

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 939 807**

(51) Int. Cl.:  
**C12N 5/0793** (2010.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2015 PCT/US2015/021783**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15143342**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2015 E 15718000 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2023 EP 3119881**

---

(54) Título: **Producción de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo y métodos para su utilización**

(30) Prioridad:

**21.03.2014 US 201461968838 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.04.2023**

(73) Titular/es:

**FUJIFILM CELLULAR DYNAMICS, INC. (100.0%)**  
University Research Park 525 Science Drive,  
Suite 200  
Madison, WI 53711, US

(72) Inventor/es:

**GEORGE, MATT;**  
**CHAVEZ, CARRIE;**  
**MCMAHON, CHRIS;**  
**WANG, WEN, BO;**  
**CHASE, LUCAS y**  
**SWANSON, BRAD**

(74) Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 939 807 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**

Producción de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo y métodos para su utilización

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos número 61/968 838, presentada el 21 de marzo de 2014.

**5 Antecedentes de la invención**

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, al campo de la biología molecular y celular. Más concretamente, se trata de métodos para producir células neuronales dopaminérgicas del mesencéfalo a partir de células madre, tales como células madres pluripotentes inducidas ("induced pluripotent stem cells", iPS).

**10 2. Descripción de la técnica relacionada**

Las poblaciones celulares que conservan la capacidad de diferenciarse en numerosos tipos celulares especializados son útiles para desarrollar grandes cantidades de poblaciones celulares diferenciadas de linaje específico. Se prevé que estas poblaciones celulares diferenciadas de linaje específico puedan utilizarse en tratamientos de reposición celular para pacientes con enfermedades que provocan la pérdida de función de una población celular definida.

**15** Además de su valor terapéutico directo, las células diferenciadas de linaje específico también son valiosas herramientas de investigación para diversos fines, tales como los ensayos de selección *in vitro* para identificar, confirmar y ensayar las características de la función o para ensayar la administración de moléculas terapéuticas para tratar enfermedades específicas del linaje celular.

**20** En el caso de la enfermedad de Parkinson, por ejemplo, es la pérdida de neuronas dopaminérgicas (DA) del mesencéfalo lo que provoca la aparición de los síntomas de la enfermedad. Por lo tanto, se necesitan métodos para producir células neuronales DA a partir de células pluripotentes, ya que dichas células podrían utilizarse tanto de modo terapéutico como en modelos de enfermedades, por ejemplo, para identificar nuevas terapias para tratamientos de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, los métodos convencionales para diferenciar las neuronas DA (véase, por ejemplo, Perrier *et al.*, 2004) dieron como resultado poblaciones celulares con injerto deficiente *in vivo* y que

**25** mostraban marcadores que eran discordantes con las auténticas neuronas DA del mesencéfalo. En fechas recientes, Studer y colegas lograron subsanar estas deficiencias y desarrollaron un protocolo que permitía la diferenciación de auténticas células neuronales DA del mesencéfalo, capaces de injertarse con eficacia *in vivo* (véase, publicación PCT n.º WO2013/067362 de Studer *et al.*). Los métodos y las composiciones que se proporcionan en el presente documento se basan en los métodos de Studer *et al.* para proporcionar una mayor eficacia de diferenciación y poblaciones de células DA del mesencéfalo de gran pureza.

**Sumario de la invención**

Las realizaciones de la presente invención se refieren a métodos mejorados para la diferenciación de células neuronales DA del mesencéfalo a partir de una población de células madre pluripotentes.

**35** Así, una primera realización de la invención se refiere a un método para proporcionar una población enriquecida de neuronas DA del mesencéfalo que comprende: diferenciar células de una población de células pluripotentes para proporcionar una población de células de linaje neural; diferenciar aún más células de la población de células de linaje neural para generar una población celular, que incluye neuronas del mesencéfalo; y purificar células de dicha población celular utilizando un marcador expresado a partir de un promotor panneural, para proporcionar una población enriquecida de neuronas DA del mesencéfalo. En algunos aspectos, los métodos de las realizaciones comprenden además el uso de un inhibidor de MEK en la diferenciación de células DA del mesencéfalo, que mejora la característica de mesencéfalo de una población celular. En otros aspectos, un método de las realizaciones no comprende la purificación de células utilizando un marcador específico de DA.

**45** En ciertos aspectos, la purificación de las células que utilizan un marcador según las realizaciones comprende la selección de células que expresan un marcador seleccionable o cribable bajo el control de un promotor panneural.

Así, en algunos aspectos, la purificación de las células comprende la selección de células que expresan un marcador

seleccionable bajo el control de un promotor panneural, en el que el marcador seleccionable es un marcador de resistencia a fármacos y la selección es la selección con fármacos de células que expresan un marcador de resistencia a fármacos.

En ciertos aspectos, el promotor panneural puede ser un promotor de TuJ-1, Map-2, Dcx, sinapsina, enolasa 2, proteína ácida fibrilar glial o cadena alfa-1A de tubulina. En otros aspectos, el marcador seleccionable o cribable se integra en el genoma de las células. Por ejemplo, el marcador puede integrarse en el sitio AAVS1 del genoma. En aspectos alternativos, el marcador seleccionable o cribable puede ser extracromosómico, por ejemplo, transportado en un vector episómico.

**55** En otros aspectos, la purificación de las células utilizando un marcador según las realizaciones comprende realizar la purificación por afinidad de células que comprenden un marcador de superficie de linaje panneural expresado. Por ejemplo, se puede utilizar un ligando o un anticuerpo contra un marcador de superficie para purificar las células. Se

pueden utilizar diversas metodologías de purificación según las realizaciones, incluidas, entre otras, la purificación en columna, la unión de las células a una superficie sólida, tales como esferas (por ejemplo, una esfera magnética) o el uso de la clasificación celular activada por fluorescencia ("fluorescence-activated cell sorting", FACS).

- 5 En ciertos aspectos, un método de las realizaciones comprende (a) obtener una población de células pluripotentes; (b) cultivar la población de células en un medio que comprende: un inhibidor de BMP; un inhibidor de TGF $\beta$ ; un activador de la transducción de señales de Sonic hedgehog (SHH); y un activador de la transducción de señales de Wnt; (c) transferir la población celular a un cultivo en suspensión en un medio que comprende un inhibidor de BMP; un activador de la transducción de señales de SHH; y un activador de la transducción de señales de Wnt, formando así agregados celulares; (d) disociar los agregados celulares y sembrar las células disociadas en un cultivo de matriz; 10 (e) diferenciar aún más la población celular en un medio de maduración que comprende factores de maduración neuronal para generar una población celular que incluye neuronas del mesencéfalo; y (f) purificar las células utilizando un marcador de linaje panneural para proporcionar una población Enriquecida de neuronas DA del mesencéfalo.

En otras realizaciones, se proporciona un método para proporcionar una población Enriquecida de neuronas DA del mesencéfalo que comprende obtener una población celular, que incluye neuronas del mesencéfalo, y purificar células de la población celular utilizando un marcador expresado a partir de un promotor panneural, para proporcionar una población Enriquecida de neuronas DA del mesencéfalo. En algunos aspectos, las células comprenden un casete de expresión que comprende un gen marcador bajo el control de un promotor panneural (por ejemplo, MAP2); y la purificación de las células comprende la selección de células que expresan el gen marcador bajo el control del promotor panneural, proporcionando así una población Enriquecida de neuronas DA del mesencéfalo.

- 20 En otra realización, se proporciona un método para proporcionar una población Enriquecida de neuronas DA del mesencéfalo que comprende: obtener una población de células pluripotentes; diferenciar las células en una población de células de linaje neural en un medio que comprende un inhibidor de MEK (por ejemplo, PD0325901) y, opcionalmente, que no contiene FGF8b añadido exógenamente; y diferenciar aún más las células de la población de células de linaje neural para proporcionar una población Enriquecida de neuronas DA del mesencéfalo. Los ejemplos 25 no limitantes de inhibidores de MEK que podrían utilizarse según las realizaciones incluyen PD0325901, trametinib (GSK1120212), selumetinib (AZD6244), pimasertib (AS-703026), MEK162, cobimetinib, PD184352, BIX 02189, AZD8330 y PD98059. Por ejemplo, el método puede comprender el cultivo de las células en presencia de entre aproximadamente 0,1 y 10  $\mu$ M (por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 y 5; entre 0,5 y 3 o entre 0,5 y 1,5  $\mu$ M) del inhibidor de MEK, tal como PD0325901. Así, en ciertos aspectos, la diferenciación de las células comprende cultivar 30 una población de células pluripotentes en un medio que comprende un inhibidor de BMP; un inhibidor de TGF $\beta$ ; un activador de la transducción de señales de Sonic hedgehog (SHH); un activador de la transducción de señales de Wnt, un inhibidor de MEK o una combinación de los anteriores, en la que el medio no contiene FGF8b añadido exógenamente. En otros aspectos, un método de las realizaciones no comprende la purificación de células utilizando 35 un marcador específico de DA. En algunos aspectos, las células pluripotentes comprenden un primer casete de expresión que comprende un primer gen marcador bajo el control del promotor panneural detallado anteriormente.

Así, en algunos aspectos, un método de las realizaciones comprende (a) obtener una población de células pluripotentes; (b) cultivar la población de células en un medio que comprende: un inhibidor de BMP, un inhibidor de TGF $\beta$ ; un activador de la transducción de señales de Sonic hedgehog (SHH); un activador de la transducción de señales de Wnt (y opcionalmente que no contenga FGF8b añadido exógenamente); (c) transferir la población celular a un cultivo en suspensión en un medio que comprende un inhibidor de BMP; un activador de la transducción de señales de SHH; un activador de la transducción de señales de Wnt; un inhibidor de MEK; y, opcionalmente, que no contenga FGF8b añadido exógenamente, formando así agregados celulares; (d) disociar los agregados celulares y sembrar las células disociadas en un cultivo de matriz; y (e) diferenciar aún más la población celular para generar una población Enriquecida de neuronas DA del mesencéfalo.

- 45 En aspectos preferidos, las células pluripotentes para su uso según las realizaciones son células de mamífero, tales como células de primate o humanas. Por ejemplo, las células pluripotentes pueden proceder de un paciente que padezca, esté en riesgo de padecer o presente síntomas de la enfermedad de Parkinson (EP). En aspectos especialmente preferidos, las células son células madre pluripotentes inducidas (iPS), tales como células iPS obtenidas de células recogidas de un paciente que va a ser tratado con neuronas DA o de un banco de células iPS.

50 En ciertos aspectos, la obtención de la población de células neuronales DA del mesencéfalo comprende la obtención de una población de células pluripotentes, comprendiendo dichas células un primer casete de expresión que comprende un primer gen marcador bajo el control del promotor panneural; y la diferenciación de las células en una población de células que incluyen neuronas DA del mesencéfalo. En algunos aspectos, las células pueden comprender además un segundo casete de expresión. Por ejemplo, el segundo casete de expresión puede comprender un gen marcador, un factor de reprogramación o un gen que activa la diferenciación. En algunos aspectos, un segundo casete de expresión comprende un segundo gen marcador, tal como un gen marcador bajo el control del promotor PGK. El segundo casete de expresión puede estar integrado en el genoma de las células o puede ser extracromosómico (por ejemplo, episómico). En otro aspecto, la obtención de una población de células pluripotentes puede comprender la selección de una población de células pluripotentes que expresan el segundo gen marcador, tal como un gen bajo el control de un promotor PGK. En otros aspectos, un segundo gen marcador puede ser un marcador de selección de

fármaco y la selección de una población de células pluripotentes puede comprender el cultivo de las células en presencia del fármaco.

En algunos aspectos, un método de las realizaciones puede llevarse a cabo durante un período de aproximadamente 20 a 200 días (por ejemplo, entre aproximadamente 30 y 150, entre 30 y 120 o entre 30 y 100 días, o menos de 5 aproximadamente 90 días). En otro aspecto, al menos el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las células de la población enriquecida de neuronas DA del mesencéfalo son positivas para un marcador de neuronas del mesencéfalo o neuronas DA del mesencéfalo. En otros aspectos, una población enriquecida de neuronas DA del mesencéfalo producida por un método de las realizaciones comprende al menos  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  o  $1 \times 10^6$  células neuronales DA del mesencéfalo. En algunos aspectos, las neuronas producidas por los métodos de las realizaciones se clasifican para al menos un primer marcador de neuronas, neuronas del mesencéfalo o neuronas DA del mesencéfalo.

En otro aspecto, un método de las realizaciones puede comprender (a) obtener una población de células pluripotentes (por ejemplo, células que comprenden un casete de expresión que comprende un gen marcador bajo el control del promotor panneural); (b) cultivar la población de células adherentes en un medio que comprende: un inhibidor de BMP; un inhibidor de TGF $\beta$ ; un activador de la transducción de señales de Sonic hedgehog (SHH); un activador de la transducción de señales de Wnt; y, opcionalmente, un inhibidor de MEK; (c) transferir la población de células adherentes a un cultivo en suspensión en un medio (por ejemplo, en un medio sin retinol ni ácido retinoico) que comprende un inhibidor de BMP; un activador de la transducción de señales de SHH; un inhibidor de miosina II (por ejemplo, blebistatina); y un activador de la transducción de señales de Wnt, formando así agregados celulares; (d) disociar los agregados celulares y sembrar las células disociadas en un cultivo de matriz; (e) madurar las células en el cultivo de matriz en un medio de maduración que comprende factores de maduración neuronal; y, opcionalmente, (f) purificar las células de la población celular utilizando un marcador de linaje panneural, proporcionando así una población enriquecida de neuronas DA del mesencéfalo.

Ciertos aspectos de las realizaciones se refieren a la diferenciación de células pluripotentes en una población de células neuronales que comprende neuronas DA del mesencéfalo, en la que la diferenciación se realiza en un medio que comprende al menos un primer inhibidor de la transducción de señales de BMP. Los ejemplos no limitantes de inhibidores de la transducción de señales de BMP incluyen dorsomorfina, BMP dominante-negativo, receptor BMP truncado, receptores BMP solubles, quimeras de receptor de BMP-Fc, nogina, LDN-193189, folistatina, cordina, gremlina, proteínas de la familia cerberus/DAN, ventropina, activina en dosis altas y amnionless. Por ejemplo, en ciertos aspectos, el inhibidor de BMP de las etapas (b) o (c) puede ser LDN-193189 o nogina. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en un medio que comprenda LDN-193189 de aproximadamente 1 a 1 000 nM (por ejemplo, LDN-193189 entre 10 y 500, entre 50 y 500, entre 50 y 300 o aproximadamente 200 nM). Tal como se utiliza en el presente documento, un inhibidor de la transducción de señales de BMP puede denominarse simplemente "inhibidor de BMP".

Otros aspectos de las realizaciones se refieren a la diferenciación de células pluripotentes en una población de células neuronales que comprende neuronas DA del mesencéfalo, en la que la diferenciación se realiza en un medio que comprende al menos un primer inhibidor de la transducción de señales de TGF $\beta$ . Los ejemplos no limitantes de inhibidores de la transducción de señales de TGF $\beta$  incluyen A-83-01, GW6604, IN-1130, Ki26894, LY2157299, LY364947 (HTS-466284), LY550410, L Y5 73636, LY580276, NPC-30345, SB-431542, SB-505124, SD-093, Smil6, 30 SM305, SX-007, Antp-Sm2A y LY2109761. Por ejemplo, el inhibidor de TGF $\beta$  de la etapa (b) puede ser SB431542. En algunos aspectos, las células se cultivan en un medio que comprende SB431542 de aproximadamente 0,1 a 100  $\mu$ M de (por ejemplo, SB431542 entre aproximadamente 1 y 100, entre 1 y 50, entre 5 y 20 o aproximadamente 10  $\mu$ M). Tal como se utiliza en el presente documento, un inhibidor de la transducción de señales de TGF $\beta$ , incluido un inhibidor del receptor de TGF $\beta$ , puede denominarse simplemente "inhibidor de TGF $\beta$ ".

Otros aspectos de las realizaciones se refieren a la diferenciación de células pluripotentes en una población de células neuronales que comprende neuronas DA del mesencéfalo, en la que la diferenciación se realiza en un medio que comprende al menos un primer activador de la transducción de señales de SHH. Por ejemplo, el activador de la transducción de señales de SHH puede ser un polipéptido SHH recombinante (o una porción del mismo) o un activador de molécula pequeña. En ciertos aspectos, el activador de SHH de las etapas (b) o (c) puede ser Shh C25II, purmorphamina o un análogo de purmorphamina (por ejemplo, un agonista de Smoothened, tal como 3-cloro-N-[(1r,4r)-4-(metilamino)ciclohexil]-N-[3-(piridin-4-il)bencilo]benzo[b]tiofen-2-carboxamida). Así, en ciertos aspectos, un medio de cultivo para su uso según las realizaciones comprende purmorphamina de aproximadamente 0,1 a 50  $\mu$ M (por ejemplo, purmorphamina entre aproximadamente 0,1 y 20, entre 0,5 y 10, entre 0,5 y 5 o aproximadamente 2  $\mu$ M). En otros aspectos, un medio de cultivo comprende Shh C25II aproximadamente de 1 a 1 000 ng/ml (por ejemplo, Shh C25II entre aproximadamente 10 y 1 000, entre 10 y 500, entre 50 y 500 o aproximadamente 100 ng/ml). En otros aspectos, el activador de la transducción de señales de SHH de las etapas (b) o (c) puede ser Shh C25II y purmorphamina. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en un medio que comprende purmorphamina de aproximadamente 0,1 a 50  $\mu$ M y Shh C25II de aproximadamente 1 a 1 000 ng/ml.

Otros aspectos de las realizaciones se refieren a la diferenciación de células pluripotentes en una población de células neuronales que comprende neuronas DA del mesencéfalo, en la que la diferenciación se realiza en un medio que comprende al menos un primer activador de la transducción de señales de Wnt. Por ejemplo, el activador de la

transducción de señales de WNT puede ser un inhibidor de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). Los ejemplos no limitantes de inhibidores de GSK3 incluyen NP031112, TWS119, SB216763, CHIR-98014, AZD2858, AZD1080, SB415286, LY2090314 y CHIR99021. En ciertos aspectos, el activador de la transducción de señales de Wnt de las etapas (b) o (c) puede ser CHIR99021. Así, en algunos aspectos, un medio de cultivo para su uso según las realizaciones comprende CHIR99021 entre aproximadamente 0,1 y 10  $\mu\text{M}$  (por ejemplo, CHIR99021 entre aproximadamente 0,1 y 5, entre 0,5 y 5, entre 0,5 y 3 o aproximadamente 1,25  $\mu\text{M}$ ).

Así, en ciertos aspectos, la etapa (b) puede comprender el cultivo de las células durante 1 a 6 días en un sistema de cultivo adherente con un medio DMEM/F12 que comprende suplemento B27, LDN-193189 de 1 a 1 000 nM, SB431542 de 0,1 a 100  $\mu\text{M}$ , purmorfamina de 0,1 a 50  $\mu\text{M}$ , Shh C25II de 1 a 1 000 ng/ml y CHIR99021 de 0,1 a 10  $\mu\text{M}$ . En un aspecto, los medios pueden comprender suplemento B27, LDN-193189 200 nM, SB431542 10  $\mu\text{M}$ , purmorfamina 2  $\mu\text{M}$ , Shh C25II 100 ng/ml y CHIR99021 1,25  $\mu\text{M}$ . En algunos aspectos, la etapa (b) puede comprender la adición de un inhibidor de MEK a los medios después de 1 a 2 días del cultivo de la etapa (b). En ciertos aspectos, el inhibidor de MEK puede ser PD0325901 (por ejemplo, PD0325901 aproximadamente 1  $\mu\text{M}$ ). En algunos aspectos, la etapa (b) puede comprender el cultivo de las células en un medio carente de retinol o ácido retinoico añadido exógenamente después de 1 a 2 días del cultivo de la etapa (b). En algunos aspectos, dicho medio no comprende FGF8 añadido exógenamente.

