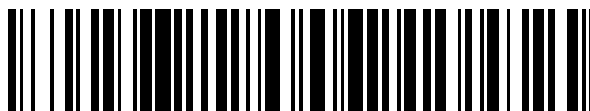


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 853**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0793 (2010.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C12N 5/07 (2010.01)

A61K 35/30 (2015.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/079 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2014** **PCT/IL2014/050846**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015** **WO15049677**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2014** **E 14851149 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020** **EP 3052191**

54 Título: **Diferenciación dirigida de astrocitos a partir de células madre pluripotentes humanas para uso en el cribado de medicamentos y el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA)**

30 Prioridad:

01.10.2013 US 201361885018 P

17.06.2014 US 201462013003 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.11.2020

73 Titular/es:

KADIMASTEM LTD. (100.0%)
7 Pinhas Sapir Street P.O. Box 4152
74140 Nes-Ziona, IL

72 Inventor/es:

IZRAEL, MICHAL;
REVEL, MICHEL;
HASSON, ARIK;
MOLAKANDOV, KFIR y
CHEBATH, JUDITH

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 796 853 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

Diferenciación dirigida de astrocitos a partir de células madre pluripotentes humanas para uso en el cribado de medicamentos y el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] La invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a un método para identificar agentes que afectan funcionalidad de astrocitos humanos usando células madre pluripotentes diferenciadas *ex-vivo* (PSC). Además, también se proporciona el uso de astrocitos humanos para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

[0002] La ELA es una enfermedad de las neuronas motoras (MN) que se caracteriza por la pérdida de los MNs superior e inferior (Moloney et al, Front Neurosci 2014, 8:252). Afecta a alrededor de 30.000 personas en los Estados Unidos, alrededor de 150.000 pacientes en todo el mundo y alrededor de 400 personas en Israel. 5-10% de los casos de ELA son ELA familiares, mientras que la mayoría de los casos de ELA son esporádicos con causas desconocidas. Los ratones y ratas transgénicos que portan los genes SOD1 humanos mutantes asociados a ELA recapitulan muchas características de la enfermedad humana. Es importante tener en cuenta que, hasta la fecha, no hay un tratamiento efectivo disponible, excepto un compuesto aprobado por la FDA, Rilutek (Riluzole) que solo extiende la vida útil en un máximo de tres meses.

[0003] ELA se diagnostica en un momento en que ya se ha producido una pérdida significativa de células. La longitud del axón de MN es de hasta un metro. El axón del MN conecta el cuerpo celular con su diana, el músculo. La capacidad de recablear y asegurar adecuadamente las conexiones funcionales después de la terapia de reemplazo de MN siguen siendo una tarea desalentadora con resultados cuestionables y hasta la fecha no hay evidencia de que esto sea posible en humanos. Por lo tanto, un intento de evitar una mayor pérdida celular tendría un impacto significativo en la supervivencia de los MN y la calidad de vida y la longevidad de los pacientes después del diagnóstico.

[0004] Sin embargo, las anomalías celulares en ELA no están limitadas a los MNs. Existen numerosas observaciones del mal funcionamiento de los astrocitos en pacientes con ELA, tanto ELA esporádico (ELSe) como familiar (ELAf). El cocultivo in vitro de astrocitos de pacientes con ELA con neuronas motoras normales parece acelerar la muerte de las neuronas motoras.

[0005] Existe por tanto una necesidad ampliamente reconocida para la producción de astrocitos humanos, propagados y expandidos a partir de células humanas PSC que abordan estas deficiencias.

[0006] WO 2010042669 describe composiciones y procedimientos de co-cultivo descritos para la identificación de agentes que modulan un fenotipo celular, en particular de las neuronas o células beta pancreáticas, en donde los métodos incluyen el co-cultivo de células diferenciadas, en donde al menos uno de los tipos de células son derivados de células madre pluripotentes inducidas por humanos de un sujeto que tiene o está predispuesto a un trastorno neurodegenerativo o metabólico.

[0007] Gupta et al. describen en Cell Death and Differentiation, vol. 19, nº 5, 1 de mayo de 2012, páginas 779-787) un sistema basado en células madre embrionarias humanas (HESC) para evaluar el alcance y el mecanismo de la neuroprotección mediada por astrocitos humanos. La activación del factor de transcripción Nrf2 en astrocitos humanos mediante el tratamiento con CDDO (TFEA) indujo la expresión de la subunidad catalítica glutamato-cisteína ligasa (GCL), lo que condujo a una mayor actividad de GCL y producción de glutatión, y una fuerte neuroprotección contra H₂O₂.

[0008] Serio y col. describen en Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 110, nº 12, 11 de febrero de 2013, páginas 4697-4702) una plataforma única para abordar la cuestión de la autonomía celular en las proteinopatías de la proteína de unión al ADN de respuesta transactiva (TDP-43). Los autores generaron astroglias funcionales a partir de células madre pluripotentes inducidas por humanos que portaban una mutación TDP-43 causante de ELA y muestran que los astrocitos mutantes exhiben niveles aumentados de TDP-43, deslocalización subcelular de TDP-43 y disminución de la supervivencia celular.

[0009] Woehrling y col. describen en Toxicology in vitro, Elsevier Science, GB, vol. 21, nº 7, 1 de octubre de 2007, páginas 1241-1246) un sistema de prueba de neurotoxicidad, que utiliza líneas celulares post-mitóticas, astrocíticas y neuronales humanas en cocultivo. Los puntos finales funcionales examinados incluyeron ensayos de energía celular (ATP) y niveles de glutatión (GSH), generación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y activación de caspasa-3.

[0010] Meyer et al. describen en Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 111, nº 2, 30 de diciembre de 2013, páginas 829-832), un método reproducible para convertir fibroblastos humanos adultos de pacientes vivos con ELA en células progenitoras neuronales inducidas y la posterior diferenciación en astrocitos (i-astrocitos). La toxicidad autónoma no celular para las neuronas motoras se encuentra después del cocultivo de i-astrocitos de pacientes familiares con ELA con mutación en superóxido dismutasa o expansión de hexanucleótidos en C9orf72 (ORF 72 en el cromosoma 9), las dos causas más frecuentes de ELA.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0011] Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de cribado de un agente para prevenir o tratar la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) comprendiendo el método:

- (a) poner en contacto una población de astrocitos, habiéndose diferenciado los astrocitos *ex vivo* de las células madre pluripotentes (PSC), con el agente;
- (b) cocultivar la población de astrocitos de la etapa (a) o un medio acondicionado de los mismos con una población de neuronas bajo estrés seleccionadas entre hipoxicidad, estrés oxidativo, toxicidad por glutamato o toxicidad por AMPA/kainato; y
- (c) cuantificar un efecto de dicho agente para mejorar la supervivencia o la función neural de la población de neuronas.

[0012] De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la relación de la población de los astrocitos a neuronas es mayor que 1:1, 10:1, 100:1, 1000:1, o 10.000:1.

[0013] De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los astrocitos expresan cada uno de GFAP, GLAST, AQP4, o una combinación de los mismos.

[0014] Según algunas realizaciones de la invención, los astrocitos muestran secreción de factores neurotróficos seleccionados del grupo que consiste en BDNF, GDNF y VEGF.

[0015] De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el estrés oxidativo se selecciona entre el grupo constituido por especies de oxígeno reactivas (ROS), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y cualquier derivado de los mismos.

[0016] De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la cuantificación se lleva a cabo mediante el recuento del número de neuronas que se encuentran bajo la apoptosis.

[0017] De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la apoptosis de dichas neuronas es detectada por el etiquetado por caspasa-3a, anexina V, tubulina-B3, HB9 o DAPI.

[0018] De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el agente es una molécula pequeña.

[0019] Los astrocitos humanos progenitores normales o astrocitos deben proporcionar un entorno para evitar que la muerte de neuronas motoras.

[0020] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que comúnmente entendido por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o prueba de realizaciones de la invención, a continuación se describen métodos y/o materiales ejemplares. En caso de conflicto, prevalecerá la especificación del patente, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0021] El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. La Oficina proporcionará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo(s) en color, previa solicitud y pago de la tarifa necesaria.

[0022] Se describen en el presente documento algunas realizaciones de la invención, solamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos e imágenes que acompañan. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se enfatiza que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y para propósitos de discusión ilustrativa de realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente a los expertos en la materia cómo se pueden practicar las realizaciones de la invención.

[0023] En los dibujos:

FIG. 1 ilustra la cinética de la expresión génica del linaje de astrocitos por astrocitos derivados de hESC. Se presenta la expresión de los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35 para cada gen. Se utilizaron cerebro humano adulto y fetal como controles. Los siguientes colores naranja, azul, verde, amarillo, rojo y azul claro representan la cinética de expresión génica de GFAP, BDNF, PDGFR α , GLAST, GDNF y ALDH1L1 respectivamente. Para cada gen, la expresión del cerebro fetal sirvió como gen de referencia (cuantificación relativa, CR = 1). FIGS. 2A-C ilustran que los astrocitos derivados de hESC expresan marcadores de astrocitos. A. CD44, B.CXCR4 y C. GLAST se midieron por FACS durante 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 43 días. PDGF y CNTF son factores conocidos por promover el compromiso y la diferenciación de APC. Se probó el efecto de los

tratamientos no tratados (NT), PDGF, CNTF y PDGF + CNTF sobre la diferenciación hESC-APC (% de expresión del marcador). Línea azul: NT, línea roja: CNTF, línea verde: CNTF + PDGF y azul claro: PDGF. La población que se obtiene mediante el protocolo de astrocitos derivados de hPSC da como resultado una población enriquecida de astrocitos.

FIGS. 3A-E ilustran que los astrocitos derivados de hESC expresan marcadores de astrocitos maduros. A. Niveles grises de células positivas para GFAP. B. Niveles grises de células GLAST positivas. C. Imagen de montaje superpuesta de A + B, en células positivas rojas GFAP, células positivas verdes GLAST y en células positivas azules Dapi. La tinción amarilla sugiere la tinción conjunta para GFAP y GLAST. D. Ampliación del inserto C (mismo comentario con respecto a la tinción amarilla). E. En células positivas para Aquaporin-4 verdes (AQP4) y en células positivas para GLAST rojas. Barra de escala A-C y E: 100 μ m y barra de escala D: 30 μ m.

FIGS. 4A-C ilustran que los astrocitos derivados de hPSC producen y secretan factores neurotróficos, medidos en el contenido celular y en los medios después de la activación de los astrocitos, respectivamente. A. Contenido de células GDNF y secreción después de la activación de IFN- γ (en rojo). B. Contenido de células BDNF y secreción después de la activación de IFN- γ (en naranja). C. Contenido de células VEGF y secreción de VEGF después de la activación de LPS (en púrpura).

FIGS. 5A-B ilustran la cinética de la absorción de glutamato 500 μ m y 2 mM por los astrocitos derivados de hESC. A. De izquierda a derecha (barras verdes): 0', 10', 30', 60', 90' y 120' después de la adición de 500 μ m de glutamato a los astrocitos derivados de hESC en el día 100 de diferenciación. Barra roja clara: 1^{er} control negativo, medios con 500 μ m de glutamato 60' sin la presencia de astrocitos. Barra roja oscura - 2^o control negativo, Niveles de glutamato en medios cultivados con fibroblastos humanos después de 120'. Barra derecha (azul): niveles de control positivo de glutamato en medios cultivados con astrocitos derivados de la médula espinal humana. B. De izquierda a derecha (barras de color verde claro): 0', 10', 30', 60', 90' y 120' después de la adición de glutamato 2 mM a los astrocitos derivados de hESC en el día 100 de diferenciación. Barra azul: control negativo, medios con glutamato 2 mM después de 60' sin la presencia de astrocitos.

FIGS. 6A-D ilustran el efecto neuroprotector de los astrocitos humanos derivados de PSC sobre las neuronas motoras bajo estrés oxidativo.

A. Los MNs se complementaron con H₂O₂ (50 μ m y 150 μ m) o se dejan sin tratar durante 6 horas. Durante este período, los MN se dejaron solos o se suplementaron con sobrenadante de astrocitos (medio acondicionado durante 24 horas) o con astrocitos. A: % caspasa -3a en MN sin H₂O₂ está representado por la barra gris (derecha). El % de caspasa-3a en MN incubado con H₂O₂ solo está representado por la barra roja (50 μ m H₂O₂) y verde oliva (150 μ m H₂O₂), o después de la adición del medio acondicionado de astrocitos por la naranja y barras de color verde pálido, y en presencia de astrocitos junto a la barra de color rosa y verde pálido. En activación Caspasa-3 B y C (rojo). Las neuronas motoras se tiñen con tubulina beta3 (verde) y los núcleos con DAPI. D. Una imagen del dispositivo de análisis de alto contenido utilizado para la cuantificación y análisis de imágenes.

FIGS. 7A-C demuestran que la inyección de astrocitos progenitores humanos (hAPC) aumentó la supervivencia de los ratones hSOD1. A. Tabla que compara la supervivencia de ratones hSOD1 en dos puntos de tiempo (día 130 y día 140). La supervivencia de los ratones que fueron trasplantados con células "día 7" (crecidas en ausencia de factores de crecimiento durante 7 días) aumentó como se muestra en el día 140. B. Gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier que compara todos los grupos experimentales. C. Gráfico de Kaplan-Meier generado para el inicio de la enfermedad según lo medido por Rotarod <106 comparando todos los grupos experimentales (no de acuerdo con la invención).

