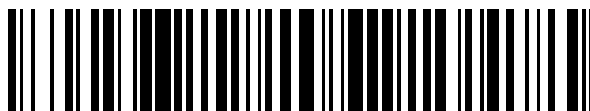


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 878**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 35/30 (2015.01)

A61L 27/00 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

C12N 5/0793 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2014** **PCT/JP2014/071352**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015** **WO15020234**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2014** **E 14834874 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018** **EP 3031908**

54 Título: **Método para producir neuronas dopaminérgicas**

30 Prioridad:

06.08.2013 JP 2013163062

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2019

73 Titular/es:

TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED
(100.0%)

1-1, Doshomachi 4-chome Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 541-0045, JP

72 Inventor/es:

SHOJI, MASANOBU

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 712 878 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 para producir neuronas dopaminérgicas

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método de producción de una neurona dopaminérgica. Además, la presente invención proporciona también un reactivo y un equipo de reactivos para utilizarse para el método.

Antecedentes de la invención

10 La dopamina (3,4-dihidroxifeniletilamina) es una molécula biológica que tiene una variedad de acciones, y funciona principalmente como un neurotransmisor en el sistema nervioso central. En el cuerpo, la dopamina se biosintetiza intracelularmente mediante la acción de dos enzimas de la tirosina hidroxilasa y la DOPA descarboxilasa con el aminoácido tirosina como origen.

15 La neurona dopaminérgica es una neurona que sintetiza y libera dopamina como un neurotransmisor. En el cerebro, está presente principalmente en el cerebro medio, y en parte en el hipotálamo. La neurona dopaminérgica presente en el cerebro medio juega un papel importante en la motilidad y el control emocional. Cuando la neurona dopaminérgica del cerebro medio se degenera o deja de existir, por ejemplo, se pueden inducir enfermedades neurodegenerativas graves tales como la enfermedad de Parkinson y similares. Uno de los enfoques terapéuticos más esperados para tratar dicha enfermedad neurodegenerativa es una terapia de trasplante celular que incluye el trasplante de una neurona dopaminérgica al objetivo.

20 Como un método para obtener una neurona dopaminérgica, se conoce actualmente un método que incluye la diferenciación de células madre tales como células madre embrionarias (algunas veces se referirán como células ES en la presente memoria descriptiva), células madre pluripotentes inducidas (algunas veces se referirán como células iPS en la presente memoria descriptiva) y similares en el neuroectodermo, y que inducen además la diferenciación en la neurona dopaminérgica.

25 Recientemente, se ha reportado que una neurona dopaminérgica del cerebro medio se produce a partir de células de la placa del suelo. Además, se ha reportado sucesivamente un método que incluye la diferenciación de células madres en células de la placa del suelo mediante el uso de dos tipos de inhibidores de la señalización de SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic) para obtener una neurona dopaminérgica del cerebro medio (documento de Patente 1, documento de no-Patente 1), un método para inducir una neurona dopaminérgica del cerebro medio mediante la inducción de las células de la placa del suelo a partir de células madre humanas y cultivar las células de la placa del suelo junto con un factor neurotrófico (documento de Patente 2, documentos de no-Patentes 2-4), y un método para inducir eficazmente las células de la placa del suelo mediante la reacción de células ES humanas con un inhibidor GSK3 beta y un inhibidor de activina/Nodal (documento de no-Patente 5).

35 Sin embargo, la eficacia de producción de las neuronas dopaminérgicas obtenidas mediante estos métodos sigue siendo baja, y también, las células son funcionalmente insuficientes ya que no pueden reproducir, in vitro, la capacidad de respuesta al estrés oxidativo y la estimulación farmacológica, y similares. Por lo tanto, aún se desea el desarrollo de un método para obtener de manera eficaz una neurona dopaminérgica de alta calidad.

Lista de documentos

Documentos de Patente

[Documento de Patente 1] US-B-2012/0094381

[Documento de Patente 2] WO 2013/067362

40 Documentos de no-Patente

[Documento de no-Patente 1] Fasano et al., Cell Stem Cell 6 (2010) 336-347

[Documento de no-Patente 2] Kriks et al., Nature 480 (2011) 547-553

[Documento de no-Patente 3] Kirkeby et al., Cell Reports 1 (2012) 703-714

[Documento de no-Patente 4] Xi et al., Stem Cells 30 (2012) 1655-1663

45 [Documento de no-Patente 5] Denham et al., Stems Cells 30 (2012) 2400-2411

Compendio de la invención

Problemas a resolver por la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para producir más efectivamente una neurona

dopaminérgica de alta calidad. La presente invención pretende además proporcionar un reactivo y un equipo de reactivos para ser utilizados para el método.

Métodos para resolver los problemas

En vista de los problemas anteriormente mencionados, los presentes inventores han realizado estudios intensivos y han encontrado que una neurona dopaminérgica se puede producir a una elevada densidad y con buena reproducibilidad mediante el cultivo de células progenitoras neurales en un medio que contiene (i) un análogo estructural del cAMP y (ii) una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de MEK o una sustancia que tiene una actividad inhibitoria del receptor de FGF. Además, han confirmado que la neurona dopaminérgica obtenida es una neurona dopaminérgica de alta calidad que tiene las mismas características y funciones fenotípicas que las de una neurona dopaminérgica in vivo y similares, lo que dio como resultado la finalización de la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención proporciona lo siguiente.

[1] Un método de producción de una neurona(s) dopaminérgica, que comprende someter las células de la placa del suelo a la siguiente etapa (1):

(1) una etapa de cultivo en un medio que contiene (i) un análogo estructural de cAMP y (ii) una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de MEK o una sustancia que tiene una actividad inhibitoria del receptor de FGF;

[2] El método de producción según [1] mencionado anteriormente, en donde el medio es un medio que contiene además ácido ascórbico o una sal del mismo;

[3] El método de producción según [2], en donde el medio es un medio que contiene además un activador de la quinasa-4,7 similar al receptor de la activina;

[4] El método de producción según [1], en donde el análogo de cAMP es dibutilil-cAMP;

[5] El método de producción según [1], en donde el inhibidor de MEK o del receptor de FGF es

(i) N-[(2R)-2,3-dihidroxiopropoxi]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-iodo-fenil)amino]benzamida (PD0325901),

(ii) 2-(2-cloro-4-iodofenilamino)-N-ciclopropilmetoxi-3,4-difluorobenzamida (PD184352), o

(iii) ácido 2-[(1,2-dihidro-2-oxo-3H-indol-3-iliden)metil]-4-metil-1H-pirrol-3-propanoico (SU5402);

[6] El método de producción según [1], en donde la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de MEK o del receptor de FGF es un oligonucleótido antisentido o siRNA para el mRNA del MEK o del receptor de FGF.

[7] El método de producción según [3], en donde el activador de la quinasa-4,7 similar al receptor de la activina es activina;

[8] El método de producción según [3], en donde el análogo de cAMP es dibutilil-cAMP, el inhibidor de MEK es

(i) N-[(2R)-2,3-dihidroxiopropoxi]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-iodo-fenil)amino]benzamida (PD0325901)

(ii) 2-(2-cloro-4-iodofenilamino)-N-ciclopropilmetoxi-3,4-difluorobenzamida (PD184352), o el inhibidor del receptor de FGF es

(iii) ácido 2-[(1,2-dihidro-2-oxo-3H-indol-3-iliden)metil]-4-metil-1H-pirrol-3-propanoico (SU5402), y el activador de la quinasa-4,7 similar al receptor de activina es activina,

[9] Un reactivo para producir una neurona(s) dopaminérgica a partir de las células de la placa del suelo, que comprende

(i) un análogo estructural de cAMP y (ii) una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de MEK o una sustancia que tiene una actividad inhibitoria del receptor de FGF; con la condición de que el reactivo no sea un reactivo que consiste en un medio de cultivo de hepatocitos sin EGF, 8-Br-cAMP 10 mM, XAV 939 1 μ M y PD032590 1 μ M.

[10] Un equipo de reactivos para producir una neurona(s) dopaminérgica a partir de las células de la placa del suelo, que comprende (i) un análogo estructural de cAMP y (ii) una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de MEK o una sustancia que tiene una actividad inhibitoria del receptor FGF; con la condición de que el reactivo no sea un reactivo que consiste en un medio de cultivo de hepatocitos sin EGF, 8-Br-cAMP 10 mM, XAV 939 1 μ M y PD032590 1 μ M.

[11] El uso de (i) un análogo estructural de cAMP y (ii) una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de MEK o una sustancia que tiene una actividad inhibitoria del receptor de FGF para producir una neurona(s) dopaminérgica a partir de las células de la placa del suelo.

Efecto de la invención

- 5 Según la presente invención, una neurona dopaminérgica de alta calidad se puede producir de manera más eficiente a partir de células progenitoras neurales. La neurona dopaminérgica producida por la presente invención tiene las características y funciones fenotípicas similares a las de las neuronas dopaminérgicas in vivo, ya que muestra una respuesta al estrés oxidativo y estimulación farmacológica que no se ha observado en neuronas dopaminérgicas producidas por métodos convencionales, y similares. Por lo tanto, la neurona dopaminérgica producida por la presente invención puede lograr una alta tasa de injerto y es extremadamente útil para una terapia de trasplante de células para tratar una enfermedad provocada por la producción (liberación) disminuida de dopamina, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y similares, así como se puede utilizar para diversas aplicaciones tales como la selección de un compuesto útil para la profilaxis y/o tratamiento de dichas enfermedades, evaluación de la toxicidad de los compuestos, verificación de los objetivos de descubrimiento de fármacos, análisis del mecanismo de la enfermedad y similares.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados de la variación de expresión de un marcador de las células de la placa del suelo, que se obtuvieron al inducir una diferenciación de las células de la placa del suelo utilizando Neuro/B27 añadido con varias combinaciones de factores que inducen la diferenciación y examinando la variación de la expresión mediante RT-PCR cuantitativa en el día 13 del cultivo. [-] muestra la no adición de cada factor que induce la diferenciación, [Todos] muestra las condiciones que utilizan los 5 tipos de LDN193189 (LDN), SB431542 (SB), Sonic Hedgehog (SHH), purmorfamina (Pur) y CHIR99021 (CHIR). [-nombre del factor] muestra las condiciones sin cada factor. Como líneas celulares, se utilizaron la cepa 253G1 y 201B7. El valor del eje Y muestra el número de copias de cada gen normalizado con el número de copias de GAPDH, y las barras de errores muestran la desviación estándar.

La Figura 2 muestra los resultados de la tinción inmunofluorescente de las células de la placa del suelo inducidas con el anticuerpo anti-FOXA2 y el anticuerpo anti-LMX1A en el día 13 del cultivo. Como línea celular, se utilizó la cepa 253G1. El rojo muestra el núcleo de las células positivas FOXA2, el verde muestra el núcleo de las células positivas LMX1A, y el azul (tinción con DAPI) muestra el núcleo celular.

La Figura 3 muestra los resultados de la variación de expresión de NURR1, que se obtuvieron mediante la inducción de la diferenciación de las células de las placas del suelo, cultivando las células mediante la adición de varias combinaciones de ácido ascórbico (AA), dibutiril-cAMP (dbcAMP) y PD0325901 (PD) a partir de 13 días después de la inducción, y examinando la variación de la expresión mediante RT-PCR cuantitativa en el día 45. Como líneas celulares, se utilizaron la cepa 253G1 y la cepa 201B7. El valor del eje Y muestra el número de copias de cada gen normalizado con el número de copias de GAPDH, y las barras de errores muestra la desviación estándar.

La Figura 4 muestra los resultados de la tinción inmunofluorescente utilizando el anticuerpo anti-TH y el anticuerpo anti-NURR1 en el día 45 del cultivo, después de la inducción de la diferenciación de la misma manera que en la Figura 3. Como líneas celulares, se utilizaron la cepa 253G1 y la cepa 201B7. El verde muestra el cuerpo celular de las células positivas TH, y el rojo muestra el núcleo de las células positivas NURR1.

La Figura 5 muestra los resultados de la tinción inmunofluorescente, que se obtuvieron mediante la inducción de la diferenciación de las células de la placa del suelo, cultivando las células mediante la adición de ácido ascórbico (AA), dibutiril-cAMP (dbcAMP) y PD0325901 (PD) a partir de 13 días después de la inducción, y realizando la tinción inmunofluorescente utilizando el anticuerpo anti-TH, anticuerpo anti-NURR1 y anticuerpo anti-FOXA2 en el día 45 (cepa 253G1) o día 52 (cepa 201B7). Como líneas celulares, se utilizaron la cepa 253G1 y la cepa 201B7. El verde muestra el cuerpo celular de las células positivas TH, el rojo muestra el núcleo de las células positivas NURR1, el magenta muestra el núcleo de las células positivas FOXA2, y el azul (tinción con DAPI) muestra el núcleo celular.

La Figura 6 muestra la observación de los resultados obtenidos utilizando la cepa 253G1 en la Figura 5 a gran aumento. El verde muestra el cuerpo celular de las células positivas TH, el rojo muestra el núcleo de las células positivas NURR1, y el azul (tinción con DAPI) muestra el núcleo celular.

La Figura 7 muestra los resultados de la evaluación de una capacidad para liberar dopamina mediante la estimulación con KCl alto en el día 50 del cultivo, después de la inducción de la diferenciación de la misma manera que en la Figura 5. Como líneas celulares, se utilizaron la cepa 253G1 y la cepa 201B7, y se muestran los resultados de dos experimentos independientes. Ctrl muestra las condiciones de estimulación con HBSS, y KCL muestra las condiciones de estimulación con HBSS que contiene KCl 55 mM. El valor del eje Y muestra el valor relativo cuando la cantidad de dopamina liberada en el grupo de control es 1, y la barra de error muestra la desviación estándar.

La Figura 8 muestra los resultados de la variación de expresión de NURR1, que se obtuvieron mediante la inducción de la diferenciación de las células de la placa del suelo, cultivando las células mediante la adición de varios inhibidores de MEK (incluyendo inhibidores de FGFR) además de ácido ascórbico (AA) y dibutiril-cAMP (dbcAMP) a

partir de 13 días después de la inducción, y examinando la variación de la expresión mediante RT-PCR cuantitativa en el día 45. Como línea celular, se utilizaron la cepa 253G1 y la cepa 201B7. El valor del eje Y muestra el número de copias de cada gen normalizado con el número de copias de GAPDH, y la barra de error muestra la desviación estándar.

- 5 La Figura 9 muestra un dibujo esquemático de un método para inducir la diferenciación de células iPS humanas en las células de la placa del suelo y neuronas dopaminérgicas.

La Figura 10 muestra los resultados de la variación de expresión en el transcurso del tiempo de varios marcadores de diferenciación como se examinó mediante RT-PCR cuantitativa, cuando la inducción de la diferenciación se realizó según el método de la Figura 9. [Todos], [-], [-SHH], y [-Pur] muestran que la inducción de la diferenciación se realizó según la Figura 9, excluyendo CHIR99021, LDN193189, SB431542, SHH y purmorfamina, excluyendo SHH solo, y excluyendo purmorfamina sola, respectivamente. Como líneas celulares, se utilizaron la cepa 253G1 y la cepa 201B7. El valor del eje Y muestra el número de copias de cada gen normalizado con el número de copias de GAPDH, y la barra de error muestra la desviación estándar.

La Figura 11 muestra los resultados de la variación de expresión de los marcadores de neuronas dopaminérgicas, que se obtuvieron mediante la inducción de la diferenciación, en la etapa 3 mostrada en la Figura 9, mediante la adición de varias combinaciones de ácido ascórbico (AA), dibutiril-cAMP (dbcAMP), PD0325901 (PD) y activina A (Act) y examinando la variación de expresión de los marcadores de neuronas dopaminérgicas mediante RT-PCR cuantitativa en el día 26 del cultivo. [-] muestra la no adición de cada factor que induce la diferenciación. Como líneas celulares, se utilizaron la cepa 253G1 y la cepa 201B7. El valor del eje Y muestra el número de copias de cada gen normalizado con el número de copias de GAPDH, y la barra de error muestra la desviación estándar.

