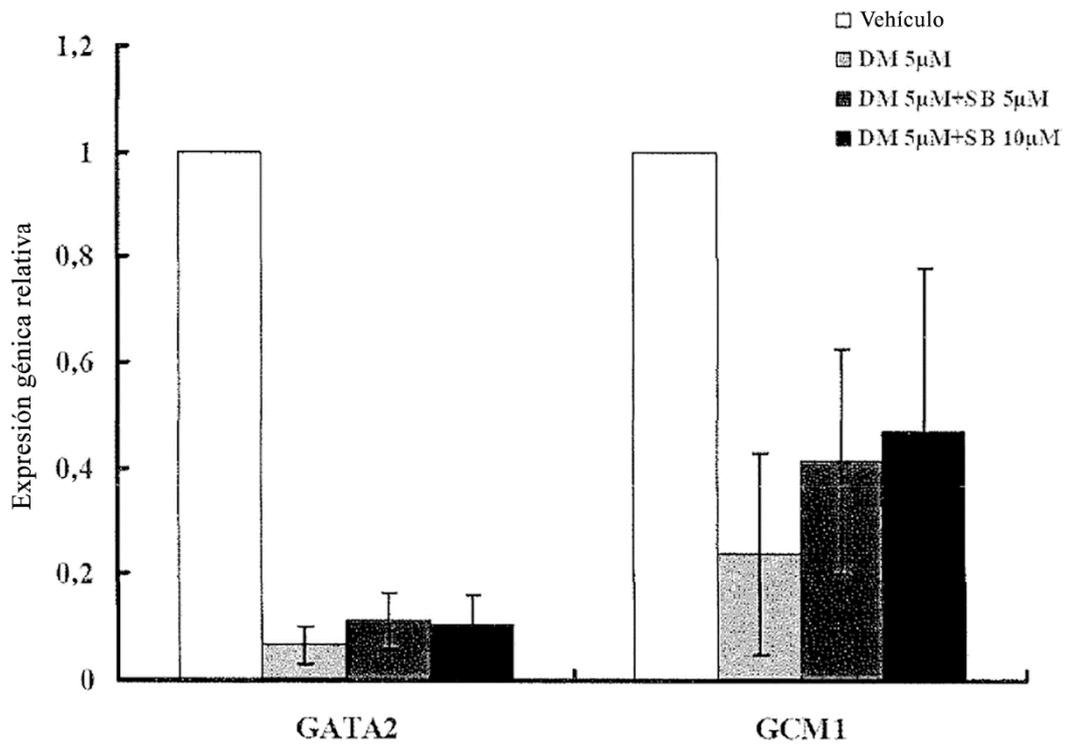


Fig. 4a

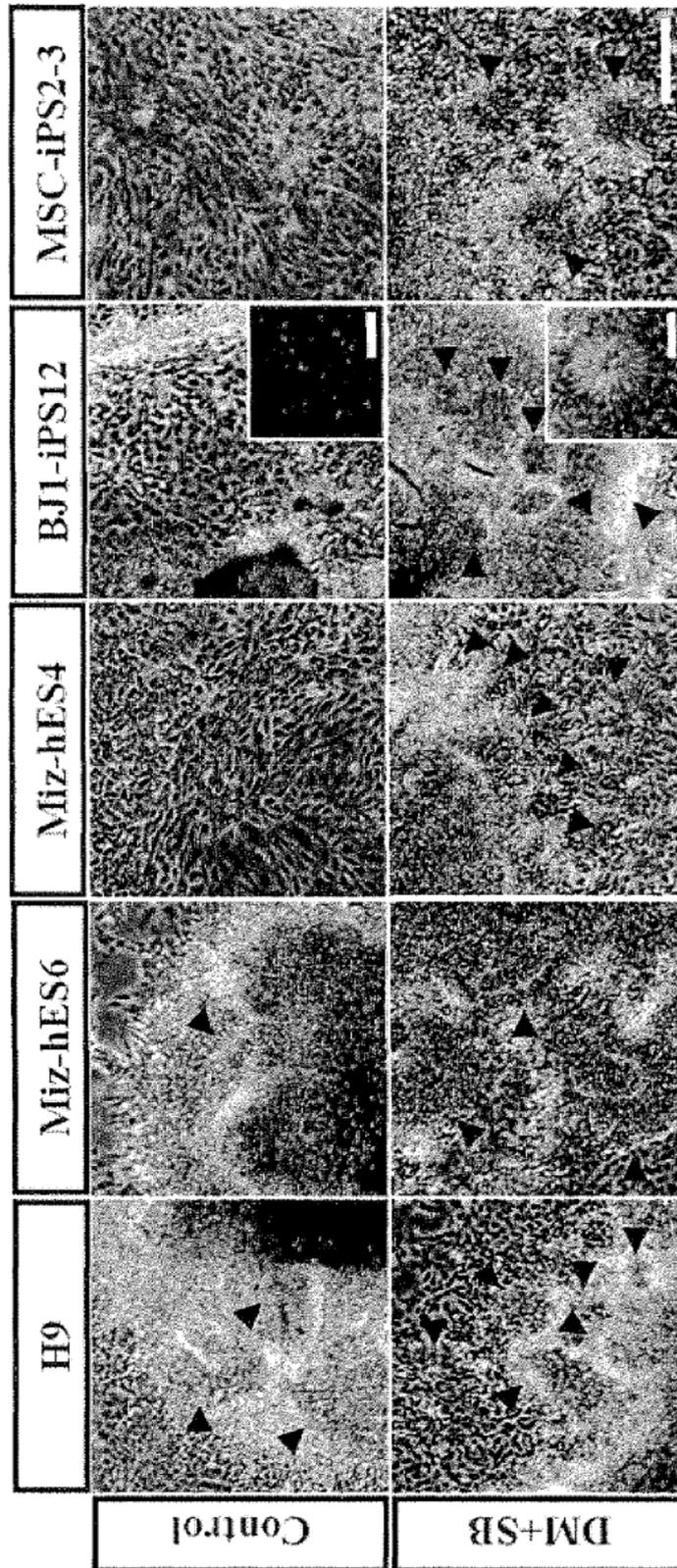