En otros aspectos, la etapa (c) puede comprender la disociación de las células en células individuales antes de transferir las células al cultivo en suspensión. Por ejemplo, la etapa (c) puede comprender el cultivo de las células durante 5 a 20 días en un sistema de cultivo en suspensión con un medio que comprende DMEM/F12 con suplemento B27, LDN-193189 de 1 a 1 000 nM y CHIR99021 de 0,1 a 10  $\mu\text{M}$ , careciendo el medio de retinol o ácido retinoico añadidos exógenamente. En un aspecto, el medio puede comprender suplemento B27, LDN-193189 aproximadamente de 50 a 500 nM, y CHIR99021 aproximadamente de 0,5 a 3  $\mu\text{M}$ . En otro aspecto, la etapa (c) puede comprender el cultivo de las células en un medio que comprende blebistatina de 1 a 100  $\mu\text{M}$  (por ejemplo, blebistatina de 1 a 50  $\mu\text{M}$  o blebistatina aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ ) durante una parte de los 5 a 20 días de cultivo en suspensión. En otro aspecto, la etapa (c) puede comprender el cultivo de las células en un medio que comprende FGF (por ejemplo, FGF8b) durante una parte de los 5 a 20 días de cultivo en suspensión. En otros aspectos, la etapa (c) puede comprender el cultivo de las células en un medio que comprende purmorfamina de 0,1 a 10  $\mu\text{M}$  y Shh C25II de 10 a 1 000 ng/ml durante una parte de los 5 a 20 días de cultivo en suspensión. En algunos aspectos, la purmorfamina puede utilizarse a una concentración de aproximadamente 2  $\mu\text{M}$  y la Shh C25II puede utilizarse a una concentración de aproximadamente 100 ng/ml. En otros aspectos, dicho medio no comprende FGF8 añadido exógenamente.

En otros aspectos, la disociación de la etapa (d) puede comprender la disociación de los agregados celulares en células individuales. En algunos aspectos, el cultivo de matriz de la etapa (d) puede comprender proteínas de matriz extracelular, tales como laminina, entactina, colágeno o una mezcla de las mismas (por ejemplo, Matrigel®). En otros aspectos, el cultivo de matriz de la etapa (d) puede comprender componentes de matriz de laminina, poli-lisina y/o poli-L-ornitina.

En otros aspectos más, la etapa (e) puede comprender madurar las células durante 2 a 30 días en un medio de maduración que comprende medio Neurobasal que comprende suplemento B27, L-glutamina, BDNF de 1 a 50 ng/ml (por ejemplo, BDNF de 5 a 50, de 10 a 30 o aproximadamente 20 ng/ml), GDNF de 1 a 50 ng/ml (por ejemplo, GDNF de 5 a 50, de 10 a 30 o aproximadamente 20 ng/ml), TGF $\beta$  de 0,1 a 10 ng/ml (por ejemplo, TGF $\beta$  de 0,1 a 5, de 0,5 a 3 o aproximadamente 1 ng/ml), ácido ascórbico de 1 a 1 000  $\mu\text{M}$  (por ejemplo, ácido ascórbico de 10 a 1 000, de 50 a 500 o aproximadamente 200  $\mu\text{M}$ ), bibutiril AMPc de 10 a 2 000  $\mu\text{M}$  (por ejemplo, bibutiril AMPc de 10 a 1 000, de 100 a 1 000 o aproximadamente 500  $\mu\text{M}$ ) y DAPT de 0,1 a 20  $\mu\text{M}$  (por ejemplo, DAPT de 0,1 a 10, de 1 a 10 o aproximadamente 5  $\mu\text{M}$ ). En algunos aspectos, el medio carece de retinol o ácido retinoico añadido exógenamente. Así, en un aspecto, el medio Neurobasal puede comprender suplemento B27, L-glutamina, BDNF 20 ng/ml, GDNF 20 ng/ml, TGF $\beta$  1 ng/ml, ácido ascórbico 200  $\mu\text{M}$ , bibutiril AMPc 500  $\mu\text{M}$  y DAPT 5  $\mu\text{M}$ . En algunos aspectos, la etapa (e) puede comprender madurar las células en un medio de maduración que comprende blebistatina de 1 a 50  $\mu\text{M}$ , tal como blebistatina aproximadamente 2,5  $\mu\text{M}$ , durante una parte de los 2 a 30 días de cultivo.

Ciertos aspectos de las realizaciones se refieren a agregados celulares formados durante el cultivo de células madre pluripotentes o la progenie de las mismas. En algunos aspectos, los agregados celulares pueden tener aproximadamente, al menos o como máximo 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500  $\mu\text{m}$  de diámetro. El diámetro puede ser un diámetro medio, mediano o promedio. En otro aspecto, al menos aproximadamente el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 80 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % (o cualquier intervalo derivable de los mismos) de los agregados pueden comprender al menos o aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 1000 células, o cualquier intervalo que pueda obtenerse entre estas cifras. En ciertos aspectos, una parte sustancial (por ejemplo, al menos aproximadamente el 50 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 99 % o cualquier intervalo que pueda obtenerse entre estas cifras) de los agregados tienen un diámetro aproximadamente de entre 80 y 200  $\mu\text{m}$ . La uniformidad aproximada de un intervalo óptimo de tamaño de los agregados puede activar la diferenciación, ya que ésta se guía por señales espaciales y por la interacción entre diversos tipos de células, que pueden manipularse variando el tamaño de los agregados.

La diferenciación según las realizaciones comprende el cultivo de células madre pluripotentes y/o células progenitoras en un cultivo adherente o en suspensión. En una realización concreta, durante la diferenciación, la célula puede

transferirse a un cultivo adherente. Por ejemplo, el cultivo adherente puede tener un componente de matriz no celular. En una realización preferente, los métodos pueden utilizarse para la diferenciación de células madre pluripotentes para producir células neurales en un cultivo en suspensión. Las células madre pluripotentes o las células de su progenie pueden incubarse en un cultivo en suspensión. En otra realización, los agregados de células madre pluripotentes pueden formarse en un cultivo en suspensión. El cultivo en suspensión puede tener un volumen de aproximadamente, al menos o como máximo 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1 litro, 3 litros, 5 litros, 10 litros, 20 litros, 25 litros, 30, litros, 40 litros, 50 litros o cualquier intervalo que pueda obtenerse entre estas cifras, como en un biorreactor. Algunas realizaciones implican células que crecen en un espacio cuyo volumen es mayor que una placa de Petri o una placa de 96 pocillos convencionales; en consecuencia, algunas realizaciones excluyen el uso de tales recipientes.

Para optimizar el tamaño y el crecimiento de los agregados celulares, el cultivo en suspensión puede moverse a una velocidad de al menos o aproximadamente 5, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100 rpm o cualquier intervalo de velocidad que pueda obtenerse entre estas cifras. El movimiento puede comprender agitar, sacudir, balancear o girar, como ejemplos no limitantes.

La diferenciación según las realizaciones puede comenzar con o sin disociar las células madre pluripotentes. En algunos aspectos, la diferenciación puede comprender la disociación de las células en un cultivo fundamentalmente de células individuales. La disociación abarca el uso de cualquier método conocido en la actualidad o que se desarrolle posteriormente que sea capaz de producir un cultivo celular fundamentalmente único. En un ejemplo de realización, las células pueden disociarse mediante un tratamiento con proteasas o un tratamiento mecánico como el pipeteo. Por ejemplo, la proteasa puede ser colagenasa, tripsina-EDTA, dispasa o una combinación de las mismas. Como alternativa, puede utilizarse un agente quelante para disociar las células, tal como citrato de sodio, EGTA, EDTA o una combinación de los mismos. Un cultivo celular fundamentalmente de células individuales puede ser un cultivo celular en el que las células que se desea cultivar están disociadas entre sí, de forma que la mayoría de las células son células individuales o, como máximo, dos células que permanecen asociadas (dobletes). Preferentemente, más del 50 %, del 60 %, del 70 %, del 80 %, del 90 %, del 95 %, del 96 %, del 97 %, del 98 %, del 99 % o más de las células que se desea cultivar son células individuales o dobles.

En algunos aspectos, un gen marcador puede ser un marcador de selección de fármaco y la etapa (f) puede comprender la selección de células en un medio de maduración que comprende el fármaco. Como alternativa, el primer gen marcador puede ser un marcador seleccionable, y la etapa (f) puede comprender la selección de células (por ejemplo, mediante FACS) en función de la expresión del marcador seleccionable.

En otras realizaciones, se proporciona una población *in vitro* de células neuronales en la que al menos el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 % o el 95 % de las células son positivas para la expresión de la caja Forkhead (cabeza de tenedor) A2 (FoxA2; n.º de registro NCBI NP\_068556.2, incorporado en el presente documento por referencia) y/o el factor de transcripción LIM homeobox 1 (Lmx1) (por ejemplo, Lmx1-alfa (Lmx1a; n.º de registro NCBI NP\_001167540.1, incorporado en el presente documento por referencia). En algunos aspectos, al menos aproximadamente el 75 % o el 80 % de las células de la población son positivas tanto para la expresión de Lmx1 como de FoxA2. Por ejemplo, las células pueden ser positivas para FoxA2 y/o Lmx1 según se mide por hibridación *in situ*, inmunofluorescencia (IF) o citometría de flujo. En otros aspectos, al menos aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 % o el 90 % de las células de la población son positivas para la expresión de tirosina hidroxilasa (TH; n.º de registro NCBI NP\_954986.2, incorporado en el presente documento por referencia). En algunos aspectos, una población celular de las realizaciones comprende al menos aproximadamente 50 000, 100 000, 200 000, 300 000, 500 000, 1 millón o 1,5 millones de células (por ejemplo, entre aproximadamente 500 000 y 2 millones de células). En ciertos aspectos, una población celular de las realizaciones no comprende ninguna modificación genética (por ejemplo, un transgén integrado). En otros aspectos, una población celular comprende un transgén, como un marcador seleccionable o cribable bajo el control de un promotor panneural como se detalla en el presente documento. En otros aspectos, las poblaciones celulares de las realizaciones están comprendidas en un sistema de cultivo de tejidos o en un medio farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, se proporciona una población *in vitro* de células purificadas, comprendiendo la población células neuronales DA del mesencéfalo o células madre pluripotentes, comprendiendo dichas células un primer casete de expresión que comprende un primer gen marcador bajo el control de un promotor panneural. En algunos aspectos, las células de las realizaciones pueden ser células de mamífero, tales como células humanas. En ciertos aspectos, las células pueden proceder de un paciente que padezca, esté en riesgo de padecer o presenta síntomas de la enfermedad de Parkinson. En algunos aspectos, una población de células purificadas puede comprender células neuronales DA del mesencéfalo, en las que al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o más de las células son positivas para un marcador de células DA del mesencéfalo.

En otra realización, se proporciona una población de células que comprende neuronas del mesencéfalo, neuronas DA, neuronas DA del mesencéfalo o una mezcla de las mismas. Por ejemplo, una población de las realizaciones puede estar compuesta de al menos aproximadamente el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 % o el 90 % de neuronas del mesencéfalo y al menos aproximadamente el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 % o el 90 % de neuronas DA (por ejemplo, al menos un 50 % de neuronas del mesencéfalo y al menos un 50 % de neuronas DA). En algunos aspectos, una población de células

- se compone de al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más neuronas DA del mesencéfalo (por ejemplo, aproximadamente del 90 % al 98 % o del 95 % al 99 % de neuronas DA del mesencéfalo). En otros aspectos, se proporciona una población de células que comprende neuronas DA del mesencéfalo, y la población está compuesta de al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más neuronas DA del mesencéfalo (por ejemplo, aproximadamente del 90 % al 98 % o del 95 % al 99 % de neuronas DA del mesencéfalo). En algunos aspectos, la población comprende células de neuronas DA del mesencéfalo que comprenden un primer casete de expresión que comprende un primer gen marcador bajo el control de un promotor panneural (por ejemplo, el promotor MAP2).
- Se divulga además una población de células en una solución de congelación estable que comprende neuronas de mesencéfalo viables, neuronas DA viables, neuronas DA de mesencéfalo viables o una mezcla de las mismas. En algunos aspectos, una población de células en una solución de congelación estable se compone de al menos un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 % o un 95 % de células que son positivas para la expresión de FoxA2 y/o Lmx1. En otros aspectos, una población de las realizaciones puede estar compuesta de al menos aproximadamente 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 % o un 90 % de neuronas del mesencéfalo viables y al menos aproximadamente un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 % o un 90 % de neuronas DA viables (por ejemplo, al menos un 50 % de neuronas del mesencéfalo viables y al menos un 50 % de neuronas DA viables) después de un ciclo de congelación y descongelación. En otros aspectos, se proporciona una población de células que comprende neuronas DA del mesencéfalo en una solución de congelación estable, y la población está compuesta de al menos un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % de neuronas DA del mesencéfalo viables después de un ciclo de congelación y descongelación. En algunos aspectos, la población se compone de al menos un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % de neuronas DA del mesencéfalo viables después de dos, tres o cuatro ciclos de congelación y descongelación. En otros aspectos, la población está compuesta en un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de neuronas DA del mesencéfalo (por ejemplo, aproximadamente del 90 % al 98 % o del 95 % al 99 % de neuronas DA del mesencéfalo). En algunos aspectos, la población comprende células de neuronas DA del mesencéfalo que comprenden un primer casete de expresión que comprende un primer gen marcador bajo el control de un promotor panneural (por ejemplo, el promotor MAP2). Una solución de congelación estable de las realizaciones, en algunos aspectos, comprende uno o más de un medio de cultivo celular, una proteasa o cóctel de proteasas, estabilizante (por ejemplo, DMSO o glicerol), factor de crecimiento, tampones o componentes de la matriz extracelular. En otros aspectos, se proporciona un vial sellado que comprende una población de neuronas DA del mesencéfalo (por ejemplo, una población congelada de células) en una solución de congelación estable en el que la población se compone de al menos un 90 % de neuronas DA del mesencéfalo viables después de un ciclo de congelación y descongelación. En algunos aspectos, un vial de las realizaciones comprende al menos  $1\times10^2$ ,  $1\times10^3$ ,  $1\times10^4$ ,  $1\times10^5$  o  $1\times10^6$  células de neuronas DA del mesencéfalo viables.
- Así, se divulga además un recipiente etiquetado para su uso como modalidad terapéutica para el tratamiento de enfermedades humanas, comprendiendo dicho contenedor una dosis de neuronas dopaminérgicas humanas en el recipiente, comprendiendo las neuronas dopaminérgicas humanas más del 70 %, del 75 %, del 80 %, del 85 % o del 90 % de neuronas que son positivas para la expresión de FoxA2 y Lmx1 (por ejemplo, Lmx1a), y el contenedor se suministra con una etiqueta que describe el uso previsto de las neuronas en el tratamiento de enfermedades humanas.
- En algunos aspectos, un recipiente de las realizaciones comprende al menos  $1\times10^2$ ,  $1\times10^3$ ,  $1\times10^4$ ,  $1\times10^5$ ,  $1\times10^6$  o  $1\times10^7$  (por ejemplo, entre aproximadamente  $1\times10^4$  y  $1\times10^7$ ) neuronas viables que son positivas para la expresión de FoxA2 y Lmx1 (por ejemplo, Lmx1a). En otros aspectos, las células se encuentran en una solución de congelación estable, de forma que al menos el 80 %, el 85 % o el 90 % de las neuronas son viables después de un ciclo de congelación y descongelación.
- Se divulga además un método para producir una población congelada de células neuronales DA del mesencéfalo que comprende (a) obtener un cultivo de células neuronales DA del mesencéfalo; (b) separar las células (por ejemplo, en células fundamentalmente individuales); (c) resuspender las células en una solución de congelación estable; y (d) congelar la población de células neuronales DA. En algunos aspectos, la separación de las células comprende la separación mecánica y/o el tratamiento de las células con proteinasa o un cóctel de proteinasas (por ejemplo, Accutase®). Por ejemplo, el tratamiento con proteinasa puede durar 10, 20, 30, 40, 50 o más minutos. En otros aspectos, resuspender las células en una solución de congelación estable comprende resuspender las células en una solución que comprende uno o más de los siguientes: un medio de cultivo celular, una proteasa o cóctel de proteasas, estabilizante (por ejemplo, DMSO o glicerol), factor de crecimiento, tampones o componentes de la matriz extracelular. En otros aspectos, la congelación de las células comprende la congelación de las células en un congelador de velocidad controlada.
- En otro aspecto, se proporciona una población de células purificadas que comprende células madre pluripotentes que comprenden un gen marcador bajo el control de un promotor panneural (por ejemplo, el promotor MAP2). En un aspecto, las células madre pluripotentes pueden ser células iPS.
- En otros aspectos, una población celular de las realizaciones comprende un casete de expresión que comprende un primer gen marcador bajo el control de un promotor panneural en la que el gen marcador puede ser un marcador seleccionable. En algunos aspectos, el primer casete de expresión puede integrarse en el genoma de las células. En

un aspecto, el primer casete de expresión puede integrarse en el sitio AAVS1 del genoma. En algunos aspectos, una población de células según las realizaciones puede comprender al menos  $1\times10^2$ ,  $1\times10^3$ ,  $1\times10^4$ ,  $1\times10^5$  o  $1\times10^6$  células.

En otra realización, se proporciona un método de tratamiento que comprende (a) proporcionar una población de neuronas (por ejemplo, neuronas DA del mesencéfalo) de las realizaciones; y (b) trasplantar células de dicha población al sujeto en condiciones que permitan el injerto *in vivo* (es decir, para proporcionar la función neuronal DA). Por ejemplo, en algunos aspectos, la población de neuronas comprende al menos un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 % o un 95 % de células que son positivas para la expresión de FoxA2 y/o Lmx1 (por ejemplo, Lmx1a). En algunos aspectos, el sujeto puede mostrar reducción de al menos uno de dichos síntomas neurológicos. Por ejemplo, el tratamiento puede ser un método para tratar o reducir los síntomas de la enfermedad de Parkinson.

10 En otra realización, se proporciona un método de selección de un fármaco candidato que comprende (a) proporcionar una población de neuronas (por ejemplo, neuronas DA del mesencéfalo) según las realizaciones; (b) poner en contacto la población de neuronas con el fármaco candidato; y (c) determinar el efecto del fármaco candidato en la población celular. Por ejemplo, en algunos aspectos, la población de neuronas comprende al menos un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 % o un 95 % de células que son positivas para la expresión de FoxA2 y/o Lmx1, tal como Lmx1a (por ejemplo, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 % o un 95 % de células que son positivas para la expresión de FoxA2 y Lmx1). En ciertos aspectos, la determinación del efecto del fármaco candidato puede comprender la evaluación de la viabilidad de las células de la población. Así, en algunos aspectos, un método puede comprender la selección de un banco de fármacos candidatos.

20 Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, "un" o "una" puede significar uno o más. Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, cuando se utiliza junto con la palabra "comprendiendo", las palabras "un" o "una" pueden significar uno o más de uno. Tal como se utiliza en el presente documento, en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, "otro" puede significar al menos un segundo o más.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que se emplea para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos del estudio.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, "fundamentalmente exento", con respecto a un componente especificado, se utiliza en el presente documento para indicar que ninguno de los componentes especificados ha sido formulado a propósito en una composición y/o está presente sólo como contaminante o en cantidades traza. La cantidad total del componente especificado resultante de cualquier contaminación no intencionada de una composición es, por tanto, muy inferior al 0,05 %, preferentemente inferior al 0,01 %. Lo más preferido es una composición en la que no pueda detectarse ninguna cantidad del componente especificado con los métodos analíticos convencionales.