FIGS. 8A-C demuestran que los astrocitos derivados de humanos jóvenes aumentaron el rendimiento motor en ratones hSOD1. A. Cinética de la progresión de la enfermedad según lo describe la puntuación BBB que compara todos los grupos. 0 = ratones normales 5 = ratones paralizados. B. Cinética de la progresión de la enfermedad como se describe en la puntuación rotarod que compara todos los grupos experimentales, 180 segundos = ratones normales 0 = ratón que no puede sostener la barra. C. ratones en el aparato Rotarod.

FIG. 9 demuestra que los astrocitos derivados de humanos jóvenes mantuvieron el peso corporal trasplantado de hSOD1. Cinética de los cambios en el peso corporal a lo largo de la progresión de la enfermedad comparando todos los grupos.

FIG. 10 ilustra el análisis estadístico de rango de Kaplan Meier Log. El análisis de supervivencia Log Rank se realizó en el 50% de la población.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ESPECÍFICAS DE LA INVENCION

[0024] La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a un método de identificación de agentes que afectan funcionalidad de astrocitos humanos usando células madre pluripotentes diferenciadas *ex-vivo* (PSC).

[0025] Para obtener grandes cantidades de astrocitos humanos los inventores de la presente invención proponen diferenciarlos a partir de células madre pluripotentes humanas (PSC) que pueden ser propagadas indefinidamente antes de la diferenciación.

[0026] La presente invención da a conocer además un protocolo único y robusto para generar una población de astrocitos altamente homogénea (>90% GFAP, S100b) a partir de células madre pluripotentes humanas (HPSC). El

protocolo de diferenciación junto con la tecnología de cultivo escalable, permite la producción de grandes cantidades de astrocitos *in vitro*. Estos astrocitos derivados de hPSC exhiben un patrón de expresión génica similar al de los astrocitos humanos primarios, así como propiedades funcionales que incluyen: I) Secreción de factores neurotróficos que protegen las neuronas motoras (BDNF, GDNF y VEGF). II) Capacidad de captación de glutamato y III) Protección de las neuronas contra el estrés oxidativo *in vitro*. Estos astrocitos derivados de hPSC pueden mantenerse congelados y usarse según sea necesario.

[0027] Las propiedades terapéuticas de dichos astrocitos humanos se evaluaron *in vivo*, para ese fin, las células se trasplantaron por vía intratecal en número alto de copia G93A de ratones hSOD1 (un modelo de ratón para la enfermedad ELA). El trasplante de astrocitos humanos resultó en una mejora significativa ($P < 0,05$) en el rendimiento motor en todas las pruebas funcionales. Además, se observó un efecto positivo sobre la supervivencia y la duración de la enfermedad en ratones trasplantados.

[0028] ELA se caracteriza por la muerte de neuronas motoras en la corteza, el tronco cerebral, y la médula espinal. La ELA es familiar en aproximadamente el 5-10% de los casos y es esporádica en el resto. El curso de la enfermedad es indistinguible entre la ELA familiar y la esporádica. La enfermedad se manifiesta tarde en la vida a una edad promedio de 56 años, y una vez diagnosticada, conduce a la parálisis completa y la muerte dentro de 2-5 años. En un subconjunto de pacientes familiares, se han encontrado mutaciones en un gen que codifica la dismutasa superóxido de cobre-zinc 1 (SOD1). SOD1 es una enzima citosólica implicada en la desintoxicación de radicales libres. Además, la sobreproducción de alelos patógenos que codifican la proteína SOD1 humana en neuronas motoras conduce a una enfermedad neurodegenerativa progresiva de aparición tardía. Los estudios han llevado a la identificación de características patógenas intrínsecas de las neuronas motoras de ELA, incluida la formación de agregados de proteínas, anomalías del citoesqueleto, disfunción proteosómica y una mayor sensibilidad a las señales de muerte celular. Además, la sobreproducción de alelos patógenos humanos que codifican la proteína SOD1 en otras células que a menudo se encuentran asociadas con neuronas motoras *in vivo*, como por ejemplo, pero sin limitarse a las células gliales (p. ej., astrocitos, células de Schwann, etc.) puede dar lugar a patologías de neuronas motoras autónomas no celulares. Los ejemplos de un alelo que codifica la proteína SOD1 patógena incluyen, pero sin limitación, SOD1G93A, SOD1G85R y SOD1G37R.

[0029] Las enfermedades neurodegenerativas tales como la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, son condiciones tratables, que en conjunto representan una importante carga para la salud. Se requiere una mejor comprensión de la biología de estas enfermedades para desarrollar tratamientos neuroprotectores y, en última instancia, reparadores. Hasta hace poco, las enfermedades neurodegenerativas se habían considerado en gran medida como trastornos exclusivamente neuronales. Sin embargo, hallazgos recientes han desafiado este concepto, implicando mecanismos de neurodegeneración no autónomos de células mediados por astrocitos en trastornos agudos y crónicos. La biología de las células madre humanas permite modelar la interacción humano-astrocito-neuronal bajo paradigmas fisiológicos y de lesiones. Aunque existen plataformas robustas para la generación de células madre neurales y neuronas funcionales, la generación de astrocitos humanos enriquecidos y funcionales está relativamente poco estudiada. Los mecanismos por los cuales los astrocitos humanos podrían proteger las neuronas enfermas y aumentar su supervivencia tienen la hipótesis de que incluyen: prevención de la neurotoxicidad del glutamato, secreción de factores neurotróficos (NTF) como BDNF y GDNF, y modificación neurovascular por secreción de VEGF.

[0030] La presente invención se basa en parte en la generación de población enriquecida y funcional de los astrocitos progenitores derivados de las células madre pluripotentes humanas y astrocitos *in vitro*, y el establecimiento de una plataforma de cribado de medicamentos para la ELA, en donde fue probado el efecto neuroprotector de los astrocitos humanos en neuronas motoras bajo estrés oxidativo.

[0031] En algunas realizaciones de la presente invención, se proporcionan métodos y composiciones para la identificación, caracterización y optimización de compuestos principales que muestran efectos neuroprotectores y mejoren la funcionalidad de astrocitos humanos.

[0032] Los agentes que pueden ser probados utilizando el ensayo de la invención incluyen agentes de molécula pequeña, productos químicos, péptidos, proteínas, agentes de polinucleótidos (por ejemplo, agentes ARNs).

[0033] El contacto de las células con el agente se puede realizar por cualquier método *in vitro* conocido en la técnica incluyendo, por ejemplo, la adición del agente a las células de tal manera que el agente está en contacto directo con las células. Según la invención, las células se incuban con el agente. Las condiciones utilizadas para incubar las células se seleccionan para un período de tiempo/concentración de células/concentración de agente/relación entre células y agente y similares, que permiten al agente inducir cambios celulares, tales como cambios en la velocidad de transcripción y/o traducción de genes específicos, que se analizan. Las células pueden ponerse en contacto con el agente durante al menos 1 día, 3 días, 5 días, 7 días, 10 días, 14 días o al menos 21 días.

[0034] Se pueden agregar compuestos principales neuroprotectores candidatos a los medios de cultivo de las células de la presente invención y ensayar para propiedades deseables. Los compuestos que exhiben propiedades deseables tales como compuestos que aumentan el número de neuronas motoras viables en un cultivo en relación con el número

de neuronas motoras viables en ausencia del compuesto líder neuroprotector candidato pueden seleccionarse para caracterización y optimización adicionales. Los compuestos pueden seleccionarse por su capacidad para aumentar la viabilidad de las neuronas motoras en un cocultivo con astrocitos humanos, o en medios condicionados de los mismos.

[0035] Los cribados de alto rendimiento también pueden usarse para identificar compuestos capaces de corregir cualquier fenotipo asociado a la enfermedad, por ejemplo, supervivencia, apoptosis, necrosis, degeneración axonal, guía axonal, morfología axonal, morfología dendrítica, la densidad de receptores, la sinaptogénesis, la neurogénesis, densidad de sinapsis, transmisión sináptica, señalización sináptica, tráfico de receptores, tráfico de proteínas, agregación de proteínas, actividad proteasómica, expresión del receptor, estrés oxidativo (ROS), señalización de FGFR y señalización de FGF.

[0036] Caracterización y optimización de compuestos principales candidatos seleccionados por su capacidad para modular un fenotipo celular (por ejemplo, efecto neuroprotector) incluyen, pero no se limitan a un cribado adicional, la generación de derivados y análogos, análisis de las características de distribución de absorción, metabolismo y excreción (ADME), ensayos de seguridad y ensayos de eficacia. En particular, los esfuerzos de optimización pueden involucrar el desarrollo de compuestos diseñados para cruzar la barrera hematoencefálica.

[0037] Los compuestos de fármaco candidatos (o "agentes de ensayo") pueden ser pequeñas moléculas individuales de elección (por ejemplo, un compuesto principal a partir de un cribado de medicamentos anterior) o en algunos casos, los compuestos fármaco candidatos a cribar provienen de una combinatoria de biblioteca, es decir, una colección de diversos compuestos químicos generados por síntesis química o síntesis biológica mediante la combinación de una serie de "componentes básicos" químicos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal como una biblioteca de polipéptidos se forma combinando un conjunto de componentes químicos llamados aminoácidos en todas las formas posibles para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto de polipéptido). Millones de compuestos químicos pueden sintetizarse a través de tal combinación combinatoria de componentes químicos. De hecho, teóricamente, la mezcla combinatoria sistemática de 100 bloques de construcción químicos intercambiables da como resultado la síntesis de 100 millones de compuestos tetraméricos o 10 mil millones de compuestos pentaméricos.

[0038] Tal como se utiliza aquí, el término "supervivencia" se refiere a cualquier proceso por el cual una célula evita la muerte. El término supervivencia, como se usa en el presente documento, también se refiere a la prevención de la pérdida celular como se evidencia por necrosis, apoptosis o la prevención de otros mecanismos de pérdida celular. El aumento de la supervivencia como se usa en el presente documento indica una disminución en la tasa de muerte celular en al menos 10%, 25%, 50%, 75%, 100% o más en relación con un control no tratado. La tasa de supervivencia puede medirse contando células capaces de teñirse con un colorante específico para células muertas (p. ej., yoduro de propidio) en cultivo.

[0039] Las células utilizadas en el ensayo de la presente invención comprenden células de astrocitos que han sido diferenciadas *ex-vivo* a partir de células madre pluripotentes.

[0040] Solo como referencia, las células madre embrionarias humanas pueden aislarse de 5 blastocistos humanos o etapa de blastocisto retardado (como se describe en el documento WO2006/040763). Los blastocistos humanos se obtienen típicamente de embriones de preimplantación *in vivo* humanos o de embriones fertilizados *in vitro* (FIV). Alternativamente, un embrión humano de una sola célula puede expandirse a la etapa de blastocisto. Para el aislamiento de las células ES humanas, la zona pelúcida se elimina del blastocisto y la masa de las células internas (ICM) se aísla mediante inmunocirugía, en la que las células del trofotodermo se lisan y se eliminan de la ICM intacta mediante pipeteo suave. El ICM se coloca en un matraz de cultivo de tejidos que contiene el medio apropiado que permite su crecimiento. Después de 9 a 15 días, el crecimiento derivado de ICM se disocia en grupos ya sea por disociación mecánica o por degradación enzimática y las células se vuelven a sembrar en un medio de cultivo de tejido fresco. Las colonias que demuestran una morfología indiferenciada se seleccionan individualmente por micropipeta, se disocian mecánicamente en grumos y se vuelven a platear. Las células ES resultantes se dividen rutinariamente cada 1-2 semanas. Para más detalles sobre los métodos de preparación de células ES humanas, véase Thomson et al., [Pat. N° 5,843,780; Science 282:1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133, 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92: 7844, 1995]; Bongso y col., [Hum Reprod 4: 706, 1989]; Gardner y col., [Fertil. Steril. 69: 84, 1998].

[0041] Se apreciará que las células madre disponibles en el mercado también se pueden utilizar con este aspecto de la divulgación. Las células ES humanas se pueden comprar en el registro de células madre embrionarias humanas NIH (<<http://escr.nih.gov>>). Ejemplos no limitantes de líneas de células madre embrionarias disponibles comercialmente son BG01, BG02, BG03, SA01, TE03 (I3), TE04, TE06 (I6), HES-1, HES-2, HES-3, UC01, UC06, WA01, WA07 y WA09.

[0042] Las células madre utilizadas por la presente invención también se pueden derivar de células madre pluripotentes inducidas (iPSC).

[0043] Independientemente de su origen, las células madre usadas de acuerdo con la presente invención son purificadas al menos al 50%, purificadas al 75% o purificadas a al menos 90%. Cuando se usan líneas de células

madre embrionarias humanas, las colonias de células ES humanas se separan de su capa de alimentación (células similares a fibroblastos irradiados con rayos X), tal como por medios mecánicos y/o enzimáticos para proporcionar poblaciones de células madre sustancialmente puras.