La Figura 12 muestra los resultados de la tinción inmunofluorescente utilizando un anticuerpo anti-TH y un anticuerpo anti-NURR1 en el día 26 del cultivo, después de la inducción de la diferenciación de la misma manera que en la Figura 11. Como líneas celulares, se utilizaron la cepa 253G1 y la cepa 201B7. El verde muestra el cuerpo celular de las células positivas TH, y el rojo muestra el núcleo de las células positivas NURR1.

La Figura 13 muestra los resultados de la variación de expresión de los marcadores de neuronas dopaminérgicas, que se obtuvieron mediante la inducción de la diferenciación, en la etapa 3 mostrada en la Figura 9, mediante la adición de varias combinaciones de ácido ascórbico (AA), dibutiril-cAMP (dbcAMP), PD0325901 (PD) y activina A (Act), crioconservando las células en el día 26 de cultivo, descongelando las células, cultivando las células durante 2 semanas mediante la adición de varias combinaciones de AA, dbcAMP, PD y ACT, y examinando la variación de expresión de los marcadores de neuronas dopaminérgicas mediante RT-PCR cuantitativa en el día 26 de cultivo. [-] muestra la no adición de cada factor que induce diferenciación. Como líneas celulares, se utilizaron la cepa 253G1 y la cepa 201B7. El valor del eje Y muestra el número de copias de cada gen normalizado con el número de copias de GAPDH, y la barra de error muestra la desviación estándar.

La Figura 14 muestra los resultados de la tinción inmunofluorescente, que se obtuvieron mediante descongelación de las células crioconservadas de la misma manera que en la Figura 13, cultivando las células durante 2 semanas mediante la adición de AA, dbcAMP, PD y ACT, y realizando la tinción inmunofluorescente utilizando un anticuerpo anti-TH y un anticuerpo anti-NURR1. El verde muestra el cuerpo celular de las células positivas TH, el rojo muestra el núcleo de las células positivas NURR1, y el azul (tinción con DAPI) muestra el núcleo celular.

La Figura 15 muestra los resultados de la tinción de tejidos, que se obtuvieron mediante la inducción de la diferenciación, en la etapa 3 mostrada en la Figura 9, mediante la adición de ácido ascórbico, dbcAMP, PD0325901 (grupo de control; cuatro piezas de paneles en el lado izquierdo) o ácido ascórbico, dbcAMP, PD0325901 y activina A (grupo de activina A; cuatro piezas de paneles en el lado derecho), recuperando las células en el día 26 del cultivo, trasplantando las células al estriado del ratón, y realizando la tinción de los tejidos 4 semanas después del trasplante. El verde muestra el cuerpo celular de las células positivas TH, el rojo muestra el núcleo de las células positivas hNuc, y el azul (tinción con DAPI) muestra el núcleo celular.

La Figura 16 muestra los resultados de la tinción de los tejidos después del trasplante de la misma manera que en la Figura 15 y a 8 semanas después del trasplante. El verde muestra el cuerpo celular de las células positivas TH, el rojo muestra el núcleo de las células positivas hNuc, y el azul (tinción con DAPI) muestra el núcleo celular.

La Figura 17 muestra los resultados de la tinción de los tejidos después del trasplante de la misma manera que en la Figura 15 y a 12 semanas después del trasplante. El verde muestra el cuerpo celular de las células positivas TH, el rojo muestra el núcleo de las células positivas hNuc, y el azul (tinción con DAPI) muestra el núcleo celular.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se explica a continuación. Los términos utilizados en la presente memoria descriptiva tienen los mismos significados que los que se utilizan generalmente en el campo pertinente, a menos que se indique particularmente.

En la presente memoria descriptiva, la "neurona dopaminérgica" significa una neurona que tiene la capacidad para

producir dopamina (3,4-dihidroxifeniletilamina). La neurona dopaminérgica no necesita producir dopamina todo el tiempo, sino que solo necesita tener la capacidad de producir dopamina. La cantidad de dopamina que se va a producir no está particularmente limitada.

De las neuronas dopaminérgicas in vivo, particularmente las neuronas dopaminérgicas presentes en el cerebro medio tales como la parte compacta de la sustancia negra, el área tegmental ventral y similares se pueden caracterizar por la expresión de un marcador celular particular in vitro, tal como la tirosina hidroxilasa (TH), FOXA2 (forkhead box A2), NURR1 (relacionado con el receptor nuclear 1) gen/proteína y similares. Además, las neuronas dopaminérgicas anteriormente mencionadas presentes en el cerebro medio pueden caracterizarse también mediante la expresión de un marcador celular particular in vitro, tal como TH, FOXA2, LMX1A (factor de transcripción homeobox 1 alfa LIM), NURR1 gen/proteína y similares.

La "neurona dopaminérgica" obtenida al someter las células de la placa del suelo al método de producción de la presente invención es una neurona dopaminérgica presente en el cerebro medio (es decir, una neurona dopaminérgica del cerebro medio).

En la presente memoria descriptiva, la "célula progenitora neural" se refiere a una célula capaz de producir una neurona dopaminérgica después de la diferenciación, que es específicamente, por ejemplo, células de la placa del suelo, una célula del neuroectodermo caracterizada por un marcador de expresión, tal como la proteína de filamento intermedio Nestina y similares, lo más preferible una célula de la placa del suelo.

En la presente memoria descriptiva, la "célula de la placa del suelo" significa una célula organizadora morfológicamente especializada localizada desde la médula espinal hasta el diencefalo, en la línea media ventral del tubo neural. De las células de la placa del suelo, particularmente una localizada en el cerebro medio ventral se puede caracterizar in vitro mediante la expresión de un marcador celular particular tal como FOXA2, gen/proteína LMX1A y similares.

En la presente memoria descriptiva, la "célula madre" se refiere a una célula que se puede cultivar in vitro y puede diferenciarse en células de linajes plurales que constituyen el cuerpo. Incluyen específicamente células ES, células madre pluripotentes derivadas de células germinales primordiales fetales (células EG: Proc Natl Acad Sci U S A. 1998, 95: 13726-31), células madre pluripotentes derivadas de testículos (células GS: Nature. 2008, 456: 344-9), células madre pluripotentes inducidas derivadas de células somáticas (células madre pluripotentes inducidas: células iPS), y células madre somáticas pluripotentes humanas (células madre neurales), preferiblemente células iPS y células ES, más preferiblemente células iPS.

Como células ES, se puede utilizar una célula ES derivada de cualquier animal de sangre caliente, preferiblemente un mamífero. Los ejemplos de mamíferos incluyen ratones, ratas, cobayas, hámster, conejos, gatos, perros, ovejas, cerdos, bovinos, caballos, cabras, monos y humanos. Los ejemplos preferidos de las células ES incluyen células ES derivadas de humanos.

Los ejemplos específicos de las células ES incluyen una célula ES de un mamífero y similares, que se ha establecido mediante el cultivo de un embrión temprano antes de la implantación, una célula ES establecida mediante el cultivo de un embrión temprano preparado por trasplante del núcleo del núcleo de una célula somática, y una célula ES obtenida por alteración de un gen en los cromosomas de estas células ES mediante un método de ingeniería genética.

Cada célula ES se puede preparar según un método realizado generalmente en el campo pertinente, o un documento conocido.

La célula ES del ratón se estableció en 1981 por Evans et al (1981, Nature 292: 154-6) y Martin GR. et al (1981, Proc Natl Acad Sci 78: 7634-8) y puede adquirirse en, por ejemplo, Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd. (Osaka, Japan) y similares.

La célula humana ES se estableció en 1998 por Thomson et al (Science, 1998, 282: 1145-7), y está disponible en WiCell Research Institute. (sitio web: <http://www.wicell.org/>, Madison, Wisconsin, USA), US National Institute of Health, Kyoto University y similares y se puede adquirir en, por ejemplo, Cellartis (sitio web: <http://www.cellartis.com/>, Sweden) y similares.

Como una célula iPS, se puede utilizar una célula iPS derivada de cualquier animal de sangre caliente, preferiblemente mamífero. Los ejemplos de mamífero incluyen ratón, rata, cobaya, hámster, conejo, gato, perro, oveja, cerdo, bovinos, caballo, cabras, monos y humanos. Los ejemplos preferidos de las células iPS incluyen células iPS derivadas de humanos.

Los ejemplos específicos de las células iPS incluyen una célula que adquirió multipotencia como en la célula ES, que puede obtenerse introduciendo genes plurales en una célula somática tal como células de la piel y similares. Por ejemplo, una célula iPS obtenida introduciendo el gen Oct 3/4, gen Klf4, gen c-Myc y gen Sox2, y una célula iPS obtenida introduciendo el gen Oct 3/4, gen Klf4 y gen Sox2 (Nat Biotechnol 2008; 26: 101-106). Además de estos, un método para disminuir más el transgén (Nature. 2008 Jul 31; 454 (7204): 646-50), un método que utiliza un

compuesto de bajo peso molecular (Cell Stem Cell. 2009 Jan 9; 4(1): 16-9, Cell Stem Cell. 2009 Nov 6; 5(5): 491-503), un método que utiliza una proteína de factor de transcripción en lugar de un gen (Cell Stem Cell. 2009 May 8; 4(5): 381-4) y similares.

5 La célula iPS producida puede utilizarse para la presente invención independientemente del método de producción de la misma.

Los ejemplos de la línea celular iPS humana incluyen, específicamente, la cepa 253G1 (línea celular iPS preparada mediante la expresión de OCT4/SOX2/KLF4 en el fibroblasto de la piel de hembras de 36 años), la cepa 201B7 (línea celular iPS preparada mediante la expresión de OCT4/SOX2/KLF4/c-MYC en el fibroblasto de la piel de hembras de 36 años), 1503-iPS (297A1) (línea celular iPS preparada mediante la expresión de OCT4/SOX2/KLF4/c-MYC en el fibroblasto de la piel de hembras de 73 años), 1392-iPS (297F1) (línea celular iPS preparada mediante la expresión de OCT4/SOX2/KLF4/c-MYC en el fibroblasto de la piel de machos de 56 años), NHDF-iPS (297L1) (línea celular iPS preparada mediante la expresión de OCT4/SOX2/KLF4/c-MYC en el fibroblasto de la piel de niños recién nacidos) y similares.

1. Método de producción de neuronas dopaminérgicas

15 La presente invención proporciona un método de producción de una neurona dopaminérgica, que comprende someter las células de la placa del suelo a la siguiente etapa (1):

(1) una etapa de cultivo en un medio que contiene (i) un análogo estructural de cAMP (adenosin monofosfato cíclico) y (ii) una sustancia que tiene una actividad inhibidora de MEK o una sustancia que tiene una actividad inhibidora del receptor de FGF (en lo sucesivo, se denomina método de producción de la presente invención).

20 Un método para obtener una célula progenitora neural para utilizar en el método de producción de la presente invención no está particularmente limitado, y la célula puede recuperarse directamente del embrión del animal objetivo. Para obtener una gran cantidad de células progenitoras neurales, se produce preferiblemente a partir de una célula madre como material de partida.

25 Un método para obtener una célula progenitora neural a partir de una célula madre no está particularmente limitado, y se puede utilizar un método conocido per se, tal como un método que incluye el cultivo de células madre pluripotentes en presencia de un inhibidor de BMP de bajo peso molecular, un método de inducción de la diferenciación mediante un co-cultivo con células estromales (método SDIA) y similares.

30 Si bien la célula progenitora neural que se utilizará en el método de producción de la presente invención puede ser cualquiera siempre y cuando se pueda producir una neurona dopaminérgica después de la diferenciación, una célula de la placa del suelo se utiliza más preferiblemente como célula de partida. Por lo tanto, a continuación, se describe específicamente un método para diferenciar una célula madre en una célula de la placa del suelo.

1.1 Método de diferenciación de la célula madre en las células de la placa del suelo.

Este método de diferenciación incluye una etapa de cultivo de células madre en un medio que contiene un factor que induce la diferenciación de las células de la placa del suelo.

35 En el presente método de diferenciación (método de inducción de la diferenciación), la célula madre generalmente se cultiva en un recipiente de cultivo. Los ejemplos del recipiente de cultivo que se van a utilizar aquí incluyen matraz, matraz de cultivo de tejidos, plato, plato Petri, plato de cultivo de tejidos, multiplatos, microplaca, placa de micropocillos, multiplaca, placa de múltiples pocillos, portaobjetos, placa de Petri, tubo, bandeja, bolsa de cultivo, y botella de rodillo. Se prefieren platos, plato Petri, plato de cultivo de tejidos, multiplatos, microplacas, placa de micropocillos, multiplaca, placa de múltiples pocillos y similares. El recipiente de cultivo se aplica preferiblemente con un recubrimiento adecuado para el mantenimiento y cultivo de las células madre. Específicamente, se utiliza preferiblemente un recipiente de cultivo recubierto con una célula de alimentación o un componente de sustrato extracelular. Si bien la célula de alimentación no está particularmente limitada, por ejemplo, se pueden mencionar los fibroblastos (fibroblasto embrionario de ratón (MEF), fibroblasto de ratón (STO) y similares). La célula de alimentación se inactiva preferiblemente mediante un método conocido per se, por ejemplo, irradiación de radiación (rayos gamma y similares), un tratamiento con un agente anticancerígeno (mitomicina C y similares) y similares. Los ejemplos del componente de sustrato extracelular incluyen proteínas fibrosas tales como gelatina, colágeno, elastina y similares, glucosaminoglicanos y proteoglicanos tales como ácido hialurónico, sulfato de condroitina y similares, proteínas de adhesión celular tales como fibronectina, vitronectina, laminina y similares, componentes de láminas basales tales como Matrigel y similares, y similares.

55 El factor que induce la diferenciación de las células de la placa del suelo que se utiliza en el método de diferenciación no está particularmente limitado siempre que sea una sustancia que se induzca la diferenciación en una célula de la placa del suelo, y se puede utilizar cualquier sustancia conocida como factor que induce la diferenciación de las células de la placa del suelo. La sustancia incluye compuestos de bajo peso molecular, péptidos, proteínas y similares. Los ejemplos de factores que inducen la diferenciación de las células de la placa del suelo incluyen inhibidores de BMP tales como Noggin, LDN-193189 (clorhidrato de 4-(6-(4-(piperazin-1-

il)fenil)pirazol[1,5-a]pirimidin-3-il)quinolina), dorsomofina (6-[4-(2-piperidin-1-iletoksi)fenil]-3-piridin-4-ilpirazol[1,5-a]pirimidina) y similares; inhibidores de la familia TGF β tales como SB431542 (4-[4-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]-benzamida), A-83-01 (3-(6-metilpiridin-2-il)-1-feniltiocarbamoil-4-quinolin-4-ilpirazol) y similares; inhibidores de GSK3 β tales como CHIR99021 (6-[[2-[[4-(2,4-diclorofenil)-5-(5-metil-1H-imidazol-2-il)-2-pirimidinil]amino]etil]amino]-3-piridincarbonitrilo, BIO (6-bromo-indirubin-3'-oxima) y similares; agonistas alisados tales como purmorfamina (N-(4-morfolinofenil)-2-(1-naftiloxi)-9-ciclohexil-9H-purin-6-amina), SAG (N-metil-N'-(3-piridinilbencil)-N'-(3-clorobenzo[b]tiofen-2-carbonil)-1,4-diaminociclohexano y similares; y factores de crecimiento tales como Sonic hedgehog (SHH), factor 8 de crecimiento de fibroblastos (FGF8) y similares. Estos se pueden adquirir de Axon Medchem BV, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Enzo Life Sciences, Inc., Merck Bioscience, Tocris bioscience, Stemgent, Inc, Sigma, R&D, PeproTech, Inc. y similares, y el mismo nombre o el mismo nombre comercial indica la misma sustancia, y la estructura y las propiedades son iguales independientemente de los fabricantes. Incluso cuando no están disponibles comercialmente como productos, los expertos ordinarios en la técnica también pueden prepararlos según documentos conocidos.