35 Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican ciertas realizaciones de la invención, se ofrecen sólo a modo de ilustración, ya que varios cambios y modificaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

#### Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede comprenderse mejor remitiéndose a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

40 Figura 1: Perfil cuantitativo de expresión génica de las células antes de la diferenciación (célula iPS humana), en el día 6 del proceso de diferenciación de neuronas DA del mesencéfalo (diferenciación de neuronas dopaminérgicas en el día 6), y tras la finalización de la diferenciación (día 42). Tras aislar el ARN, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real utilizando ensayos de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems), y los resultados se expresaron como expresión relativa respecto al control de GAPDH. Los valores  $<10^4$  se consideran el fondo (recuadro sombreado). La neuronalización se detectó el día 6, como lo demuestra la regulación al alza de los marcadores de subtipo neuronal vGAT, Nkx6.1, vGLUT1, NGN2 y los marcadores del mesencéfalo FoxA2, Lmx1a y OTX2. En el día 42, otros genes expresados en las neuronas DA del mesencéfalo se habían regulado al alza (EN1, NURR1, TH, DRD2, GIRK2, VMAT2, DRD2, CALB1, TUBB3, SYN1, SYP, vGLUT2).

45 50 Figura 2: Patrón en el mesencéfalo de progenitores de neuronas DA. La coexpresión de FoxA2 y Lmx1a es un marcador específico de los progenitores de neuronas DA del mesencéfalo procedentes de la placa ventral. En el día 15 del proceso de diferenciación, la inmunocitoquímica (ICC) cuantitativa que utiliza imágenes de alto contenido demostró que >80 % (un 81,7 %) de las células expresan tanto FoxA2 como Lmx1. La citometría de flujo confirma este resultado, ya que sólo el 16 % de las células son FoxA2<sup>+</sup>/Lmx1<sup>+</sup> y el 3 % de las células son FoxA2<sup>-</sup>/Lmx1<sup>-</sup>.

55 Figura 3: Selección genética panneuronal para la purificación de neuronas DA del mesencéfalo. La figura muestra los resultados de la citometría de flujo de células iPS diferenciadas en neuronas. La línea celular iPS

MAP2 Neo n.º 2 (01279.107.00402) se generó mediante recombinación homóloga mediada por nucleasas de dedos de zinc en el sitio de puerto seguro de AAVS1. La construcción incluye el promotor Map2 que dirige la expresión de un gen de resistencia a la neomicina. El protocolo de diferenciación de neuronas DA del mesencéfalo realizado sin selección con fármacos dio lugar a una población de células que es un 39 % de neuronas ( $\text{Map2}^+/\text{nestina}^-$ ) en el día 38. Las células no neuronales ( $\text{Map2}^+/\text{nestina}^+$ ) siguieron proliferando y no expresan FoxA2 ni tirosina hidroxilasa (TH). Por el contrario, la selección genética de fármacos con G418 dio lugar a una población altamente purificada de neuronas (un 95 % de  $\text{Map2}^+/\text{nestina}^-$ ). La caracterización con marcadores demostró que la gran mayoría de estas células tienen el fenotipo de neuronas DA del mesencéfalo (véanse la figura 4-figura 6).

Figura 4: Perfil cuantitativo de expresión génica de las células después de la descongelación. Las células se criopreservaron en el día 38 del protocolo de diferenciación, se descongelaron y se colocaron en placas de PLO/laminina durante el tiempo indicado antes del aislamiento del ARN. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real se realizó mediante ensayos de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems) y los resultados se expresaron como expresión relativa respecto al control de GAPDH. Los valores  $<10^{-4}$  se consideran el fondo (recuadro sombreado claro). Las células expresaban genes que indicaban una regionalización del mesencéfalo y marcadores de neuronas, neuronas dopamínergicas y neuronas DA del mesencéfalo procedentes de la placa ventral. Los marcadores de regionalización del prosencéfalo (FoxG1) u otros subtipos neuronales (DBH, CHAT, OLIG2) se expresaron poco o de forma negativa. La mayoría de los genes mostraron niveles de expresión muy similares a través del tiempo de descongelación, hasta 42 días después de la descongelación. El perfil de expresión coincide con el del ARN extraído de la sustancia negra (SN) del mesencéfalo humano.

Figura 5: Pureza de las neuronas DA maduras del mesencéfalo. La expresión de FoxA2 se confirmó mediante citometría de flujo, con un 96 % de células FoxA2<sup>+</sup>. Las células coexpresan el marcador característico de neuronas DA, la tirosina hidroxilasa (TH) (un 88 % en comparación con la tinción de control del isótopo). Además, el 97 % de las células se tiñen con el marcador panneuronal Map2.

Figura 6: Pureza de las neuronas DA maduras del mesencéfalo. El fenotipo de las neuronas DA del mesencéfalo se mantuvo incluso después de un cultivo prolongado después de la descongelación. En el día 14 después de la descongelación, los niveles de expresión de TH aumentaron en comparación con el día 3 después de la descongelación. Se mantiene la pureza neuronal (un 98 %), sin crecimiento de células nestina<sup>+</sup>.

Figura 7: La pureza de las neuronas DA maduras del mesencéfalo generadas utilizando la variación del protocolo "Sin FGF8" del ejemplo 2 se evaluó mediante citometría de flujo. Esta variación del protocolo se desarrolló para obtener neuronas DA del mesencéfalo de alta pureza sin necesidad de selección con fármacos (es decir, sin modificación genética de la línea de células iPS) y la criopreservación poco después de que las células dejan de dividirse, cambios que hacen que las células sean más susceptibles de implantación y de uso clínico. Cuando las células se criopreservaron el día 26 sin selección con fármacos, eran un 99 % FoxA2<sup>+</sup>, un 40 % TH<sup>+</sup> y un 77 % Map2<sup>+</sup>. Sin embargo, en ese momento, Map2 y TH aún estaban en proceso de regulación al alza, y tras 7 días de cultivo después de la descongelación, la pureza neuronal final (Map2) alcanzó el 90 %, con un 93 % de las células que expresaban FoxA2 y un 55 % que expresaban TH. En comparación, en las células preparadas usando el mismo protocolo, pero con selección con fármacos (+G418), la pureza final a los 7 días después de la descongelación es del 96 % de FoxA2<sup>+</sup>, del 63 % de TH<sup>+</sup> y del 98 % de Map2<sup>+</sup>.

Figura 8: Expresión génica comparativa de las variaciones del protocolo de las neuronas DA del mesencéfalo. Se aisló el ARN de células diferenciadas como se describe en el ejemplo 1 (iCell DopaNeurons), o de células preparadas con el protocolo "Sin FGF8" descrito en el ejemplo 2, con selección del fármaco G418 y criopreservadas el día 33 (protocolo sin FGF8). A modo de comparación, también se aisló ARN de neuronas del prosencéfalo procedentes de células madre (iCell Neurons) y de la sustancia negra del mesencéfalo humano. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real se realizó mediante ensayos de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems) y los resultados se expresaron como expresión relativa respecto al control de GAPDH. Los valores  $<10^{-4}$  se consideran el fondo (recuadro sombreado). En la mayoría de los casos, el patrón de expresión génica de las células preparadas con el protocolo sin FGF8 es muy similar al del protocolo convencional con FGF8 (protocolos del ejemplo 1 frente al ejemplo 2). Una excepción notable es la expresión de Engrailed 1 (EN1), que se sabe que está regulada por el FGF8. Ambos perfiles de expresión coinciden con los del ARN extraído de la sustancia negra (SN) del mesencéfalo humano. El perfil de expresión de las neuronas del prosencéfalo procedentes de células madre es notablemente diferente, con una menor expresión de marcadores de neuronas DA del mesencéfalo, tales como FoxA2, Lmx1, Nurr1, TH, vMAT2, vGLUT2 y AACD, y una mayor expresión del marcador FoxG1 del prosencéfalo.

#### Descripción de realizaciones ilustrativas

##### I. La presente invención

Las poblaciones celulares diferenciadas de linaje específico son prometedoras en los tratamientos de reposición celular para pacientes con enfermedades que provocan la pérdida de una población celular definida. Estas células también son valiosas herramientas de investigación para el estudio de enfermedades y la identificación de nuevos productos terapéuticos. Por ejemplo, se ha explorado la producción de neuronas DA del mesencéfalo para el tratamiento y el estudio de la enfermedad de Parkinson. Studer *et al.* han desarrollado recientemente un protocolo que permite la diferenciación de auténticas células neuronales DA del mesencéfalo, capaces de injertarse de modo eficaz *in vivo* (publicación PCT n.º WO2013/067362 incorporada en el presente documento por referencia). Los métodos y las composiciones detallados en la presente solicitud amplían el protocolo de Studer *et al.* al proporcionar métodos con una eficacia de diferenciación significativamente mejorada y capaces de proporcionar poblaciones de células DA del mesencéfalo muy puras que han demostrado que pueden injertarse en ratas Sprague Dawley y primates no humanos. Asimismo, se proporcionan métodos para el aislamiento de composiciones de células DA del mesencéfalo de alta pureza. Por ejemplo, se ha demostrado que el uso de células que comprenden un marcador seleccionable o crible bajo el control de un promotor MAP2 permite una selección (o cribado) eficiente de las células neuronales DA del mesencéfalo. En concreto, las células pluripotentes pueden modificarse con el marcador, diferenciarse en células DA del mesencéfalo y, a continuación, seleccionarse en función del marcador para obtener una población purificada de células DA del mesencéfalo. Asimismo, se ha demostrado que el uso de un inhibidor de MEK durante la diferenciación de las células DA del mesencéfalo mejora la característica de mesencéfalo de una población celular. Así, empleando composiciones inhibidoras de MEK en el protocolo de diferenciación se pueden producir células DA del mesencéfalo de forma más eficiente y rápida.

## 20 II. Definiciones

"Pluripotencia" se refiere a una célula madre que tiene el potencial de diferenciarse en todas las células que constituyen uno o más tejidos u órganos, por ejemplo, cualquiera de las tres capas germinales: endodermo (revestimiento interior del estómago, tracto gastrointestinal, los pulmones), mesodermo (músculo, hueso, sangre, urogenital), o ectodermo (tejidos epidérmicos y sistema nervioso).

25 Las "células madre pluripotentes inducidas", normalmente abreviadas como células iPS o iPSC, se refieren a un tipo de célula madre pluripotente preparada artificialmente a partir de una célula no pluripotente, suele ser una célula somática adulta, o una célula diferenciada terminalmente, tal como un fibroblasto, una célula hematopoyética, un miocito, una neurona, una célula epidérmica o similares, mediante la introducción o el contacto con factores de reprogramación.

30 Las "células madre embrionarias" ("embryonic stem cells", (ES)) son células madre pluripotentes procedentes de embriones tempranos.

Un "cultivo adherente" se refiere a un cultivo en el que las células, o agregados de células, están adheridas a una superficie.

35 Un "cultivo en suspensión" se refiere a un cultivo en el que las células, o agregados de células, se multiplican mientras están suspendidas en un medio líquido.

40 "Fundamentalmente exento" de un componente añadido externamente se refiere a un medio que no tiene o que no tiene fundamentalmente nada del componente especificado procedente de una fuente distinta de las células del medio. "Fundamentalmente exento" de factores de crecimiento o inhibidores de la transducción de señales añadidos externamente, tales como TGF $\beta$ , bFGF, inhibidores de la transducción de señales de la superfamilia TGF $\beta$ , etc., puede significar una cantidad mínima o una cantidad indetectable del componente añadido externamente. Por ejemplo, un medio o un entorno fundamentalmente exento de TGF $\beta$  o bFGF puede contener menos de 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,01, 0,001 ng/ml o cualquier intervalo que pueda obtenerse entre estas cifras. Por ejemplo, un medio o un entorno fundamentalmente exento de inhibidores de la transducción de señales puede contener menos de 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001  $\mu$ M, o cualquier intervalo que pueda obtenerse entre estas cifras.

45 La "diferenciación" es un proceso por el cual una célula menos especializada forma una progenie de al menos un nuevo tipo celular más especializado.

La expresión "medio estimulador de agregados" se refiere a cualquier medio que potencie la formación de agregados de células sin ninguna restricción en cuanto al modo de acción.

50 El término "agregados", es decir, cuerpos embrioides, se refiere a agrupamientos homogéneos o heterogéneos de células que comprenden células diferenciadas, células parcialmente diferenciadas y/o células madre pluripotentes cultivadas en suspensión.

55 "Neuronas" o "células neuronales" o "tipos de células neuronales" o "linaje neuronal" puede incluir cualquier célula de linaje neuronal, y puede tomarse para referirse a células en cualquier estadio de la ontogenia neuronal sin ninguna restricción, a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, las neuronas pueden incluir tanto células precursoras de neuronas como neuronas maduras y tipos de células neuronales, tales como los astrocitos.

- Un "gen", "polinucleótido", "región codificante", "secuencia", "segmento" o "fragmento" que "codifica" una proteína concreta es una molécula de ácido nucleico que se transcribe y, opcionalmente, también se traduce en un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. La región codificante puede estar presente en forma de ADNc, ADN genómico o ARN. Cuando se presenta en forma de ADN, la molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria (es decir, la cadena sentido) o bicatenaria. Los límites de una región codificante vienen determinados por un codón de inicio en el extremo 5' (amino) y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Un gen puede incluir, entre otros, ADNc procedente de ARNm procariota o eucariota, secuencias de ADN genómico procedente de ADN procariota o eucariota y secuencias de ADN sintético. La secuencia de terminación de la transcripción suele situarse a 3' de la secuencia del gen.
- 5      10      15      20      25      30      35      40      45      50      55
- El término "transgén" se refiere a un gen, un ácido nucleico o un polinucleótido que se ha introducido en la célula u el organismo por medios artificiales o naturales, tales como un ácido nucleico exógeno. Un ácido nucleico exógeno puede proceder de un organismo o célula diferente, o puede ser una o más copias adicionales de un ácido nucleico que se encuentra de forma natural en el organismo o la célula. A modo de ejemplo no limitante, un ácido nucleico exógeno se encuentra en una posición cromosómica diferente a la de las células naturales o, en otras circunstancias, está flanqueado por una secuencia de ácido nucleico diferente a la que se encuentra en la naturaleza.
- El término "promotor" se utiliza en el presente documento en su sentido normal para referirse a una región de nucleótidos que comprende una secuencia reguladora de ADN, en la que la secuencia reguladora procede de un gen que es capaz de unirse a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una secuencia codificadora cadena abajo (dirección 3').
- 10      15      20      25      30      35      40      45      50      55
- III. Fuentes de células madre pluripotentes
- Las células madre pluripotentes pueden utilizarse en los presentes métodos de inducción neural de células madre pluripotentes. En la presente invención se han divulgado métodos y composiciones para mejorar la eficacia de la diferenciación neuronal mediante la optimización de componentes del medio y/o la selección de las neuronas DA del mesencéfalo deseadas que son el producto del protocolo de diferenciación.
- 20      25      30      35      40      45      50      55
- La expresión "célula madre pluripotente" se refiere a una célula capaz de dar lugar a células de las tres capas germinales, es decir, endodermo, mesodermo y ectodermo. Aunque, en teoría, una célula madre pluripotente puede diferenciarse en cualquier célula del cuerpo, la determinación experimental de la pluripotencia se basa normalmente en la diferenciación de una célula pluripotente en varios tipos celulares de cada capa germinal. En algunas realizaciones de la presente invención, una célula madre pluripotente es una célula madre embrionaria (ES) procedente de la masa celular interna de un blastocisto. En otras realizaciones, la célula madre pluripotente es una célula madre pluripotente inducida procedente de la reprogramación de células somáticas.
- A. Células madre embrionarias (antecedentes)
- Las células madre embrionarias (ES) son células pluripotentes procedentes de la masa celular interna de un blastocisto. Las células ES pueden aislarse extrayendo la capa externa de trofoectodermo de un embrión en desarrollo y cultivando las células de la masa interna sobre una capa alimentadora de células que no se encuentran en crecimiento. En condiciones adecuadas, se producen colonias de células ES en proliferación e indiferenciadas. Las colonias pueden extraerse, disociarse en células individuales y volverse a colocar en una nueva capa alimentadora. Las células que se han vuelto a cultivar pueden seguir proliferando, produciendo nuevas colonias de células ES indiferenciadas. A continuación, las nuevas colonias pueden extraerse, disociarse, volverse a cultivar y dejar que crezcan. Este proceso de "subcultivo" o "pases" de células madre embrionarias indiferenciadas puede repetirse varias veces para producir líneas celulares que contengan células ES indiferenciadas (patentes de EE. UU. n.º 5 843 780; 6 200 806; 7 029 913). Un "cultivo celular primario" es un cultivo de células obtenidas directamente de un tejido, tal como la masa celular interna de un blastocisto. Un "subcultivo" es cualquier cultivo que se obtiene a partir del cultivo celular primario.
- 30      35      40      45      50      55
- Los métodos para obtener células madre embrionarias de ratón son bien conocidos. En un método, un blastocisto de preimplantación de la raza 129 de ratón se trata con antisuero de ratón para retirar el trofoectodermo, y la masa celular interna se cultiva en una capa de células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón inactivados químicamente en un medio que contiene suero de ternero fetal. Las colonias de células madre embrionarias indiferenciadas que se desarrollan se subculturvan sobre capas alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón en presencia de suero de ternero fetal para producir poblaciones de células madre embrionarias. En algunos métodos, las células madre embrionarias de ratón pueden cultivarse en ausencia de una capa alimentadora añadiendo la citocina factor inhibidor de leucemia ("leukemia inhibitory factor", LIF) al medio de cultivo que contiene suero (Smith, 2000). En otros métodos, las células madre embrionarias de ratón pueden cultivarse en medio sin suero en presencia de proteína morfogenética ósea y LIF (Ying et al., 2003).
- 35      40      45      50      55
- Las células madre embrionarias humanas pueden obtenerse a partir de blastocistos utilizando métodos descritos previamente (Thomson et al., 1995; Thomson et al., 1998; Thomson y Marshall, 1998; Reubinoff et al., 2000) En un método, los blastocistos humanos en día 5 se exponen a antisuero de conejo anticélulas del bazo humano y, a continuación, se exponen a una dilución 1:5 de complemento de cobaya para lisar las células del trofoectodermo. Tras

extraer las células trofoectodérmicas lisadas de la masa celular interna intacta, se cultiva la masa celular interna sobre una capa alimentadora de fibroblastos embrionarios de ratón inactivados por rayos gamma y en presencia de suero bovino fetal. Después de 9 a 15 días, los grupos de células procedentes de la masa celular interna pueden disociarse químicamente (es decir, exponerse a tripsina) o mecánicamente y volverse a cultivar en medio fresco que contenga suero bovino fetal y una capa alimentadora de fibroblastos embrionarios de ratón. Tras una mayor proliferación, las colonias de morfología indiferenciada se seleccionan con una micropipeta, se disocian mecánicamente en grupos y se vuelven a cultivar en placa (véase la patente de EE. UU. n.º 6 833 269). La morfología de tipo ES se caracteriza por colonias compactas con una proporción núcleo/citoplasma aparentemente elevada y nucleolos destacados. Las células madre embrionarias resultantes pueden pasarse siguiendo el procedimiento normal mediante una breve tripsinización o mediante la selección de colonias individuales con micropipeta. En algunos métodos, las células madre embrionarias humanas pueden cultivarse sin suero mediante el cultivo de las células madre embrionarias sobre una capa alimentadora de fibroblastos en presencia del factor de crecimiento básico de fibroblastos (Amit *et al.*, 2000). En otros métodos, las células madre embrionarias humanas pueden cultivarse sin una capa de células alimentadoras mediante el cultivo de las células en una matriz proteica, tal como Matrigel™ o laminina en presencia de un medio "acondicionado" que contenga factor de crecimiento de fibroblastos básico (Xu *et al.*, 2001). El medio se acondiciona previamente mediante cocultivo con fibroblastos.