[0044] Una vez que se obtienen células madre humanas, se pueden tratar para diferenciarse en astrocitos. Un método ejemplar se describe en la sección Materiales y Métodos a continuación. Sin embargo, se apreciará que el presente método contempla métodos adicionales para generar astrocitos, que son conocidos en la técnica.

[0045] El medio de cultivo utilizado se selecciona de acuerdo con la célula madre utilizada. Así, por ejemplo, un medio adecuado para el crecimiento de células ES, puede ser, por ejemplo, DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, St. Lewis, MO) o medio alfa MEM (Life Technologies Inc., Rockville, MD, EE.UU.), suplementado con enzimas y hormonas de soporte. Estas hormonas pueden ser, por ejemplo, insulina (ActRapid; Novo Nordisk, Bagsværd, DINAMARCA), progesterona y/o Apo-transferrina (Biological Industries, Beit Haemek, Israel). Otros ingredientes se enumeran en la sección de Ejemplos.

[0046] Como se usa aquí la frase "ácido retinoico" se refiere a una forma activa (sintética o natural) de la vitamina A, capaz de inducir la diferenciación de células neuronales. Los ejemplos de formas de ácido retinoico que pueden usarse de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, ácido retinoico, retinol, retinal, 11-cis-retinal, ácido retinoico todo trans, ácido retinoico 13-cis y 9-cis-ácido retinoico (todos disponibles en Sigma- Aldrich, St. Lewis, MO).

[0047] El ácido retinoico se puede utilizar en un intervalo de concentración de 1-50 μm .

[0048] El medio de cultivo puede complementarse adicionalmente con factores de crecimiento, que pueden estar presentes al menos en parte del período de cultivo para promover la proliferación de células y facilitar la diferenciación en los linajes neuronales gliales. Tales factores de crecimiento pueden incluir, por ejemplo, EGF (5-50 ng/ml) y bFGF (5-50 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, Biotest, Dreieich, Alemania).

[0049] Como se usa aquí, la frase "neuroesferas" se refiere a grupos cuasi-esféricos o esferas que contienen principalmente células madre neuronales y progenitores multipotentes tempranos que pueden diferenciarse en neuronas, oligodendrocitos y astrocitos, así como otras células gliales.

[0050] Las células se cultivan hasta que se forman neuroesferas maduras.

[0051] Como se usa aquí la frase "neuroesferas maduras" se refiere a neuroesferas en donde algunas de las células madre neurales se han diferenciado para convertirse en progenitores de oligodendrocitos especializados que tienen fabricantes adquiridos del linaje de oligodendrocitos (por ejemplo, Sox10, NKX2.2., NG2, A2B5), mientras que otros se han diferenciado para convertirse en progenitores neurales o progenitores de astrocitos.

[0052] Se puede permitir que se cultiven las células, por ejemplo durante 10-30 (por ejemplo, 20-30) días, al final del cual se forman neuroesferas separadas. Las esferas, o células disociadas a partir de ellas, se adhieren a sustratos adherentes (por ejemplo, matrigel o un componente de la matriz extracelular (por ejemplo, colágeno, laminina y fibronectina) y se someten a una mayor expansión con factores de crecimiento y eventualmente a la diferenciación después de la eliminación de los factores de crecimiento en sustrato adherente catiónico (por ejemplo, poli-D-lisina o sustratos de poliornitina con fibronectina (FN) o adherentes (por ejemplo, Matrigel o una matriz extracelular de componentes (por ejemplo, colágeno, laminina y fibronectina).

[0053] En el presente documento los términos "células progenitoras de astrocitos humanos (HAPC)" o "astrocitos progenitores humanos" significan células que pueden generar progenie que son astrocitos maduros. Típicamente, las células expresan algunos de los marcadores fenotípicos que son característicos del linaje de astrocitos.

[0054] Los términos "administrar" y "administración" se refieren al proceso por el cual una cantidad terapéuticamente efectiva de astrocitos o medicamento contemplados en este documento se administra a un sujeto para fines de prevención y/o de tratamiento. Los astrocitos y los medicamentos se administran de acuerdo con las buenas prácticas médicas, teniendo en cuenta la condición clínica del sujeto, el sitio y el método de administración, la dosis, la edad del paciente, el sexo, el peso corporal y otros factores conocidos por los médicos.

[0055] El término "tratar" se refiere a revertir, aliviar, o inhibir el progreso de una enfermedad, o uno o más síntomas de tal enfermedad, a la que se aplica tal término. El tratamiento incluye el manejo y cuidado de un sujeto en el momento del diagnóstico o más tarde. Un tratamiento puede realizarse de forma aguda o crónica. Dependiendo de la condición del sujeto, el término puede referirse a prevenir una enfermedad, e incluye prevenir el inicio de una enfermedad o prevenir los síntomas asociados con una enfermedad. El término también se refiere a la reducción de la gravedad de una enfermedad o síntomas asociados con dicha enfermedad antes de la afección con la enfermedad. Dicha prevención o reducción de la gravedad de una enfermedad antes de la afección se refiere a la administración de astrocitos o medicamento que lo comprende, a un sujeto que no está afectado por la enfermedad en el momento de la administración. "Prevenir" también se refiere a prevenir la recurrencia de una enfermedad o de uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad. Un objetivo del tratamiento es combatir la enfermedad e incluye la administración

de los astrocitos para prevenir o retrasar la aparición de los síntomas o complicaciones, o aliviar los síntomas o complicaciones, o eliminar o eliminar parcialmente la enfermedad. Los términos "tratamiento" y "terapéuticamente" se refieren al acto de tratar, ya que "tratar" se define anteriormente.

5 [0056] Los términos "sujeto", "individuo" o "paciente" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a un animal, incluyendo un animal de sangre caliente tal como un mamífero.

[0057] Tal como se utiliza aquí, el término "sujeto sano" significa un sujeto, en particular un mamífero, que no tiene ELA diagnosticada ni síntomas de ELA.

10 [0058] Como se usa en el presente documento una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos o células descritas en este documento con otros componentes químicos tales como portadores y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de células o compuestos a un organismo.

15 [0059] En el presente documento, el término "ingrediente activo" se refiere a un agente que mejora la supervivencia o la función neuronal de la población de neuronas motoras.

20 [0060] De aquí en adelante, las frases "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable", que pueden ser usadas de forma intercambiable se refieren a un portador o un diluyente que no causa irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Se incluye un adyuvante en estas frases.

25 [0061] Aquí el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar la administración de un ingrediente activo. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

30 [0062] "Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad o dosis de astrocitos o medicamento de los mismos, que conducirá a uno o más efectos deseados, en particular, uno o más efectos beneficiosos. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una sustancia puede variar según factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del sujeto, y la capacidad de la sustancia para provocar una respuesta deseada en el sujeto. Se puede ajustar un régimen de dosificación para proporcionar la respuesta terapéutica óptima (por ejemplo, efectos beneficiosos, más particularmente efectos beneficiosos sostenidos). Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente o la dosis se puede reducir proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

35 [0063] Las líneas de células madre multipotentes y pluripotentes inducidas se denominan "líneas de células madre inducidas" (líneas ISC) en este documento. Las células madre pluripotentes inducidas se denominan células iPS o iPSCs.

40 [0064] "Corregir" un fenotipo, como se usa en el presente documento, se refiere a alterar un fenotipo de manera que se aproxima más a un fenotipo normal.

45 [0065] Las técnicas para la formulación y administración de fármacos pueden encontrarse en "Remingtons Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición, que se incorpora aquí por referencia.

[0066] En la presente memoria el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

50 [0067] Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "incluyendo, pero no limitado a".

[0068] El término "que consiste en" significa "que incluye y limitado a".

55 [0069] El término "que consiste esencialmente en" significa que la composición, método o estructura pueden incluir adicionales ingredientes, pasos y/o partes, pero sólo si los adicionales ingredientes, pasos y/o partes no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicada.

60 [0070] A lo largo de esta solicitud, diversas realizaciones de esta invención pueden presentarse en un formato de intervalo. Se debe entender que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe ser interpretado como una limitación inflexible sobre el alcance de la invención. En consecuencia, se debe considerar que la descripción de un rango ha revelado específicamente todos los subrangos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un rango, como del 1 al 6, ha revelado específicamente subrangos, como del 1 al 3, del 1 al 4, del 1 al 5, del 2 al 4, del 2 al 6, del 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese rango, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del rango.

[0071] Siempre que un intervalo numérico se indica en el presente documento, se entiende que incluye cualquier numeral citado (fraccionada o integral) dentro del intervalo indicado. Las frases "rango/rangos entre" un primer número de indicación y un segundo número de indicación y "rango/rangos de" un primer número de indicación "a" un segundo número de indicación se usan aquí indistintamente y están destinados a incluir el primer y el segundo número indicado y todos los números fraccionales e integrales entre ellos.

[0072] Tal como se utiliza aquí, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada incluyendo, pero no limitado a, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos bien conocidos por, o fácilmente desarrollados a partir de maneras conocidas, medios, técnicas y procedimientos de profesionales de las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

[0073] Se aprecia que ciertas características de la invención, que son, por claridad, se describen en el contexto de distintos modos de realización, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. A la inversa, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier sub-combinación adecuada o como sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización no funcione sin esos elementos.

[0074] Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

[0075] Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no limitativa.

[0076] En general, la nomenclatura utilizada aquí y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican a fondo en la literatura. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se establece en la patente de EE.UU. N^{os} 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, JE, ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" por Freshney, Wiley-Liss, NY (1994), tercera edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan JE, ed. (1994); Stites y col. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8^a edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", WH Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la literatura científica y de patentes, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N^{os} 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 y 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos los cuales se incorporan por referencia como si se establecieran completamente en este documento. Se proporcionan otras referencias generales a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos allí conocidos son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector. Toda la información aquí contenida se incorpora aquí como referencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Generación de los astrocitos usados para el ensayo

[0077] Las líneas de células ES humanas se cultivaron a 37°C en 5% de CO₂ en capas alimentadoras de fibroblastos de prepucio humano de recién nacidos (HEF). El medio de crecimiento (ES1) consistió en DMEM/F12 (Sigma), reemplazo de suero inactivo al 14% (KSR), aminoácidos no esenciales (1/100), beta-mercaptoetanol 0,1 mM (los tres de Invitrogen/Gibco), Na 1 mM piruvato, 2 µg/ml de heparina (Sigma) y 8 ng/ml de FGF básico recombinante humano (FGF-2; Preprotech). Cinco días después de la siembra, las colonias de células hES se separaron con 1,2 mg/ml de colagenasa IV (Worthington) durante 45-90 minutos a 37°C. Los agregados se cultivaron adicionalmente como anteriormente, o se sometieron a diferenciación como se describe (Izrael et al. Mol Cell Neurosci 34, 310-323 (2007)).

Paso 1-transición: Para este paso de transición, las colonias de células hES se transfirieron a placas de

cultivo de tejidos en medio T (Transición) que consiste en 50% (v/v) de medio ES1 y 50% (v/v) de medio ITTSPP/B27. ITTSPP/B27 es una mezcla de un volumen de DMEM/F12 que contiene un 2% de suplemento B27 (Invitrogen) y un volumen de DMEM/F12 que contiene 25 µg/ml de insulina humana (ActRapid, Novo Nordisk), 50 µg/ml de Apo-transferrina humana (Biological Industries, Israel), 6,3 ng/ml de progesterona, 10 µg/ml putrescina, 50 ng/ml de selenito de sodio y 40 ng/ml de triyodotironina (T3) (todas de Sigma), con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. El medio T se complementó con 20 ng/ml de EGF humano (R&D Systems) y 4 ng/ml de r-bFGF humano. Después de 1 día, la mayor parte de las colonias y agregados de células hES no adherentes se transfirieron a placas bacterianas (no adherentes) de 6 cm y d crecido en medio T suplementado con 20 ng/ml de r-EGF humano (R&D Systems) y 2 ng/ml de bFGF r-humano.

Paso 2: Tratamiento con ácido retinoico todo trans (ATRA): El medio se cambió a ITTSPP/B27, con adiciones de 20 ng/ml de EGF y 10 µM de ATRA. El medio se cambió diariamente durante 7 días.

Paso 3: Cultivo en suspensión: Durante este paso, que permite la maduración de las neuroesferas (NS), el cultivo continuó en medio ITTSPP/B27 con 20 ng/ml de EGF durante 18 días. El medio fue cambiado cada dos días.

Proliferación y diferenciación de células madre neuronales

[0078]

Paso 4: Adhesión Matrigel 1: Esferas/racimos se transfirieron a placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos que habían sido recubiertas por 1,5 h a temperatura ambiente (TA) con BD Matrigel (factor de crecimiento reducido Matrigel, BD Biosciences) diluido 1:30 en DMEM/F12. El medio de cultivo fue ITTSPP/B27 con 20 ng/ml de EGF y después de un día, se descartaron los agregados no adherentes. El medio se cambió cada dos días durante 7-9 días.