Fig. 4b

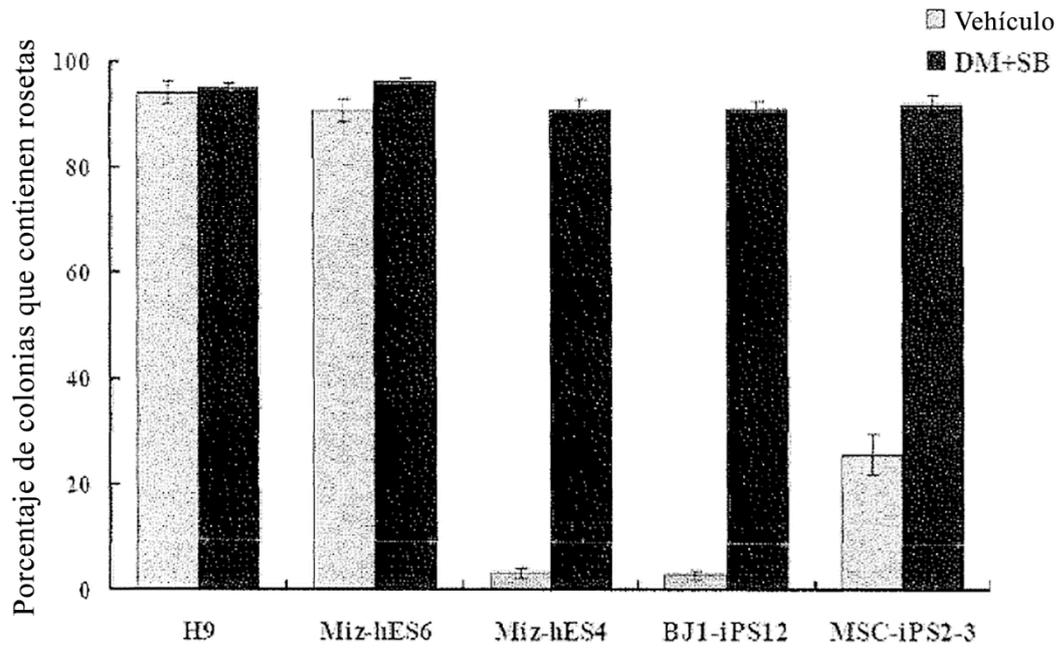


Fig. 4c