También se conocen métodos para el aislamiento de células madre embrionarias de mono rhesus y tití común (Thomson y Marshall, 1998; Thomson *et al.*, 1995; Thomson y Odorico, 2000).

Otra fuente de células ES son las líneas celulares ES establecidas. Se conocen diversas líneas celulares de ratón y líneas celulares ES humanas y se han definido las condiciones para su crecimiento y propagación. Por ejemplo, la línea celular CGR8 de ratón se estableció a partir de la masa celular interna de embriones de ratón de la raza 129, y los cultivos de células CGR8 pueden crecer en presencia de LIF sin capas alimentadoras. Como otro ejemplo, Thomson *et al.* crearon las líneas celulares ES humanas de referencia H1, H7, H9, H13 y H14. Además, se han desarrollado los subclones H9.1 y H9.2 de la línea H9. Se prevé que prácticamente cualquier línea de células madre o ES conocida en la técnica pueda utilizarse con la presente invención, tales como, por ejemplo, las descritas en Yu y Thomson, 2008.

La fuente de células ES para su uso en relación con la presente invención puede ser un blastocisto no humano, células procedentes del cultivo de la masa celular interna de un blastocisto no humano, o células obtenidas de cultivos de líneas celulares establecidas. Así, tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "células ES" puede referirse a células de la masa celular interna de un blastocisto no humano, células ES obtenidas a partir de cultivos de la masa interna de células de un blastocisto no humano y células ES obtenidas a partir de cultivos de líneas celulares ES.

#### B. Células madre pluripotentes inducidas

Las células madre pluripotentes inducidas (iPS) son células que tienen las características de las células ES, pero que se obtienen por reprogramación de células somáticas diferenciadas. Las células madre pluripotentes inducidas se han obtenido por diversos métodos. En un método, fibroblastos dérmicos humanos de adulto se transfecan con los factores de transcripción Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4 mediante transducción retroviral (Takahashi *et al.*, 2007). Las células transfecadas se siembran en placas sobre células alimentadoras SNL (una línea celular de fibroblastos de ratón que produce LIF) en medio suplementado con factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF). Despues de aproximadamente 25 días, aparecen en el cultivo colonias parecidas a las de las células madre embrionarias humanas. Se recogen las colonias similares a células ES y se expanden sobre células alimentadoras en presencia de bFGF.

Basándose en las características celulares, las células de las colonias similares a células ES son células madre pluripotentes inducidas. Las células madre pluripotentes inducidas son morfológicamente similares a las células madre embrionarias humanas y expresan diversos marcadores de células madre embrionarias humanas. Además, cuando se cultivan en condiciones que se sabe que dan lugar a la diferenciación de células madre embrionarias humanas, las células madre pluripotentes inducidas se diferencian en consecuencia. Por ejemplo, las células madre pluripotentes inducidas pueden diferenciarse en células con estructuras neuronales y marcadores neuronales. Se prevé que prácticamente cualquier célula iPS o línea celular puede ser utilizada con la presente invención, incluidas, por ejemplo, las descritas en Yu y Thomson, 2008.

En otro método, fibroblastos humanos fetales o de recién nacido se transfecan con cuatro genes, Oct4, Sox2, Nanog y Lin28, utilizando la transducción con lentivirus (Yu *et al.*, 2007). A los 12 a 20 días después la infección, se hacen visibles colonias con morfología de células madre embrionarias humanas. Las colonias se recogen y se expanden. Las células madre pluripotentes inducidas que componen las colonias son morfológicamente similares a las células madre embrionarias humanas, expresan diversos marcadores de células madre embrionarias humanas y forman teratomas con tejido neural, cartílago y epitelio intestinal tras su inyección en ratones.

También se conocen métodos para preparar células madre pluripotentes inducidas a partir de ratones (Takahashi y Yamanaka, 2006). La inducción de células iPS suele requerir la expresión o la exposición al menos a un miembro de la familia Sox y al menos a un miembro de la familia Oct. Se cree que Sox y Oct son fundamentales en la jerarquía reguladora transcripcional que especifica la identidad de las células madre embrionarias. Por ejemplo, Sox puede ser

Sox-1, Sox-2, Sox-3, Sox-15 o Sox-18; Oct puede ser Oct-4. Otros factores pueden aumentar la eficiencia de la reprogramación, tales como Nanog, Lin28, Klf4, o c-Myc; ciertos conjuntos específicos de factores de reprogramación pueden ser un conjunto que comprenda Sox-2, Oct-4, Nanog y, opcionalmente, Lin-28; o que comprenda Sox-2, Oct4, Klf y, opcionalmente, c-Myc.

- 5 Las células IPS, al igual que las células ES, tienen antígenos característicos que pueden ser identificados o confirmados por inmunohistoquímica o citometría de flujo, usando anticuerpos para SSEA-1, SSEA-3 y SSEA-4 (Developmental Studies Hybridoma Bank, National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda Md.), y TRA-1-60 y TRA-1-81 (Andrews *et al.*, 1987). La pluripotencia de las células madre embrionarias puede confirmarse inyectando aproximadamente  $0,5\text{--}10 \times 10^6$  células en los músculos de las patas traseras de ratones SCID macho de 8 a 12 semanas de edad. Se desarrollan teratomas que muestran al menos un tipo celular de cada una de las tres capas germinales.

10 En ciertos aspectos de la presente invención, las células iPS se preparan a partir de células somáticas reprogramadas utilizando factores de reprogramación que comprenden un miembro de la familia Oct y un miembro de la familia Sox, tales como Oct4 y Sox2, en combinación con Klf o Nanog como se describió anteriormente. La célula somática, en ciertos aspectos de la presente invención, puede ser cualquier célula somática que pueda inducirse a la pluripotencia, tal como un fibroblasto, un queratinoctocito, una célula hematopoyética, una célula mesenquimal, una célula hepática, una célula estomacal o un linfocito β. En cierto aspecto, las células T también pueden utilizarse como fuente de células somáticas para la reprogramación (véase la solicitud de EE. UU. n.º 61/184 546).

- 15 20 Los factores de reprogramación pueden expresarse a partir de casetes de expresión comprendidos en uno o más vectores, tales como un vector integrador, un vector viral de ARN cromosómico no integrador (véase la solicitud de EE. UU. n.º 13/054 022, incorporada en el presente documento por referencia) o un vector episómico, tal como un sistema basado en elementos del VEB (véase la solicitud de EE. UU. n.º 61/058 858, Yu *et al.*, 2009). En otro aspecto, las proteínas o ARN de reprogramación (TAL como ARNm o miARN) podrían introducirse directamente en las células somáticas mediante transfección de proteínas o ARN (véase la Solicitud de EE. UU. n.º 61/172 079, Yakubov *et al.*, 2010).

#### IV. Condiciones de diferenciación de las células madre pluripotentes

25 Dependiendo de las condiciones de cultivo, las células madre pluripotentes pueden producir colonias de células diferenciadas o células indiferenciadas. Por ejemplo, las células madre pluripotentes se cultivan en un medio fundamentalmente exento de factores de crecimiento, tales como TGFβ y bFGF, antes de la diferenciación, más en concreto, antes de la inducción de la formación de agregados. A menos que se especifique lo contrario, la diferenciación se consigue por inducción (por ejemplo, formación de agregados), que puede implicar al menos un cambio de las condiciones de cultivo, pero no por cambios espontáneos.

- 30 35 Los cultivos de células madre pluripotentes se describen como "indiferenciados" cuando una proporción sustancial (por ejemplo, al menos aproximadamente el 50 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 99 % o cualquier intervalo que pueda obtenerse entre estas cifras) de células madre y sus derivados en la población muestran características morfológicas de células indiferenciadas, distinguiéndolas claramente de las células diferenciadas de origen embrionario o de adulto. Las células ES o iPS indiferenciadas son reconocidas por los expertos en la materia, y suelen aparecer en las dos dimensiones de una vista microscópica en colonias de células con alta proporción nuclear/citoplasmática y nucleolos destacados. Se entiende que las colonias de células indiferenciadas pueden tener células vecinas que estén diferenciadas.

40 45 En ciertos aspectos, las células de partida para los presentes métodos pueden comprender al menos o aproximadamente  $10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}$  células o cualquier intervalo que pueda obtenerse entre estas cifras. La población celular de partida puede tener una densidad de siembra de al menos o aproximadamente  $10, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8$  células/ml, o cualquier intervalo que pueda obtenerse entre estas cifras.

##### A. Medio de diferenciación

50 Un medio de diferenciación según ciertos aspectos de la presente invención puede prepararse utilizando un medio que se utilizará para cultivar células animales como su medio basal. En algunos aspectos, el medio comprende un inhibidor de BMP; un inhibidor de TGFβ; un activador de la transducción de señales de Sonic hedgehog (SHH); un activador de la transducción de señales de Wnt y opcionalmente y/o un inhibidor de MEK. El medio puede ser un medio fundamentalmente exento de TGFβ y bFGF. Cualquiera de los medios utilizados en la diferenciación puede contener TGFβ y bFGF o puede ser un medio fundamentalmente exento de TGFβ y bFGF. En ciertos aspectos, el medio de diferenciación puede obviar la necesidad de inhibidores de la transducción de señales de la superfamilia TGFβ añadidos externamente e inhibidores de bFGF añadidos externamente.

- 55 En ciertos aspectos, un método de diferenciación según las realizaciones implica el pase de la célula a través de una gama de condiciones de los medios, por ejemplo, las células se cultivan:

- en cultivo adherente en un medio que comprende: un inhibidor de BMP; un inhibidor de TGF $\beta$ ; un activador de la transducción de señales de Sonic hedgehog (SHH); y un activador de la transducción de señales de Wnt;
  - en suspensión en un medio que comprende un inhibidor de BMP; un activador de la transducción de señales de SHH; y un activador de la transducción de señales de Wnt, para formar agregados celulares;
  - en cultivo adherente en un medio Neurobasal que comprende suplemento B27, L-glutamina, BDNF, GDNF, TGF $\beta$ , ácido ascórbico, bibutiril AMPc y DAPT (y, opcionalmente, carente de retinol o ácido retinoico añadidos exógenamente) para la maduración.
- Como medio basal, puede utilizarse cualquier medio químicamente definido, tal como el medio basal de Eagle (BME), BGJb, CMRL 1066, Glasgow MEM, Improved MEM Zinc Option, medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), medio 199, Eagle MEM,  $\alpha$ MEM, DMEM, Ham, RPMI 1640 y medio de Fischer, variaciones o combinaciones de los mismos, en los que pueden incluirse o no TGF $\beta$  y bFGF.
- En otras realizaciones, el entorno de diferenciación celular también puede contener suplementos, tales como el suplemento B-27, un suplemento de insulina, transferrina y selenio (ITS), L-glutamina, NEAA ("non-essential amino acids", aminoácidos no esenciales), P/S (penicilina/estreptomicina), suplemento N2 (insulina 5  $\mu$ g/ml, transferrina 100  $\mu$ g/ml, progesterona 20 nM, selenio 30 nM, putrescina 100  $\mu$ M (Bottenstein y Sato, 1979, PNAS USA, 76, 514-517) y  $\beta$ -mercaptopropano (β-ME). Se contempla la posibilidad de añadir o no otros factores, incluidos, entre otros, fibronectina, laminina, heparina, sulfato de heparina, ácido retinoico.
- Pueden añadirse o no factores de crecimiento a un medio de diferenciación. Además o en lugar de los factores descritos anteriormente, pueden emplearse factores de crecimiento, tales como miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), incluidos FGF2 y/o FGF8, miembros de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), antagonistas de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF)/proteína morfogenética ósea (BMP)/factor de crecimiento y diferenciación (GDF) en diversas etapas del proceso. Otros factores que pueden o no añadirse incluyen moléculas que pueden activar o inactivar la transducción de señales a través de la familia de receptores Notch, incluidas, entre otras, proteínas de las familias Jagged y similar a Delta, así como inhibidores de la gamma secretasa y otros inhibidores del procesamiento o escisión de Notch, tales como el DAPT. Otros factores de crecimiento pueden incluir miembros de la familia del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), la familia del factor relacionado con Wingless (ausencia de alas) (WNT) y la familia del factor Hedgehog.
- Pueden añadirse otros factores en un medio de formación y/o diferenciación de agregados para estimular la proliferación y la supervivencia de progenitores/células madre neurales, así como la supervivencia y diferenciación de neuronas. Estos factores neurotróficos incluyen, entre otros, el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotropina-3 (NT-3), la neurotropina-4/5 (NT-4/5), la interleucina-6 (IL-6), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor inhibidor de la leucemia (LIF), la cardiotrofina, miembros de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF)/proteína morfogenética ósea (BMP)/factor de crecimiento y diferenciación (GDF), la familia del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), incluidas, entre otras, la neurturina, la neublastina/artemina y la persefina, y factores relacionados con el factor de crecimiento de hepatocitos, incluido éste. Los cultivos neuronales que se diferencian terminalmente para formar neuronas postmitóticas también pueden contener un inhibidor mitótico o una mezcla de inhibidores mitóticos que incluyen, entre otros, 5-fluoro 2'-desoxiuridina, mitomicina C y/o citosina β-D-arabino-furanosida (Ara-C).
- El medio puede ser un medio que contenga o no suero. El medio sin suero puede referirse a un medio sin suero no procesado o no purificado y, en consecuencia, puede incluir medios con componentes purificados procedentes de la sangre o componentes procedentes de tejidos animales (tales como factores de crecimiento). Desde el punto de vista de la prevención de la contaminación por componentes heterogéneos de origen animal, el suero puede proceder del mismo animal que el de la célula o células madre.
- El medio puede contener o no alternativas al suero. Las alternativas al suero pueden incluir materiales que contengan adecuadamente albúmina (tal como albúmina rica en lípidos, sustitutos de la albúmina, tales como albúmina recombinante, almidón vegetal, dextranos e hidrolizados de proteínas), transferrina (u otros transportadores de hierro), ácidos grasos, insulina, precursores del colágeno, oligoelementos, 2-mercaptopropano, 3'-tiolglícerol o equivalentes de los mismos. Las alternativas al suero pueden prepararse por el método divulgado en la publicación internacional n.º 98/30679, por ejemplo. Como alternativa, se puede utilizar cualquier material disponible en el mercado para mayor comodidad. Entre los materiales disponibles en el mercado figuran el sustituto de suero Knockout (KSR) y el concentrado de lípidos químicamente definidos (Gibco).
- El medio también puede contener ácidos grasos o lípidos, aminoácidos (tales como aminoácidos no esenciales), una o más vitaminas, factores de crecimiento, citocinas, sustancias antioxidantes, 2-mercaptopropano, ácido pirúvico, agentes tamponantes y sales inorgánicas. La concentración de 2-mercaptopropano puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,05 a 1,0 mM, y especialmente de aproximadamente 0,1 a 0,5, o 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,1,

0,2, 0,5, 0,8, 1, 1,5, 2, 2,5, 5, 7,5, 10 mM o cualquier valor intermedio, pero la concentración no está especialmente limitada por estas cifras, siempre que sea apropiada para el cultivo de las células madre.

La densidad de las células madre pluripotentes a diferenciar no está especialmente limitada en la medida en que se trate de una densidad de al menos o aproximadamente 10, 10, 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> células/cm<sup>2</sup> o en la que puedan conseguirse los efectos deseados, tales como la inducción neural mejorada. Por ejemplo, es de aproximadamente 1,0×10<sup>4</sup> a 1,0×10<sup>6</sup> células/cm<sup>2</sup>, más en concreto de aproximadamente 2,0×10<sup>4</sup> a 6,5×10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> y más en concreto de aproximadamente 3,0×10<sup>4</sup> a 3,0×10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>.

En ciertas realizaciones, las células madre pluripotentes se cultivan en un medio antes de la formación de agregados para mejorar la inducción neural y el patrón de la placa ventral (por ejemplo, antes de ser disociadas en células individuales o agregados pequeños para inducir la formación de agregados). En ciertas realizaciones de la invención, las células madre pueden cultivarse en ausencia de células alimentadoras, extractos de células alimentadoras y/o suero.

#### B. Condiciones de cultivo

Un recipiente de cultivo utilizado para cultivar las células puede incluir, entre otros: un matraz, un matraz para cultivo de tejidos, un matraz de centrifugación, una placa, una placa de Petri, una placa para cultivo de tejidos, una multiplaca, una microplaca, una placa de micropocillos, una multiplaca, una placa de pocillos múltiples, un microportaobjetos, un portaobjetos de cámara, un tubo, una bandeja, cámaras CellSTACK®, una bolsa de cultivo y un frasco rotatorio, siempre que sea capaz de cultivar las células en su interior. Las células pueden cultivarse en un volumen de al menos o aproximadamente 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 800, 1000, 1500 ml o cualquier intervalo que pueda obtenerse entre estas cifras, dependiendo de las necesidades del cultivo. En una determinada realización, el recipiente de cultivo puede ser un biorreactor, que puede referirse a cualquier dispositivo o sistema que mantenga un entorno biológicamente activo. El biorreactor puede tener un volumen de al menos o aproximadamente 2, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 500 litros, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 metros cúbicos o cualquier intervalo que pueda obtenerse entre estas cifras.

La superficie del recipiente de cultivo puede prepararse con o sin adhesivo celular, dependiendo del objetivo. El recipiente de cultivo celular adhesivo puede recubrirse con cualquier sustrato para la adhesión celular, tal como la matriz extracelular (MEC), para mejorar la adhesividad de la superficie del recipiente a las células. El sustrato utilizado para la adhesión celular puede ser cualquier material destinado a fijar células madre o células alimentadoras (si se utilizan). Los sustratos no limitantes para la adhesión celular incluyen colágeno, gelatina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, poli-L-ornitina, laminina, vitronectina y fibronectina y mezclas de los mismos, por ejemplo, mezclas de proteínas de células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (tales como Matrigel™ o Geltrex) y preparaciones de membranas de células lisadas (Klimanskaya *et al.*, 2005).

Pueden definirse adecuadamente otras condiciones de cultivo. Por ejemplo, la temperatura de cultivo puede ser de aproximadamente 30 a 40 °C, por ejemplo, al menos o aproximadamente 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 °C, pero no se limita en concreto a estas. La concentración de CO<sub>2</sub> puede ser de aproximadamente el 1 al 10 %, por ejemplo, de aproximadamente el 2 al 7 %, o cualquier intervalo que pueda obtenerse entre estas cifras. La tensión de oxígeno puede ser al menos o aproximadamente del 1, 5, 8, 10, 20 % o cualquier intervalo que pueda obtenerse entre estas cifras.

En ciertos aspectos puede utilizarse un cultivo de adhesión. En este caso, las células pueden cultivarse en presencia de células alimentadoras. En el caso en que se utilicen células alimentadoras en los métodos de la presente invención, pueden emplearse células estromales, tales como fibroblastos fetales, como células alimentadoras (por ejemplo, véase Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual (1994); Gene Targeting, A Practical Approach (1993); Martin (1981); Evans *et al.* (1981); Jainchill *et al.* (1969); Nakano *et al.* (1996); Kodama *et al.* (1982); y las publicaciones internacionales n.º 01/088100 y 2005/080554).