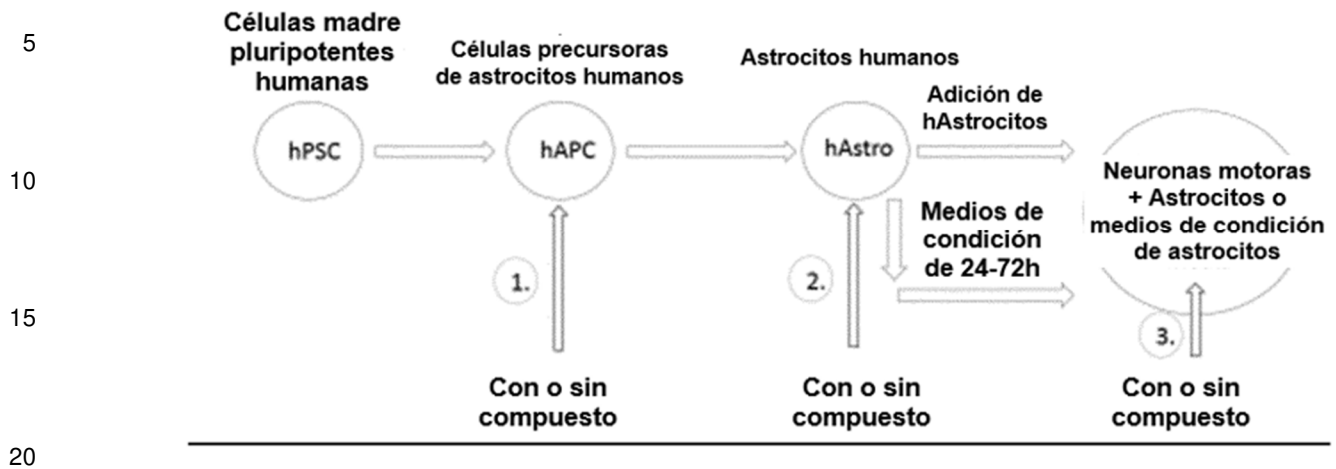
Paso 5: Adhesión Matrigel 2: Las neuroesferas/agrupaciones que estaban libres de fibroblastos y células epiteliales se seleccionaron y se recogieron en una nueva placa Matrigel. Las neuroesferas (no más de 10 NS) se separaron y se disociaron parcialmente con tripsina al 0,025% (Invitrogen) en PBS (libre de Ca⁺ y Mg²⁺), durante 2-3 minutos a 37°C (pase 1). La tripsina fue neutralizada por un volumen de inhibidor de tripsina (Invitrogen) y cuatro volúmenes de 2 mg/ml de BSA en ITTSPP/B27. Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante cinco minutos en una centrífuga Eppendorf. Los pequeños grupos disociados se volvieron a sembrar en placas recubiertas con Matrigel (en una proporción de 1:1 a 1:3) en ITTSPP/B27 con 20 ng/ml de EGF (paso 4). Después de 2-3 semanas, las células se disociaron mediante tratamiento con tripsina como se indicó anteriormente (pase 2) y las células hES-NS resultantes se sembraron en placas recubiertas con poli-D-lisina (PDL, 100 µg/ml) o placas recubiertas con Matrigel y laminina de ratón (20 µg/ml) o PDL (20 µg/ml) y fibronectina 5 µg/ml en ITTSPP/B27 con 20 ng/ml EGF, durante un día. En cada nueva siembra, se añadió 1 µg/ml de laminina de ratón (Sigma) al medio.

Pasos 6 y 7: Expandir en poli-D-lisina o Matrigel: Después de un día, el medio se cambió a medio N2/B27 que consiste en DMEM/F12 con suplemento de N2 al 0,5% (v/v) (Invitrogen), 1% (v/v) suplemento B27. Se agregaron factores de crecimiento EGF y bFGF a 10 ng/ml cada uno. Después de 7-14 días, las células se dividieron (1:2 o 1:3, Pase 2 (P2) por tratamiento con tripsina para obtener monocapas. Después de una semana, se recogieron las células con tripsina y se congelaron en 0,5x10⁶ células ampolla (P3). Se realizaron pases adicionales semanalmente, cuando se indicó. Con el fin de enriquecer y promover el compromiso de los astrocitos, las células pueden crecer en Matrigel, Cultrex o Geltrex.

Paso 8: Eliminación de GF: En diferentes pases, la diferenciación terminal se inició mediante la eliminación de los factores de crecimiento. Siempre que se eliminaron los factores de crecimiento, 50 µg/ml de vitamina C se añadió al medio de N2/B27. las células se descongelaron en medio N2/B27 suplementado con factores de crecimiento bFGF y EGF. Un día antes de la división y la siembra en 96 placas de pocillos, se eliminaron factores de crecimiento.

Ensayo neuro-protector utilizando medio de condición de astrocitos o adición de astrocitos

[0079]

Esquema general

[0080] El efecto de los compuestos puede ser probado en los siguientes pasos (círculo amarillo):

1. Los compuestos se pueden añadir durante la diferenciación HAPC hacia astrocitos maduros después de lo cual los astrocitos expuestos o sus medios de condición al compuesto se pueden agregar a las neuronas.
2. Por fin cambio de medios para las 24-72 h antes de inducir estrés oxidativo.
3. En cocultivo durante el estrés oxidativo.
4. Se puede llevar a cabo una combinación, es decir, 1+2, 1+3, 2+3, etc.

Paso 1: Generación de neuronas motoras a partir de las médulas espinales de roedores

[0081] Se utilizaron las médulas espinales de embriones de rata (E15) para cada experimento. Las meninges fueron removidas de todas las médulas espinales. Los tejidos de la médula espinal se cortaron en pequeños fragmentos y se dividieron en tubos de 15 ml (cinco embriones por tubo). Se añadió tripsina (2 ml, 0,25%) (Gibco nº 250050014) a cada tubo y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Las células se resuspendieron en medio NB (7 ml) y FCS (1 ml), se centrifugaron a 300 g durante cinco minutos y se aspiró el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en medio NB (2 ml). Las células individuales se contaron y se sembraron (120 K células/pocillo) en placas de 96 pocillos recubiertas con matrigel (BD nº FAL354230) (Costar nº cc-3596). Las células se cultivaron en medio NB suplementado con 50 ng/ml de NGF (Alomone nº n-100), con cambios de medio de 2 días. La caracterización de las neuronas motoras se realizó después de tres días de cultivo. Las neuronas se tiñeron con Tubulin-b3, Neurofilamento y HB9 (factor de transcripción específico de la neurona motora). Al menos el 70% de las neuronas fueron positivas para estos anticuerpos.

Paso 2: La siembra de astrocitos

[0082] Los astrocitos se sembraron en días 8-10 (después de la operación de la médula espinal). Las células se cultivaron con medio NB suplementado con 50 ng/ml de NGF (Alomone nº n-100).

Paso 3: Generación de medios de condición de astrocitos

[0083] Medios de astrocitos derivados de HPSC (astrocitos de 30-150 días de edad) se recogieron; diluido 1:1 con N2B27 fresco suplementado con vitamina C. El medio se denominó ACM (medio de condición de astrocitos).

Paso 4: Inducción de estrés oxidativo (realizada el día 9-10)

[0084] Se diluyeron 50 µm o 150 µm de H₂O₂ (Sigma nº 216763) en N2B27 suplementado con Vitamina C o ACM (150 µl) y se añadieron a cada pocillo de las placas sembradas con los astrocitos. Las placas se incubaron durante 6 horas a 37°C.

[0085] Las placas se fijaron con PFA al 4%, 100 µl/pocillo durante 10 minutos, y luego las placas se lavaron dos veces y se almacenaron a 4°C hasta la tinción.

Paso 5: Análisis de la muerte celular de neuronas motoras:

Tinción:

[0086] Las células se incubaron con tampón de bloqueo suplementado con Tx-100 0,3% (Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA), y después se lavaron con PBS (-/-).

[0087] Las células se incubaron con los siguientes anticuerpos durante 1 hora a RT:

1^{os} Anticuerpos- Rb-anti Caspasa-3a (Promega n° G7481) (1:250)

M-anti-β-Tub3 (Convence n° MMS-435P) (1:500)

Rb-anti-HB9 (Abcam n° AB-ab92606) (1:100)

[0088] Las células se lavaron dos veces con PBS (-/-), y se incubaron con los siguientes anticuerpos durante 1 hora a TA:

2^{os} Anticuerpos - Cabra-anti-Rb-568 (Invitrogen n° A11036) (1:1000) Cabra-anti-ratón-488 (Invitrogen n° A11029) (1:1000)

[0089] Las células se lavaron dos veces usando PBS (-/-), marcado con DAPI (1:1000), incubado durante 5 minutos y lavado dos veces con PBS (-/-). El análisis HCS se realizó utilizando el Scan Array -Cellomics (Thermo-scientific inc).

[0090] El efecto de la ACM o adición de astrocitos derivados de HPSC pueden ser probados en otros inductores de estrés, tales como:

- Excitotoxicidad de neuronas motoras. Específicamente, la toxicidad del glutamato (la capacidad de captación de glutamato se prueba además de la viabilidad de células de neuronas motoras)
- Toxicidad adicional de especies de oxígeno reactivo
- Toxicidad de AMPA/kainato

Composición de medios:

Medio N2B27:

[0091]

- DMEM/F12 (Sigma n° 01-170) 96,5%
- N2 (Invitrogen n° 17502-048) 0,5%.
- B27 (Invitrogen n° 17504044) 1%.
- Pluma/Srep/Ampho B (Biological ind. n° 03-033-1B) 1%.
- GlutaMAX (Invitrogen n° 35050038) 1%.

Medio NB:

[0092]

- Medio neurobasal (Gibco n° 21103049) 97%.
- B27 (Invitrogen n° 17504044) 1%.
- Pluma/Srep/Ampho B (Biological ind. n° 03-033-1B) 1%.
- GlutaMAX (Invitrogen n° 35050038) 1%.

Caracterización de astrocitos derivados de PSC humano utilizando el análisis FACS: Muestras utilizadas para FACS:

[0093] Las muestras de astrocitos derivados de HPSC en diferentes etapas de desarrollo se tiñeron;

Día 0 = astrocitos derivados de hPSC crecidos en presencia de EGF y bFGF
 Días 7-14 = astrocitos derivados de hPSC crecidos en ausencia de EGF y bFGF durante 7-14 días
 Días 14-28 = astrocitos derivados de hPSC crecidos en ausencia de EGF y bFGF durante 14-28 días
 Días 28-42 = astrocitos derivados de hPSC cultivados en ausencia de EGF y bFGF durante 28-42 días
 Días 42-56 = astrocitos derivados de hPSC crecidos en ausencia de EGF y bFGF durante 42-56 días

Tinción de FACS:

Reactivos:

[0094] Tampón FACS: PBS (Gibco nº 14190-094) 99,5%
BSA (Sigma nº A9418) 0,5%

Anticuerpos:

[0095]

- GLAST (Miltenyi)
- A2B5 (Miltenyi)
- CD44 (Miltenyi)
- CXCR4 (Miltenyi)
- CD140 (BD)
- CD9 (Miltenyi)
- CD133 (Miltenyi)
- TRA1-60 (Miltenyi)
- EpCAM (Miltenyi)
- ALDH1L1 (Miltenyi)
- GFAP (Después de la fijación) (Sigma)
- Aqua4 (Después de la fijación+Tx-100)

Preparación de células para células adherentes:

[0096] Las células se trataron con tripsina durante 3 minutos usando tripsina (Gibco), inactivadas con DTI (Gibco) suplementado con 2 mg/ml de BSA (Sigma, Cat nº: A9418) en DMEM/F12 (Sigma). Las células se recogieron con los medios en un tubo cónico, se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se descartó. Las células se resuspendieron con tampón PBS frío (Gibco, nº de Cat:14190-094), se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se desechó.

Fijación:

[0097] Las células se re-suspendieron con PFA 0,5% (diluido, EMC) y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Las células se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante.

[0098] Las células se lavaron en 1 ml de PBS, se centrifugaron a 300g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante.

Permeabilización para antígenos intracelulares tinción:

[0099] Las células se incubaron con Tx-100 0,5% durante 30 minutos a 4°C para permeabilizar la membrana celular. Las células se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante. Las células se volvieron a suspender en PBS, se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante.

Inmunotinción:

[0100] Las células se resuspendieron con tampón FACS (FB) (1×10^5 células/tubo, en un volumen de 100 ul).

Para un anticuerpo no conjugado primario:

[0101] El anticuerpo primario sin conjugar y el anticuerpo de control de isotipo no conjugado se diluyeron por separado en FB. El anticuerpo primario se diluyó a la dilución óptima de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se resuspendieron con el anticuerpo primario diluido o anticuerpo de control de isotipo diluido y se incubaron durante 30 min a 4°C.

[0102] Las células se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células se lavaron con FB y se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante. Los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromo se diluyeron en FB. Las células se resuspendieron con el anticuerpo secundario diluido y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. El anticuerpo secundario se diluyó a la dilución óptima de acuerdo con las instrucciones del fabricante y esta incubación debe realizarse en la oscuridad. Las células se resuspendieron con FB y se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 0,5 ml de FB y se analizaron en citómetro de flujo.