Los presentes inventores han encontrado que la diferenciación de una célula madre en una célula de la placa del suelo puede ser inducida más eficientemente por este método de diferenciación al realizar un cultivo primario durante 3-5 días en un medio que contiene LDN193189, SB431542, purmorfamina y CHIR99021 (SHH está opcionalmente contenido), seguido por un cultivo secundario en un medio que contiene LDN193189 y CHIR99021 durante 5-8 días.

Por lo tanto, una célula madre se puede inducir de manera eficiente para diferenciarse en una célula de la placa del suelo mediante un uso combinado de LDN193189, SB431542, purmorfamina y CHIR99021 como el factor que induce la diferenciación de las células de la placa del suelo anteriormente mencionado, incluso sin añadir un componente proteico tal como SHH y similares al medio, y una célula de la placa del suelo, y además, una neurona dopaminérgica, se puede producir a un coste menor que antes.

Si bien la concentración del factor que induce la diferenciación de las células de la placa del suelo en el medio en este método de diferenciación se determina apropiadamente según el tipo de factor que se va a utilizar, por ejemplo, la concentración de LDN193189, purmorfamina y CHIR99021 cuando se utilizan como un factor que induce la diferenciación de las células de la placa del suelo es generalmente de 0,05-10 μ M, preferiblemente 0,1-5 μ M, para cada una de ellas. La concentración cuando se utiliza SB431542 como un factor que induce la diferenciación de las células de la placa del suelo es generalmente 1-20 μ M, preferiblemente 5-15 μ M. La concentración cuando se utiliza SHH como un factor que induce la diferenciación de las células de la placa del suelo es generalmente 10-500 ng/ml, preferiblemente 100-300 ng/ml.

Un medio que se va a utilizar para este método de diferenciación no está particularmente limitado siempre y cuando el factor que induce la diferenciación de las células de la placa del suelo esté contenido y sea generalmente un medio utilizado para el cultivo de células madre (de aquí en adelante a veces se denominará también medio basal) añadido con un factor que induce la diferenciación de las células de la placa del suelo.

El medio basal anteriormente mencionado no está particularmente limitado siempre y cuando se pueda utilizar para el cultivo de células animales, tales como medio Neurobasal, medio Neurobasal-A, medio basal progenitor neural, medio NS-A, medio BME, medio BGJb, medio CMRL 1066, medio MEM de Glasgow, medio MEM mejorado con opción de Zinc, medio IMDM, medio Medium 199, medio MEM de Eagle, medio α MEM, medio DMEM, medio DMEM/F12, medio de ham, medio RPMI 1640, medio de Fischer, y un medio de mezcla de los mismos y similares. Estos medios basales se pueden adquirir en Invitrogen, SIGMA, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd. y similares, y el mismo nombre o el mismo nombre comercial de un medio indica la misma composición del medio, independientemente de los fabricantes. Dado que la inducción de la diferenciación en las células de la placa del suelo se puede realizar de manera más eficiente, el medio DMDM/F12, el medio Neurobasal, y un medio mezcla de los mismos se utiliza preferiblemente como medio basal.

El medio que se va a utilizar en este método de diferenciación puede ser un medio que contiene suero o un medio libre de suero. Como se utiliza en la presente memoria, el medio libre de suero significa un medio basal libre de un suero no ajustado o no purificado, y un medio que contiene componentes derivados de la sangre purificados y componentes derivados de tejidos animales (por ejemplo, factor de crecimiento) corresponde a un medio libre de suero. Cuando el método que se va a utilizar en este método de diferenciación es un medio que contiene suero, y como suero se puede utilizar suero de un mamífero tal como suero fetal bovino y similares. La concentración del suero en el medio es generalmente 0,01-20 % en peso, preferiblemente 0,1-10 % en peso.

El medio que se va a utilizar en este método de diferenciación puede contener también un sustituto del suero. Los ejemplos de sustitutos del suero incluyen albúmina (por ejemplo, albúmina rica en lípidos), transferrina, ácidos grasos, precursor del colágeno, oligoelementos (por ejemplo, zinc, selenio), suplemento de B-27, suplemento de N2, sustituto de suero knockout, 2-mercaptoetanol, 3'-tioglicerol, y equivalentes de los mismos. La concentración de estos en el medio es la misma que la concentración del suero anteriormente mencionado en el medio.

En este método de diferenciación, el suplemento N2 y el suplemento B-27 (Brewer G.J. et al., J. Neurosci. Res. (1993) 35, 567) se añaden preferiblemente al medio como un sustituto del suero.

En este caso, la concentración del suplemento N2 en el medio es preferiblemente 0,1-10% en peso, más preferiblemente 0,5-2% en peso, y la concentración del suplemento B-27 es preferiblemente 0,1-10% en peso, más preferiblemente 1-5% en peso.

5 El sustituto de suero knockout se puede adquirir de Invitrogen. Otros sustitutos del suero se pueden adquirir de Invitrogen, SIGMA, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd. y similares, y el mismo nombre o el mismo nombre comercial de un reactivo o aditivo indica la misma composición independientemente de los fabricantes.

10 El medio que se va a utilizar en este método de diferenciación puede contener también un lípido, aminoácido (por ejemplo, un aminoácido no esencial), vitamina, factor de crecimiento, citoquina, antioxidante, 2-mercaptoetanol, ácido pirúvico, agente tamponante, sal inorgánica, antibiótico (por ejemplo, penicilina y estreptomycin) o agente antibacteriano (por ejemplo, anfotericina B) y similares. La concentración de estos en el medio es la misma que la concentración del suero mencionado anteriormente en el medio.

15 Otras condiciones de cultivo tales como temperatura de cultivo, concentración de CO₂ y similares se pueden determinar apropiadamente. Si bien la temperatura de cultivo no está particularmente limitada, es, por ejemplo, aproximadamente 30-40°C, preferiblemente aproximadamente 37°C. La concentración de CO₂ es, por ejemplo, aproximadamente 1-10%, preferiblemente aproximadamente 5%.

20 En este método de diferenciación, la diferenciación de una célula madre en una célula de la placa del suelo se puede confirmar mediante la evaluación de la variación de la expresión de proteínas y genes que se expresan específicamente por las células de la placa del suelo (en la presente memoria descriptiva, las proteínas y genes anteriormente mencionados se denominan a veces como marcadores de células de la placa del suelo). La evaluación de la variación de la expresión de los marcadores de las células de la placa del suelo anteriormente mencionada se puede realizar mediante, por ejemplo, un método de evaluación de la expresión de proteínas utilizando una reacción antígeno-anticuerpo, un método de evaluación de la expresión génica utilizando RT-PCR cuantitativa, y similares. Los ejemplos de los marcadores de células de la placa del suelo anteriormente
25 mencionados, que se diferencian en el cerebro medio, incluyen FOXA2 y el gen/proteína de LMX1A.

1-2. Método para producir una neurona dopaminérgica a partir de una célula progenitora neural (el método de producción de la presente invención)

30 Las células progenitoras neurales tales como las células de la placa del suelo obtenidas por el método de diferenciación anteriormente mencionado, y similares, se pueden diferenciar además en una neurona dopaminérgica mediante una etapa de cultivo en un medio que contiene (i) un análogo estructura de cAMP y (ii) una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de MEK o una sustancia que tiene una actividad inhibitoria del receptor de FGF. Cuando se utiliza una célula de la placa del suelo como una célula progenitora neural, la adición de factores neurotróficos tales como factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) y similares a un medio, que generalmente se utiliza para la inducción de la diferenciación de una
35 célula de la placa del suelo en una neurona dopaminérgica, no es esencial en el método de producción de la presente invención.

El análogo de cAMP que se va a utilizar en el método de producción de la presente invención no está particularmente limitado siempre y cuando sea un compuesto que tenga una estructura similar a la de cAMP y sea capaz de elevar la concentración de cAMP intracelular en contacto con la célula.

40 Los ejemplos del análogo de cAMP anteriormente mencionado incluyen 8-bromo-cAMP, dibutilil-cAMP, N6-benzoil-cAMP, 8-tiometil-cAMP y similares. Estos se pueden adquirir en Sigma, Merck Bioscience, Wako Pure Chemical Industries, Ltd. y similares, y el mismo nombre o el mismo nombre comercial indica la misma sustancia y la estructura y propiedades son iguales independientemente de los fabricantes. Incluso cuando no están disponibles comercialmente como productos, los expertos ordinarios en la técnica pueden también prepararlos según
45 documentos conocidos.

Como el análogo de cAMP que se va a utilizar en el método de producción de la presente invención, se prefiere el dibutilil-cAMP.

50 Si bien la concentración del análogo de cAMP en el medio se determina apropiadamente según la clase de análogo de cAMP que se va a utilizar, la concentración de dibutilil-cAMP como un análogo de cAMP es generalmente 0,01-5 mM, preferiblemente 0,1-1 mM.

El inhibidor de MEK que se va a utilizar en el método de producción de la presente invención se refiere a una sustancia que tiene una actividad inhibidora de MAP quinasa (proteína quinasa activada por el mitógeno/quinasa ERK; MEK). Un inhibidor del receptor de FGF que es un factor anterior de la vía de transducción de la señal de MEK se incluye también en la presente invención.

55 Los ejemplos de los inhibidores de MEK y del receptor de FGF anteriormente mencionados incluyen PD0325901 (N-[(2R)-2,3-dihidroxipropoxi]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-iodofenil)amino]-benzamida), PD184352 (2-(2-cloro-4-

iodofenilamino)-N-ciclopropilmetoxi-3,4-difluorobenzamida), SU5402 (ácido 3-[4-metil-2-(2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenmetil)-1H-pirrol-3-il]-propanoico, PD173074 (N-[2-[[4-(dietilamino)butil]amino-6-(3,5-dimetoxifenil)pirido[2,3-d]pirimidin-7-il]-N'-(1,1-dimetil)urea) y similares. Estos se pueden adquirir en Axon Medchem BV, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Enzo Life Sciences, Inc., Merck Bioscience, Tocris bioscience, Stemgent, Sigma y similares, y el mismo nombre o el mismo nombre comercial indica la misma sustancia y la estructura y propiedades son iguales independientemente de los fabricantes. Incluso cuando no estén comercialmente disponibles como productos, los expertos ordinarios en la técnica pueden también prepararlos según documentos conocidos.

Además, también se pueden utilizar oligonucleótidos antisentido, siRNA y similares para el mRNA del MEK o del receptor de FGF como un inhibidor de MEK y del receptor de FGF, respectivamente. Están comercialmente disponibles o se pueden sintetizar según publicaciones anteriores.

Como un inhibidor de MEK o del receptor de FGF que se va a utilizar en el método de producción de la presente invención, se prefiere PD0325901, PD184352 o SU5402.

Si bien la concentración del inhibidor de MEK en el medio se determina apropiadamente según la clase de inhibidor de MEK que se va a utilizar, la concentración de PD0325901 o PD184352 utilizada como inhibidor de MEK es generalmente 0,1-10 μ M, preferiblemente 1-5 μ M. La concentración de SU5402 utilizada como un inhibidor del receptor de FGF es generalmente 0,1-20 μ M, preferiblemente 5-15 μ M.

En el método de producción de la presente invención, el análogo de cAMP y el inhibidor de MEK y del receptor de FGF se pueden añadir simultáneamente al medio, o añadirse al medio de manera escalonada siempre y cuando puedan inducir la diferenciación de las células progenitoras neurales en una neurona dopaminérgica. El análogo de cAMP y el inhibidor de MEK y del receptor de FGF se añaden convenientemente y preferiblemente de manera simultánea al medio.

El medio que se va a utilizar en el método de producción de la presente invención se produce añadiendo un análogo de cAMP y un inhibidor de MEK o del receptor de FGF al medio basal ejemplificado como el método de diferenciación del 1-1 anteriormente mencionado (conteniendo opcionalmente varios aditivos ejemplificados anteriormente, suero o sustituto de suero cuando se desee).

El medio que se va a utilizar en el método de producción de la presente invención se puede producir utilizando un medio basal del mismo tipo que el medio basal utilizado para el método de producción anteriormente mencionado de las células de la placa del suelo, o se puede producir utilizando un tipo diferente de medio basal. Sin embargo, se produce preferiblemente utilizando el mismo tipo de medio basal.

Una neurona dopaminérgica de alta calidad se puede producir de manera más efectiva añadiendo, además del análogo de cAMP y del inhibidor de MEK o del receptor de FGF anteriormente mencionados, ácido ascórbico o una sal del mismo al medio que se va a utilizar en el método de producción de la presente invención.

Los ejemplos de sales de ácido ascórbico que se pueden utilizar en el método de producción de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ascorbato de sodio, ascorbato de potasio, ascorbato de calcio y similares.

La concentración de ácido ascórbico o una sal del mismo que se va a añadir al medio es generalmente 0,01-10 mM, preferiblemente 0,05-1 mM.

El ácido ascórbico o una sal del mismo se puede añadir al medio de manera simultánea con el análogo de cAMP y el inhibidor de MEK o del receptor de FGF, o se puede añadir de manera separada al medio de una forma escalonada siempre y cuando se pueda inducir la diferenciación de las células progenitoras neurales en una neurona dopaminérgica. El ácido ascórbico o una sal del mismo se añade convenientemente y preferiblemente al medio de manera simultánea con el análogo de cAMP y el inhibidor de MEK o del receptor de FGF.

En el método de producción de la presente invención, una neurona dopaminérgica de alta calidad se puede producir de manera más efectiva cultivando las células progenitoras neurales en el medio añadido con un activador de la quinasa-4,7 similar al receptor de la activina además del análogo de cAMP y el inhibidor de MEK o del receptor de FGF anteriormente mencionados, así como el período de inducción de la diferenciación en una neurona dopaminérgica también puede reducirse. Si bien el activador de la quinasa-4,7 similar al receptor de la activina no está particularmente limitado siempre y cuando active la quinasa-4 similar al receptor de la activina y/o la quinasa-7 similar al receptor de la activina, se pueden mencionar, por ejemplo, nodal, GDF-1, Vg1, activina y similares. Se prefiere la activina (particularmente, activina A).

La activina es un factor de proliferación y diferenciación de células peptídicas 24kD perteneciente a la familia TGF β (factor de crecimiento transformante β), en donde dos subunidades β constituyen un dímero a través de un enlace SS (Ling, N., et al., (1986) Nature 321, 779-782; Vale, W., et al., (1986) Nature 321 (776-779). Se sabe que la activina incluye activina A, B, C, D y AB. En el método de producción de la presente invención, se puede utilizar cualquiera de las activinas A, B, C, D, AB. Cuando se va a utilizar activina en el método de producción de la presente invención, la activina A se utiliza particularmente preferiblemente como activina. Como activina, se puede utilizar activina derivada de cualquier mamífero tal como humano, ratón y similares. Cuando se utiliza activina en el método

de producción de la presente invención, se utiliza preferiblemente activina derivada de la misma especie animal que la célula progenitora neural que se va a utilizar. Por ejemplo, cuando se utiliza una célula progenitora neural derivada de humano como material de partida, se utiliza preferiblemente activina derivada de humano. Estas activinas están disponibles comercialmente.