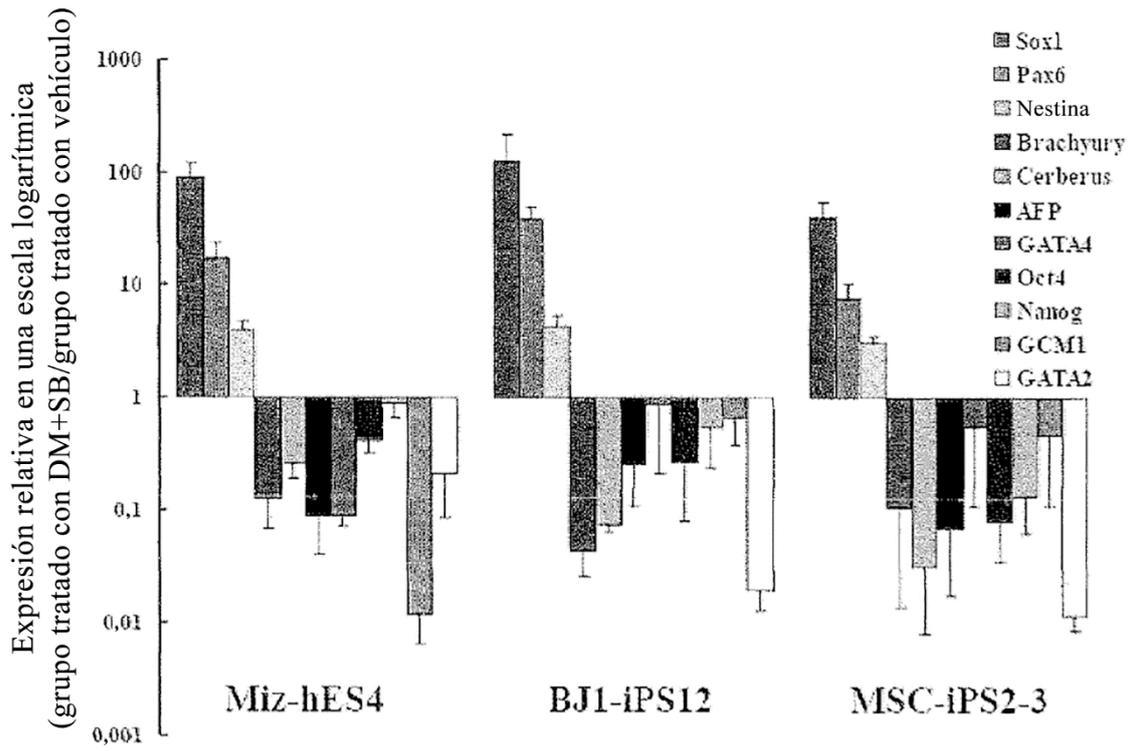


Fig. 5a

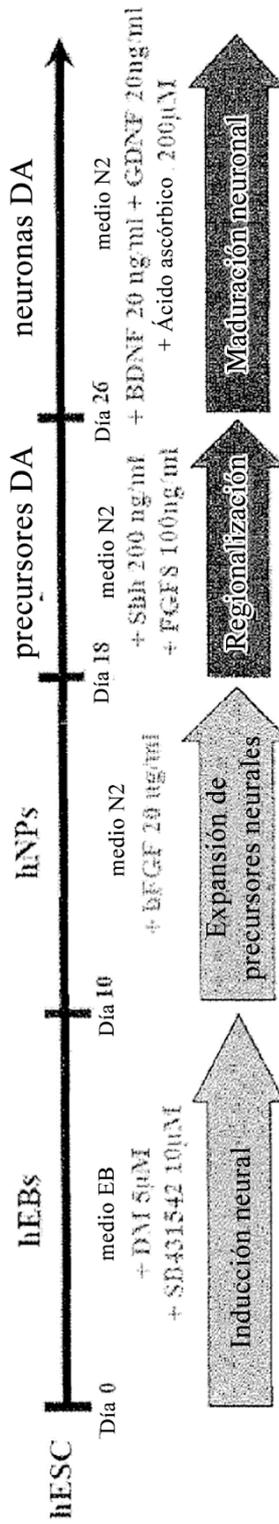