Para un anticuerpo primario conjugado por fluorocromo:

[0103] El anticuerpo primario conjugado por fluorocromo se diluyó en FB de acuerdo con las instrucciones del

fabricante. Las células se resuspendieron con el anticuerpo primario conjugado y se incubaron durante 15 minutos a 4°C en la oscuridad. Las células se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células se volvieron a suspender con FB y se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 0,5 ml de PBS y se analizaron en citómetro de flujo.

Expresión génica de los astrocitos derivados de PSC humanos:

Muestras utilizadas para la extracción de ARN:

[0104] Las muestras de ARN se extrajeron a partir de astrocitos derivados de hPSC en diferentes etapas de desarrollo;

Día 0 = astrocitos derivados de hPSC cultivados en presencia de EGF y bFGF
 Días 7-14 = astrocitos derivados de hPSC cultivados en ausencia de EGF y bFGF durante 7-14 días
 Días 14-28 = astrocitos derivados de hPSC cultivados en ausencia de EGF y bFGF durante 14-28 días
 Días 28-42 = astrocitos derivados de hPSC cultivados en ausencia de EGF y bFGF durante 28-42 días
 Días 42-56 = astrocitos derivados de hPSC cultivados en ausencia de EGF y bFGF durante 42-56 días.

Extracción de ARN a partir de astrocitos derivados de hPSC:

[0105] 0,05% de tripsina (Invitrogen nº 25200-056) se añadió a la muestra de células (células $1 \cdot 10^6$ - $10 \cdot 10^6$). Las células se incubaron durante 5 minutos a 37°C. La tripsina se inactivó mediante la adición de 2 volúmenes de 2 mg/ml de BSA (Sigma). Las células se centrifugaron a 300 rpm y se retiró el sobrenadante. El sedimento se volvió a suspender en 1 ml de RLT (Qiagen) y 10 µl de betamercaptoetanol, y se almacenó a -80°C.

RT-PCR en tiempo real

Reactivos y equipos

[0106] Sondas de ensayo de expresión génica TaqMan®:

- A2B5 (ABI, Life technologies)
 - GFAP Hs00909236 (Life technologies)
 - BDNF (ABI, Life technologies)
 - PDGFR Hs00998018 (Life technologies)
 - GLAST (ABI, Life technologies)
 - GDNF (ABI, Life technologies)
 - ALDH1L1 Hs00201836 (Life technologies)
 - TRA-1-60 (ABI, Life technologies)
 - Nanog Hs04260366 (Life technologies)
 - Oct4 (ABI, Life technologies)
 - Glul Hs00365928 (Life technologies)
 - IGF-1 (ABI, Life technologies)
 - NGF (ABI, Life technologies)
 - Aqua4 (ABI, Life technologies)
 - Connexin30 (ABI, Life technologies)
 - CD44 (ABI, Life technologies)
- ARN total humano (Ambion).
 - ARN fetal humano (Clontech).
 - Mezcla maestra de PCR TaqMan, 50 ml (Applied Biosystems).
 - Placa de reacción óptica rápida de 96 pocillos (Applied Biosystems).
 - Gradiente básico T-Profesional para RT-PCR (Biometra).
 - Kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (200 reacciones) (Applied Biosystems).
 - Sistema de PCR en tiempo real Step One Plus (Applied Biosystems).

Transcripción inversa

[0107] La transcripción inversa se llevó a cabo utilizando la High Capacity de cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) y el gradiente básico T-Profesional. El siguiente procedimiento se basó en el protocolo de Invitrogen.

[0108] La siguiente mezcla de ARN/cebador se preparó en cada tubo:

	Tampón RT	2 µl
	ARN total	1 µg
5	Cebadores aleatorios de RT	1 µl
	Inhibidor de RNasa	1 µl
	Transcriptasa inversa	1 µl
	100 mM mezcla dNTP	0,8 µl
10	DEPC H ₂ O	a 10 µl

[0109] El termociclador automatizado fue programado para:

1. 25°C 10 min
2. 37°C 120 min
3. 85°C 5 min
4. 4°C Pausa

[0110] ADNc se almacenó a -20°C hasta su uso para la PCR en tiempo real.

PCR en tiempo real

[0111] La siguiente mezcla se preparó en cada pocillo de placa óptica (para 10 µl de mezcla de reacción).

- 5 µl TaqMan Mix
- 0,5 µl sonda + cebadores
- 0,5 µl de ADNc
- 4 µl H₂O

[0112] Los datos obtenidos por qPCR para cada uno de los genes se analizaron usando ARN de cerebro fetal adulto como referencia.

Ensayos de secreción de factor neurotrófico de astrocitos derivados de hPSC

Protocolo de Elisa:

[0113] Kits comerciales utilizados:

- BDNF (promega nº G7610)
- GDNF (promega nº G7620)
- IGF-1 (Sistemas de I + D nº DG100)
- VEGF (Sistemas de I + D nº DVE00)
- NGF (promega nº G7630)

[0114] Los astrocitos derivados de hPSC se cultivaron en ausencia de factores de crecimiento (EGF + bFGF) durante al menos 20 días. Los medios sobrenadantes de astrocitos derivados de hPSC (medio de condición) y/o el contenido celular (24 h-72 h) se recogieron después de la última reposición de medios.

[0115] Para cada uno de los factores, Elisa se realizó según las instrucciones del protocolo de fabricación.

Protocolo de captación de glutamato:

[0116] Kit comercial: - Se utilizó el kit de análisis de glutamato EnzyChrom (Bioassay Systems # EGLT-100).

[0117] Muestras de cultivo celular utilizadas: al menos 20 días de astrocitos derivados de hPSC privados de factor de crecimiento (EGF + bFGF), astrocitos humanos de control positivo (Gibco), fibroblastos humanos de control negativo. Se añadió glutamato (0,5-3 mM) a cada pocillo experimental.

[0118] Se tomaron al menos 0,5 ml de muestra de medio de las células analizadas en los siguientes puntos de tiempo: T=0', 10', 30', 60', 90', 120' y se almacenaron a 4°C hasta procesamiento posterior. La absorción de glutamato se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante (Bioassay Systems # EGLT-100).

Astrocitos humanos utilizados para el trasplante:

[0119] Los astrocitos humanos se generaron como se describe anteriormente ("Generación de los astrocitos utilizados para el ensayo") pasando por los pasos 1 a 8. Para el trasplante, se permitió que las células precursoras de los astrocitos humanos se diferenciaron mediante la eliminación de factores de crecimiento. Se utilizaron dos poblaciones de células para el experimento: una que creció en ausencia de factores de crecimiento durante 7 días ("Día 7") y la otra durante 42 días ("día 42"). Astrocitos humanos de "día 7" y "día 42" se suspendieron en DMEM/F12 a una concentración de $2,85 \times 10^5$ células/ μ L.

Diseño experimental de trasplante de células

[0120] Se probaron cinco grupos experimentales de trasplante. En el **grupo nº 1**, $67 \pm$ ratones SOD1^{G93A} de 2 días de edad se trasplantaron con astrocitos humanos diferenciados "día 42" (n=10 ratones SOD1^{G93A}). Grupo nº 2, $67 \pm$ ratones SOD1^{G93A} de 2 días de edad se trasplantaron con astrocitos humanos diferenciados "día 7" (n=12 ratones SOD1^{G93A}). Grupo nº 3, se realizaron dos inyecciones de células "día 7" en $67 \pm$ ratones SOD1^{G93A} de 2 días de edad y en el día 97 ± 2 ratones SOD1^{G93A} (n=13). El grupo nº 4 se inyectó con vehículo solamente (grupo inyectado con DMEM/F12 Sham) en el día $67 \pm$ ratones SOD1^{G93A} de 2 días de edad (n=10) y el grupo nº 5 no recibió ningún tratamiento (grupo intacto, n=4). Los ratones fueron inmunosuprimidos mediante inyecciones IP diarias de 10 mg/kg de ciclosporina (Sandimmun, Novartis) comenzando 3 días antes del trasplante hasta el final del experimento, además se administraron 15 mg/kg de CellCept (Roche) (por OS) dos veces al día a partir 3 días antes del trasplante hasta el día 7 después del trasplante.

Trasplante de astrocitos humanos

[0121] Animales inmunosuprimidos recibieron trasplantes en 67 ± 2 días (todos los grupos) y 97 ± 2 (grupo nº 3). Se inyectaron 7 μ L de medio o $2,0 \times 10^6$ células en un volumen total de 7 μ L por vía intratecal a través de Cisterna Magna. Las células fueron entregadas usando una jeringa Hamilton Gastight (10 μ L) con una aguja biselada de calibre 30 de 45° (Hamilton; Reno, NV). Después de la finalización de la sesión de trasplante, se evaluó la viabilidad celular usando Nucleocounter y se encontró que era superior al 85%.

Ratones SOD1^{G93A}

[0122] Se usaron ratones transgénicos que portaban el gen SOD1 humano con la mutación^{G93A} (B6SJL-Tg(SOD1^{G93A})1Gur/J). Los ratones machos y hembras se distribuyeron de manera uniforme entre los grupos experimentales. Los ratones se obtuvieron del Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME), y se mantuvieron como una colonia interna.

Cuidado y tratamiento de animales

[0123] Todos los procedimientos se llevaron a cabo en estricta conformidad con las directrices israelíes; se tomaron medidas para minimizar cualquier dolor potencial o incomodidad animal. Los ratones se alojaron a temperatura estándar (21°C) y en un ambiente controlado con luz con acceso ad libitum a la comida y al agua, y se mantuvieron en bastidores de jaulas ventiladas ubicadas en la misma habitación. Para evitar la deshidratación, se proporcionó acceso a platos de agua de jaula cuando los animales comenzaron a mostrar síntomas de la enfermedad.

Comportamiento y análisis de rendimiento motor

Fuerza de agarre de la extremidad anterior

[0124] El pesaje de los animales y toda la colección de datos del comportamiento comenzó una semana antes del trasplante, y fue llevado a cabo dos veces por semana hasta la etapa final. Las fuerzas de agarre muscular de las extremidades anteriores se determinaron por separado utilizando un "medidor de fuerza de agarre". La prueba de fuerza de agarre se realizó permitiendo que los animales agarren una barra delgada unida al medidor de fuerza. Esto fue seguido alejando al animal del medidor hasta que las extremidades posteriores o anteriores liberaron la barra. Esto proporciona un valor para la fuerza de la máxima fuerza de agarre. Las mediciones de fuerza se registraron en tres ensayos separados, y los promedios se usaron en los análisis.

Prueba de rendimiento de Rotarod

[0125] La función motora se realizó dos veces por semana. La función del motor se probó utilizando un dispositivo de aceleración Rota-Rod (durante 180 segundos, Rota-Rod 7650; Ugo Basile, Comerio, Italia). Se registró el tiempo por el cual un ratón falló desde la barra. Los animales fueron entrenados durante una semana antes de la grabación. La grabación comenzó una semana antes de la implantación.

Puntuación clínica BBB

[0126] La puntuación está en la escala de 0 a 5, según la tabla a continuación. Los ratones pueden recibir puntajes "intermedios" (es decir, 0,5, 1,5, 2,5, 3,5) cuando el cuadro clínico se encuentra entre dos puntajes definidos.

[0127] La puntuación se realizó en la escala de 0 a 5:

Puntuación	Observaciones clínicas
0	No hay cambios obvios en funciones motoras del ratón en comparación con ratones no inmunizados. Cuando se levanta por la cola, la cola tiene tensión y está recto. Las patas posteriores normalmente están separadas. Cuando el ratón va de pie, no hay inclinación en la marcha o de la cabeza.
1	Cola floja. Cuando se levanta el ratón por la cola, en lugar de estar recto, toda la cola cubre el dedo.
2	Cola floja y debilidad de las patas posteriores. Cuando el ratón se levanta por la cola, las patas no están separadas, sino que se acercan. Cuando se observa al ratón mientras camina, tiene una marcha aparentemente inestable.
3	Cola floja y parálisis completa de las patas posteriores (lo más común). O Cola floja con parálisis completa de una pata anterior y una pata posterior O TODO lo siguiente: Inclinación grave de la cabeza, Caminar solo a lo largo de los bordes de la jaula, Empujar contra la pared de la jaula, Rotación cuando se levanta por la cola.
4	Cola floja, parálisis completa de la pata posterior y parcial de la pata anterior. El ratón se mueve mínimamente alrededor de la jaula, pero parece estar alerta y estar alimentándose. Normalmente, se recomienda la eutanasia después de que el ratón consigue una puntuación de nivel 4 durante 2 días. Cuando se aplica la eutanasia debido a la parálisis severa, se aplica una puntuación de 5 para ese ratón durante el resto del experimento.
5	Parálisis completa de la pata posterior y parcial de la pata anterior, no hay movimiento alrededor de la jaula. O El ratón se rueda espontáneamente en la jaula. O El ratón es hallado muerto debido a la parálisis. Si el ratón es encontrado vivo, debe ser eutanasiado inmediatamente si la puntuación es de 5. Una vez que el ratón puntúa 5, la misma puntuación se aplica para todos los días durante el resto del experimento.