- 5 Si bien la concentración de la activina en el medio en el método de producción de la presente invención se determina apropiadamente según el tipo de activina que se va a utilizar, la concentración de la activina A utilizada como activina es generalmente 0,1-200 ng/ml, preferiblemente 5-150 ng/ml, particularmente preferiblemente 10-100 ng/ml.

- 10 La activina se puede añadir al medio de manera simultánea con el análogo de cAMP y el inhibidor de MEK o del receptor de FGF, o se puede añadir de manera separada al medio de una manera escalonada siempre y cuando se pueda inducir la diferenciación de las células progenitoras neurales en neuronas dopaminérgicas. La activina se añade convenientemente y preferiblemente al medio de manera simultánea con el análogo de cAMP y el inhibidor de MEK y del receptor de FGF.

- 15 El método de producción de la presente invención se realiza cultivando en una incubadora de CO₂ aireada con 1-10% (preferiblemente 5%) de dióxido de carbono a una temperatura de cultivo (generalmente 30-40°C, preferiblemente aproximadamente 37°C) adecuada para el cultivo de las células progenitoras neurales.

- 20 En el método de producción de la presente invención, la diferenciación de las células progenitoras neurales en una neurona dopaminérgica se puede confirmar mediante la evaluación de la variación de expresión de proteínas y genes que se expresan específicamente por la neurona dopaminérgica (en la presente memoria descriptiva, las proteínas y genes anteriormente mencionados se refieren a veces como marcadores de neuronas dopaminérgicas). La evaluación de la variación de la expresión de los marcadores de células neuronales dopaminérgicos anteriormente mencionada puede realizarse, por ejemplo, mediante un método de evaluación de la expresión de proteínas utilizando una reacción antígeno-anticuerpo, un método de evaluación de la expresión génica utilizando una RT-PCR cuantitativa y similares. Los ejemplos de los marcadores de células neuronales dopaminérgicas
25 anteriormente mencionados, que están presentes en el cerebro medio, incluyen tirosina hidroxilasa (TH), FOXA2, LMX1A, y gen/proteína de NURR1.

Además, si la neurona dopaminérgica obtenida por el método de producción de la presente invención tiene funciones equivalentes a las de la neurona dopaminérgica in vivo, se puede confirmar evaluando la liberación de dopamina, y las respuestas al estrés oxidativo y la estimulación farmacológica.

- 30 Utilizando el método de producción de la presente invención, una neurona dopaminérgica de alta calidad se puede producir también de manera efectiva utilizando, como material de partida, una célula de la placa del suelo o una célula progenitora neural distinta de la célula de placa del suelo obtenida por el método de diferenciación del 1-1 anteriormente mencionado.

- 35 En el método de producción de la presente invención, una neurona dopaminérgica de alta calidad se puede producir en una gran cantidad al inducir de manera eficiente la diferenciación de las células progenitoras neurales en una neurona dopaminérgica. Ya que las neuronas dopaminérgicas tienen características y funciones similares a las de las neuronas dopaminérgicas in vivo, pueden lograr una alta tasa de implante cuando se utiliza como medicamento en una terapia de trasplante celular para tratar una enfermedad provocada por la producción disminuida (liberada) de dopamina, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson y similares.
40 Además, es útil como una herramienta para el desarrollo de un fármaco terapéutico para la enfermedad.

- Las células obtenidas durante los procesos del método de producción de la presente invención y la neurona dopaminérgica obtenida por el método de producción de la presente invención se pueden crioconservar y descongelar. Los métodos de congelación y descongelación de las células son conocidos en el campo pertinente, y no están particularmente limitados siempre y cuando no influyan en la potencia de diferenciación, la viabilidad, la
45 capacidad de producción de dopamina y similares de las células. Por ejemplo, la neurona dopaminérgica obtenida por el método de producción de la presente invención se puede conservar a -80°C lavando las células con PBS, separándolas de una placa de cultivo con una disolución de dispersión celular (por ejemplo, Accutase (marca comercial registrada) Innovative Cell Technologies), eliminando la disolución de dispersión celular, y suspendiendo las células en una disolución de crioconservación (por ejemplo, banco de células 2 (LSI Medience Corporation)). Los
50 ejemplos del método de descongelación incluyen un método que comprende descongelar en un tanque termostático a 37°C, lavar una disolución de crioconservación por centrifugación, y suspender en un medio para su uso, y similares. Cuando las células obtenidas durante los procesos del método de producción de la presente invención se congelan y descongelan, la neurona dopaminérgica positiva Nurr1 también puede ser inducida a partir de las células después de la descongelación.

- 55 2. Medicamento que contiene la neurona dopaminérgica

La presente descripción proporciona un medicamento que contiene una neurona dopaminérgica producida por el método de producción de la presente invención anteriormente mencionado (a veces se abreviará como el medicamento de la presente descripción en la presente memoria descriptiva).

Como se utiliza en la presente memoria, la neurona dopaminérgica no está particularmente limitada siempre y cuando sea una célula obtenida por el método de producción de la presente invención anteriormente mencionado.

En este medicamento, una neurona dopaminérgica se utiliza como tal, o como un agregado celular obtenido por concentración al pasar a través de un filtro y similares, tal como bolitas y similares, y similares. Además, el medicamento se puede añadir también con un protector tal como DMSO (dimetilsulfóxido) y similares y crioconservarlo. Para una utilización más segura el medicamento, el medicamento se puede someter a un tratamiento en condiciones tales que mantenga las funciones como una neurona dopaminérgica y proteína patógena desnaturalizada, por ejemplo, tratamiento térmico, tratamiento de radiación y similares. Además, para prevenir el crecimiento de la neurona dopaminérgica en una cantidad mayor de la necesaria, el medicamento puede someterse, en combinación con los tratamientos mencionados anteriormente, a la supresión del crecimiento mediante el tratamiento previo con mitomicina C y similares, y un tratamiento mediante un método que incluye introducir un gen de una enzima metabólica naturalmente ausente en los mamíferos en las neuronas, administrando un agente en una forma inactivada según sea necesario para permitir que el agente se convierta en un tóxico solo en las neuronas, en las que el gen de una enzima metabólica naturalmente ausente en mamíferos se ha introducido, lo que conduce a las células a la erradicación (terapia génica suicida) y similares.

Ya que el medicamento de la presente descripción es seguro y tiene baja toxicidad, se puede administrar a un mamífero (por ejemplo, humano, ratón, rata, cobaya, cerdo, mono).

Como la forma de administración (método de trasplante) del medicamento de la presente invención a humanos, se puede mencionar un método descrito en Nature Neuroscience, 2, 1137 (1999) o N Engl J Med.; 344: 710-9 (2001). Preferiblemente, el medicamento de la presente descripción se administra (trasplanta) a una región deficiente de dopamina en el cerebro.

Una neurona dopaminérgica preparada utilizando la propia célula del paciente o una célula de un donante que tiene un tipo de histocompatibilidad en un intervalo tolerable se utiliza preferiblemente para el medicamento de la presente invención. Cuando no se pueden obtener células suficientes debido a la edad, constitución y similares, las células embebidas con una cápsula de polietilenglicol o silicio, un recipiente poroso y similares se pueden trasplantar también para evitar el rechazo. La dosis (cantidad a trasplantar) y la frecuencia de administración (número de veces a trasplantar) del medicamento de la presente invención se pueden determinar apropiadamente según la edad, peso corporal, los síntomas y similares de los pacientes que reciben la administración.

Un medicamento que contiene la neurona dopaminérgica obtenida por el método de producción de la presente invención puede implantarse de manera efectiva en el cuerpo de los pacientes por administración (trasplante) del mismo, lo que a su vez permite la producción (liberación) eficiente de dopamina en el cuerpo de los pacientes. Por lo tanto, el medicamento de la presente descripción es útil para el tratamiento de enfermedades provocadas por la producción (liberación) disminuida de dopamina, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson, corea de Huntington, enfermedad de Alzheimer, epilepsia y esquizofrenia y similares.

3. Otros usos

Dado que la neurona dopaminérgica obtenida por el método de producción de la presente invención tiene características y funciones fenotípicas similares a las de la neurona dopaminérgica in vivo, es útil para la selección de un compuesto farmacológico, preferiblemente un compuesto para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, si el compuesto de prueba es útil como medicamento se puede evaluar añadiendo el compuesto de prueba solo o en combinación con otros medicamentos a la neurona dopaminérgica obtenida por el método de producción de la presente invención, y midiendo el cambio morfológico o funcional de la neurona. Como un ejemplo del cambio funcional, se mide la cantidad de dopamina producida o liberada de la neurona. Como se utiliza en la presente memoria, la neurona dopaminérgica es preferiblemente una célula que muestra el mismo fenotipo que la enfermedad que es objetivo del tratamiento, y se prefiere particularmente una neurona dopaminérgica producida al inducir la diferenciación de una célula madre producida a partir de una célula somática derivada de la enfermedad.

Los ejemplos del compuesto de prueba incluyen péptidos, proteínas, anticuerpos, compuestos no peptídicos, compuestos sintéticos, productos de fermentación, extracto celulares, extractos de plantas, extractos de tejidos animales, plasma y similares. Como se utiliza en la presente memoria, el compuesto de prueba puede formar una sal. Como la sal, se utiliza una sal con un ácido fisiológicamente aceptable (por ejemplo, ácido inorgánico, ácido orgánico), una base (por ejemplo, una sal de un metal alcalino, sal de un metal alcalinotérreo, sal de aluminio) y similares, y los ejemplos de dichas sales incluyen una sal con un ácido inorgánico (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico), una sal con un ácido orgánico (por ejemplo, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico), sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, sal de magnesio, sal de bario, y sal de aluminio se pueden utilizar.

El medicamento obtenido utilizando la selección mencionada anteriormente se puede formular utilizando un aditivo fisiológicamente aceptable y según un método conocido.

Los ejemplos de la forma de dosificación de la preparación obtenida de este modo incluyen preparaciones orales tales como comprimidos aplicados con recubrimiento de azúcar según sea necesario, cápsulas, elixir, microcápsulas y similares; y agentes parenterales tales como inyección y similares. El contenido del ingrediente activo (compuesto seleccionado por el método de selección anteriormente mencionado) en la preparación es, por ejemplo, 0,1-90% en peso.

Los ejemplos del aditivo anteriormente indicado incluyen aglutinantes tales como gelatina, almidón de maíz, tragacanto, goma arábica y similares; excipientes tales como celulosa cristalina; agentes de hinchamiento tales como almidón de maíz, gelatina, ácido alginico y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio, y similares; agentes edulcorantes tales como sacarosa, lactosa, sacarina y similares; condimentos tales como menta, aceite de Gaultheria adenothrix, cereza y similares; portadores líquidos tales como grasas y aceites, agua para inyección, aceites vegetales (por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de coco, aceite de soja), agentes de tamponamiento (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato de sodio) y similares; agentes solubilizantes (por ejemplo, etanol, propilenglicol, polietilenglicol); tensioactivos no iónicos (por ejemplo, polisorbato80™, HCO-50); agentes solubilizantes (por ejemplo, benzoato de bencilo, alcohol bencílico); agentes calmantes (por ejemplo, cloruro de benzalconio, clorhidrato de procaína); estabilizantes (por ejemplo, albúmina de suero humano, polietilenglicol); conservantes (por ejemplo, alcohol bencílico, fenol); y antioxidantes.

Los ejemplos del agua para inyección anteriormente mencionada incluyen disolución salina; y soluciones isotónicas que contienen glucosa, D-sorbitol, D-manitol, cloruro de sodio y similares.

Dado que un medicamento (preferiblemente, un fármaco terapéutico para la enfermedad neurodegenerativa) obtenido mediante la selección mencionada anteriormente es seguro y poco tóxico, puede administrarse por vía oral o parenteral a, por ejemplo, mamíferos (por ejemplo, humanos, ratón, rata, conejo, oveja, cerdos, bovinos, caballos, perros, gatos, monos, chimpancés).

La dosificación y frecuencia de administración del medicamento se puede determinar apropiadamente según la acción de los mismos, la enfermedad objetivo, el sujeto de administración, la vía de administración y similares.

La neurona dopaminérgica obtenida por el método de producción de la presente invención se puede utilizar también para la evaluación de la toxicidad de un compuesto. Por ejemplo, si el compuesto de prueba tiene toxicidad se puede evaluar añadiendo el compuesto de prueba solo o en combinación con otros medicamentos a la neurona dopaminérgica de la presente invención, y midiendo el cambio morfológico o funcional de la neurona. Como un ejemplo del cambio funcional, se mide la cantidad de dopamina producida o liberada de la neurona.

Los ejemplos del compuesto de prueba incluyen péptidos, proteínas, anticuerpos, compuestos no peptídicos, compuestos sintéticos, productos de fermentación, extracto celular, extracto de plantas, extracto de tejidos animales, y plasma. El compuesto de prueba de la presente memoria puede formar una sal tal como las descritas en la selección anteriormente mencionada.

La neurona dopaminérgica obtenida por el método de producción de la presente invención se puede utilizar también para la verificación del objetivo de descubrimiento de fármacos y el análisis del mecanismo de la enfermedad y similares.

En otra realización, la presente invención proporciona también un reactivo y un equipo de reactivos para producir una neurona dopaminérgica a partir de células progenitoras neurales, que contienen (i) una análogo estructura de cAMP y (ii) una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de MEK o una sustancia que tiene una actividad inhibitoria del receptor de FGF; con la condición de que el reactivo no sea un reactivo que consiste en un medio de cultivo de hepatocito sin EGF, 8-Br-cAMP 10 mM, XAV 939 1 μ M y PD032590 1 μ M.

El reactivo o equipo de reactivos anteriormente mencionados pueden contener además (1) ácido ascórbico o una sal del mismo y/o (2) un activador de la quinasa-4,7 similar al receptor de activina.

Como análogo de cAMP, inhibidor de MEK o del receptor de FGF y activador de la quinasa-4,7 similar al receptor de activina anteriormente mencionados, se pueden mencionar aquellos útiles para el método de producción de la presente invención.

Aunque la presente invención se explica con más detalle a continuación haciendo referencia a los ejemplos, la presente invención no está limitada de ninguna manera por los ejemplos que se muestran a continuación.

Ejemplos

Ejemplo de Referencia 1

Mantenimiento y cultivo de células iPS humanas indiferenciadas

Como células iPS humanas, se utilizó la cepa 253G1 (Nature Biotechnology 2008; 26: 101-106) o la cepa 201B7 (Cell. 2007; 131: 861-872).

Las células iPS (cepa 253G1 o cepa 201B7) en un estado indiferenciado se mantuvieron y cultivaron de dos maneras mediante (i) un método que utiliza una célula de alimentación y (ii) un método sin la utilización de una célula de alimentación.

(i) Método utilizando una célula de alimentación

- 5 Como una célula de alimentación, se utilizaron fibroblastos de ratón (MEFs, KITAYAMA LABES Co., Ltd) que se sometieron a un tratamiento con mitomicina C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para inactivar el crecimiento de los mismos y se sembraron en una placa recubierta de gelatina. En este método, se utilizó un medio para células ES de primate (ReproCELL Incorporated) añadido con 4 ng/ml de bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico) (PeproTech) y 0,5xpenicilina-estreptomicina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) como un medio, y las células se cultivaron a 37°C bajo 5% de CO₂. El medio se intercambió todos los días y las células se pasaron cada 6-7 días. Para el pasaje anteriormente mencionado, las células iPS en forma de un agregado celular se separaron de la placa utilizando una disolución de desprendimiento de células para células ES de primate (fabricada por Reprocell Inc.), y las células iPS desprendidas se sembraron en nuevas células de alimentación.