Fig. 5b

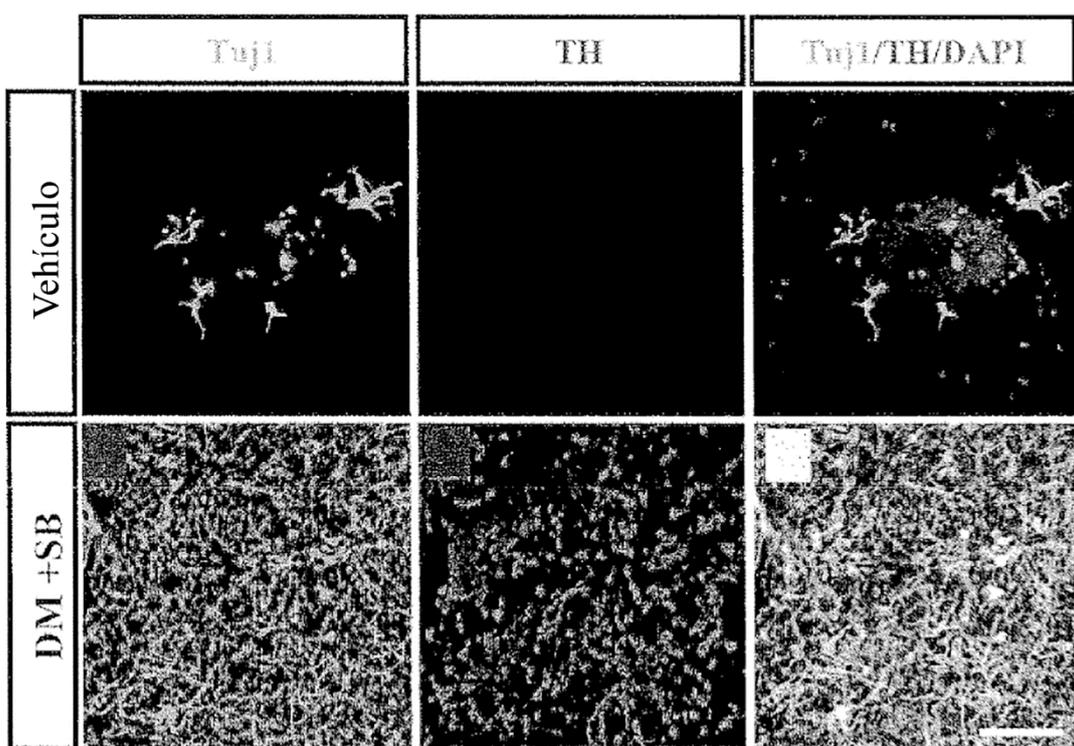


Fig. 5c

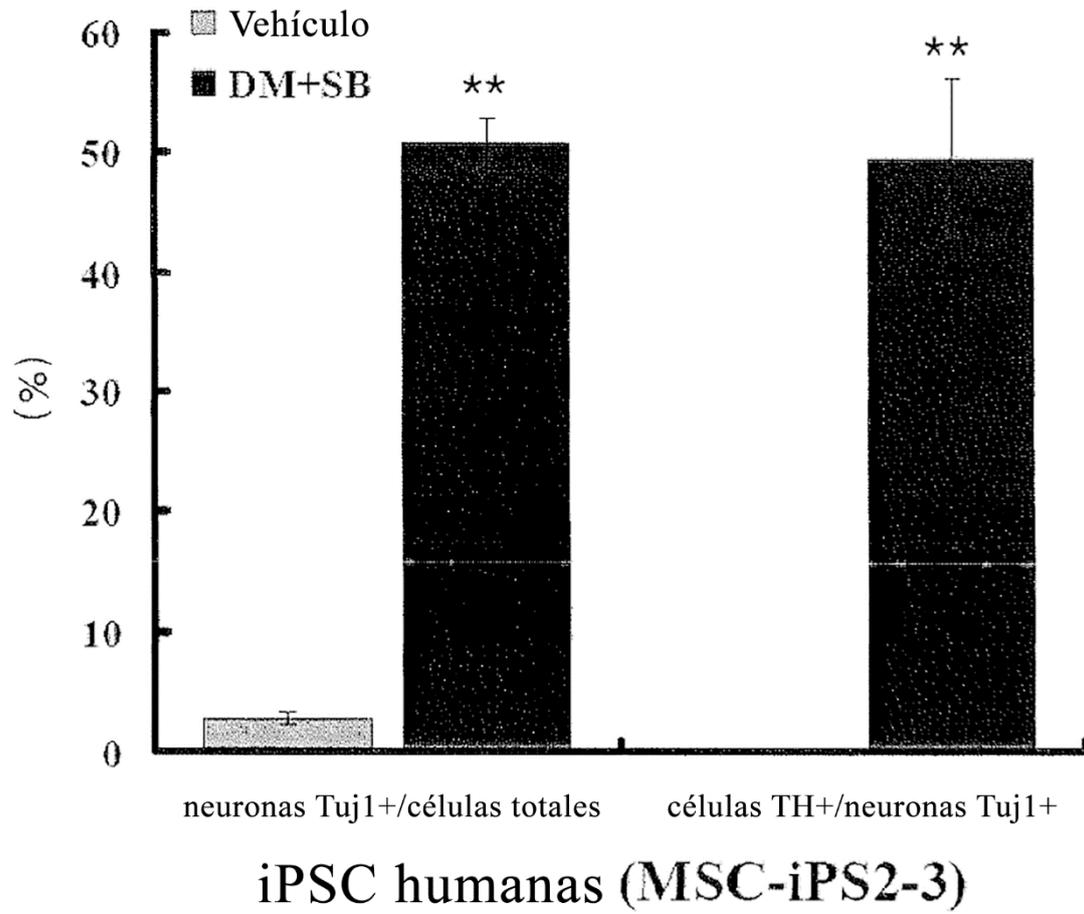