[0128] Los ratones reciben puntuaciones "intermedias" (es decir, 0,5, 1,5, 2,5, 3,5) cuando el cuadro clínico se encuentra entre dos puntuaciones definidas. En la mayoría de los casos, los ratones alcanzan una puntuación clínica de 3,5-4 y sus signos clínicos empeoran a partir de ese momento.

Peso corporal

[0129] El peso corporal se midió dos veces a la semana.

Análisis de supervivencia/etapa final e inicio

[0130] Para determinar la etapa final de la enfermedad de una manera confiable y ética, la etapa final se definió por la incapacidad de los ratones de enderezarse dentro de los 30 segundos cuando se colocaban de lado.

[0131] La aparición de la enfermedad se define por una disminución en el rendimiento rotarod debajo de 160 segundos.

Análisis estadísticos

[0132] El análisis de Kaplan-Meier de los ratones SOD1^{G93A} se llevó a cabo usando el software estadístico Sigmapstat (SAS Software) para analizar la supervivencia, la aparición de la enfermedad y los datos de duración. Los resultados del peso Rotarod, BBB y de la fuerza de agarre se analizaron mediante medidas repetidas ANOVA. En algunos casos, se realizó la *prueba t* de Student para comparar datos entre grupos de animales. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SEM, y el nivel de significación se estableció en $p \leq 0,05$.

Análisis histológico y bioquímico

Procesamiento de tejidos

[0133] Los animales se sacrificaron en la etapa final por perfusión transcardial con solución salina al 0,3%, seguido de paraformaldehído al 4% helado (Fisher Scientific; Pittsburgh, PA). Se retiraron las médulas espinales del animal, seguido de crioprotección en sacarosa al 30% (Fisher)/tampón fosfato 1 M a 4°C durante 3 días. El tejido se incluyó en OCT (Fisher), se congeló rápidamente con hielo seco y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento. Se cortaron bloques de tejido de la médula espinal en los planos sagital o transversal a espesores de 30 µm. Las secciones se recogieron en portaobjetos de vidrio y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Se recogieron subconjuntos de cortes de la médula espinal en PBS para histoquímica de flotación libre.

Cuantificación de la supervivencia y migración del trasplante

[0134] Se usó HuNA (antígeno nuclear humano; Millipore; Temecula, CA; monoclonal; 1:400) para identificar selectivamente células humanas derivadas del trasplante (tanto hGRP como hF).

EJEMPLO 1

Generación y caracterización de astrocitos derivados de células madre pluripotentes humanas (PSC) in vitro.

[0135] La diferenciación de células humanas precursoras de astrocitos (APC) hacia astrocitos maduros se ensayó para cada línea de astrocitos in vitro por:

a. PCR en tiempo real (qPCR). Se probaron las siguientes sondas (ARNm): BDNF, GDNF, PDGFR, GFAP, GLAST y ALDH1L1. La Figura 1 demostró la cinética de la expresión génica del linaje de astrocitos de los astrocitos derivados de hESC. En el fin de promover la diferenciación de células precursoras de astrocitos hacia fenotipo maduro, los factores de crecimiento se eliminaron de los medios. Las muestras se recogieron y analizaron el día 0 (con factores de crecimiento) y cada dos semanas tras la eliminación de los factores de crecimiento. El cerebro fetal humano se usó como muestra de referencia para todos los genes probados (cuantificación relativa (CR) = 1) y junto con el cerebro humano adulto sirvieron como controles positivos. Es importante tener en cuenta que el cerebro humano adulto consiste en más del 50% de astrocitos. En este estudio se encontró un aumento significativo en todos los genes de astrocitos probados tras la diferenciación celular, y en muchos casos la expresión de genes astrocíticos (es decir, GFAP, BDNF, PDGFR y GLAST) fue significativamente mayor que el cerebro fetal humano (Figura 1). Estos resultados demuestran que el protocolo da como resultado una población enriquecida de astrocitos humanos.

b. Análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, citometría de flujo) utilizando marcadores de restricción glial temprana y tardía tales como: CD44, CXCR4 y GLAST. En el análisis FACS presentado (Figura 2), se probaron las cinéticas de marcadores de astrocitos tempranos como CD44 y CXCR4, y GLAST como marcador de astrocitos tardío. CXCR4 también conocido como Fusin o CD184 es un receptor de quimiocinas con potente actividad quimiotáctica en el SNC. Se encontró que por encima del 95% de las células expresaron CXCR4 y CD44 en el día 0 hasta el 21, estos niveles disminuyeron con la maduración de los astrocitos. En paralelo, los niveles de GLAST se incrementaron en maduración de astrocitos (Figura 2). La expresión de CXCR4 indica un alto potencial de capacidad migratoria de las células precursoras de astrocitos derivadas de hESC, una capacidad necesaria para que las células lleguen a su destino.

c. Inmunohistoquímica (IHC) usando anticuerpos específicos de astrocitos: GFAP, GLAST, S100b y Aquaporin4. La tinción se cuantifica mediante nuestro dispositivo de detección de alto contenido (HCS) ScanArray. En la Figura 3, los astrocitos derivados de hPSC se tiñeron en el día 50 de diferenciación in vitro. Como se puede ver en las imágenes, la mayoría de las células son positivas para marcadores específicos de astrocitos; GFAP, GLAST y AQP4.

EJEMPLO 2

Prueba de la funcionalidad biológica de los astrocitos derivados de hPSC

[0136] Se realizaron varios experimentos para demostrar que los astrocitos humanos derivados de hPSC exhiben propiedades funcionales de astrocitos maduros sanos. Los resultados in vitro arrojan luz sobre el posible mecanismo de acción in vivo. Para ello se probaron los siguientes mecanismos funcionales:

a. **Secreción de factores neurotróficos (NTF):** Elisa para BDNF, GDNF y VEGF se realizó en medios sobrenadantes de astrocitos y extractos de detergente. Se utilizaron diferentes activadores de astrocitos como IFN-γ y LPS. La Figura 4 demostró que tras la activación de los astrocitos derivados de hPSC, GDNF, BDNF y VEGF se secretan a los medios (Figura 4, columnas del medio respectivamente).

b. **Absorción de glutamato:** la capacidad de absorción de glutamato de los astrocitos se probó midiendo los niveles de glutamato en los medios sobrenadantes de astrocitos. Se usó un ensayo colorimétrico (Enzychrom) para medir los niveles de glutamato en los medios. Los fibroblastos se utilizaron como control negativo, mientras que los astrocitos de tejido humano adulto se utilizaron como control positivo. Los datos han

mostrado una absorción de glutamato por los astrocitos humanos derivados de PSC (Figura 5). En este estudio, se evaluó la cinética de la absorción de glutamato de dos concentraciones de glutamato (0,5mM y 2mM) en los siguientes puntos de tiempo: 0', 10', 30', 60', 90' y 120' después de la adición de glutamato. Se descubrió que los astrocitos derivados de hPSC captan glutamato de los medios en ambas concentraciones de manera dependiente del tiempo. Esto indica la capacidad de la muestra específica de astrocitos para captar glutamato.

c. **Ensayo neuroprotector de MN:** en este ensayo, el ratón o los MNs derivados de humanos fueron desafiados con hidróxido de peróxido (H_2O_2). El efecto de los astrocitos derivados de hPSC condiciona la adición de medios y/o astrocitos sobre la supervivencia de los MN se probó después de la inducción del estrés oxidativo. El número de MN vivos/muertos se evaluó utilizando un dispositivo de detección de alto contenido (Cellomics-Scan Array). Este ensayo puede servir como una herramienta valiosa para encontrar nuevos medicamentos que afecten la supervivencia de los MN en la enfermedad de ELA. Los datos han demostrado efecto neuroprotector de medios condicionados a partir de cultivos de tejido de astrocitos derivados de HPSC en MNs de la médula espinal de roedores que estaban bajo el estrés oxidativo (con H_2O_2). Como se muestra en la Figura 6, se probó el efecto protector de los medios de condición de los astrocitos derivados de hPSC y el efecto de agregar astrocitos derivados de hPSC directamente al cultivo de MN de ratón. En dos concentraciones de H_2O_2 (50 μ m y 150 μ m). Una disminución significativa en la muerte de MNs fue encontrada después de la adición de astrocitos derivados de hPSC medio acondicionado en ambas concentraciones H_2O_2 . Sorprendentemente, el efecto neuroprotector de agregar astrocitos derivados de hPSC al cultivo de MN que estaban bajo estrés oxidativo fue aún mayor que agregar su medio condicionado (Figura 6), lo que sugiere que su presencia es más significativa para reducir el estrés oxidativo que simplemente lo que secretan. Estos resultados demuestran aún más in vitro la capacidad neuroprotectora de nuestros astrocitos derivados de hPSC. El protocolo de astrocitos derivados de hPSC da como resultado una alta pureza de los astrocitos humanos. Los astrocitos humanos muestran propiedades astrocíticas funcionales in vitro tales como; la secreción de factores neurotróficos y la captación de glutamato, propiedades conocidas por aumentar la supervivencia de las neuronas motoras. Se utilizó un modelo in vitro para validar directamente el potencial de los astrocitos derivados de hPSC en la protección de las neuronas motoras bajo estrés oxidativo. Este ensayo es una herramienta valiosa para encontrar fármacos que aumenten el potencial neuroprotector de los astrocitos humanos in vivo.

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de un agente para prevenir o tratar la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), el método comprende:

- (a) contactar a una población de astrocitos, los astrocitos se han diferenciado ex vivo de las células madre pluripotentes (PSC), con el agente;
- (b) cocultivar la población de astrocitos de la etapa (a) con una población de neuronas bajo estrés seleccionadas entre hipoxicidad, estrés oxidativo, toxicidad por glutamato o toxicidad por AMPA/kainato; y
- (c) cuantificar un efecto de dicho agente para mejorar la supervivencia o la función neural de la población de neuronas.

2. El método de la reivindicación 1, en donde en la etapa (b) la relación de la población de astrocitos a neuronas es mayor que 1:1, 10:1, 100:1, 1000:1 o 10.000:1.

3. El Método según la reivindicación 1, en donde dichos astrocitos expresan cada uno de GFAP, GLAST, AQP4 o una combinación de los mismos; o mostrar secreción de factores neurotróficos seleccionados del grupo que consiste en BDNF, GDNF y VEGF.

4. El método de la reivindicación 1, en donde el estrés oxidativo se selecciona entre el grupo constituido por especies de oxígeno reactivas (ROS), H_2O_2 , y cualquier derivado del mismo.

5. El método de la reivindicación 1, en donde dicha cuantificación se realiza contando el número de neuronas que están bajo apoptosis.

6. El método de la reivindicación 5, en donde dicha apoptosis se detecta mediante el marcado de Caspasa-3a, Anexina V, Tubulina-B3, HB9 o DAPI.