(ii) Método sin la utilización de una célula de alimentación

- 15 En el método sin la utilización de una célula de alimentación, se utilizó una placa recubierta con vitronectina (Life Technologies). En este método, se utilizó Essential 8 (Life Technologies) añadido con 0,5xpenicilina-estreptomicina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) como un medio, y las células se cultivaron a 37°C bajo 5% de CO₂. El medio se cambió todos los días y las células se pasaron cada 6-7 días. Para el pasaje anteriormente mencionado, las células iPS en la forma de un agregado celular se separaron de la placa utilizando PBS añadido con EDTA 0,5 mM, y las células iPS desprendidas se sembraron en una nueva placa recubierta con vitronectina.

Ejemplo de Referencia 2

Precultivo de células iPS humanas

- Para el precultivo de la inducción de la diferenciación en una célula de placa de suelo, las células iPS humanas indiferenciadas mantenidas mediante el cultivo por el método (i) o (ii) descrito en el Ejemplo de Referencia 1 mencionado anteriormente se sembraron en una placa de 96 pocillos.

(i) Cuando se utilizan células iPS mantenidas en células de alimentación

- Las células iPS mantenidas en la forma de un agregado celular se trataron durante 10 segundos con una disolución de desprendimiento de células para células ES de primates, y se pipetearon suavemente para eliminar los MEF hasta cierto punto. Después, las células se lavaron con PBS, se trataron con Accutase (Innovative Cell Technologies) a 37°C durante 5 minutos, y se disociaron hasta que se obtuvieron células individuales. Después, las células iPS dispersadas en un medio se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de $1,5-2 \times 10^4$ células por pocillo, y se cultivaron (precultivaron) a 37°C bajo 5% de CO₂ durante un día. Como el medio de cultivo utilizado para la siembra, se utilizó un medio para la célula ES de primate añadido con Y27632 ((R)-(+)-trans-4-(1-aminoetil)-N-(4-piridil)ciclohexanocarboxamida) 10 µM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd).

(ii) Cuando se utilizan células iPS mantenidas sin utilizar células de alimentación

- Las células iPS mantenidas en la forma de un agregado celular se trataron durante 10 minutos con PBS añadido con EDTA 0,5 mM, y se disociaron hasta obtener células individuales. Después, las células iPS dispersadas en un medio se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de $1,5-2 \times 10^4$ células por pocillo, y se cultivaron (precultivaron) a 37°C bajo 5% de CO₂ durante un día. Como el medio de cultivo utilizado para la siembra, se utilizó Essential 8 añadido con Y27632 10µM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd). Como la placa de 96 pocillos mencionada anteriormente, se utilizó una recubierta a 37°C durante una noche con Matrigel (BD) diluido 1/30-1/40 con DMEM/F12 (Life Technologies Corporation).

Ejemplo de Referencia 3

Inducción de la diferenciación de las células iPS humanas en las células de la placa del suelo

- La diferenciación de las células iPS humanas en las células de la placa del suelo se indujo por el siguiente método.

- El medio después del precultivo como se describió en el Ejemplo de Referencia 2 mencionado anteriormente se intercambió con un medio de inducción de la diferenciación que contiene factores que inducen la diferenciación en las células de la placa del suelo (LDN193189 (0,5 µM, Axon MedChem B.V.), SB431542 (10 µM, Wako Pure Chemical Industries, Ltd), purmorfamina (0,5 µM, Merck), SHH (200 ng/ml, R&D systems) y CHIR99021 (1 µM, Axon MedChem)) (día 0 de cultivo), y las células se cultivaron a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 5 días. Después, el medio se intercambió con un medio de inducción de la diferenciación que contiene LDN193189 0,5 µM y CHIR99021 1 µM, y las células se cultivaron a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 5-8 días (total 10-13 días). En la presente memoria, se utilizó como el medio de inducción de la diferenciación anteriormente mencionado, (a) Neurobasal (Life Technologies) que contiene 2% de B27 (Life Technologies corporation) y GlutaMax 2 mM (Life Technologies

corporation) (de aquí en adelante se indicará como Neuro/B27), o (b) DMEM/F12 que contiene 1% de N2 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 2% de B27 (Life Technologies corporation) (de aquí en adelante se indicará como N2B27). El medio se intercambiaba cada 3-4 días durante estos periodos de cultivo.

Para examinar la variación de la expresión del marcador de las células de la placa del suelo debido a la presencia o ausencia de los factores que inducen la diferenciación en las células de la placa del suelo (LDN193189, SB431542, purmorfamina, SHH y CHIR99021), las células en el día 13 del cultivo se recuperaron, y la fracción de RNA total se purificó utilizando RNeasy (Qiagen). Utilizando el equipo de reactivos PrimeScript RT (Takara Bio Inc.), se sintetizó cDNA, se realizó una RT-PCR cuantitativa, y se midieron los niveles de expresión génica de los marcadores de las células de la placa del suelo FOXA2 y LMX1A. Los resultados se muestran en la Figura 1. Cuando se añadieron los 5 tipos de LDN193189, SB431542, SHH, purmorfamina y CHIR99021 (Todos en la Figura 1), tanto FOXA2 como LMX1A mostraron una alta expresión. De este modo, se aclaró que las células de la placa del suelo se podían inducir de manera eficiente al añadir todos los 5 tipos anteriormente mencionados. Incluso cuando SHH se excluyó de los 5 tipos mencionados anteriormente (-SHH en la Figura), la expresión de FOXA2 y LMX1A se elevó en cierto grado. Por lo tanto, se consideró que las células de la placa del suelo se podían inducir incluso cuando no se utilizó SHH, es decir, cuando nada más que estos compuestos se añadieron como factores que inducen la diferenciación. Además, incluso cuando FGF8 se utilizó ampliamente como un factor para la inducción del neuroectodermo diferenciado de células ES/iPS humanas en la dirección de la región del cerebro medio, se añadió además de los 5 tipos mencionados anteriormente, la expresión de FOXA2 y LMX1A apenas cambió (Todos+FGF8 en la Figura 1).

Por lo tanto, FGF8 se considera que no es esencial para este sistema.

Después, para examinar la expresión de las proteínas FOXA2 y LMX1A en el día 13 del cultivo, se llevó a cabo la tinción inmunofluorescente utilizando el anticuerpo anti-FOXA2 y el anticuerpo anti-LMX1A. Las células se cultivaron hasta el día 13 utilizando los 5 tipos de LDN193189, SB431542, SHH, purmorfamina y CHIR99021, se añadió 4% de para-formaldehído (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y las células se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para fijar las células. Las células se hicieron reaccionar con el anticuerpo anti-FOXA2 (sc-6544, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y el anticuerpo anti-LMX1A (AB10533, Nihon Millipore K.K.) como anticuerpos primarios, y se hicieron reaccionar secuencialmente con el anticuerpo secundario marcado con Alexa488 (Invitrogen) y el anticuerpo secundario marcado con Alexa568, correspondiente al animal inmunizado del anticuerpo primario, como los anticuerpos secundarios, y observados bajo un microscopio de fluorescencia. Los resultados se muestran en la Figura 2. Incluso cuando se utilizó cualquiera de los anteriormente mencionados (a) y (b) como medio de inducción de la diferenciación, se observó que la mayoría de las células expresaban tanto las proteínas FOXA2 como LMX1A.

A partir de los resultados anteriores, se aclaró que las células de la placa del suelo se podían inducir de manera eficiente cultivando en un medio de inducción de la diferenciación añadido con LDN193189, SB431542, SHH, purmorfamina y CHIR99021 durante 5 días, y después en un medio de inducción de la diferenciación añadido con LDN193189 y CHIR99021 durante 5-8 días.

Ejemplo 1

Inducción de la diferenciación de las células de la placa del suelo en una neurona dopaminérgica

Las células de la placa del suelo se indujeron mediante un método similar a los métodos descritos en los Ejemplos de Referencia 1 a 3, el medio se intercambiaba con (A) Neuro/B27 añadido con 3 factores de ácido ascórbico 0,1 mM (SIGMA), dibutiril-cAMP 0,5 mM (SIGMA, de aquí en adelante se indicará como dbcAMP) y PD0325901 3 μ M, o (B) Neuro/B27 añadido con 2 factores de ácido ascórbico 0,1 mM y dbcAMP 0,5 mM en el día 13 del cultivo, y las células se cultivaron a 37°C bajo 5% de CO₂ durante no menos de 30 días. El medio se intercambiaba cada 3-4 días durante los periodos de cultivo anteriormente indicados.

Ejemplo Experimental 1

Análisis de la expresión del gen marcador y la proteína marcadora de la neurona dopaminérgica del cerebro medio después de la inducción de la diferenciación de la neurona dopaminérgica

En el día 45 del cultivo, se recuperaron las células, y se examinó la variación de la expresión de la NURR1 conocida como un factor de transcripción extremadamente importante para la diferenciación, maduración y mantenimiento de las funciones de la neurona dopaminérgica del cerebro medio. Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 3. La expresión de NURR1 se elevó mediante la inducción de la diferenciación con la adición de 2 factores de ácido ascórbico y dbcAMP, y la expresión se elevó aún más altamente al añadir PD0325901 además de los dos factores.

Después, la expresión de los marcadores de la neurona dopaminérgica del cerebro medio de las proteínas TH, NURR1 y FOXA2 se examinó mediante tinción inmunofluorescente utilizando anticuerpos anti-TH, anticuerpos anti-NURR1 y anticuerpos anti-FOXA2. Las células de la placa del suelo se indujeron mediante un método similar a los métodos descritos en los Ejemplos de Referencia 1 a 3, la inducción de la diferenciación se llevó a cabo mediante el intercambio del medio con (A) Neuro/B27 añadido con 3 factores de ácido ascórbico, dbcAMP y PD0325901, o (B) Neuro/B27 añadido con 2 factores de ácido ascórbico y dbcAMP a partir del día 13 del cultivo, 4% de PFA se añadió

en los días 45-52 del cultivo, y las células se fijaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células se hicieron reaccionar con anticuerpos anti-TH (AB152, Nihon Millipore K.K.), anticuerpos anti-NURR1 (PP-N1404-00, Perseus Proteomics) y anticuerpos anti-FOXA2 (sc-6544, Santa Cruz) como anticuerpos primarios, y se hicieron reaccionar secuencialmente con el anticuerpo secundario marcado con Alexa488, anticuerpo secundario marcado con Alexa568 y anticuerpo secundario marcado con Alexa647, que corresponden al animal inmunizado del anticuerpo primario, como los anticuerpos secundarios, y se observó bajo un microscopio de fluorescencia. Los resultados se muestran en la Figura 4, Figura 5 y Figura 6. En ambas condiciones, las células que expresan la proteína TH se observan de manera similar, y la tinción con la proteína NURR1 se volvió claramente positiva por la adición de PD0325901 (Ejemplo 1, (A)) (Figura 4), y se observaron muchas células que expresan simultáneamente las proteínas TH, NURR1 y FOXA2 (Figura 5). La Figura 6 muestra imágenes teñidas cuando se observan a gran aumento. Los resultados anteriores se obtuvieron casi de manera similar con las cepas 253G1 y 201B7.

De ello se aclaró que una neurona dopaminérgica del cerebro medio puede inducirse varias docenas de veces más eficientemente induciendo la diferenciación de las células de la placa del suelo utilizando el Neuro/B27 (A) mencionado anteriormente, en comparación con la no adición del análogo de cAMP y el inhibidor de MEK.

Ejemplo Experimental 2

Evaluación de la función de la neurona dopaminérgica inducida en un medio añadido con dbcAMP y PD0325901.

Las células de la placa del suelo se indujeron por un método similar al de los métodos descritos en los Ejemplos de Referencia 1 a 3, la inducción de la diferenciación se llevó a cabo mediante el intercambio del medio con (A) Neuro/B27 añadido con 3 factores de ácido ascórbico, dbcAMP y PD0325901, o (B) Neuro/B27 añadido con 2 factores de ácido ascórbico y dbcAMP a partir del día 13 de cultivo, y se evaluó una capacidad para liberar dopamina por estimulación con KCl alto en el día 50 del cultivo.

La evaluación anteriormente mencionada se llevó a cabo como sigue. El medio de las células después de la inducción de la diferenciación se intercambió con Neuro/B27, y las células se cultivaron durante una noche. Las células se incubaron el día siguiente en HBSS (Life Technologies, que contiene calcio y magnesio) a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 1 hora, el medio se intercambió con HBSS (control) o HBSS añadido con KCl 55 mM, y las células se incubaron a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 15-30 minutos. Después de la incubación, el sobrenadante se recuperó y se pasó a través de un filtro (UFC30HVN, Nihon Millipore K.K.). Se añadieron HCl 0,01N y EDTA 100 µM, y la muestra obtenida se conservó a -80°C hasta el análisis. Para el análisis, se utilizaron un sistema de análisis de trazas de muestras biológicas y HTEC500 (Eicom Corporation), un detector electroquímico EPC-500 (Eicom Corporation), y la cantidad de dopamina contenida en la muestra se midió según el manual de Eicom Corporation (Eicom information No. 25). Los resultados se muestran en la Figura 7. Mediante la inducción de la diferenciación utilizando el Neuro/B27 (A) anteriormente mencionado, un aumento en la cantidad de dopamina liberada por estimulación con KCl alto se pudo detectar claramente. Cuando se indujo la diferenciación utilizando el Neuro/B27 (B) mencionado anteriormente, la liberación de dopamina no se observó dependiendo del lote. Sin embargo, cuando la diferenciación se indujo utilizando el Neuro/B27 (A) anteriormente mencionado, un aumento en la cantidad de dopamina liberada mediante la estimulación con KCl alto se pudo detectar con buena reproducibilidad incluso en un lote diferente. Esto sugiere que PD0325901 estabilizó el sistema de diferenciación. Si bien la respuesta fue algo diferente entre las cepas 253G1 y 201B7, cuando se añadió PD0325901, se detectó de manera estable un aumento en la cantidad de dopamina liberada mediante estimulación con KCl alto, por lo que se confirmó un aumento en la cantidad de dopamina liberada mediante la estimulación con KCl alto entre las diferentes líneas celulares.

Ejemplo 2

Estudio de varios inhibidores de MEK (incluyendo inhibidores de FGFR)

Se estudió si una neurona dopaminérgica del cerebro medio se puede inducir en un medio que contiene cualquiera de PD184352 (Axon MedChem), SU5402 (inhibidor del receptor de FGF (FGFR), Wako Pure Chemical Industries, Ltd) y PD173074 (inhibidor de FGFR, Axon MedChem) en vez de PD0325901 en el Neuro/B27 (A) anteriormente mencionado.

Las células de la placa del suelo se indujeron por un método similar a los métodos descritos en los Ejemplos de Referencia 1 a 3, el medio se intercambió con Neuro/B27 añadido con (1) 3 factores de ácido ascórbico, dbcAMP y PD0325901, (2) 2 factores de ácido ascórbico y dbcAMP, (3) ácido ascórbico, dbcAMP y PD184352 3 µM, (4) ácido ascórbico, dbcAMP y SU5402 10 µM, o (5) ácido ascórbico, dbcAMP y PD173074 0,1 µM en el día 13 del cultivo, y las células se incubaron a 37°C bajo 5% de CO₂ durante no menos de 30 días. El medio se intercambió cada 3-4 días durante los periodos de cultivo anteriormente mencionados. En el día 45 del cultivo, se recuperaron las células, y se examinó la variación de la expresión de NURR1. Los resultados se muestran en la Figura 8. En la cepa 253G1, la expresión de NURR1 se elevó mediante la adición de PD0325901, PD184352 o SU5402 y, en la cepa 201B7, la expresión de NURR1 se elevó mediante la adición de todos los 4 tipos. Por otro lado, PLX4032 conocido por activar la ruta MEK no mostró ningún efecto.