En otros aspectos, puede utilizarse un cultivo en suspensión. Un cultivo en suspensión puede incluir un cultivo en suspensión sobre soportes (Fernandes *et al.*, 2007) o encapsulación en gel/biopolímero (publicación de patente de EE. UU. n.º 2007/0116680). El cultivo en suspensión de las células madre significa que las células madre se cultivan en condiciones no adherentes con respecto al recipiente de cultivo o a las células alimentadoras (si se utilizan) en un medio. El cultivo en suspensión de células madre incluye un cultivo de disociación de células madre y un cultivo en suspensión de agregados de células madre. El cultivo de disociación de células madre significa que se cultivan células madre en suspensión, y el cultivo de disociación de células madre incluye el cultivo de células madre individuales o el cultivo de agregados celulares pequeños compuestos por una pluralidad de células madre (por ejemplo, de aproximadamente 2 a 400 células). Cuando se continua con el cultivo de disociación mencionado, las células cultivadas y disociadas forman un agregado mayor de células madre y, a partir de entonces, se puede realizar un cultivo de suspensión de agregados. El cultivo en suspensión de agregados incluye un método de cultivo de embrioides (véase Keller *et al.*, 1995) y un método SFEB ("serum-free embryoid body", cuerpo embriode sin suero) (Watanabe *et al.*, 2005); publicación internacional n.º 2005/123902).

#### C. Cultivo de células madre pluripotentes

Los métodos para preparar y cultivar células madre pluripotentes, tales como las células madre embrionarias, pueden encontrarse en libros de texto y artículos establecidos como Cell biology, tissue culture, and embryology, including teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach (1987); Guide to Techniques in Mouse Development (1993); Embryonic Stem Cell Differentiation *in vitro* (1993); Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy (1998), todos ellos incorporados en el presente documento por referencia. Los métodos convencionales utilizados en el cultivo de tejidos se describen en términos generales en Animal Cell Culture (1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (1987); y Current Protocols in Molecular Biology y Short Protocols in Molecular Biology (1987 y 1995).

Después de que las células somáticas son introducidas o puestas en contacto con factores de reprogramación, estas células pueden ser cultivadas en un medio suficiente para mantener la pluripotencia y el estado indiferenciado. El cultivo de células madre pluripotentes inducidas (iPS) puede utilizar diversos medios y técnicas desarrollados para cultivar células madre pluripotentes de primates, más especialmente, células madre embrionarias, tal como se describe en la publicación de patente de EE. UU. 2007/0238170 y la publicación de patente de EE. UU. 2003/0211603y la publicación de patente de EE. UU. 2008/0171385, que se incorporan en el presente documento por referencia. Se aprecia que pueden utilizarse otros métodos para el cultivo y el mantenimiento de células madre pluripotentes, como conocen los expertos en la materia, con la presente invención.

En ciertas realizaciones, pueden utilizarse condiciones indefinidas; por ejemplo, las células pluripotentes pueden cultivarse sobre células alimentadoras de fibroblastos o en un medio que haya sido expuesto a células alimentadoras de fibroblastos para mantener las células madre en un estado indiferenciado. Como alternativa, las células pluripotentes pueden cultivarse y mantenerse en un estado prácticamente indiferenciado utilizando un sistema de cultivo definido e independiente de células alimentadoras, tal como el medio TeSR (Ludwig *et al.*, 2006a; Ludwig *et al.*, 2006b) o el medio E8 (Chen *et al.*, 2011; PCT/US2011/046796). Para cultivar y mantener células pluripotentes pueden utilizarse sistemas y medios de cultivo independientes de células alimentadoras. Estos enfoques permiten que las células madre pluripotentes humanas permanezcan en un estado prácticamente indiferenciado sin necesidad de "capas alimentadoras" de fibroblastos de ratón. Como se describe en el presente documento, se pueden realizar diversas modificaciones en estos métodos para reducir los costes según se deseé.

En el cultivo, el mantenimiento o la diferenciación de células madre pluripotentes humanas pueden utilizarse diversos componentes de la matriz. Por ejemplo, puede emplearse colágeno IV, fibronectina, laminina y vitronectina en combinación para recubrir una superficie de cultivo como medio de proporcionar un soporte sólido para el crecimiento de células pluripotentes, como se describe en Ludwig *et al.* (2006a; 2006b), que se incorpora por referencia en su totalidad.

También puede usarse Matrigel™ para proporcionar un sustrato para el cultivo celular y el mantenimiento de células madre pluripotentes humanas. Matrigel™ es una mezcla de proteínas gelatinosa secretada por células tumorales de ratón y está disponible en el mercado en BD Biosciences (Nueva Jersey, EE. UU.). Esta mezcla se asemeja al complejo entorno extracelular que se encuentra en muchos tejidos y es utilizada por los biólogos celulares como sustrato para el cultivo de células.

#### D. Transferencia de células individuales

En algunas realizaciones del cultivo de células madre pluripotentes, una vez que un recipiente de cultivo está lleno, la colonia se divide en células agregadas o incluso en células individuales por cualquier método adecuado para la disociación, y estas células luego se introducen en nuevos recipientes de cultivo para el pase. La división o pase celular es una técnica que permite a las células sobrevivir y crecer en condiciones de cultivo durante largos períodos de tiempo. Por lo general, las células se pasarán cuando sean confluentes en un 70-100 %.

La disociación en células individuales de células madre pluripotentes, seguida de la transferencia de células individuales, puede utilizarse en los presentes métodos con varias ventajas, tales como facilitar la expansión celular, la clasificación celular y la siembra definida para la diferenciación y permitir la automatización de los procedimientos de cultivo y la expansión clonal. Por ejemplo, las células de progenie obtenidas clonalmente a partir de una única célula pueden ser homogéneas en estructura genética y/o sincronizadas en ciclo celular, lo que puede aumentar la diferenciación deseada. Los ejemplos de métodos para el pase de células individuales pueden ser los descritos en la publicación de patente de EE. UU. 2008/0171385, que se incorpora en el presente documento por referencia.

En ciertas realizaciones, las células madre pluripotentes pueden disociarse en células individuales, o una combinación de células individuales y pequeños agrupamientos celulares que comprenden 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 células o más. La disociación puede lograrse mediante fuerza mecánica o mediante un agente de disociación celular, tal como citrato de Na, o con una enzima, por ejemplo, tripsina, tripsina-EDTA, TrypLE Select o similares.

En función de la fuente de células madre pluripotentes y de la necesidad de expansión, las células disociadas pueden transferirse individualmente o en pequeños agrupamientos a nuevos recipientes de cultivo en una proporción de división tal como al menos o aproximadamente 1:2, 1:4, 1:5, 1:6, 1:8, 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:100, 1:150, 1:200 o cualquier intervalo que pueda obtenerse entre estas cifras. Las proporciones de división de las líneas celulares en suspensión pueden realizarse en función del volumen de suspensión del cultivo celular. El intervalo de pase puede

ser de al menos o aproximadamente cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 días o cualquier intervalo que pueda obtenerse entre estas cifras. Por ejemplo, las proporciones de división que pueden obtenerse para los diferentes protocolos de pase enzimático pueden ser 1:2 cada 3 a 7 días, 1:3 cada 4 a 7 días, y de 1:5 a 1:10 aproximadamente cada 7 días, de 1:50 a 1:100 cada 7 días. Cuando se utilizan proporciones de división elevadas, el intervalo de pase puede prolongarse hasta al menos 12 a 14 días o cualquier periodo de tiempo sin pérdida celular debida a una diferenciación espontánea excesiva o a la muerte celular.

En ciertos aspectos, el pase de células individuales puede realizarse en presencia de una molécula pequeña eficaz para aumentar la eficacia de la clonación y la supervivencia celular, tal como un inhibidor de ROCK o un inhibidor de miosina II como se describió anteriormente. Dicho inhibidor de ROCK o inhibidor de miosina II, por ejemplo, Y-27632, HA-1077, H-1152, o blebistatina, puede utilizarse en una concentración eficaz, por ejemplo, al menos o aproximadamente de 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 a aproximadamente 100 µM, o cualquier intervalo que pueda obtenerse entre estas cifras.

#### E. Diferenciación de células madre

Se pueden proporcionar métodos para mejorar la eficiencia de la diferenciación neural (en concreto, la eficiencia de la diferenciación de DA del mesencéfalo) de células madre pluripotentes. La diferenciación de las células madre pluripotentes puede inducirse de diversas maneras, tales como en colonias adheridas o mediante la formación de agregados celulares, por ejemplo, en un entorno de baja adherencia, en el que dichos agregados se denominan cuerpos embrioides ("embryoid bodies", EB). Las señales morfogénicas moleculares y celulares y los acontecimientos que tienen lugar en las EB imitan muchos aspectos de la ontogenia natural de dichas células en un embrión en desarrollo. Los métodos para dirigir las células hacia la diferenciación neuronal se proporcionan, por ejemplo, en la publicación de EE. UU. n.º 2012/0276063, incorporado en el presente documento por referencia. Se proporcionan protocolos más detallados y específicos para la diferenciación de neuronas DA en la publicación PCT n.º WO2013/067362, incorporada en el presente documento por referencia.

Los cuerpos embrioides (EB) son agregados de células procedentes de células madre pluripotentes, tales como células ES o células iPS, y se han estudiado durante años con células madre embrionarias de ratón. Para recapitular algunas de las claves inherentes a la diferenciación *in vivo*, ciertos aspectos de la invención pueden emplear agregados tridimensionales (es decir, cuerpos embrioides) como etapa intermedia. Al iniciarse la agregación celular, puede iniciarse la diferenciación y las células pueden empezar a recapitular hasta cierto punto el desarrollo embrionario. Aunque no pueden formar tejido trofoectodérmico (que incluye la placenta), pueden desarrollarse células de prácticamente cualquier otro tipo presente en el organismo. La presente invención puede estimular aún más la diferenciación neuronal tras la formación de agregados.

La agregación celular puede imponerse mediante gota colgante, cultivo en placas sin tratamiento para el cultivo de tejidos o matraces de centrifugado; cualquiera de estos métodos impide que las células se adhieran a una superficie para formar el típico crecimiento en colonia. Los inhibidores de ROCK o los inhibidores de la miosina II pueden utilizarse antes, durante o después de la formación de agregados para cultivar células madre pluripotentes.

Las células madre pluripotentes pueden sembrarse en el medio de estimulación de agregados utilizando cualquier método conocido en la técnica del cultivo celular. Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden sembrarse como una única colonia o un grupo clonal en un medio de estimulación de agregados, y las células madre pluripotentes también pueden sembrarse como células fundamentalmente individuales. En algunas realizaciones, las células madre pluripotentes se disocian en células fundamentalmente individuales utilizando métodos mecánicos o enzimáticos conocidos en la técnica. A modo de ejemplo no limitante, las células madre pluripotentes pueden exponerse a una enzima proteolítica que interrumpe las conexiones entre las células y la superficie de cultivo y entre las propias células. Las enzimas que pueden utilizarse para individualizar las células madre pluripotentes para la formación de agregados y la diferenciación pueden incluir, entre otras, la tripsina, en sus diversas formulaciones comerciales, tales como TrypLE, o una mezcla de enzimas, tal como Accutase®. En ciertas realizaciones, las células pluripotentes pueden añadirse o sembrarse como células fundamentalmente individuales (o dispersas) a un medio de cultivo para su formación sobre una superficie de cultivo.

Por ejemplo, las células pluripotentes dispersas se siembran en un medio de cultivo a una densidad de aproximadamente  $10^4$  células/ml a aproximadamente  $10^{10}$  células/ml. Más concretamente, las células pluripotentes se siembran a una densidad de aproximadamente  $10^5$  células/ml a aproximadamente  $10^7$  células/ml, o de aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/ml. En estas realizaciones, una superficie de cultivo puede estar compuesta fundamentalmente de cualquier material que sea compatible con los métodos de cultivo celular aséptico convencionales en la técnica, por ejemplo, una superficie no adherente. Una superficie de cultivo puede comprender además un componente de matriz como se describe en el presente documento. En determinadas realizaciones, puede aplicarse un componente de matriz a una superficie de cultivo antes de poner en contacto la superficie con las células y el medio.

Los sustratos que pueden utilizarse para inducir la diferenciación son, por ejemplo, colágeno, fibronectina, vitronectina, laminina, Matrikel y similares. La diferenciación también puede inducirse dejando las células en suspensión en

presencia de un factor de crecimiento inductor de la proliferación, sin reiniciar la proliferación (es decir, sin disociar las neuroesferas).

Un método ilustrativo comprende el cultivo de las células sobre un sustrato fijo en un medio de cultivo. A continuación, puede administrarse a las células un factor de crecimiento inductor de la proliferación. El factor de crecimiento inductor de la proliferación puede hacer que las células se adhieran al sustrato (por ejemplo, plástico o vidrio tratado con poliornitina), se aplaten y empiecen a diferenciarse en distintos tipos celulares.

#### V. Cultivo no estático

En ciertos aspectos, el cultivo no estático podría utilizarse para el cultivo y diferenciación de células madre pluripotentes. El cultivo no estático puede ser cualquier cultivo con células mantenidas a una velocidad de movimiento controlada, utilizando, por ejemplo, plataformas o recipientes de cultivo de agitación, rotación o sacudida, en concreto, biorreactores rotatorios de gran volumen. La agitación puede mejorar la circulación de nutrientes y productos de desecho celular y también utilizarse para controlar la agregación celular proporcionando un entorno más uniforme. Por ejemplo, la velocidad de rotación puede ajustarse a un mínimo o un máximo de aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100 rpm o cualquier intervalo que pueda obtenerse entre estas cifras. El periodo de incubación en el cultivo no estático para células madre pluripotentes, agregados celulares, células madre diferenciadas, o células de progenie derivadas de las mismas puede ser de al menos o aproximadamente 4 horas, 8 horas, 16 horas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6 días o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 semanas o cualquier intervalo que pueda obtenerse entre estas cifras.

#### VI. Alteración genética de las células

Las realizaciones de la invención se refieren a células (por ejemplo, células pluripotentes o neuronas DA) que han sido modificadas genéticamente. Se dice que una célula está "genéticamente alterada" o es "transgénica" cuando se ha transferido un polinucleótido al interior de la célula por cualquier medio adecuado de manipulación artificial, o cuando la célula es una progenie de la célula originariamente alterada que ha heredado el polinucleótido. En algunos aspectos, las células de las realizaciones comprenden un casete de expresión que comprende un primer gen marcador bajo el control del promotor MAP2 (véase, por ejemplo, la secuencia de referencia NCBI NC\_000002.11, que comprende el promotor (incorporada en el presente documento por referencia)).

Pueden emplearse diversos mecanismos para la modificación genética de las células. Por ejemplo, en el caso de que la integración se produzca en un sitio o sitios fundamentalmente aleatorios del genoma, puede introducirse un polinucleótido en un vector retroviral (por ejemplo, un vector lentiviral), un vector de virus adenoasociado (sin un gen Rep funcional) o como parte de un sistema de transposones, tal como un vector piggyBac. En otros aspectos, el polinucleótido se integra en un sitio genómico seleccionado, por ejemplo, el ácido nucleico puede integrarse en el sitio de integración de AAVS1 (por ejemplo, mediante el uso de un vector de virus adenoasociado en presencia de un gen Rep funcional). Asimismo, en ciertos aspectos, la integración en un sitio genómico seleccionado puede ser por recombinación homóloga. La eficacia de la RH convencional en células de mamíferos es de sólo  $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  de las células tratadas (Capecchi, 1990). El uso de meganucleasas, o endonucleasas "homing", tales como I-SceI, se han utilizado para aumentar la eficiencia de la RH. Se han utilizado tanto meganucleasas naturales como meganucleasas manipuladas con especificidades modificadas para aumentar la eficiencia de la RH (Pingoud y Silva, 2007; Chevalier *et al.*, 2002). Otra vía para aumentar la eficiencia de la RH ha sido la modificación de endonucleasas químéricas con dominios de especificidad de ADN programables (Silva *et al.*, 2011). Las nucleasas de dedos de zinc ("zinc-finger nucleases", ZFN) son un ejemplo de este tipo de moléculas químéricas en las que los dominios de unión al ADN de los dedos de zinc se fusionan con el dominio catalítico de una endonucleasa de restricción de tipo IIS, tal como FokI (como se indica en Durai *et al.*, 2005; documento PCT/US2004/030606). Otra clase de moléculas de especificidad de este tipo incluye dominios de unión al ADN efectores de tipo activador de la transcripción (ETranscription Activator Like EffectorE, TALE) condensados al dominio catalítico de una endonucleasa de restricción de tipo IIS, tal como FokI (Miller *et al.*, 2011; publicación PCT/IB2010/000154). Tal como se utiliza en el presente documento, la integración en un sitio genómico seleccionado puede comprender la inserción de las moléculas de ácido nucleico (o una parte de las mismas) entre dos posiciones de nucleótidos contiguas en el genoma o entre dos posiciones de nucleótidos que no son contiguas (por ejemplo, dando lugar a una sustitución de las secuencias genómicas intermedias). Por ejemplo, la integración del ácido nucleico en sitios genómicos seleccionados puede comprender la sustitución de un exón, un intrón, un promotor, una secuencia codificante o un gen completo.

En ciertas realizaciones de la invención, las células que contienen una construcción de ácido nucleico deseada pueden identificarse *in vitro* o *in vivo* mediante la inclusión de un marcador en el vector de expresión, tal como un marcador seleccionable o cribable. Tales marcadores conferirían un cambio identificable a la célula que permitiría identificar fácilmente las células que contienen el vector de expresión, o ayudarían a enriquecer o identificar las células neurales diferenciadas mediante el uso de un promotor específico de tejido. Por ejemplo, se pueden utilizar promotores específicos de neuronas, incluidos, entre otros, TuJ-1, Map-2, Dcx, sinapsina, enolasa 2, proteína ácida fibrilar glial o cadena alfa-1A de tubulina.

En general, un marcador seleccionable es aquel que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador seleccionable positivo es aquel en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador seleccionable negativo es aquel en el que su presencia impide su selección. Un ejemplo de marcador seleccionable

positivo es un marcador de resistencia a fármacos. Normalmente, la inclusión de un marcador de selección de fármaco ayuda en la clonación y la identificación de transformantes, por ejemplo, los genes que confieren resistencia a la blasticidina, la neomicina, la puromicina, la higromicina, la DHFR, la GPT, la zeocina y el histidinol son marcadores seleccionables útiles.

- 5 Además de los marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de los transformantes en función de la aplicación de las condiciones, también se contemplan otros tipos de marcadores, incluidos los marcadores seleccionables, tales como GFP, cuya base es el análisis colorimétrico. Como alternativa, se pueden utilizar enzimas seleccionables, tales como la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Un experto en la materia también sabría cómo emplear marcadores inmunológicos, posiblemente junto con el análisis FACS. El marcador puede utilizarse siempre que sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Otros ejemplos de marcadores seleccionables y cribables son bien conocidos por los expertos en la materia.

## VII. Uso de las neuronas dopaminérgicas

- 15 Las neuronas DA proporcionadas por los métodos y las composiciones de ciertos aspectos de la invención pueden utilizarse en una diversidad de aplicaciones. Entre ellas se incluyen, entre otras, el trasplante o la implantación de neuronas DA *in vivo*; la selección *in vitro* de compuestos citotóxicos, carcinógenos, mutágenos, factores de crecimiento/reguladores, compuestos farmacéuticos, etc.; la elucidación del mecanismo de neurodegeneración; el estudio del mecanismo de actuación de fármacos y/o factores de crecimiento; la terapia génica; y la producción de productos biológicamente activos, por citar sólo algunas.