Fig. 6a

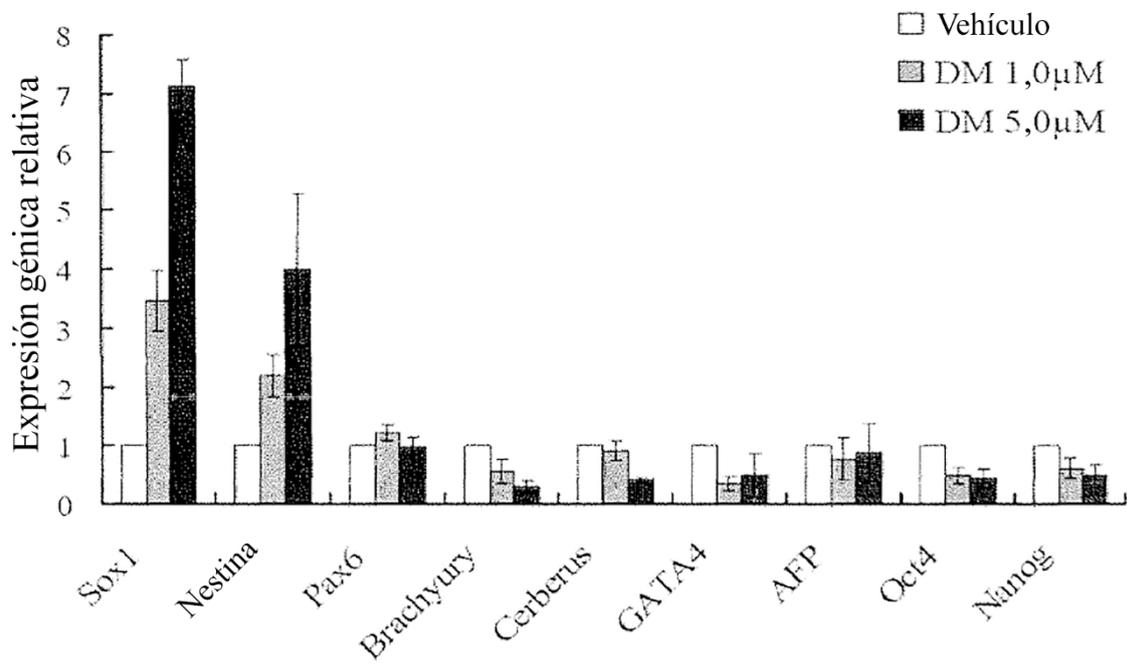


Fig. 6b