7. El método de la reivindicación 1, en donde dicho agente es una molécula pequeña.

FIG. 1

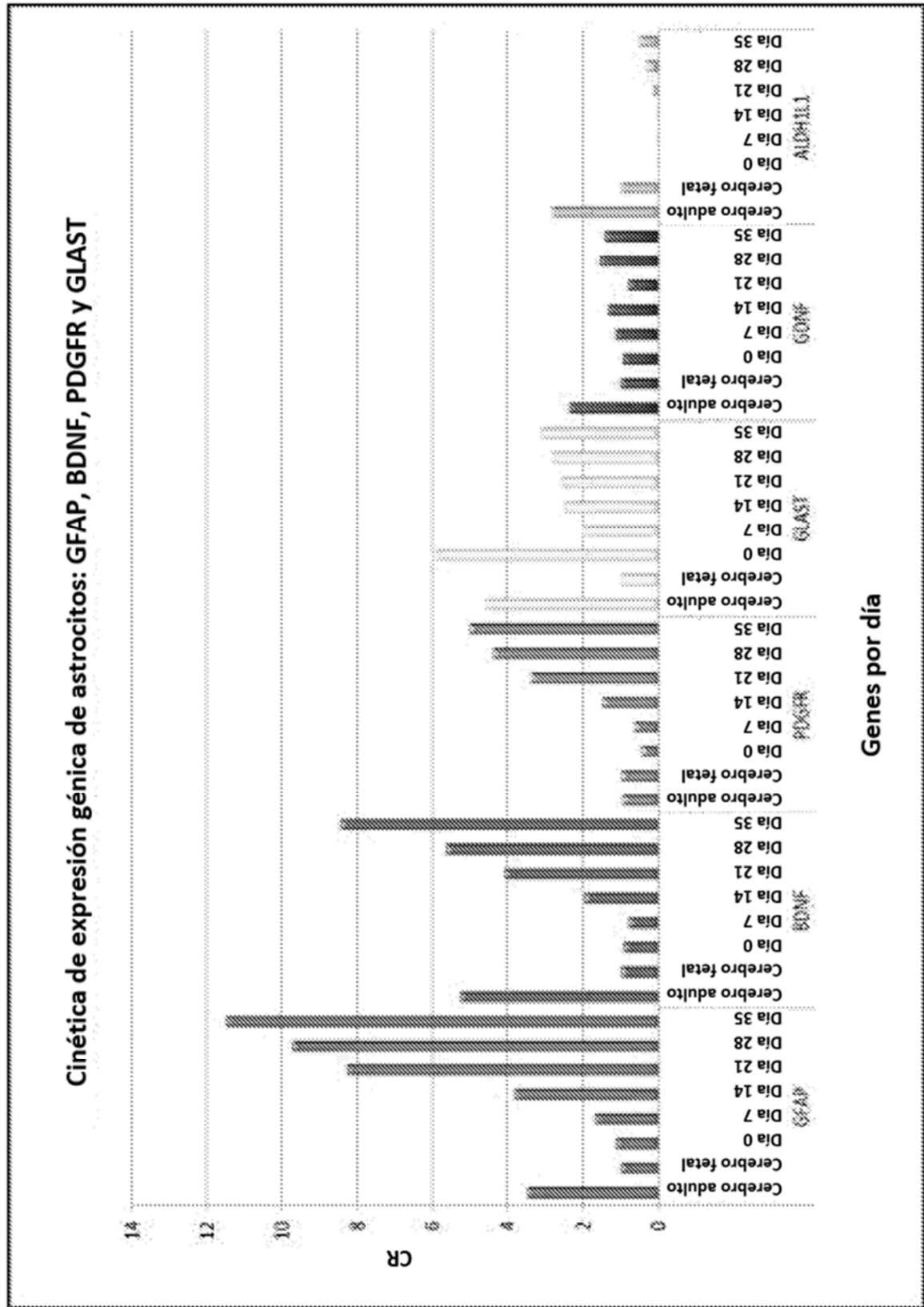


FIG. 2

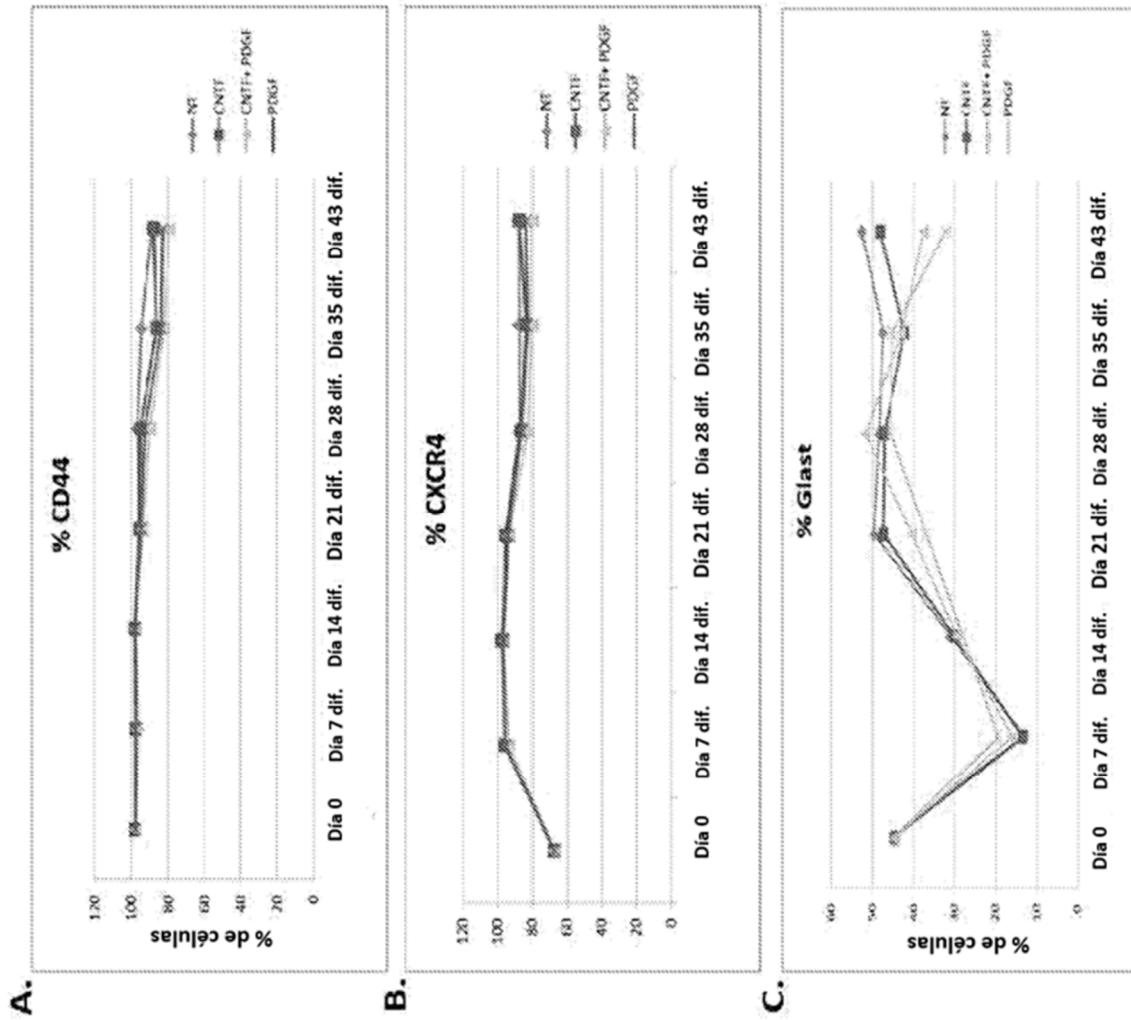


Fig 3 A.



Fig 3 B.



Fig 3 C.



Fig 3 D.



Fig 3 E.

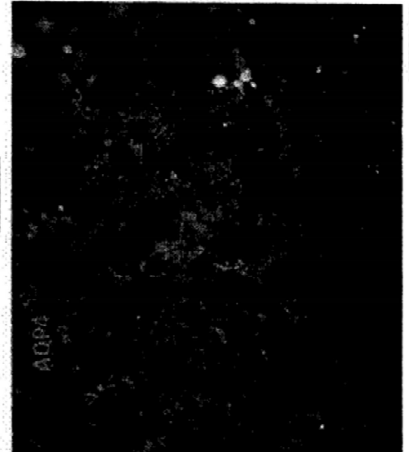


FIG. 4

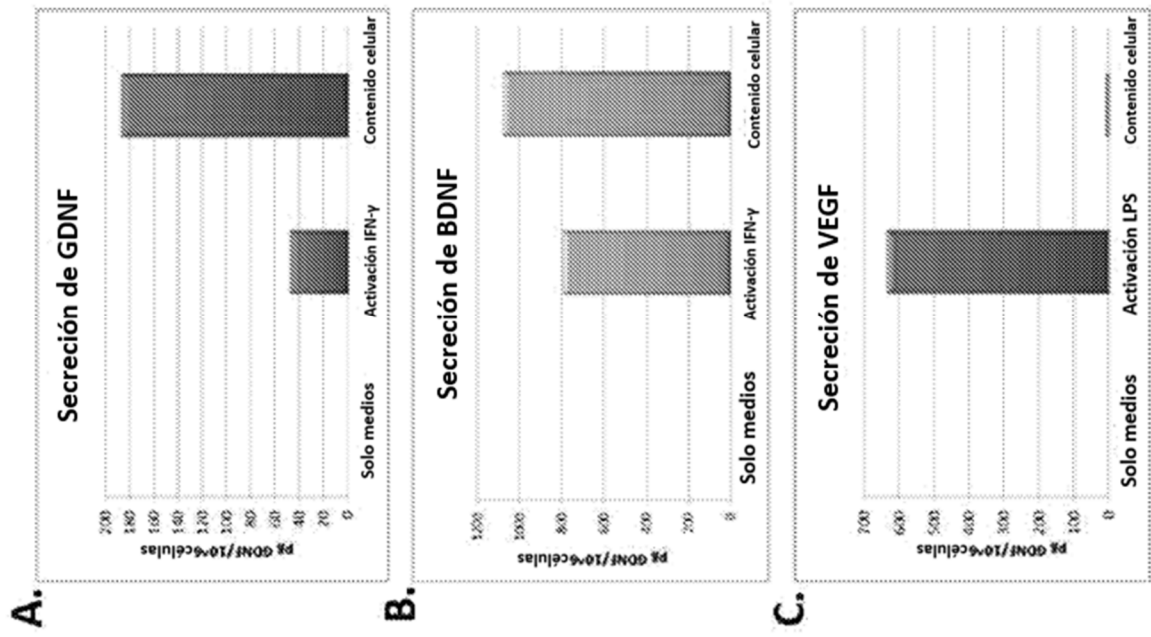
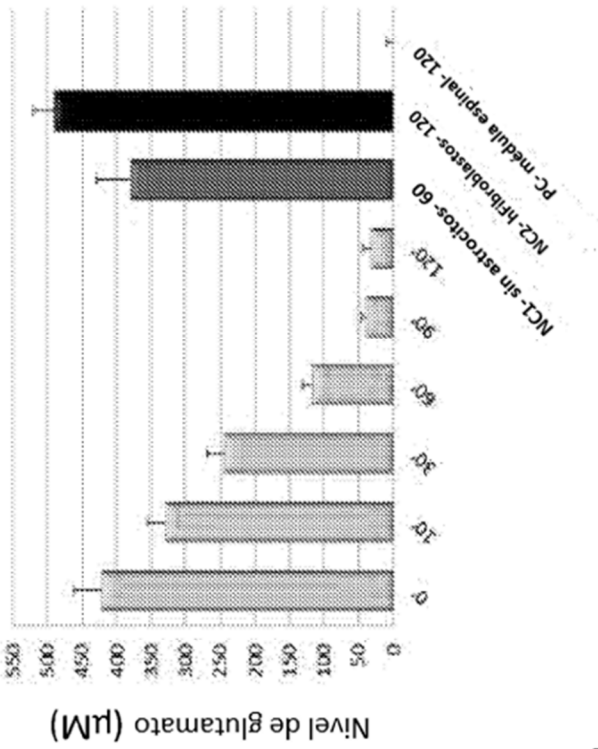


FIG. 5

A. Cinética de captación de 500µM de glutamato por astrocitos derivados por hPSC



B.