### A. Selección de compuestos de ensayo

- 20 Las neuronas DA del mesencéfalo de la presente invención se pueden utilizar para detectar factores (tales como disolventes, fármacos de molécula pequeña, péptidos y polinucleótidos) o condiciones ambientales (tales como condiciones de cultivo o manipulación) que afectan a las características de las neuronas DA proporcionadas en el presente documento.

- 25 En algunas aplicaciones, las células madre (diferenciadas o indiferenciadas) se utilizan para detectar factores que estimulan la maduración de células a lo largo del linaje neural, o para estimular la proliferación y el mantenimiento de dichas células en cultivo a largo plazo. Por ejemplo, los factores candidatos de maduración neural o los factores de crecimiento se ensayan añadiéndolos a células madre en diferentes pocillos, y luego determinando cualquier cambio fenotípico que se produzca, según los criterios deseables para el posterior cultivo y uso de las células.

- 30 Las aplicaciones de selección concretas de esta invención se refieren al ensayo de compuestos farmacéuticos en la investigación de fármacos. En general, se remite al lector al libro de texto establecido *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 1997; y la patente de EE. UU. n.º 5 030 015). En ciertos aspectos de las realizaciones, las células producidas por los métodos detallados en el presente documento pueden utilizarse como células de ensayo para ensayos convencionales de selección de fármacos y toxicidad (por ejemplo, para identificar, confirmar y comprobar la característica de función o para comprobar la administración de moléculas terapéuticas para tratar enfermedades específicas del linaje celular), como se ha realizado previamente en neuronas primarias en cultivo a corto plazo. La evaluación de la actividad de los compuestos farmacéuticos candidatos generalmente implica combinar las neuronas proporcionadas en ciertos aspectos de la presente invención con el compuesto candidato, determinar cualquier cambio en la morfología, el fenotipo marcador o la actividad metabólica de las células que sea atribuible al compuesto (en comparación con células sin tratar o con células tratadas con un compuesto inerte) y, a continuación, correlacionar el efecto del compuesto con el cambio observado. La selección puede realizarse bien porque el compuesto está diseñado para tener un efecto farmacológico en las células neuronales, bien porque un compuesto diseñado para tener efectos en otro lugar pueda tener efectos secundarios neuronales no deseados. Se pueden ensayar dos o más fármacos combinados (combinándolos con las células simultánea o secuencialmente) para detectar posibles efectos de interacción entre fármacos.
- 35
- 40
- 45

- 45 En algunas aplicaciones, los compuestos se examinan inicialmente para determinar su neurotoxicidad potencial. La citotoxicidad puede determinarse en primer lugar por el efecto sobre la viabilidad celular, la supervivencia, la morfología y la filtración de enzimas al medio de cultivo. Se realizan análisis más detallados para determinar si los compuestos afectan a la función celular (tal como la neurotransmisión) sin causar toxicidad.

### B. Tratamiento de las enfermedades del sistema nervioso central

- 50 1. Enfermedades del sistema nervioso central

Las células progenitoras neurales o células madre pueden ser trasplantadas para regenerar células neurales en un individuo que padezca una enfermedad del sistema nervioso central. Dichas enfermedades pueden incluir, entre otras, enfermedades neurodegenerativas, tales como el parkinsonismo.

- 55 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "parkinsonismo" se refiere a un grupo de enfermedades que están todas relacionadas con una insuficiencia de dopamina en los ganglios basales que es una parte del cerebro que controla el movimiento. Los síntomas incluyen temblor, bradicinesia (extrema lentitud de movimientos), postura

flexionada, inestabilidad postural y rigidez. El diagnóstico de parkinsonismo requiere la presencia de al menos dos de estos síntomas, uno de los cuales debe ser temblor o bradicinesia. La forma más habitual de parkinsonismo es la enfermedad de Parkinson (EP) idiopática, o clásica, pero en una minoría significativa de diagnósticos, aproximadamente el 15 por ciento del total, puede estar presente uno de los síndromes de Parkinson plus (SP plus).

- 5 Estos síndromes, también conocidos como parkinsonismo atípico, incluyen la degeneración corticobasal, la demencia con cuerpos de Lewy, la sistematofia múltiple y la parálisis supranuclear progresiva. En general, la enfermedad de Parkinson implica la disfunción y la muerte de células nerviosas vitales en el cerebro, principalmente en una zona del cerebro llamada sustancia negra. Muchas de estas células nerviosas vitales producen dopamina. Cuando estas neuronas mueren, la cantidad de dopamina disminuye, dejando a la persona incapaz de controlar el movimiento con normalidad. Los intestinos también tienen células dopamínergicas que degeneran en los pacientes con enfermedad de Parkinson, y esto puede ser un factor causal importante en los síntomas gastrointestinales que forman parte de la enfermedad. El conjunto de síntomas que experimenta un individuo varía de una persona a otra. Los signos motores principales de la enfermedad de Parkinson son los siguientes: temblor de manos, brazos, piernas, mandíbula y cara, bradicinesia o lentitud de movimientos, rigidez o agarrotamiento de extremidades y tronco e inestabilidad postural o alteración del equilibrio y la coordinación.

## 2. Métodos de administración de las células

Las células madre o las células diferenciadas pueden administrarse a un sujeto de forma local o sistémica. Los métodos para administrar neuronas DA a un sujeto son conocidos en la técnica. Si el paciente recibe células procedentes de sus propias células, se denomina trasplante autólogo; este tipo de trasplante tiene pocas probabilidades de rechazo.

Los ejemplos de métodos de administración de células madre o células diferenciadas a un sujeto, en concreto, a un sujeto humano, incluyen la inyección o el trasplante de las células a sitios diana (por ejemplo, cuerpo estriado y/o sustancia negra) en el sujeto. Las células madre y/o neuronas DA pueden insertarse en un dispositivo de administración que facilite la introducción, mediante inyección o trasplante, de las células en el sujeto. Dichos dispositivos de administración incluyen tubos, por ejemplo, catéteres, para inyectar células y fluidos en el cuerpo de un sujeto receptor. En una realización preferida, los tubos tienen además una aguja, por ejemplo, una jeringa, a través de la cual las células de la invención pueden ser introducidas en el sujeto en un lugar deseado. Las células madre pueden insertarse en dicho dispositivo de administración, por ejemplo, una jeringa, de diferentes formas. Por ejemplo, las células pueden estar suspendidas en una solución o, como alternativa, inmersas en una matriz de soporte cuando están contenidas en un dispositivo de administración de este tipo.

Las matrices de soporte en las que las células madre pueden estar incorporadas o inmersas incluyen matrices que son compatibles con el receptor y que se degradan en productos que no son dañinos para el receptor. Las matrices de soporte pueden ser naturales (por ejemplo, colágeno, etc.) y/o sintéticas biodegradables. Las matrices biodegradables sintéticas incluyen polímeros sintéticos, tales como polianhídridos, poliortoésteres y polí(ácido láctico).

35 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "solución" incluye un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en el que las células de la invención permanecen viables. Los vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina, soluciones tampón acuosas, disolventes y/o medios de dispersión. El uso de tales vehículos y diluyentes es conocido en la técnica. La solución es preferentemente estéril y fluida hasta el punto de que se pueda inyectar con facilidad.

40 Preferentemente, la solución es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se protege de la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos, mediante el uso, por ejemplo, de parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. Las soluciones de la invención pueden prepararse incorporando células madre como se describe en el presente documento en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y, según se requiera, otros ingredientes enumerados anteriormente, seguido de la esterilización por filtración.

## 3. Posología y administración

En un aspecto, los métodos descritos en el presente documento proporcionan un método para mejorar el injerto de células progenitoras o neuronas DA en un sujeto. En una realización, el sujeto puede ser un mamífero. En otra realización, el mamífero puede ser un ser humano, aunque la invención es eficaz con respecto a todos los mamíferos.

50 Las composiciones se administran de manera compatible con la forma farmacéutica y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad que debe administrarse y el momento de la administración dependen del sujeto a tratar, de la capacidad del sistema del sujeto para utilizar el principio activo y del grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades precisas de cada principio activo que deben administrarse dependen del criterio del facultativo y son específicas de cada individuo. Sin embargo, los intervalos de dosis adecuados dependen de la vía de administración. 55 Los regímenes adecuados de administración también son variables.

## 4. Eficacia

La eficacia de un tratamiento determinado para mejorar el injerto de neuronas DA puede ser determinada por los expertos en la materia. Sin embargo, un tratamiento se considera "tratamiento eficaz", tal como se utiliza la expresión en el presente documento, si alguno o todos los signos o síntomas, por ejemplo, de un injerto deficiente de neuronas DA, se alteran de forma beneficiosa, si otros síntomas clínicamente aceptados mejoran o incluso si mejoran, por ejemplo, en al menos un 10 % tras el tratamiento con una población celular como se describe en el presente documento. La eficacia también puede medirse por el hecho de que un individuo no empeore, evaluado por la hospitalización, la necesidad de intervenciones médicas (es decir, que se detenga la progresión de la enfermedad) o la incidencia del fracaso del injerto. Los métodos de medición de estos indicadores son conocidos por los expertos en la materia y/o se describen en el presente documento. El tratamiento incluye cualquier tratamiento de una enfermedad en un individuo o un animal (algunos ejemplos no limitantes incluyen un ser humano o un mamífero) e incluye: (1) inhibir la enfermedad, por ejemplo, evitando el fracaso del injerto; o (2) aliviar la enfermedad, por ejemplo, provocando la regresión de los síntomas. Una cantidad eficaz para el tratamiento de una enfermedad significa aquella cantidad que, administrada a un mamífero que lo necesite, es suficiente para dar lugar a un tratamiento eficaz, tal como se define esta expresión en el presente documento, para dicha enfermedad. La eficacia de un agente puede determinarse evaluando indicadores físicos, por ejemplo, de un injerto de neuronas DA, como, por ejemplo, temblor, bradicinesia, postura flexionada, equilibrio y coordinación, etc. La eficacia puede evaluarse en modelos animales de la enfermedad de Parkinson, por ejemplo, realizando pruebas de comportamiento, tales como pruebas de pasos y pruebas de cilindros.

#### C. Distribución con fines comerciales, terapéuticos y de investigación

A efectos de su fabricación, distribución y uso, las células neurales de esta invención suelen suministrarse en forma de cultivo o suspensión celular en un excipiente o medio de cultivo isotónico, opcionalmente congeladas para facilitar su transporte o almacenamiento.

Esta invención también incluye diferentes sistemas de reactivos, que comprenden un conjunto o combinación de células que existen en cualquier momento durante la fabricación, la distribución o el uso. Los conjuntos de células comprenden cualquier combinación de dos o más poblaciones celulares descritas en esta divulgación, cuyos ejemplos, entre otros, incluyen células procedentes de la programación (células de linaje neural, sus precursores y subtipos), combinadas con células madre indiferenciadas u otros tipos celulares diferenciados. Las poblaciones celulares del conjunto comparten a veces el mismo genoma o una forma genéticamente modificada del mismo. Cada tipo de célula del conjunto puede envasarse conjuntamente o en recipientes separados en la misma instalación, o en lugares diferentes, en el mismo momento o en momentos diferentes, bajo el control de la misma entidad o de entidades diferentes que comparten una relación comercial.

#### VIII. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para mostrar las realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la materia apreciarán que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan técnicas que el inventor ha descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia, a la luz de la presente divulgación, apreciarán que se pueden hacer muchos cambios en las realizaciones específicas que se divultan.

##### Ejemplo 1: Producción de DA del mesencéfalo a partir de células pluripotentes

###### *Modificación de líneas celulares:*

Se diseñó una línea de células madre pluripotentes inducidas (iPS) humanas con un constructo que codifica un gen de resistencia a la neomicina dirigido por el promotor MAP2 humano y un gen de resistencia a la puromicina dirigido por el promotor PGK. El constructo se insertó en el sitio AAVS1 mediante recombinación homóloga mediada por nucleasas de dedos de zinc. Tras la selección con puromicina, se seleccionó el clon MAP2 Neo n.º 2 y se propagó en Matrigel utilizando división con dispasa y medio mTeSR1. Antes de congelar el banco celular maestro, se pasó la línea celular a un medio de división de EDTA y Essential 8.

###### *Inducción y expansión de progenitores de DA:*

En el día (-2), las células iPS MAP2 Neo n.º 2 se dividieron utilizando la enzima de disociación TrypLE (7 min) y se cultivaron en placa sobre Matrigel a  $3,3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en medio Essential 8 que contenía blebistatina 2,5 µM (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>). Las células se alimentaron con medio Essential 8 el día (-1) y el día 0.

En el día 1 de la diferenciación, se indujo simultáneamente la inducción neural (mediante la inhibición dual de SMAD, con inhibidores de la transducción de señales de BMP y de TGFβ), la característica de la placa ventral (mediante la transducción de señales de Sonic Hedgehog) y la característica de neuronas DA del mesencéfalo (mediante la transducción de señales de WNT). El medio del día 1 estaba compuesto por DMEM/F12 con suplemento de B27 y contenía un cóctel de inhibidores y activadores de molécula pequeña ("cóctel de inducción"): LDN-193189 200 nM, SB431542 10 µM, purmorfamina 2 µM, Shh C25II 100 ng/ml y CHIR 99021 1,25 µM. El día 2, las células se alimentaron con el mismo medio, con la adición de PD0325901 1 µM, un inhibidor de MEK que induce una característica de

mesencéfalo más rápida y eficiente (DMEM/F12 con B27 + cóctel de inducción + PD0325901 1 µM). El día 3 y el día 4, las células fueron alimentadas con DMEM/F12 con B27 (-vitamina A) + cóctel de Inducción + PD0325901 1 µM.

El día 5, las células se disociaron utilizando TrypLE (15 min) y se transfirieron a un cultivo en suspensión en matraz giratorio para formar agregados. Las células se cultivaron a  $1 \times 10^6$  células/ml en DMEM/F12 con B27 (-vit. A) + 200nM LDN-193189 200 nM, purmorfamina 2 µM, Shh C25II 100 ng/ml, CHIR 99021 1,25 µM y blebistatina 10 µM (37 °C, 7 % de CO<sub>2</sub>). El día 6, se asentaron los agregados, se eliminó el 66 % del medio y se alimentó a los agregados con DMEM/F12 con B27 (-vit. A) + LDN-193189 200 nM, purmorfamina 2 µM, Shh C25II 100 ng/ml y CHIR 99021 1,25 µM. En los días 7-10, los agregados fueron alimentados diariamente (sustitución del 75 % del medio) con DMEM/F12 con B27 (-vit. A) + LDN-193189 200 nM y CHIR 99021 1,25 µM. En los días 11-16, la expansión de progenitores de DA se amplificó con la adición de FGF8b y un aumento de la concentración de CHIR99021: los agregados se alimentaron diariamente (sustitución del 75 % del medio) con DMEM/F12 con B27 (-vit. A) + LDN-193189 200 nM, CHIR 99021 3 µM y FGF8b 100 ng/ml.

*Maduración de neuronas DA, selección con fármacos y crioconservación:*

El día 17, los agregados se disociaron a una suspensión de células individuales usando TrypLE (15 min). Las células se sembraron sobre Matrigel a  $5,2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en el mismo medio utilizado en los días 11 a 16, con la adición de blebistatina 2,5 µM (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>). El día 18, el medio se sustituyó por "medio de maduración": Neurobasal con B27 (-vit. A) (Gibco®) y Glutamax + BDNF 20 ng/ml, GDNF 20 ng/ml, TGFβ3 1 ng/ml, ácido ascórbico 200 µM, dibutiril AMPc 500 µM y DAPT 5 µM. Las células fueron alimentadas cada dos días (días 18, 20 y 22) con medio de maduración.

El día 24, las células se disociaron utilizando Accutase (45 min) y se volvieron a implantar a  $3,1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en matraces previamente cubiertos con poli-L-ornitina y laminina (PLO/laminina) en medio de maduración que contenía blebistatina 2,5 µM. Las células fueron alimentadas con medio de maduración el día 25. El día 27 y el día 29, las células se alimentaron con medio de maduración que contenía G418 100 µg/ml para seleccionar las células que no expresaban el gen de resistencia a la neomicina bajo el control de un promotor panneuronal MAP2.

El día 31, las células se disociaron utilizando Accutase (45 min) y se volvieron a cultivar en placa a  $3,1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en matraces de PLO/laminina en medio de maduración que contenía G418 100 µg/ml y blebistatina 2,5 µM. Los días 32, 34 y 36, las células fueron alimentadas con medio de maduración. El día 38, las células se disociaron utilizando Accutase (45 min) y se crioconservaron en medio CryoStor CS10 a  $1,25 \times 10^7$  células/ml utilizando un congelador de velocidad controlada.

*Análisis de las neuronas DA:*

Se determinaron los perfiles cuantitativos de expresión génica de las células antes de la diferenciación (célula iPS humana), en el día 6 del proceso de diferenciación de neuronas DA del mesencéfalo (diferenciación de neuronas dopamíngicas en el día 6), y tras la finalización de la diferenciación (día 42). Tras aislar el ARN, se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real utilizando ensayos de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems) y los resultados se expresaron como expresión relativa respecto al control de GAPDH. Los resultados de estos estudios se muestran en la figura 1 y demuestran que la neuronalización se detectó en el día 6, como lo demuestra la regulación al alza de los marcadores de subtipos neuronales vGAT, Nkx6.1, vGLUT1, NGN2 y los marcadores de mesencéfalo FoxA2, Lmx1a y OTX2. En el día 42, otros genes expresados en las neuronas DA del mesencéfalo estaban regulados al alza (EN1, NURR1, TH, DRD2, GIRK2, VMAT2, DRD2, CALB1, TUBB3, SYN1, SYP, vGLUT2).

Las células fueron analizadas posteriormente para determinar la coexpresión de FoxA2 y Lmx1a (marcadores específicos de progenitores de neuronas DA del mesencéfalo procedentes de la placa ventral). En el día 15 del proceso de diferenciación, la ICC cuantitativa mediante imágenes de alto contenido demostró que >80 % (el 81,7 %) de las células expresaban tanto FoxA2 como Lmx1. El análisis de citometría de flujo confirmó estos resultados, ya que sólo el 16 % de las células eran FoxA2<sup>+</sup>/Lmx1<sup>-</sup> y el 3 % de las células eran FoxA2/Lmx1<sup>-</sup>.

También se analizó el efecto de la selección con fármacos sobre la expresión génica en poblaciones celulares. La figura 3 muestra los resultados de la citometría de flujo de células iPS diferenciadas en neuronas. Esta línea de células iPS (MAP2 Neo n.º 2 (01279.107.00402)) se generó mediante recombinación homóloga mediada por nucleasas de dedos de zinc en el sitio de puerto seguro de AAVS1, como se ha detallado anteriormente. El protocolo de diferenciación de neuronas DA del mesencéfalo realizado sin selección con fármacos da como resultado una población de células con un 39 % de neuronas (Map2<sup>+</sup>/nestina<sup>-</sup>) en el día 38. Las células no neuronales (Map2<sup>+</sup>/nestina<sup>+</sup>) siguieron proliferando y no expresaron FoxA2 ni tirosina hidroxilasa (TH). Por el contrario, la selección genética de fármacos con G418 da lugar a una población muy purificada de neuronas (un 95 % de Map2<sup>+</sup>/nestina<sup>-</sup>). La caracterización posterior de los marcadores (detallada más adelante) demostró que la gran mayoría de estas células tienen el fenotipo de neurona DA del mesencéfalo.