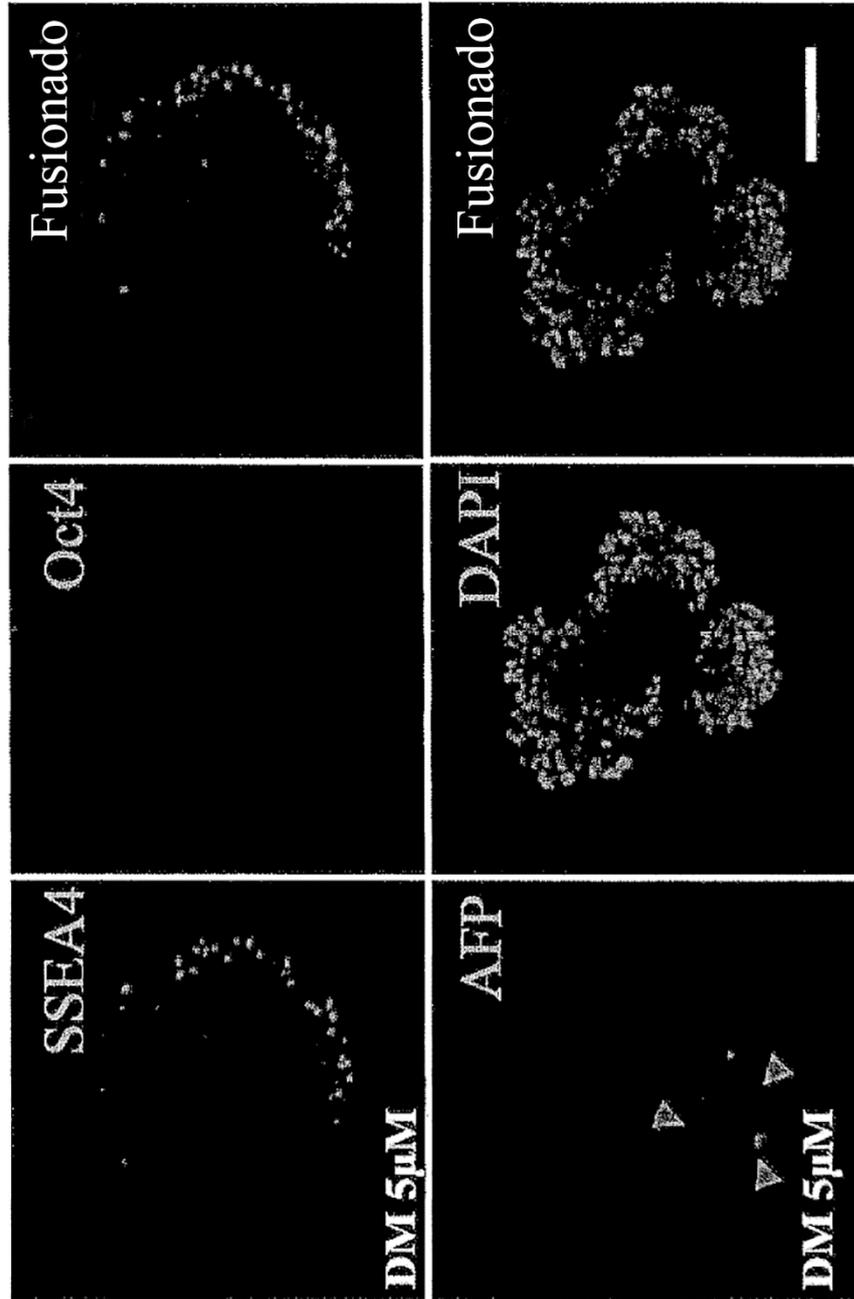


Fig. 6c

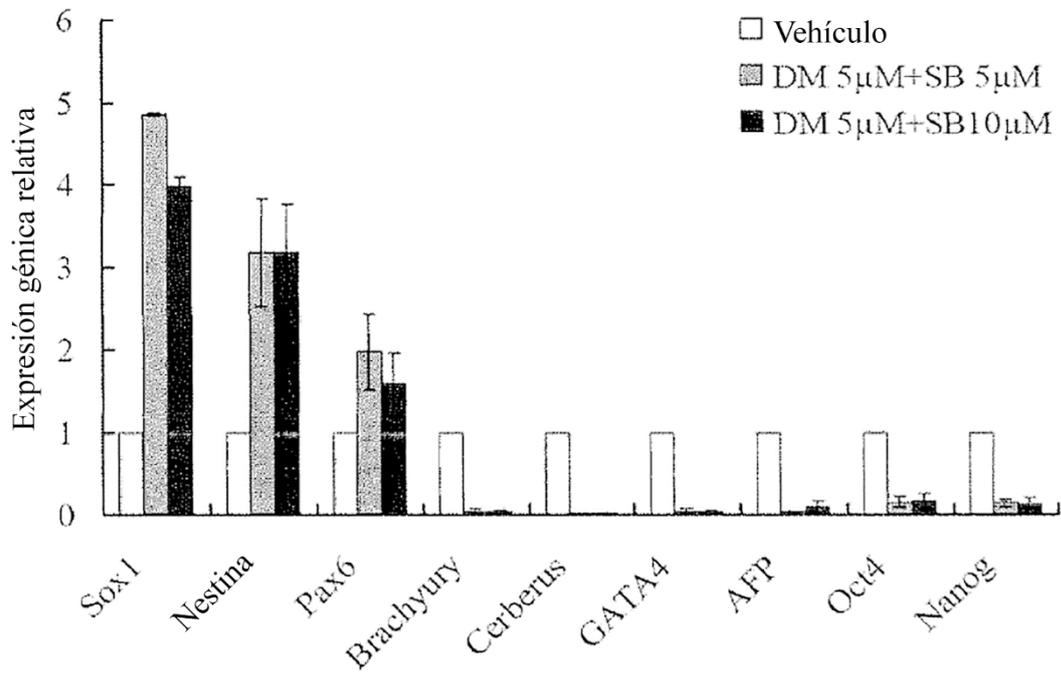