A partir de los resultados anteriores, se sugirió que la expresión elevada de NURR1 es provocada por la acción inhibitoria de MEK (o en el FGFR anterior).

Ejemplo Experimental 3

Variación de la expresión de cada marcador de diferenciación en el proceso de inducción de la diferenciación

Sobre la base de los resultados de los Ejemplos de Referencia, los Ejemplos y los Ejemplos Experimentales mencionados anteriormente, se estableció un sistema de diferenciación de una neurona dopaminérgica que consiste en las tres etapas mostradas en la Figura 9, y se examinó la expresión de varios marcadores de diferenciación en el proceso de inducción de la diferenciación de células iPS indiferenciadas.

En la etapa 1, las células se incubaron en Neuro/B27 añadido con LDN193189 0,5 μ M, SB431542 10 μ M, purmorfamina 0,5 μ M, SHH 200 ng/ml y CHIR99021 1 μ M durante 5 días. En la etapa 2, las células se incubaron en Neuro/B27 añadido con LDN193189 0,5 μ M y CHIR99021 1 μ M durante 8 días (total 13 días). En la etapa 3, las células se incubaron en Neuro/B27 añadido con ácido ascórbico 0,1 mM, dbcAM 0,5 mM y PD0325901 3 μ M durante 32 días (total 45 días). Después del cultivo, se midió la variación de la expresión en el curso del tiempo de varios marcadores de diferenciación mediante un método similar al del Ejemplo de Referencia 3. Los resultados del análisis de la expresión se muestran en la Figura 10.

Como control, las células se cultivaron en condiciones sin la adición de un factor inductor de la diferenciación (- en la Figura), condiciones que excluyen solo SHH (-SHH en la Figura) o condiciones que excluyen solo purmorfamina (-Pur en la Figura). Además, se estudió el grupo sometido a la inducción de la diferenciación bajo las condiciones mostradas en la Figura 9 a partir de la etapa 2 en adelante.

Bajo condiciones añadida con todos (Todos en la Figura), la expresión del marcador de las células de la placa del suelo FOXA2 se elevó hasta el día 7 de la inducción de la diferenciación, y el nivel de expresión se mantuvo hasta completar la inducción de la diferenciación. La expresión del marcador de las células de la placa del suelo LMX1A para la diferenciación en el cerebro medio continuó elevándose con el tiempo junto con la inducción de la diferenciación. La expresión de los marcadores neuronales dopaminérgicos TH y NURR1 aumentó drásticamente desde el día 20 de cultivo. Por otro lado, se observó también un patrón de expresión similar al de las condiciones con todo añadido (Todo en la Figura) en condiciones que excluyen solo SHH (-SHH en la Figura), lo que sugiere que SHH no es esencial. Sin embargo, dado que la expresión de FOXA2 fue baja en condiciones que excluyen solo la purmorfamina (-Pur en la Figura), la adición de purmorfamina se considera esencial para la inducción de las células de la placa del suelo.

Ejemplo 3

Eficiencia de la inducción de la diferenciación de las células de la placa del suelo en la neurona dopaminérgica

Se buscó un factor que promueva la diferenciación en una neurona dopaminérgica en la etapa 3 además de PD0325901. Como resultado, se encontró que la eficiencia de la diferenciación en una neurona dopaminérgica se eleva cuando se añade activina A en la etapa 3.

Las células de la placa del suelo se indujeron por un método similar a los métodos descritos en los Ejemplos de Referencia 1 a 3, el medio se intercambió con Neuro/B27 añadido con uno o más tipos de ácido ascórbico 0,1 mM, dbcAMP 0,5 mM, PD0325901 3 μ M, y activina A 20 ng/ml (R&D), o Neuro/B27 sin la adición de ácido ascórbico, dbcAMP, PD0325901, y activina A como un control en el día 12 del cultivo, y las células se incubaron durante 14 días más (total 26 días). Las células después del cultivo se recuperaron, y la variación de la expresión de TH y NURR1 se examinó por un método similar al Ejemplo de Referencia 3. Los resultados se muestran en la Figura 11. Cuando la activina A se añadió sola, la expresión de TH y NURR1 apenas se elevó. Sin embargo, cuando se añadió activina A junto con ácido ascórbico y dbcAMP, la expresión de TH y NURR1 aumentó notablemente, y cuando se añadió PD0325901 junto con ácido ascórbico, dbcAMP y activina A, la expresión se elevó aún más. Por otro lado, cuando se agregaron ácido ascórbico, dbcAMP y PD0325901, el nivel de expresión fue menor en el momento del día 26 de cultivo que la adición de ácido ascórbico, dbcAMP y activina A.

A continuación, se examinó la expresión de los marcadores neuronales dopaminérgicos de las proteínas TH y NURR1 mediante la tinción inmunofluorescente utilizando anticuerpos anti-TH y anticuerpos anti-NURR1. Las células de la placa del suelo se indujeron, el medio se intercambió con Neuro/B27 añadido con uno o más tipos de ácido ascórbico 0,1 mM, dbcAMP 0,5 mM, PD0325901 3 μ M, y activina A 20 ng/ml, o Neuro/B27 sin la adición de un factor que induce la diferenciación como un control en el día 12 del cultivo, y las células se cultivaron durante 14 días más (total 26 días). Después del cultivo, se añadió 4% de PFA, y las células se fijaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células se hicieron reaccionar con anticuerpos anti-TH y anticuerpos anti-NURR1 como anticuerpos primarios, y se hicieron reaccionar secuencialmente con un anticuerpo secundario marcado con Alexa488 y un anticuerpo secundario marcado Alexa568, que corresponde al animal inmunizado del anticuerpo primario, como los anticuerpos secundarios, y se observó bajo un microscopio de fluorescencia. Los resultados se muestran en la Figura 12. Se observó que la adición simultánea de ácido ascórbico, dbcAMP, activina A y PD0325901 aumentaba notablemente las células que expresaban las proteínas TH y NURR1. Estos resultados coincidieron bien con los resultados de la variación de la expresión de los genes TH y NURR1.

A partir de los resultados anteriores, se aclaró que la neurona dopaminérgica del cerebro medio puede inducirse de

manera efectiva en un periodo de inducción de la diferenciación más corto (26 días en total) de lo habitual mediante la adición de ácido ascórbico, dbcAMP, PD0325901 y activina A después de la inducción de las células de la placa del suelo.

Ejemplo Experimental 4

5 Crioconservación en el día 26 de la inducción de la diferenciación

Las células de la placa del suelo del cerebro medio se indujeron mediante un método similar a los métodos descritos en los Ejemplos de Referencia 1 a 3, el medio se intercambió con Neuro/B27 añadido con ácido ascórbico 0,1 mM, dbcAMP 0,5 mM, PD0325901 3 μ M, y activina A 20 ng/ml (R&D) en el día 12 del cultivo, y las células se cultivaron durante 14 días más (total 26 días). Después del cultivo, las células se lavaron con PBS, y se dispersaron por tratamiento con Accutase (Innovative Cell Technologies) a 37°C durante 20-30 minutos. Después del lavado centrífugo, las células se suspendieron en un banco de células 2 (Juji Field Inc.) a una concentración de aproximadamente 2×10^6 células/ml/tubo, y se crioconservaron a -80°C.

Las células crioconservadas se descongelaron por inmersión en un tanque termostático a 37°C y, después del lavado centrífugo, se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 2×10^4 células por pocillo, y se cultivaron a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 2 semanas. Como la placa de 96 pocillos mencionada anteriormente, se utilizó una recubierta a 37°C durante una noche con Matrigel diluido 1/30-1/40 con DMEM/F12 (Life Technologies Corporation) o Laminina (Trevigen Inc.) diluida con DMEM/F12 a una concentración de 10 μ g/ml. Como el medio de cultivo, se utilizó Neuro/B27 añadido con uno o más tipos de ácido ascórbico 0,1 mM, dbcAMP 0,5 mM, PD0325901 3 μ M, y activina A 20 ng/ml, o Neuro/B27 sin la adición de ácido ascórbico, dbcAMP, PD0325901, y activina A como un control.

Las células cultivadas durante 2 semanas después de descongelar se recuperaron, y la variación de la expresión de los marcadores neuronales dopaminérgicos TH, NURR1, FOXA2 y LMX1A se examinaron mediante un método similar al Ejemplo de Referencia 3. Los resultados se muestran en la Figura 13. Cada marcador de diferenciación mostró la mayor expresión cuando se añadieron simultáneamente ácido ascórbico, dbcAMP, activina A y PD0325901. Cuando no se añadieron estos factores (- en la Figura), los niveles de expresión de los marcadores de diferenciación fueron bajos, lo que indica que un factor de diferenciación es esencial después de la descongelación. También se estudió la presencia o ausencia de Y27632 (10 μ M) en este caso, y los niveles de expresión de los marcadores fueron apenas diferentes.

A continuación, se examinó la expresión de las proteínas TH y NURR1 mediante la tinción inmunofluorescente utilizando anticuerpos anti-TH y anticuerpos anti-NURR1. Se añadió 4% de PFA a las células cultivadas durante dos semanas después de la descongelación, y las células se fijaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células se hicieron reaccionar con anticuerpos anti-TH y anticuerpos anti-NURR1 como los anticuerpos primarios, y se hicieron reaccionar secuencialmente con anticuerpos secundarios marcados con Alexa488 y anticuerpos secundarios marcados con Alexa568, que corresponden al animal inmunizado del anticuerpo primario, y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia. Los resultados se muestran en la Figura 14.

A partir de los resultados anteriores, se aclaró que las células en el día 26 de la inducción de la diferenciación se pueden crioconservar, y que una neurona dopaminérgica del cerebro medio que expresa las proteínas TH y NURR1 se puede inducir de manera eficiente mediante el cultivo con la adición de ácido ascórbico, dbcAMP, activina A y PD0325901 después de la descongelación.

Ejemplo Experimental 5

Experimento de trasplante

Las células de la placa de suelo del cerebro medio se indujeron por un método similar a los métodos descritos en los Ejemplos de Referencia 1 a 3, el medio se intercambió con Neuro/B27 añadido con ácido ascórbico 0,1 mM, dbcAMP 0,5 mM, PD0325901 3 μ M o ácido ascórbico 0,1 mM, dbcAMP 0,5 mM, PD0325901 3 μ M, activina A 20 ng/ml en el día 12 del cultivo, y las células se cultivaron durante 14 días más (total 26 días). Después del cultivo, las células se lavaron con PBS, y se dispersaron por tratamiento con TrypLE Express (Life Technologies) a 37°C durante 10 minutos. La concentración celular se ajustó a 1×10^5 células/ μ l con un medio Neuro/B27, y las células se mantuvieron en hielo hasta el trasplante.

Se realizó un experimento de trasplante al estriado de ratón como sigue. Doce ratones NOD SCID machos de 8 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) se dividieron en un grupo de control y un grupo de activina A (6 ratones por cada grupo). Las células cultivadas con la adición de ácido ascórbico, dbcAMP, PD0325901 se utilizaron para el trasplante al grupo de control, y las células cultivadas con la adición de ácido ascórbico, dbcAMP, PD0325901, activina A se utilizaron para el trasplante al grupo de activina A. El pelo del campo quirúrgico de la cabeza de los ratones se rasuró bajo anestesia pentobarbital (50 mg/Kg, ip), y se aplicó isodina. Varios minutos después, la piel se desinfectó limpiando con isodina con Menban sumergido en una disolución acuosa de Osvan al 0,1 %, y los ratones se fijaron en un aparato de estereotaxis cerebral (David Kopf, David Kopf Instruments en USA). Se hizo una incisión en el cuero cabelludo desde la línea media, se separó el periostio y se expuso Bregma y

Lambda de los ratones. Se hizo referencia al "cerebro del ratón en coordenadas estereotáticas" para la coordenada del estriado (AP: +0,5 mm; ML: +1,8 mm), se hizo un orificio en el hueso craneal con un taladro eléctrico ($\Phi 0,5$ mm), la jeringa Hamilton se insertó desde la superficie del hueso craneal hasta la profundidad DV: -3,5 mm, y las células (1×10^5 células/ μ l, 2 μ l) se trasplantaron durante 10 minutos. Después del trasplante, se suturó la incisión en la cabeza y los ratones se dejaron recuperar. A las 4 semanas, 8 semanas y 12 semanas después del trasplante, se tomaron muestras de dos ratones de cada grupo. Bajo anestesia por inhalación de isoflurano, los ratones se desangraron por decapitación y la cabeza se fijó con un 4% de paraformaldehído durante 24 horas. Después de que se retiró el hueso craneal, el cerebro se deshidrató con una disolución de sacarosa al 30% durante 24 horas. Posteriormente, el cerebro se incorporó por congelación y se preparó una sección congelada (40 μ m) utilizando un criostato (Leica CM3050S). La tinción del tejido de la neurona dopaminérgica se llevó a cabo utilizando anticuerpos anti-TH y anticuerpos Nuclei específicos antihumano (MAB 1281, Nihon Millipore K.K.) (hNuc).

Después de 4 semanas desde el trasplante, se observaron levemente (no más de 5%) células TH/hNuc en el cuerpo estriado del ratón del grupo de control (Figura 15, izquierda), mientras que muchas células dobles positivas TH/hNuc (no menos del 40%, Figura 15, derecha) se observaron en el grupo de la activina A. Después de 8 semanas desde el trasplante, las células TH/hNuc dobles positivas aumentaron en la sección cerebral del grupo de control en comparación con la de 4 semanas, y las células TH/hNuc dobles positivas aumentaron aún más a no menos del 50% en el grupo de la activina A en comparación con la de 4 semanas (Figura 16). Después de 12 semanas desde el trasplante, las células TH/hNuc dobles positivas aumentaron aún más a menos del 10% en la sección del cerebro del grupo de control en comparación con la de 8 semanas. En el grupo de activina A, las células TH/hNuc dobles positivas no mostraron un aumento notable en comparación con las 8 semanas (Figura 17).

De los resultados anteriores, se aclaró que las células de la placa del suelo del cerebro medio cultivadas, después de la inducción, en un medio añadido con ácido ascórbico, dbcAMP, PD0325901, y activina A se diferencian eficazmente en una neurona dopaminérgica en el estriado del ratón y continúan colonizándose durante no menos de 3 meses.

Esta solicitud se basa en la solicitud de Patente No. 2013-163062 presentada en Japón (fecha de presentación: 6 de Agosto de 2013), cuyo contenido se incluye en su totalidad en la presente memoria.

Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, una neurona dopaminérgica de alta calidad se puede producir de manera mas eficiente a partir de células progenitoras neurales. La neurona dopaminérgica producida por la presente invención tiene características y funciones fenotípicas similares a las de las neuronas dopaminérgicas in vivo, ya que muestra una respuesta al estrés oxidativo y estimulación farmacológica que no se ha observado en las neuronas dopaminérgicas producidas por métodos convencionales, y similares. Por lo tanto, la neurona dopaminérgica producida por la presente invención puede lograr una alta tasa de implante y es extremadamente útil para una terapia de trasplante de células para tratar una enfermedad provocada por la producción (liberación) disminuida de dopamina, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y similares, así como también puede utilizarse para varias aplicaciones tales como la selección de un compuesto útil para la profilaxis y/o el tratamiento de dichas enfermedades, la evaluación de la toxicidad de los compuestos, la verificación de los objetivos de descubrimiento de fármacos, el análisis del mecanismos de la enfermedad y similares.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de una neurona(s) dopaminérgica, que comprende someter las células de la placa del suelo a la siguiente etapa (1):
 - (1) una etapa de cultivo en un medio que contiene (i) un análogo estructural de cAMP y (ii) una sustancia que tiene una actividad inhibidora de MEK o una sustancia que tiene una actividad inhibidora del receptor de FGF.
2. El método de producción según la reivindicación 1, en donde el medio contiene además ácido ascórbico o una sal del mismo.
3. El método de producción según la reivindicación 2, en donde el medio contiene además un activador de la quinasa-4,7 similar al receptor de la activina.
4. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el análogo estructural de cAMP es dibutilil-cAMP.
5. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la sustancia que tiene una actividad inhibidora de MEK es
 - (i) N-[(2R)-2,3-dihidroxiopropoxi]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-iodo-fenil)amino]benzamida, o
 - (ii) 2-(2-cloro-4-iodofenilamino)-N-ciclopropilmetoxi-3,4-difluorobenzamida, o en donde la sustancia que tiene una actividad inhibidora del receptor de FGF es (iii) ácido 2-[(1,2-dihidro-2-oxo-3H-indol-3-iliden)metil]-4-metil-1H-pirrol-3-propanoico.
6. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la sustancia que tiene una actividad inhibidora de MEK o del receptor de FGF es un oligonucleótido antisentido o siRNA para el mRNA del MEK o del receptor de FGF.
7. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde el activador de la quinasa-4,7 similar al receptor de la activina es activina.
8. El método de producción según la reivindicación 3, en donde el análogo estructural de cAMP es dibutilil-cAMP, y el activador de la quinasa-4,7 similar al receptor de la activina es activina, y la sustancia que tiene una actividad inhibidora de MEK es
 - (i) N-[(2R)-2,3-dihidroxiopropoxi]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-iodo-fenil)amino]benzamida, o
 - (ii) 2-(2-cloro-4-iodofenilamino)-N-ciclopropilmetoxi-3,4-difluorobenzamida, o
 la sustancia que tiene una actividad inhibidora del receptor de FGF es
 - (iii) ácido 2-[(1,2-dihidro-2-oxo-3H-indol-3-iliden)metil]-4-metil-1H-pirrol-3-propanoico.
9. Un reactivo para producir una neurona(s) dopaminérgica a partir de células de la placa del suelo, que comprende
 - (i) un análogo estructural de cAMP y (ii) una sustancia que tiene una actividad inhibidora de MEK o una sustancia que tiene una actividad inhibidora del receptor de FGF, con la condición de que el reactivo no sea un reactivo que consiste en un medio de cultivo de hepatocito sin EGF, 8-Br-cAMP 10 mM, XAV 939 1 µM y PD032590 1 µM.
10. El reactivo según la reivindicación 9, que comprende además (iii) ácido ascórbico o una sal del mismo y/o (iv) un activador de la quinasa-4,7 similar al receptor de la activina.
11. Un equipo de reactivos para producir una neurona(s) dopaminérgica a partir de las células de la placa del suelo, que comprende (i) un análogo estructural de cAMP y (ii) una sustancia que tiene una actividad inhibidora de MEK o una sustancia que tiene una actividad inhibidora del receptor de FGF, con la condición de que el equipo de reactivos no sea un equipo de reactivos que consista en un medio de cultivo de hepatocito sin EGF, 8-Br-cAMP 10 mM, XAV 939 1 µM y PD032590 1 µM.
12. El equipo de reactivos según la reivindicación 11, que comprende además (iii) ácido ascórbico o una sal del mismo y/o (iv) un activador de la quinasa-4,7 similar al receptor de la activina.
13. Un uso in vitro de (i) un análogo estructural de cAMP y (ii) una sustancia que tiene una actividad inhibidora de MEK o una sustancia que tiene una actividad inhibidora del receptor de FGF para producir una neurona(s) dopaminérgica a partir de las células de la placa del suelo.
14. El uso según la reivindicación 13, que comprende además el uso de (iii) ácido ascórbico o una sal del mismo y/o (iv) un activador de la quinasa-4,7 similar al receptor de la activina.