También se analizaron las células para determinar su perfil de expresión génica en diversos puntos temporales posteriores a la descongelación. En concreto, las células se crioconservaron el día 38 del protocolo de diferenciación, se descongelaron y se colocaron en placas sobre PLO/laminina durante los tiempos indicados antes del aislamiento

5 del ARN. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó mediante ensayos de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems) y los resultados se expresaron como expresión relativa respecto al control de GAPDH. Los resultados presentados en la figura 4 demuestran que las células expresan genes que indican una regionalización del mesencéfalo y marcadores para neuronas, neuronas dopaminérgicas y neuronas DA del mesencéfalo procedentes de la placa ventral. Los marcadores de regionalización del prosencéfalo (FoxG1) u otros subtipos neuronales (DBH, CHAT, OLIG2) se expresaron poco o de forma negativa. La mayoría de los genes mostraron niveles de expresión muy similares a través del tiempo de descongelación, hasta 42 días después de la descongelación. El perfil de expresión coincide con el del ARN extraído de la sustancia negra (SN) del mesencéfalo humano.

10 También se examinaron las células (tras la descongelación) para la coexpresión de FoxA2 y Lmx1a. En concreto, las células se criopreservaron el día 38 del protocolo de diferenciación, se descongelaron y se colocaron en placas de PLO/laminina durante 7 días. La inmunocitoquímica cuantitativa (ICC) utilizando imágenes de alto contenido demuestra que el 94 % de las células expresan FoxA2, el 96 % expresan Lmx1 y el 91 % de las células expresan tanto FoxA2 como Lmx1. Así, el fenotipo del mesencéfalo se mantiene en la gran mayoría de las células maduras. La expresión de FoxA2 también se confirmó mediante citometría de flujo y se determinó que un 96 % eran células FoxA2<sup>+</sup>.

15 15 Las células coexpresan el marcador característico de neuronas DA, la tirosina hidroxilasa (TH) (un 88 % en comparación con la tinción de control del isótipo). Además, el 97 % de las células se tiñeron con el marcador panneuronal Map2 (véase, la figura 5). El fenotipo de neurona DA del mesencéfalo se mantuvo incluso después de un cultivo prolongado tras la descongelación. En el día 14 tras la descongelación, los niveles de expresión de TH aumentaron en comparación con el día 3 tras la descongelación y se mantuvo la pureza neuronal (un 98 %), sin crecimiento de células nestina<sup>+</sup> (véase la figura 6).

20 20 Además, las neuronas DA producidas con el medio que contiene FGF8 según el presente ejemplo se injertaron eficientemente en ratas Sprague Dawley y primates no humanos.

Ejemplo 2: Producción de DA del mesencéfalo a partir de células pluripotentes, sin FGF8/variación del protocolo de criopreservación temprano

25 *Inducción y expansión de progenitores de DA:*

En el día (-2), la línea celular iPS MAP2 Neo n.<sup>º</sup> 2 se dividió utilizando la enzima de disociación TrypLE (7 min) y se cultivó en placas sobre Matrigel a  $3,3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en medio Essential 8 que contenía blebistatina 2,5 µM (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>). Las células se alimentaron con medio Essential 8 el día (-1) y el día 0.

30 30 En el día 1 de la diferenciación, se indujo simultáneamente la inducción neural (mediante la inhibición dual de SMAD, con inhibidores de la transducción de señales de BMP y de TGFβ), la característica de la placa ventral (mediante la transducción de señales de Sonic Hedgehog) y la característica de neuronas DA del mesencéfalo (mediante la transducción de señales de WNT). El medio del día 1 estaba compuesto por DMEM/F12 con suplemento de B27 y contenía un cóctel de inhibidores y activadores de molécula pequeña ("cóctel de inducción"): LDN-193189 200 nM, SB431542 10 µM, purmorfamina 2 µM, Shh C25II 100 ng/ml y CHIR 99021 1,25 µM. El día 2, las células se alimentaron con el mismo medio, con la adición de PD0325901 1 µM, un inhibidor de MEK que induce una característica de mesencéfalo más rápida y eficiente (DMEM/F12 con B27 + cóctel de inducción + PD0325901 1 µM). El día 3 y el día 4, las células fueron alimentadas con DMEM/F12 con B27 (-vitamina A) + cóctel de Inducción + PD0325901 1 µM.

35 40 45 El día 5, las células se disociaron utilizando TrypLE (15 min) y se transfirieron a un cultivo en suspensión en matraz giratorio para formar agregados. Las células se cultivaron a  $1 \times 10^6$  células/ml en DMEM/F12 con B27 (-vit. A) + 200nM LDN-193189 200 nM, purmorfamina 2 µM, Shh C25II 100 ng/ml, CHIR 99021 1,25 µM y blebistatina 10 µM (37 °C, 7 % de CO<sub>2</sub>). El día 6, se asentaron los agregados, se eliminó el 66 % del medio y se alimentó a los agregados con DMEM/F12 con B27 (-vit. A) + LDN-193189 200 nM, purmorfamina 2 µM, Shh C25II 100 ng/ml y CHIR 99021 1,25 µM. En los días 7-9, los agregados fueron alimentados diariamente (sustitución del 75 % del medio) con DMEM/F12 con B27 (-vit. A) + LDN-193189 200 nM y CHIR 99021 1,25 µM. En los días 10 a 12, los agregados de progenitores de DA fueron alimentados diariamente (sustitución del 75 % del medio) con DMEM/F12 con B27 (-vit. A) + LDN-193189 200 nM y CHIR 99021 3 µM.

*Maduración de neuronas DA, selección opcional con fármacos y criopreservación:*

50 55 El día 13, los agregados se disociaron a una suspensión de células individuales usando TrypLE (15 min). Las células se sembraron sobre Matrigel a  $5,2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en el mismo medio utilizado en los días 10 a 12, con la adición de blebistatina 2,5 µM (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>). El día 14, el medio se sustituyó por "medio de maduración": Neurobasal con B27 (-vit. A) (Gibco®) y Glutamax + BDNF 20 ng/ml, GDNF 20 ng/ml, TGFβ3 1 ng/ml, ácido ascórbico 200 µM, dibutiril AMPc 500 µM y DAPT 5 µM. Las células fueron alimentadas cada dos días (días 16 y 18) con medio de maduración.

55 El día 19, las células se disociaron utilizando Accutase (45 min) y se volvieron a implantar a  $3,1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en matraces previamente cubiertos con poli-L-ornitina y laminina (PLO/laminina) en medio de maduración que contenía blebistatina 2,5 µM. Las células fueron alimentadas con medio de maduración en los días 20, 22 y 24. Para comparar las células no seleccionadas con las que habían sido sometidas a selección con fármacos, en algunos experimentos se alimentó a un grupo de células en los días 22 y 24 con medio de maduración que contenía G418 100 µg/ml para

seleccionar las células que no expresaban el gen de resistencia a la neomicina bajo el control de un promotor panneuronal MAP2.

El día 26, las células se disociaron utilizando Accutase (45 min) y se criocoartearon en medio CryoStor CS10 a 1,25×10<sup>7</sup> células/ml utilizando un congelador de velocidad controlada.

5    *Análisis de las neuronas DA:*

Tras la criocoartación, las células se descongelaron y se cultivaron en placas sobre PLO/laminina. Después de 7 días, se utilizó una ICC cuantitativa que emplea imágenes de alto contenido para visualizar las células que presentaban expresión de FoxA2 y Lmx1. Los resultados de estos estudios demostraron que el 83 % (el 83,22 %) de las células expresan FoxA2, el 84 % (el 84,02 %) expresan Lmx1 y el 78 % (el 77,97 %) de las células expresan tanto FoxA2 como Lmx1. Así, el fenotipo del mesencéfalo se mantiene en la mayoría de las células maduras.

10    En estudios posteriores se evaluó la pureza de las neuronas DA maduras del mesencéfalo mediante citometría de flujo de las células generadas utilizando un protocolo "sin FGF8" solo, en comparación con las células obtenidas utilizando un método de selección con fármacos. Los resultados de estos estudios se muestran en la figura 7. Cuando las células se criocoartan el día 26 sin selección con fármacos, se determinó que 99 % eran FoxA2<sup>+</sup>, 40 % eran TH<sup>+</sup> y 77 % eran Map2<sup>+</sup>. Sin embargo, en ese momento, Map2 y TH aún estaban en proceso de regulación al alza y, tras 7 días de cultivo tras la descongelación, la pureza neuronal final (Map2) había alcanzado el 90 %, con un 93 % de las células que expresaban FoxA2 y un 55 % que expresaban TH. A modo de comparación, en las células preparadas utilizando el mismo protocolo, pero con selección con fármacos (+G418), la pureza final a los 7 días tras la descongelación fue del 96 % de FoxA2<sup>+</sup>, 63 % de TH<sup>+</sup> y 98 % de Map2<sup>+</sup>.

15    20    Estudios posteriores compararon la expresión génica de neuronas DA del mesencéfalo obtenidas con selección con fármacos (véase el ejemplo 1; iCell DopaNeurons) frente a sin selección con fármacos (usando un protocolo sin FGF8 del ejemplo 2). Para estos experimentos, se aisló ARN de células diferenciadas y se analizó mediante ensayos de expresión génica TaqMan®. A modo de comparación, también se aisló ARN de neuronas del prosencéfalo procedentes de células madre (iCell Neurons) y de la sustancia negra del mesencéfalo humano. Los resultados se muestran en la figura 8 y demuestran que, en la mayoría de los casos, el patrón de expresión génica de las células fabricadas utilizando el protocolo sin FGF8 era muy similar al del protocolo convencional con FGF8 (protocolos del ejemplo 1 frente al ejemplo 2). Una excepción notable es la expresión de Engrailed 1 (EN1), que se sabe que está regulada por el FGF8. Ambos perfiles de expresión coinciden con los del ARN extraído de la sustancia negra (SN) del mesencéfalo humano. El perfil de expresión de las neuronas del prosencéfalo procedentes de células madre es notablemente diferente, con una menor expresión de marcadores de neuronas DA del mesencéfalo, tales como FoxA2, Lmx1, Nurr1, TH, vMAT2 y AADC, y una mayor expresión del marcador FoxG1 del prosencéfalo.

25    30    35    Todos los métodos divulgados y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones y los métodos de esta invención se han descrito en términos de las realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la materia que pueden aplicarse variaciones a los métodos.

### **Referencias bibliográficas**

Se indican las siguientes referencias bibliográficas, en la medida en que proporcionan detalles de ejemplos de procedimientos u otros detalles complementarios a los expuestos en el presente documento.

Patente de EE. UU. 5 843 780

40    Patente de EE. UU. 6 200 806

Patente de EE. UU. 6 833 269

Patente de EE. UU. 7 029 913

Solicitud de patente de EE.UU. 61/058858

Solicitud de patente de EE.UU. 61/172079

45    Solicitud de patente de EE.UU. 61/184546

Publicación de patente de EE.UU. 2002/0168766

Publicación de patente de EE.UU. 2003/0022367

Publicación de patente de EE.UU. 2003/0211603

Publicación de patente de EE.UU. 20030087919

- Publicación de patente de EE.UU. 20030125344  
Publicación de patente de EE.UU. 20040002507  
Publicación de patente de EE.UU. 20040002508  
Publicación de patente de EE.UU. 20040014755  
5 Publicación de patente de EE.UU. 20050192304  
Publicación de patente de EE.UU. 20050209261  
Publicación de patente de EE.UU. 2007/0116680  
Publicación de patente de EE.UU. 2007/0238170  
Publicación de patente de EE.UU. 2008/0171385  
10 Publicación de patente de EE.UU. 2011/0229441  
Publicación de patente de EE.UU. 2012/0276063  
PCT/US2010/024487  
PCT/US2011/046796  
A practical approach, 1987.  
15 Andrews *et al.*, en: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, Robertson (ed.), IRL Press, 207-246, 1987.  
Animal Cell Culture, 1987.  
Bottenstein y Sato, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:514-517, 1979.  
Byrne *et al.*, Nature, 450(7169):497-502, 2007.  
Chen *et al.*, Cell, 133:1106-1117, 2008.  
20 Chen *et al.*, Nature Methods, 8:424-429, 2011.  
Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 1987 y 1995.  
Doe *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 32:89-98, 2007.  
Embryonic Stem Cell Differentiation *in vitro*, 1993.  
Evans *et al.*, Nature, 292:154, 1981.  
25 Fernandes, *et al.*, J. Biotechnology, 132(2):227-236, 2007.  
Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1993.  
Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, 1987.  
Greber *et al.*, Stem Cells, 25:455-464, 2007.  
Guide to Techniques in Mouse Development, 1993.  
30 Harb *et al.*, PLoS One, 20;3(8):e3001, 2008.  
Publicaciones internacionales de patente n.ºs 2003/062227, 2003/059913, 2003/062225, 2002/076976 y 2004/039796.  
Publicación internacional nº. 2005/123902  
Publicación internacional nº. 2001/088100  
35 Publicación internacional nº. 2005/080554  
Publicación internacional nº. 2013/067362  
Ishizaki, *et al.*, Mol. Pharmacol., 57:976-983, 2000.

- Jainchill *et al.*, J. Virol., 4:549, 1969.
- Keller *et al.*, Curr. Opin. Cell Biol., 7:862-869, 1995.
- Kim *et al.*, Nature, 418:50-56, 2002.
- Klimanskaya *et al.*, Lancet., 365:P1636-1641, 2005.
- 5 Kodama *et al.*, J. Cell. Physiol, 112:89, 1982.
- Krencik *et al.*, Nature Biotechnology, 29:528-534, 2011.
- Krencik y Zhang, Nature Protocols, 6(11):1710-1717, 2011.
- Ludwig *et al.*, Biotechnol., 24(2):185-187, 2006b.
- Ludwig *et al.*, Nat. Methods, 3(8):637-46, 2006a.
- 10 Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
- Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:7634, 1981.
- Nakajima *et al.*, Cancer Chemother. Pharmacol., 52:319-324, 2003.
- Nakano *et al.*, Science, 272, 722, 1996.
- 15 Ogawa *et al.*, J. Cell Sci., 120:55-65, 2007.
- Perrier *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(34): 12543-12548, 2004.
- Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy, 1998.
- Reubinoff *et al.*, Nat. Biotechnol., 18:399-404, 2000.
- 20 Sasaki *et al.*, Pharmacol. Ther., 93:225-232, 2002.
- Schwartz *et al.*, Methods, 45(2): 142-158, 2008.
- Smith, en: Origins and Properties of Mouse Embryonic Stem Cells, Annu. Rev. Cell. Dev., Biol., 2000.
- Sterneckert *et al.*, Stem Cells, 28:1772-1781, 2010.
- 25 Suzuki *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:10294-10299, 2006.
- Takahashi y Yamanaka, Cell, 126:663-676, 2006.
- Takahashi *et al.*, Cell, 126(4):663-676, 2007.
- Takahashi *et al.*, Cell, 131:861-872, 2007.
- Thomson y Marshall, Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165, 1998.
- 30 Thomson y Odorico, J. Trends. Biotechnol., 18:53B57, 2000.
- Thomson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Scie. USA, 92:7844-7848, 1995.
- Thomson *et al.*, Science, 282:1145, 1998.
- Watabe y Miyazono, Cell Res., 19:103-115, 2009.
- 35 Watanabe *et al.*, Nature Neurosci., 8:288-296, 2005.
- Xu *et al.*, Cell Stem Cell, 3:196-206., 2008.
- Xu *et al.*, Biotechnol., 19:971-974, 2001.
- Yakubov *et al.*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 394: 189-193, 2010. Ying *et al.*, Cell, 115:281-292, 2003.
- Yu y Thomson, Genes Dev., 22(15):1987-1997, 2008.

# ES 2 939 807 T3

Yu *et al.*, Science, 318:1917-1920, 2007.

Yu *et al.*, Science, 324(5928):797-801, 2009.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Una población celular *in vitro*, que comprende células neuronales de mamífero, preferentemente humanas, siendo al menos aproximadamente el 80 % de las células neuronales positivas para la expresión del factor de transcripción LIM homeobox 1 (Lmx1) y de la caja Forkhead (cabeza de tenedor) A2 (FoxA2), en la que las células son transgénicas y comprenden un marcador seleccionable o cribable bajo el control de un promotor panneural.
- 5 2.- La población de la reivindicación 1, que comprende al menos 500 000 células, preferentemente que comprende al menos 1 millón de células.
- 3.- La población de la reivindicación 1 o 2, en la que al menos aproximadamente el 10 %, preferentemente al menos aproximadamente el 50 %, de las células neuronales son positivas para la expresión de tirosina hidroxilasa (TH).
- 10 4.- La población de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el promotor se selecciona de entre un promotor de TuJ-1, Map-2, Dcx, sinapsina, enolasa 2, proteína ácida fibrilar glial o cadena alfa-1A de tubulina, siendo especialmente preferido el promotor Map-2.
- 5.- Un sistema de cultivo de tejidos que comprende una población celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en un medio definido, preferentemente en un medio farmacéuticamente aceptable.
- 15 6.- Una dosis de neuronas dopaminérgicas humanas que comprende más del 80 % de neuronas que son positivas para la expresión de FoxA2 y Lmx1, para su uso como medicamento humano, en el que las neuronas son transgénicas y comprenden un marcador seleccionable o cribable bajo el control de un promotor panneural.
- 20 7.- La población celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de un sujeto, que comprende el trasplante de la población de células al sujeto en condiciones que permiten el injerto *in vivo* de las células, preferentemente en el que el sujeto está diagnosticado de la enfermedad de Parkinson o tiene síntomas de ésta.
- 8.- Un método de selección de un fármaco candidato, que comprende:
- 25 a) proporcionar una población de células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;
- b) poner en contacto a la población con el fármaco candidato; y
- c) determinar el efecto del fármaco candidato sobre la población celular.
- 9.- Un método para proporcionar una población enriquecida de neuronas dopaminérgicas (DA) del mesencéfalo que sean positivas tanto para la expresión del factor de transcripción LIM homeobox 1 (Lmx1) como para la expresión de la caja Forkhead A2 (FoxA2) que comprende:
- 30 diferenciar células de una población de células pluripotentes, que son transgénicas y comprenden un marcador seleccionable o cribable bajo el control de un promotor panneural, para proporcionar una población de células de linaje neural;
- diferenciar aún más las células de la población de células de linaje neural para generar una población celular que incluye neuronas del mesencéfalo; y
- 35 purificar células de dicha población celular seleccionando células que expresen el marcador seleccionable o cribable bajo el control de un promotor panneural, para proporcionar una población enriquecida de neuronas DA del mesencéfalo.
- 10.- El método de la reivindicación 9, en el que el marcador seleccionable o cribable está integrado en el genoma de las células y/o en el que el promotor panneural es un promotor de TuJ-1, Map-2, Dcx, sinapsina, enolasa 2, proteína ácida fibrilar glial, o cadena alfa-1A de tubulina, especialmente preferido el promotor Map-2 y/o en el que el marcador seleccionable es un marcador de resistencia a fármacos y la selección consiste en la selección con fármacos de células que expresan un marcador de resistencia a fármacos y/o en el que la purificación de las células utilizando un marcador comprende la purificación por afinidad de células que comprenden un marcador de superficie expresado a partir de un promotor panneural.
- 40 11.- El método de la reivindicación 9, que comprende además:
- 45 (a) cultivar una población de células pluripotentes, preferentemente células humanas, en un medio que comprende: un inhibidor de la transducción de señales de BMP; un inhibidor de la transducción de señales de TGFβ; un activador de la transducción de señales de Sonic hedgehog (SHH); y un activador de la transducción de señales de Wnt;