Fig. 6d

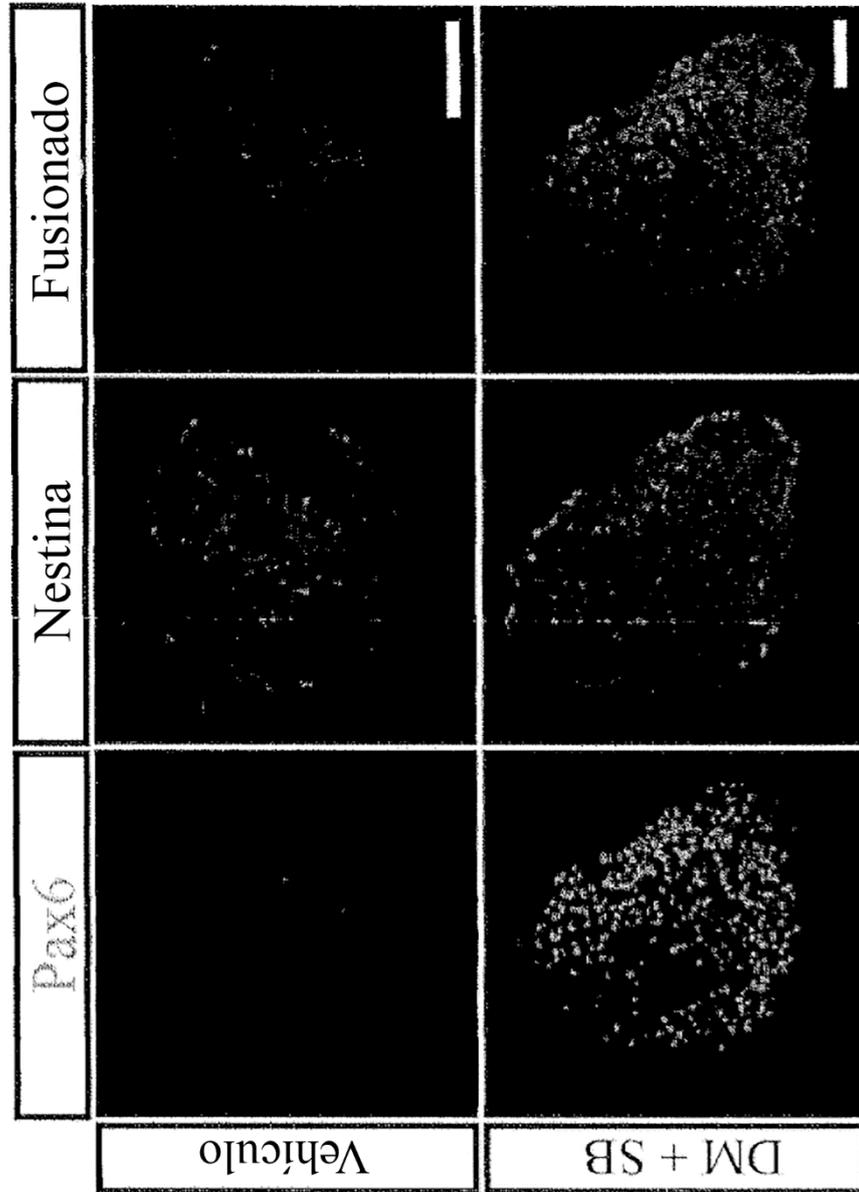


Fig. 7a