Cinética de captación de 2mM de glutamato por astrocitos derivados por hPSC

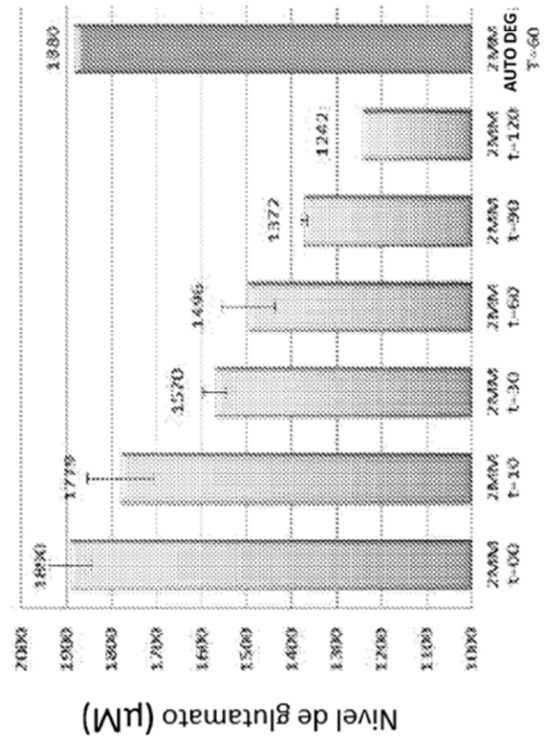


FIG. 6

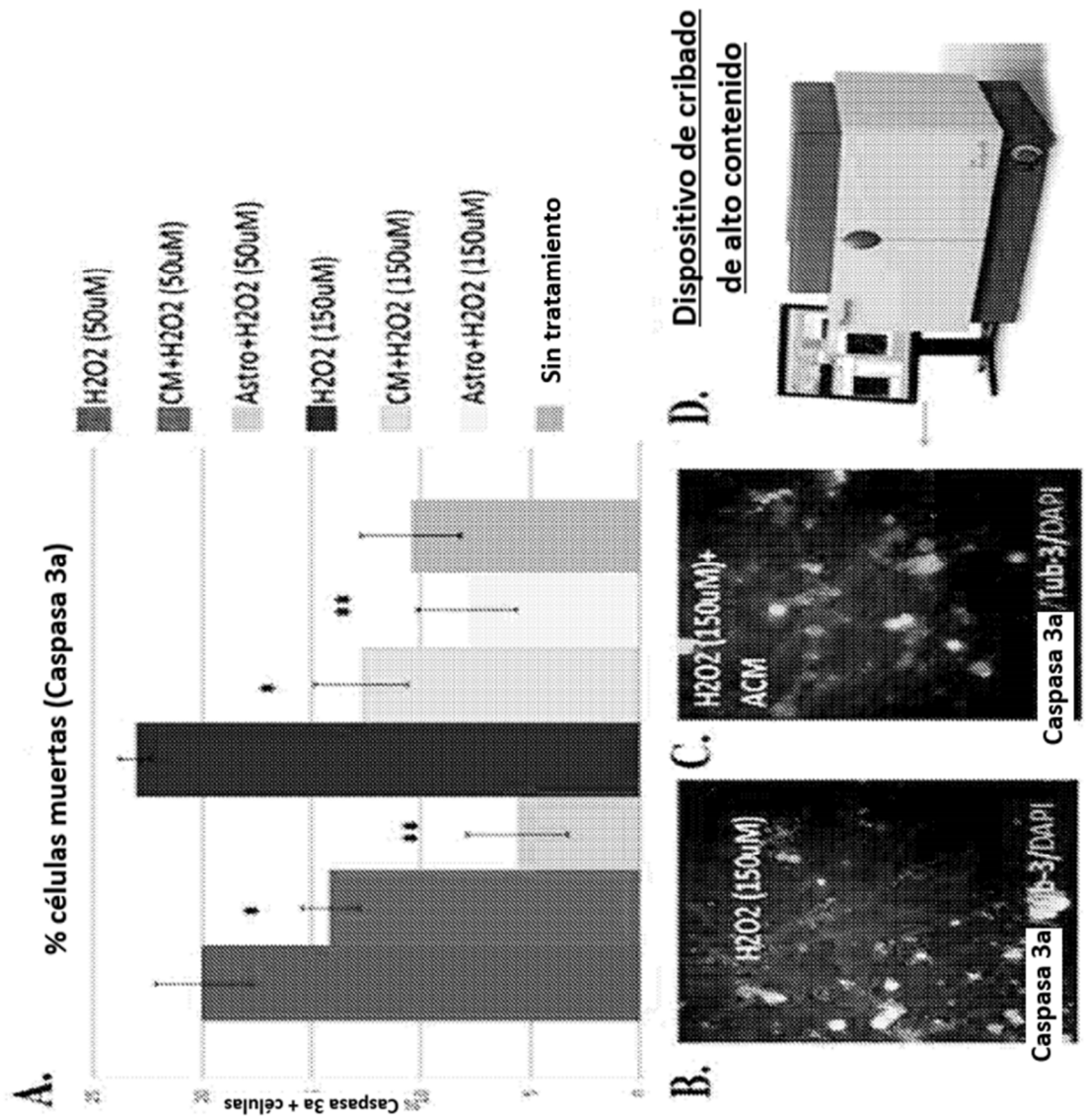
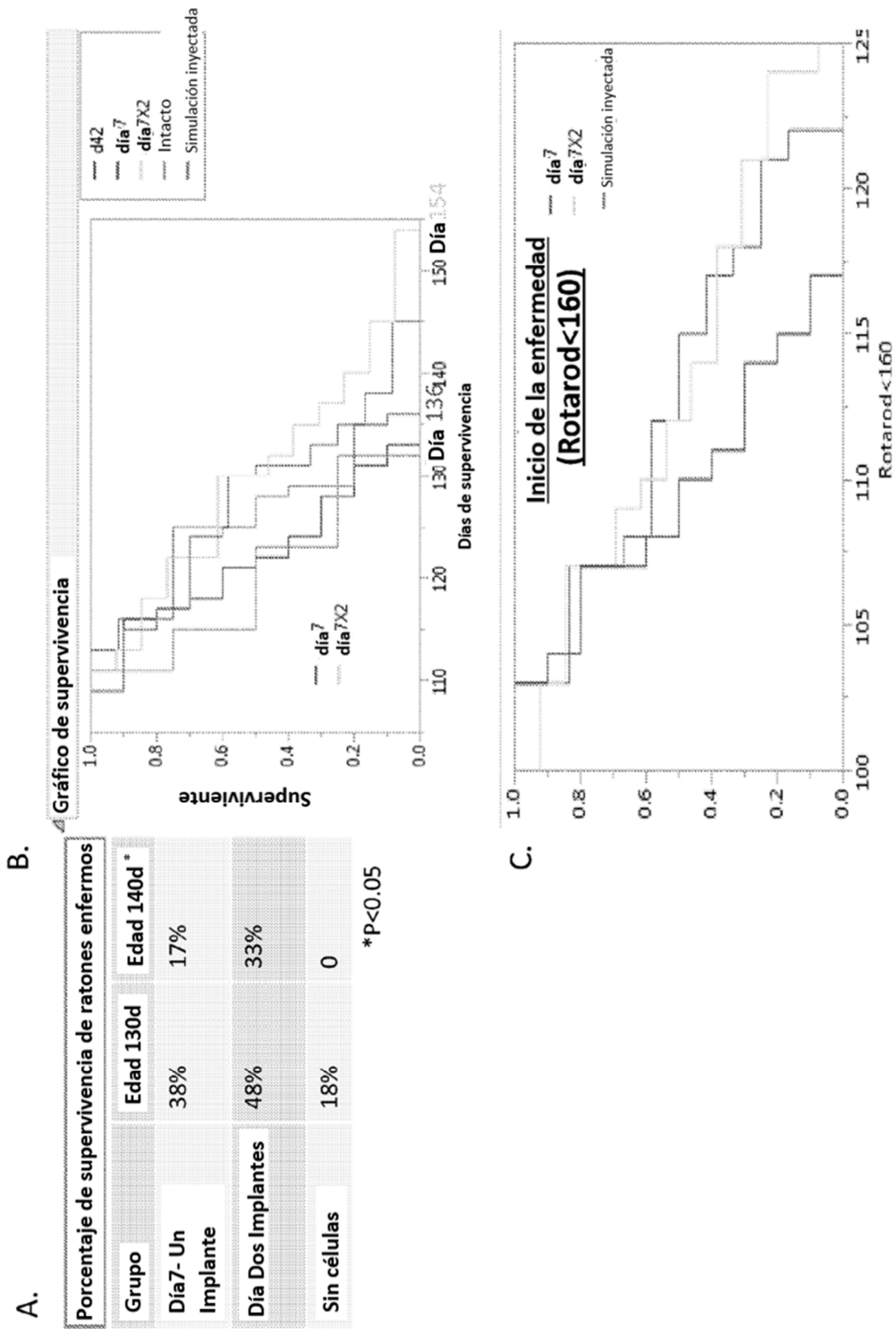


Figura 7.



*P<0.05

Figura 8.

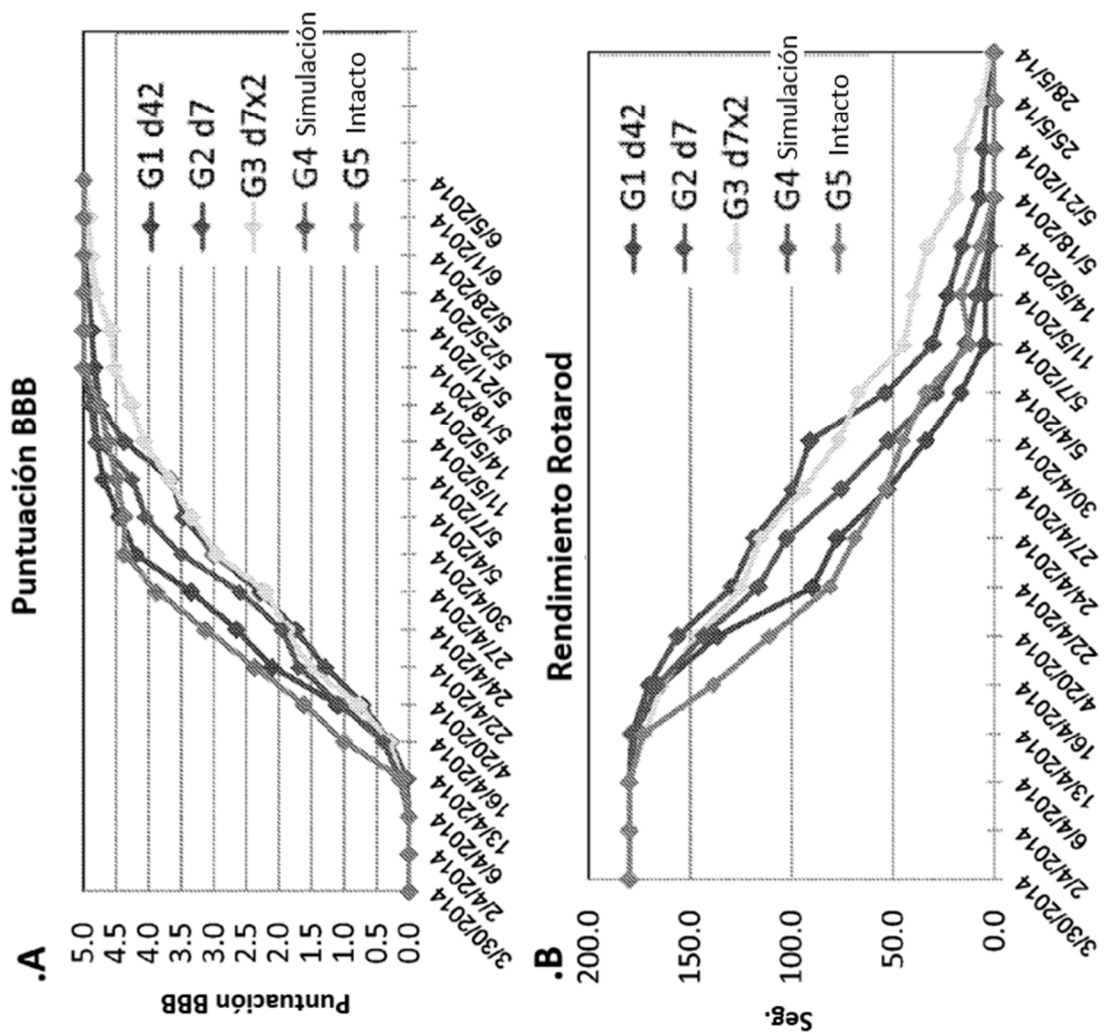


Fig. 9.

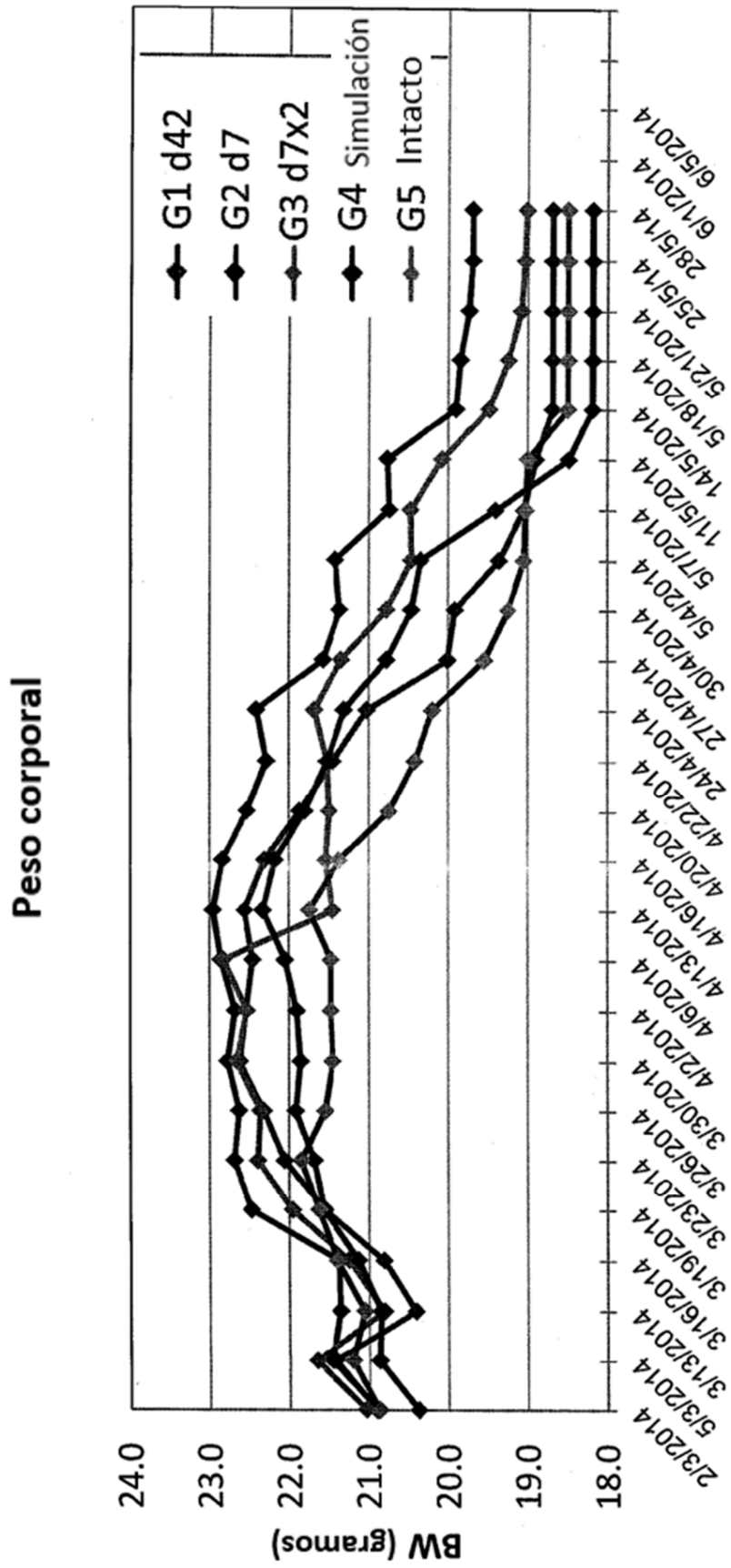


Figura 10