Fig. 1

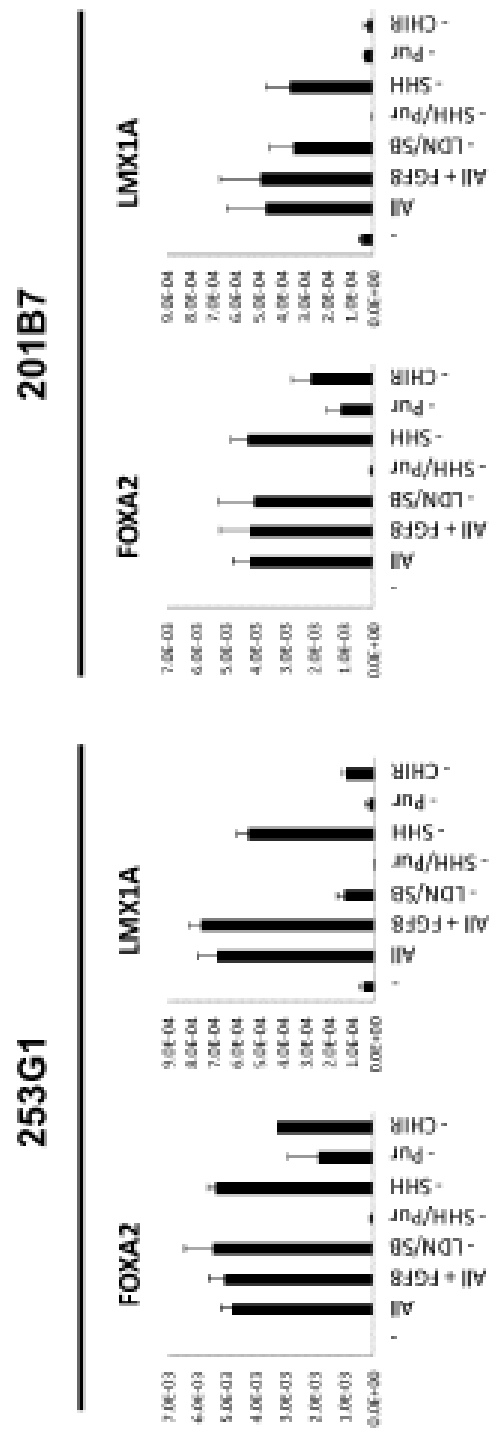


Fig. 2

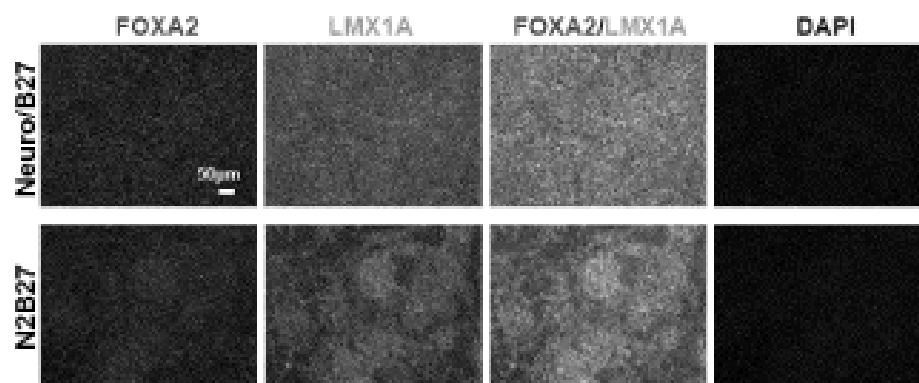


Fig. 3

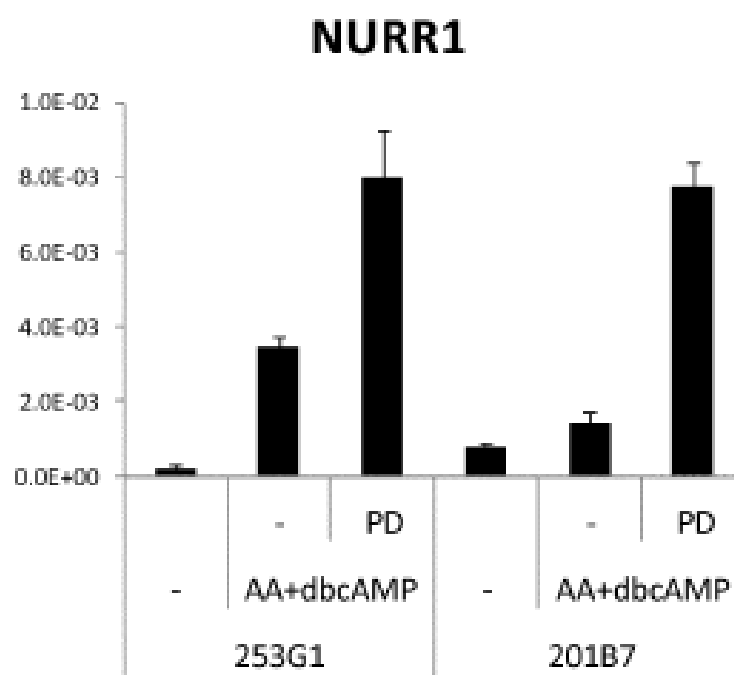


Fig. 4

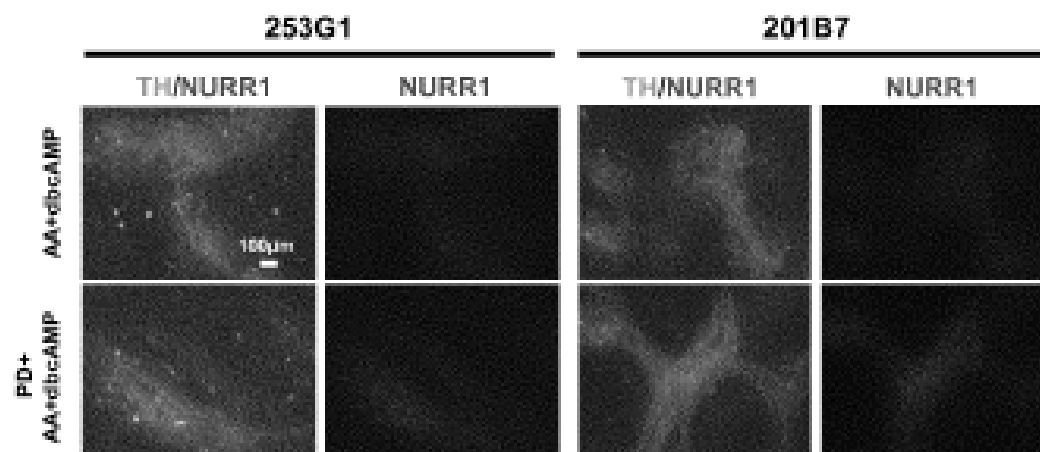


Fig. 5

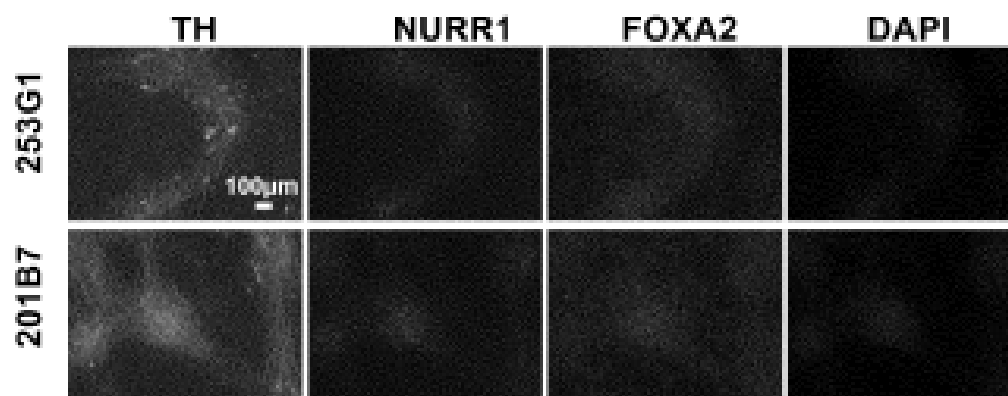


Fig. 6

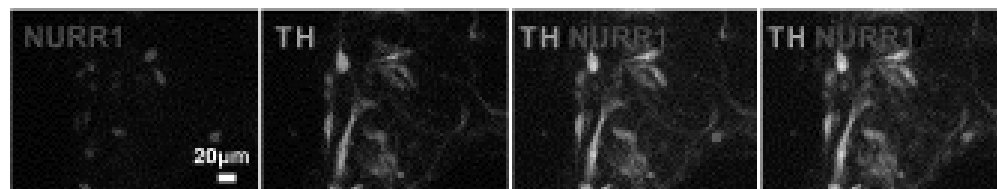


Fig. 7

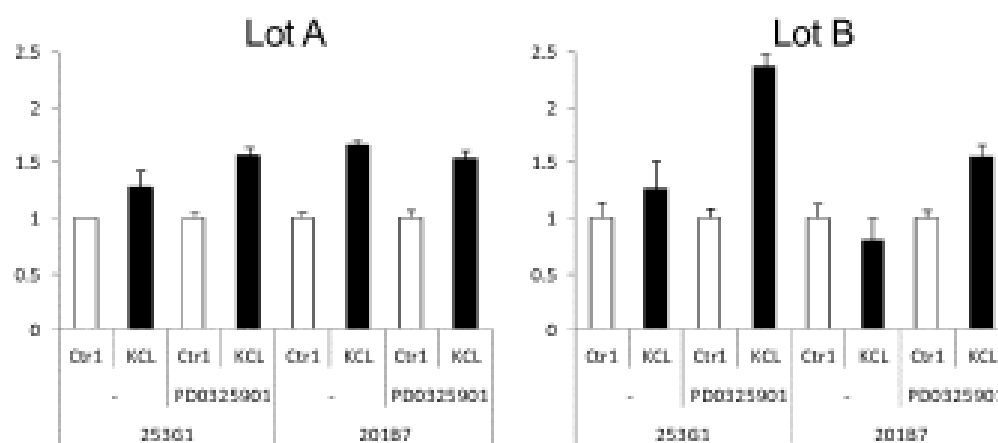


Fig. 8

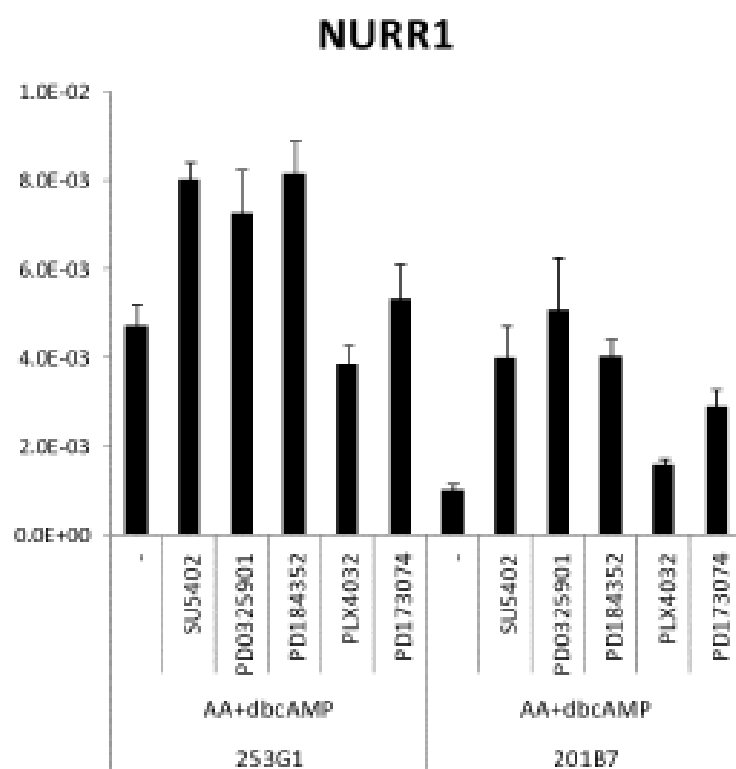


Fig. 9

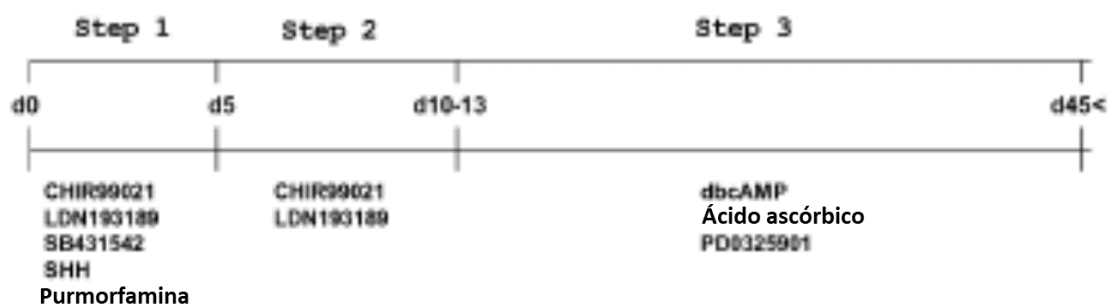


Fig. 10

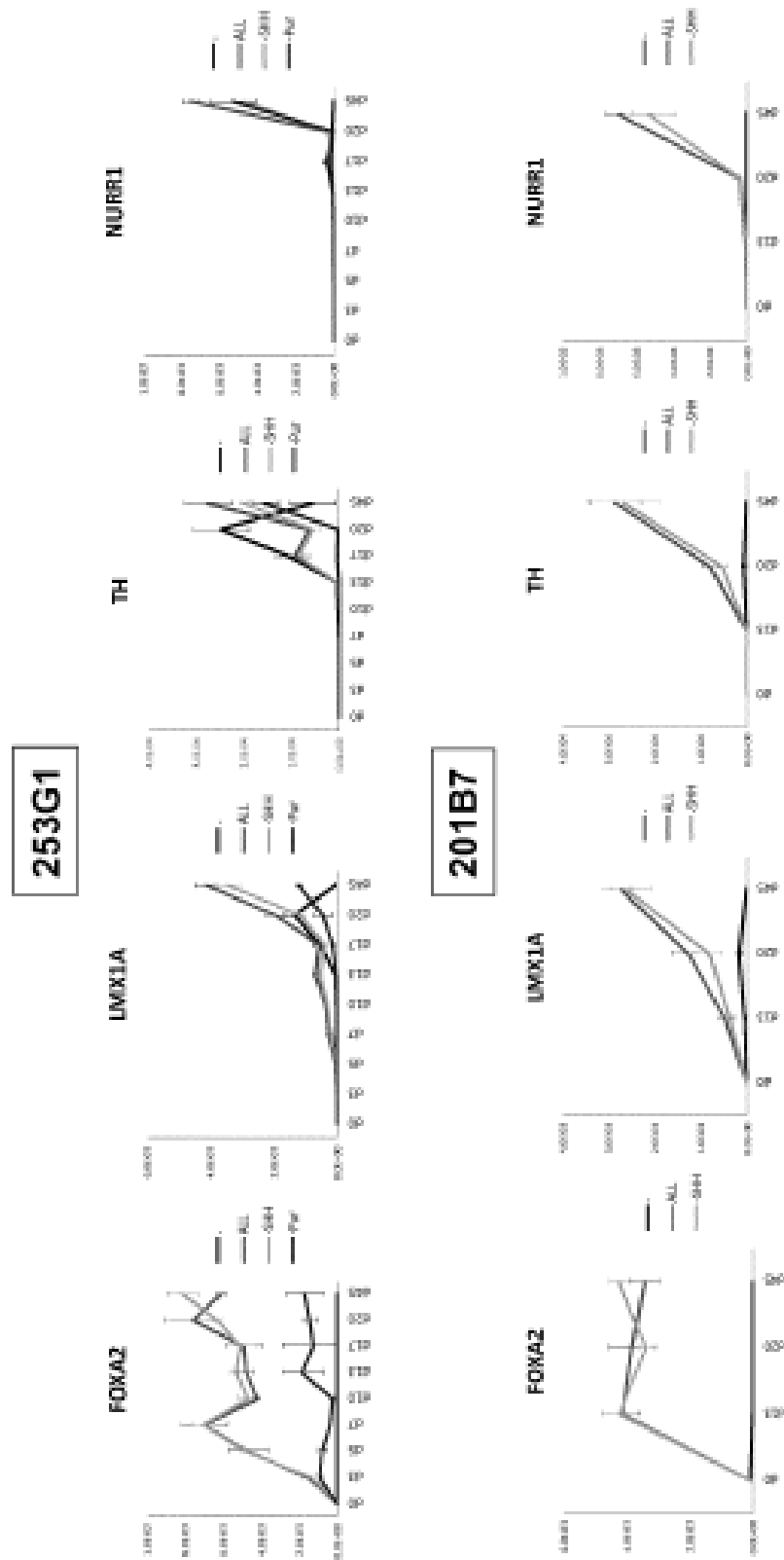


Fig. 11

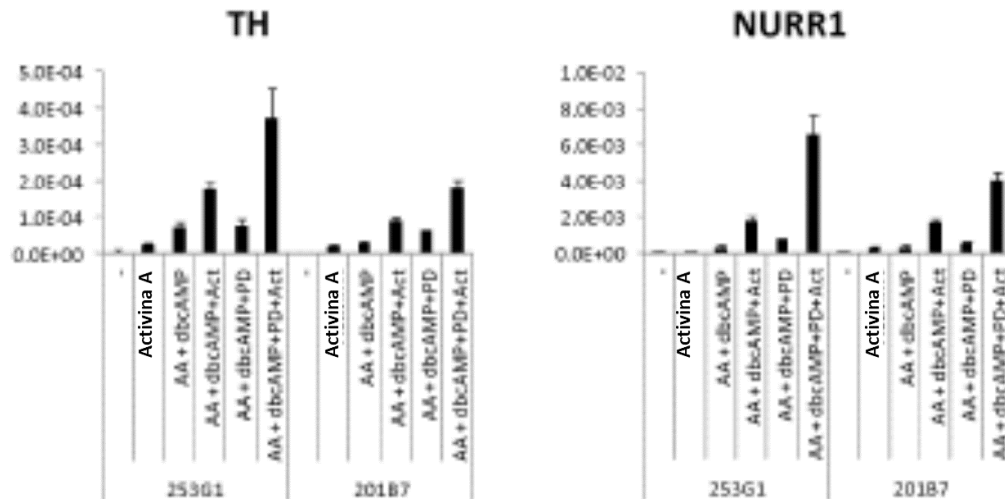


Fig. 12

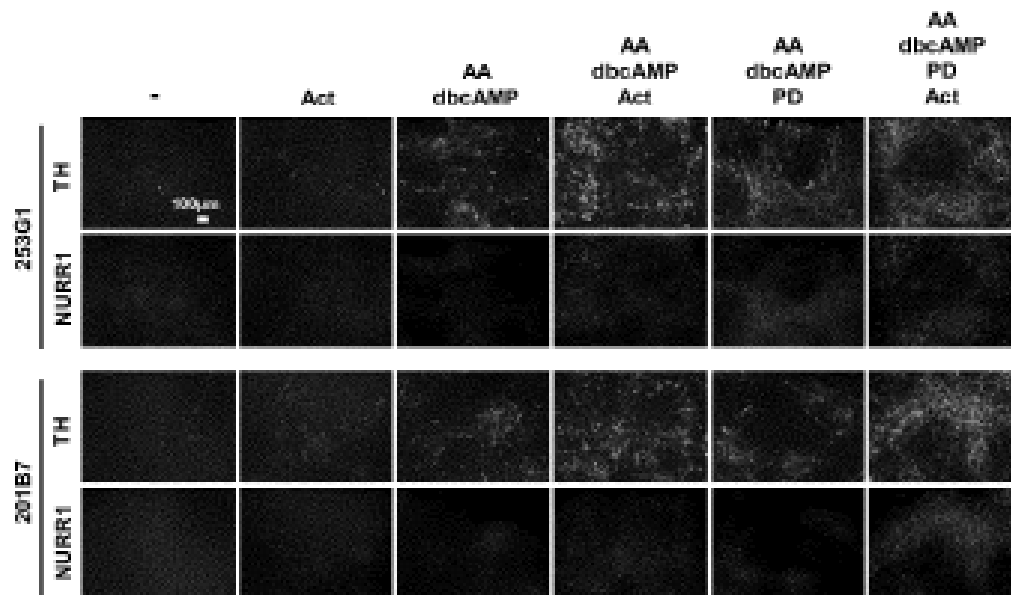


Fig. 13

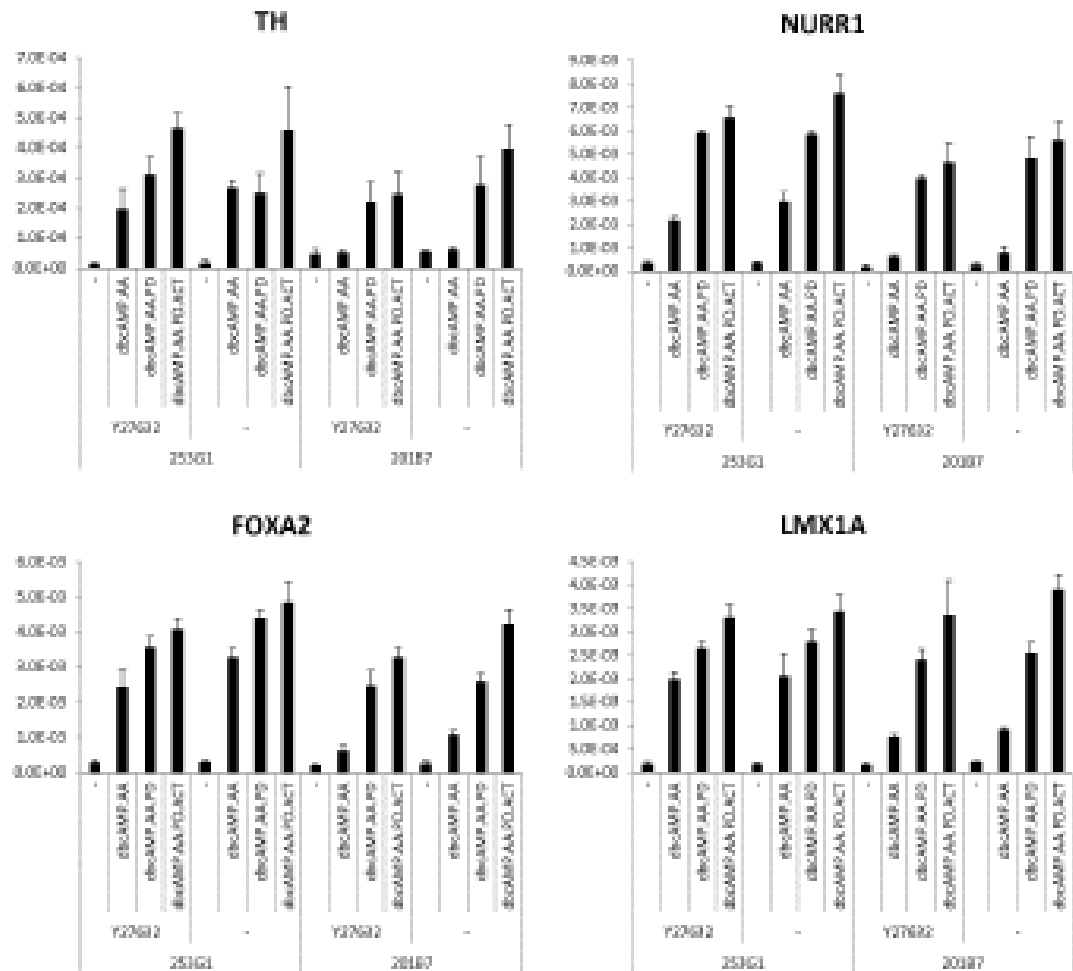


Fig. 14

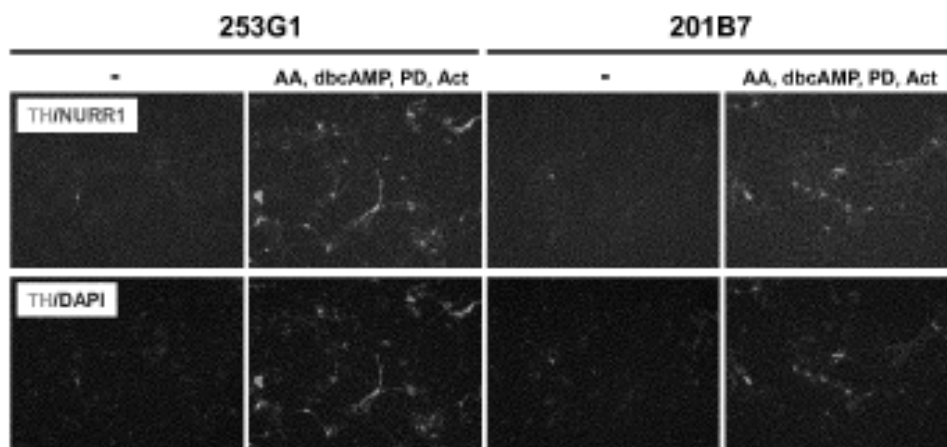


Fig. 15

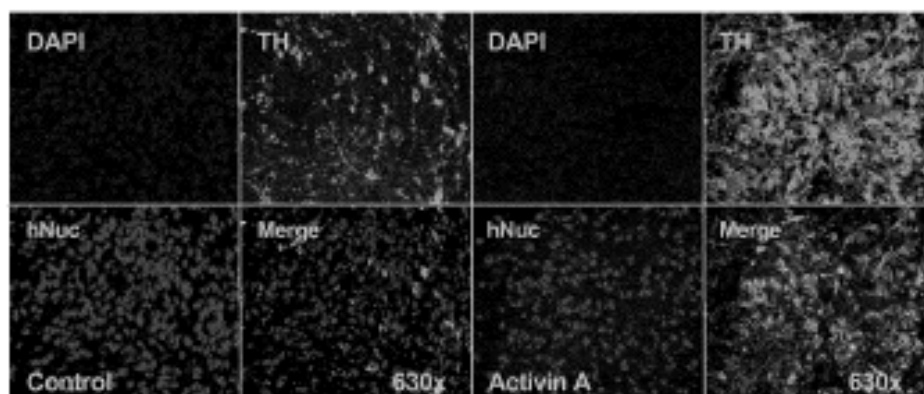


Fig. 16

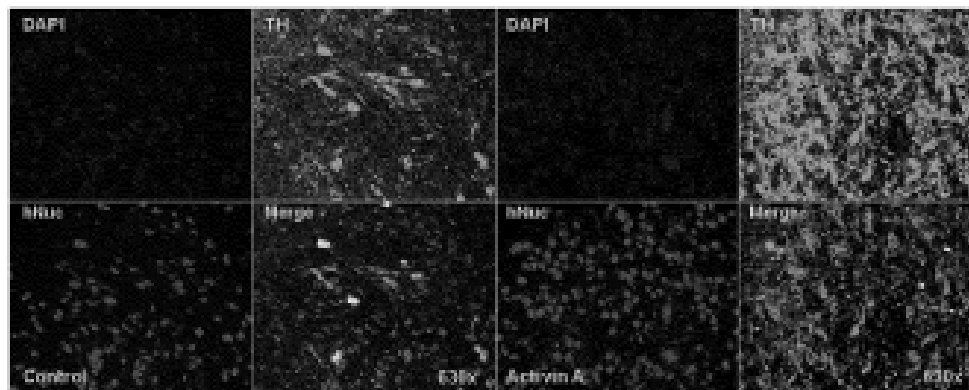


Fig. 17