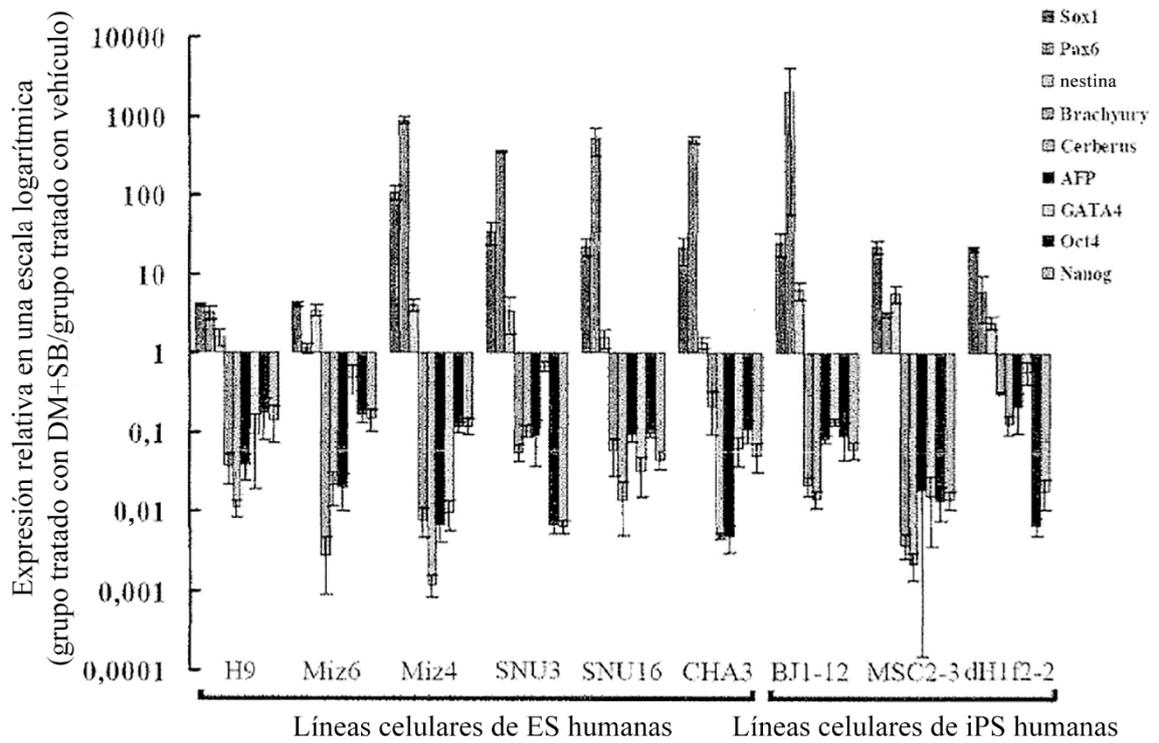


Fig. 7b

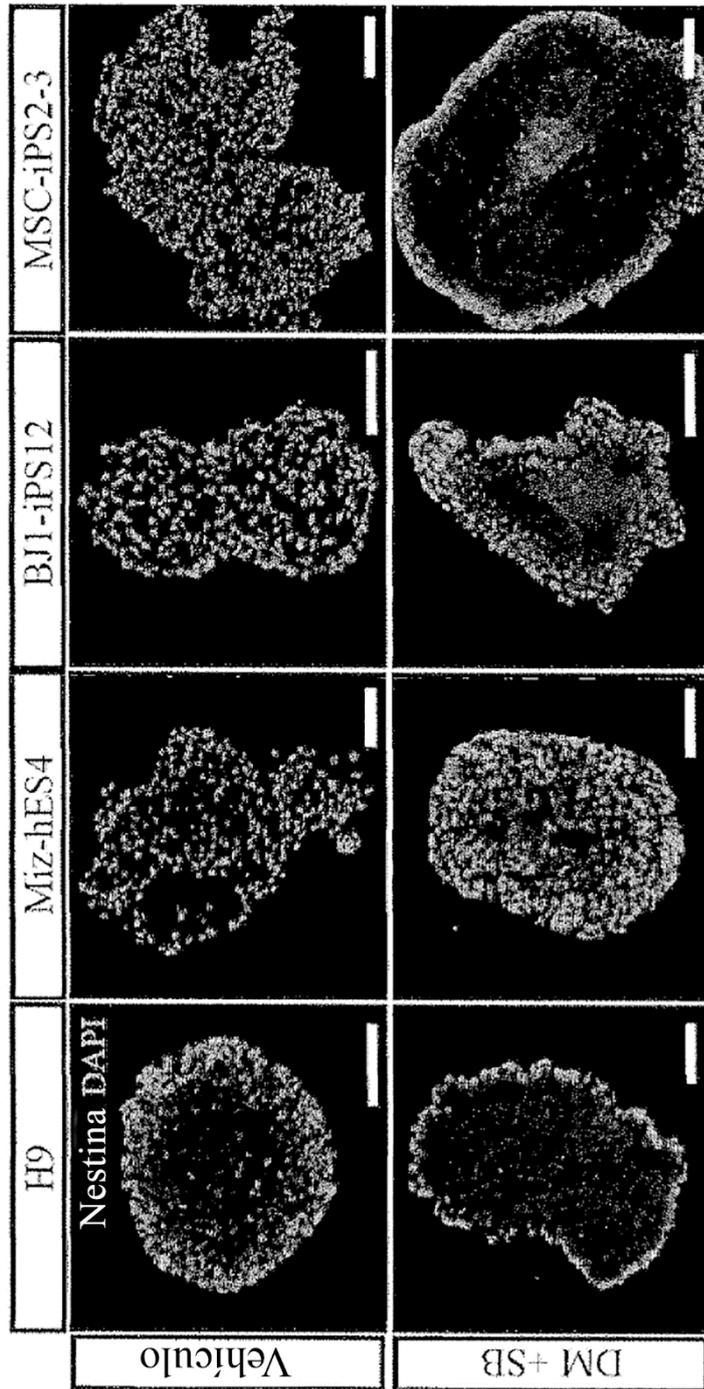


Fig. 8