- (b) transferir la población celular a un cultivo en suspensión en un medio que comprende un inhibidor de la transducción de señales de BMP; un activador de la transducción de señales de SHH; y un activador de la transducción de señales de Wnt, formando así agregados celulares;
- 5 (c) disociar los agregados celulares y sembrar las células disociadas en un cultivo de matriz para obtener una población de células de linaje neural;
- (d) diferenciar aún más la población de células de linaje neuronal en un medio de maduración que comprende factores de maduración neuronal para generar una población celular que incluye neuronas del mesencéfalo; y
- 10 (e) purificar las células utilizando un marcador, expresado a partir de un promotor panneural, para obtener una población enriquecida de neuronas del mesencéfalo.
- 12.- Un método para proporcionar una población enriquecida de neuronas dopaminérgicas (DA) del mesencéfalo que sean positivas tanto para la expresión del factor de transcripción LIM homeobox 1 (Lmx1) como para la expresión de la caja Forkhead A2 (FoxA2) que comprende:
- 15 diferenciar una población de células pluripotentes, que son transgénicas y comprenden un marcador seleccionable o cribable bajo el control de un promotor panneural, preferentemente células humanas, en una población de células de linaje neural en un medio que comprende un inhibidor de MEK y que no contiene FGF8b añadido exógenamente; y
- diferenciar aún más las células de la población de células de linaje neural para proporcionar una población enriquecida de neuronas DA del mesencéfalo,
- 20 en el que las células comprenden un marcador seleccionable o cribable bajo el control de un promotor panneural.
- 13.- El método de la reivindicación 9 o 12, en el que la diferenciación de las células en una población de células de linaje neural comprende cultivar una población de células pluripotentes en un medio que no contiene FGF8b añadido exógenamente y que comprende un inhibidor de la transducción de señales de BMP; un inhibidor de la transducción de señales de TGF $\beta$ ; un activador de la transducción de señales de Sonic hedgehog (SHH); un activador de la transducción de señales de Wnt y un inhibidor de MEK, preferentemente cultivando una población de células pluripotentes en un medio que comprende además un inhibidor de MEK y/o FGF8.
- 25 14.- El método de la reivindicación 12, que comprende además:
- (a) cultivar una población de células pluripotentes, preferentemente células de un paciente con un síntoma de la enfermedad de Parkinson en un medio que comprende: un inhibidor de la transducción de señales de BMP; un inhibidor de la transducción de señales de TGF $\beta$ ; un activador de la transducción de señales de Sonic hedgehog (SHH); un activador de la transducción de señales de Wnt y que no contiene FGF8b añadido exógenamente;
- 30 (b) transferir la población celular a un cultivo en suspensión en un medio que no contiene FGF8b añadido exógenamente y que comprende un inhibidor de la transducción de señales de BMP; un activador de la transducción de señales de SHH; un activador de la transducción de señales de Wnt; un inhibidor de MEK; y que no contiene FGF8b añadido exógenamente, formando así agregados celulares;
- (c) disociar los agregados celulares y sembrar las células disociadas en un cultivo de matriz; y
- 35 (d) diferenciar aún más las células para generar una población enriquecida de neuronas DA del mesencéfalo.
- 40 15.- El método de las reivindicaciones 9 o 14, en el que el método no comprende la purificación de células utilizando un marcador específico de DA y/o en el que la población enriquecida de neuronas DA del mesencéfalo comprende al menos  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  o  $1 \times 10^6$  células neuronales DA del mesencéfalo.
- 45 16.- Una población de neuronas DA del mesencéfalo con expresión positiva del factor de transcripción LIM homeobox 1 (Lmx1) y de la caja Forkhead A2 (FoxA2) producida por un método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en el que las neuronas son transgénicas para que comprendan un marcador seleccionable o cribable bajo el control de un promotor panneural.
- 17.- La población de células de la reivindicación 16 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto, que comprende trasplantar al sujeto una población de neuronas DA del mesencéfalo de la reivindicación 16 producidas por los métodos de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 en condiciones que permitan el injerto *in vivo* de las células.
- 50 18.- Un método de selección de un fármaco candidato, que comprende:

- a) proporcionar una población de neuronas DA del mesencéfalo de la reivindicación 16 o producidas por los métodos de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15;
- b) poner en contacto la población de neuronas DA del mesencéfalo con el fármaco candidato; y
- c) determinar el efecto del fármaco candidato sobre la población celular.
- 5 19.- Una población de células que comprenden neuronas DA del mesencéfalo que son positivas tanto para la expresión del factor de transcripción LIM homeobox 1 (Lmx1) como para la expresión de la caja Forkhead A2 (FoxA2), estando compuesta la población por al menos un 50 % de neuronas del mesencéfalo y un 50 % de neuronas DA, en la que las células son transgénicas y comprenden un marcador seleccionable o cribable bajo el control de un promotor panneural.
- 10 20.- Una población de células que comprenden neuronas DA del mesencéfalo que son positivas tanto para la expresión del factor de transcripción LIM homeobox 1 (Lmx1) como para la expresión de la caja Forkhead A2 (FoxA2) en una solución de congelación estable, estando compuesta la población por al menos un 50 % de neuronas viables del mesencéfalo y un 50 % de neuronas DA después de un ciclo de congelación y descongelación, en la que las células son transgénicas y comprenden un marcador seleccionable o cribable bajo el control de un promotor panneural.
- 15 21.- La población de la reivindicación 19 o 20, en la que la población comprende células neuronales DA del mesencéfalo que comprenden un primer casete de expresión que codifica un primer gen marcador bajo el control de un promotor panneural.

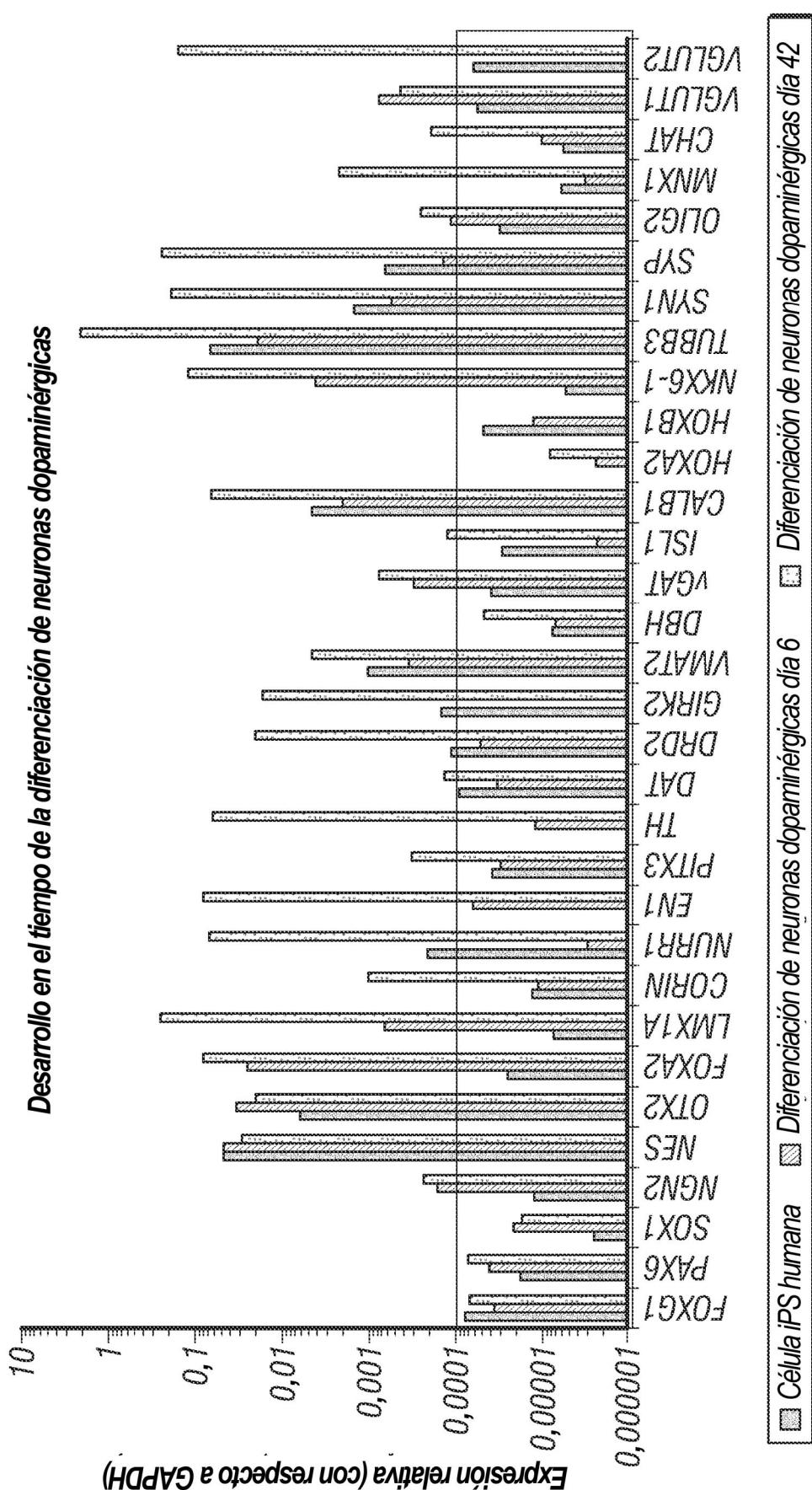
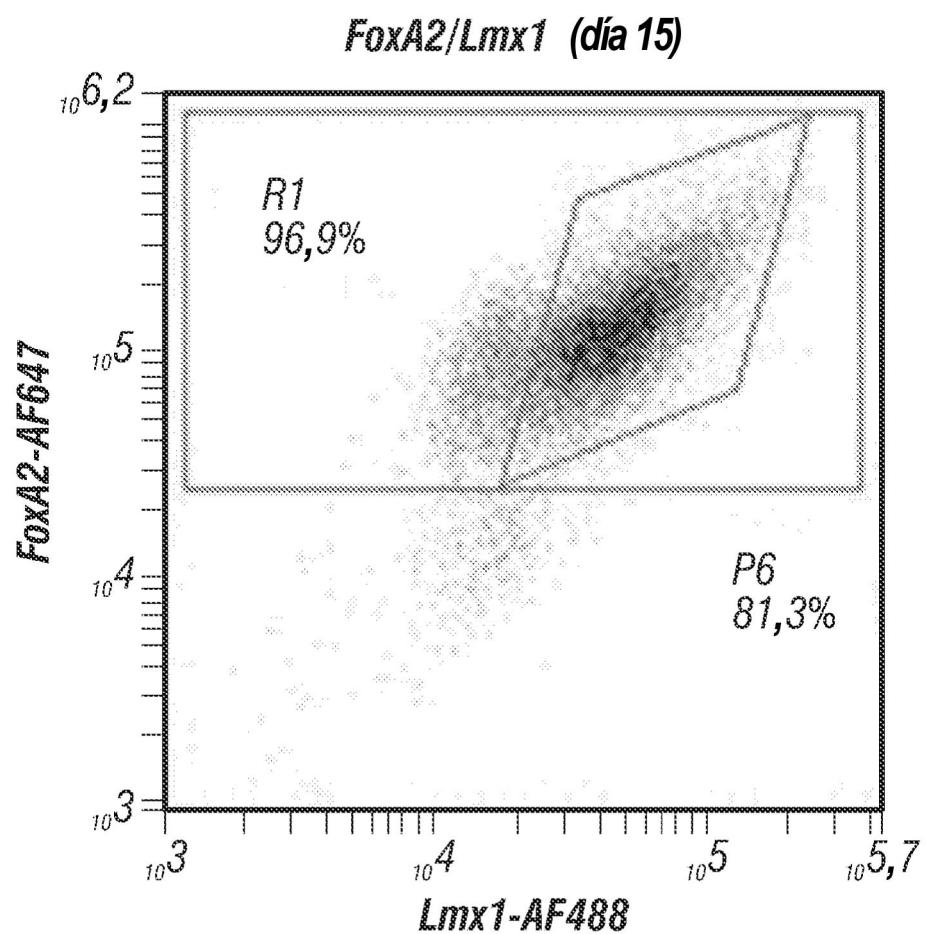
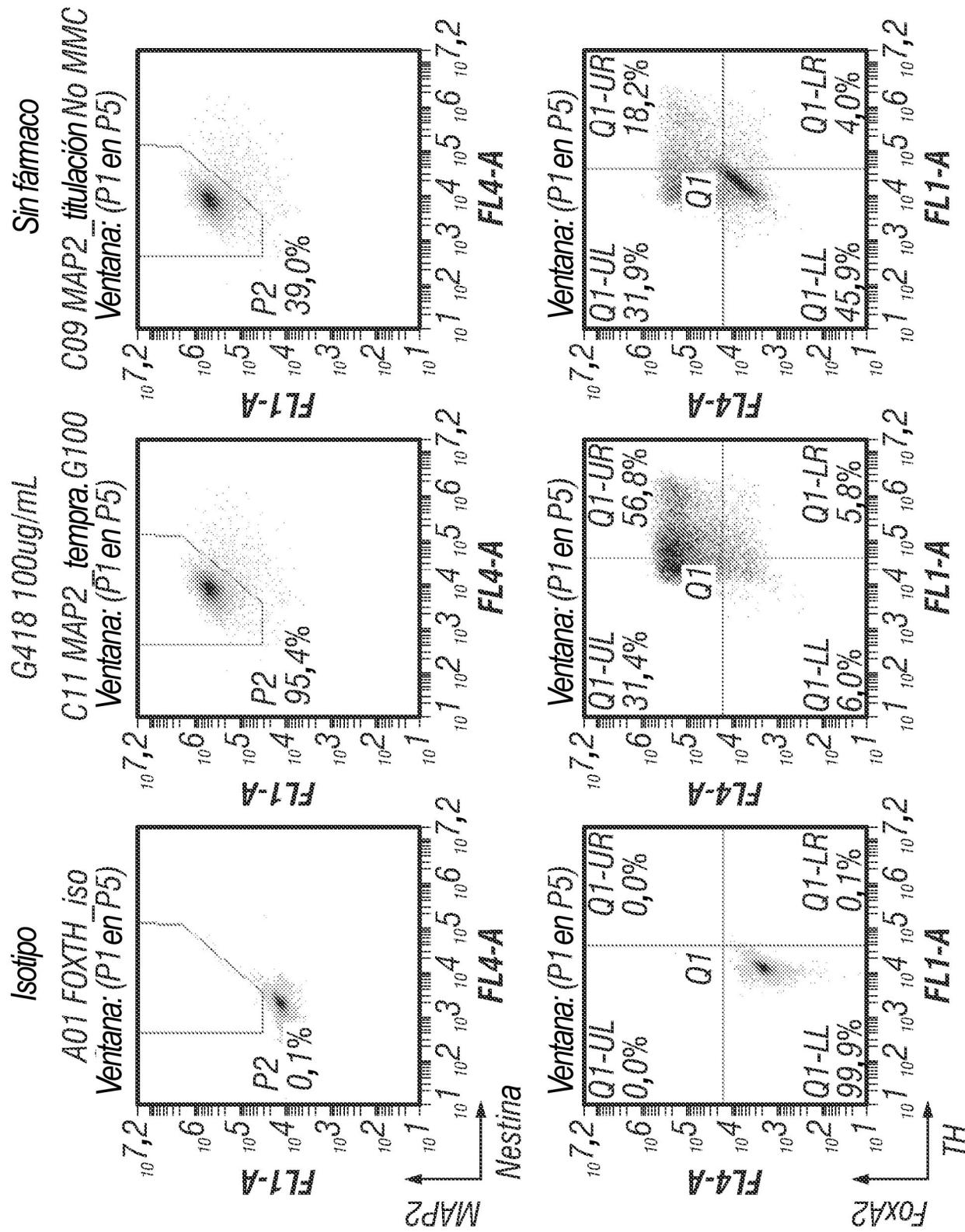


FIG. 1



*FIG. 2*



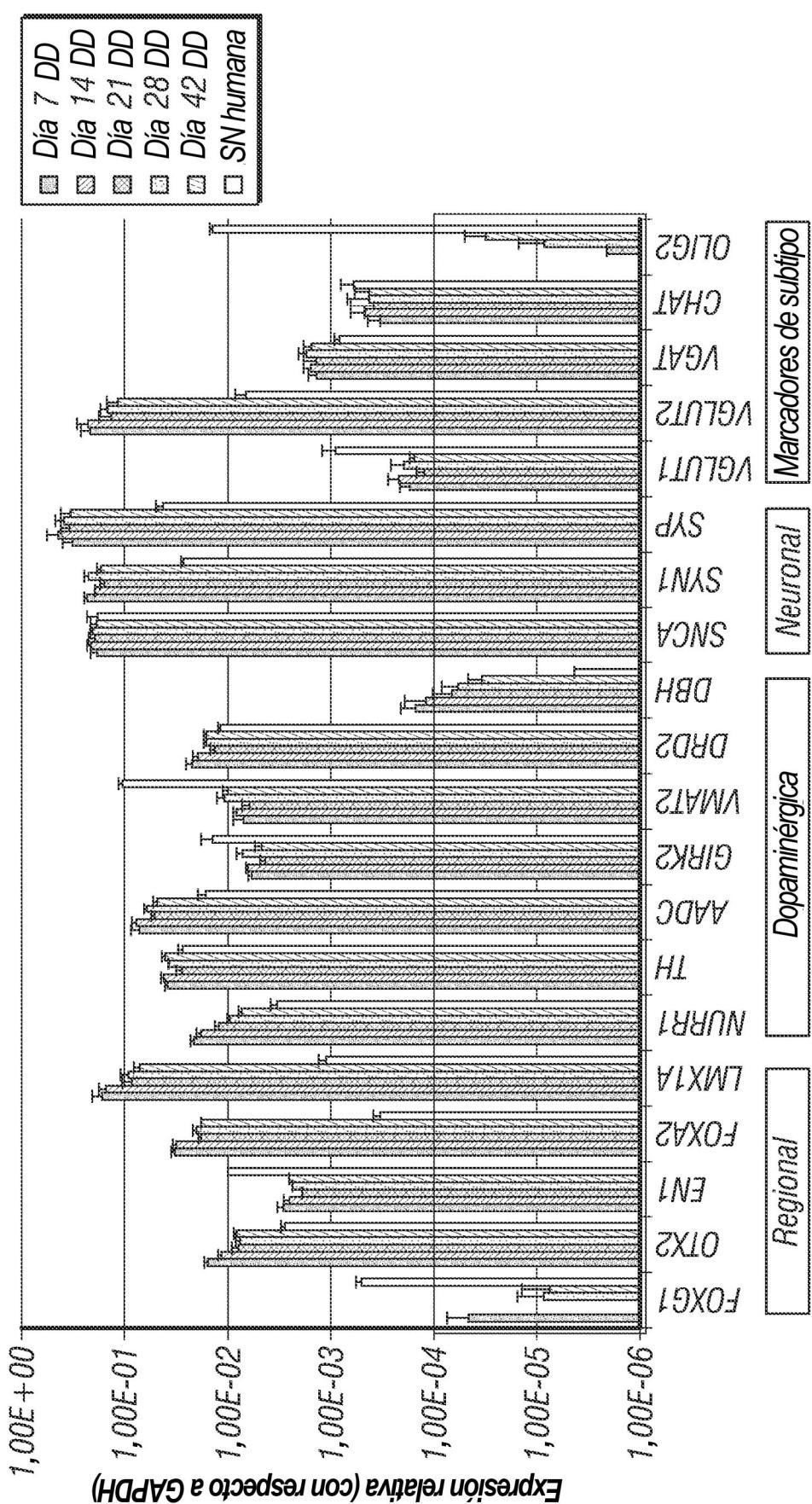


FIG. 4

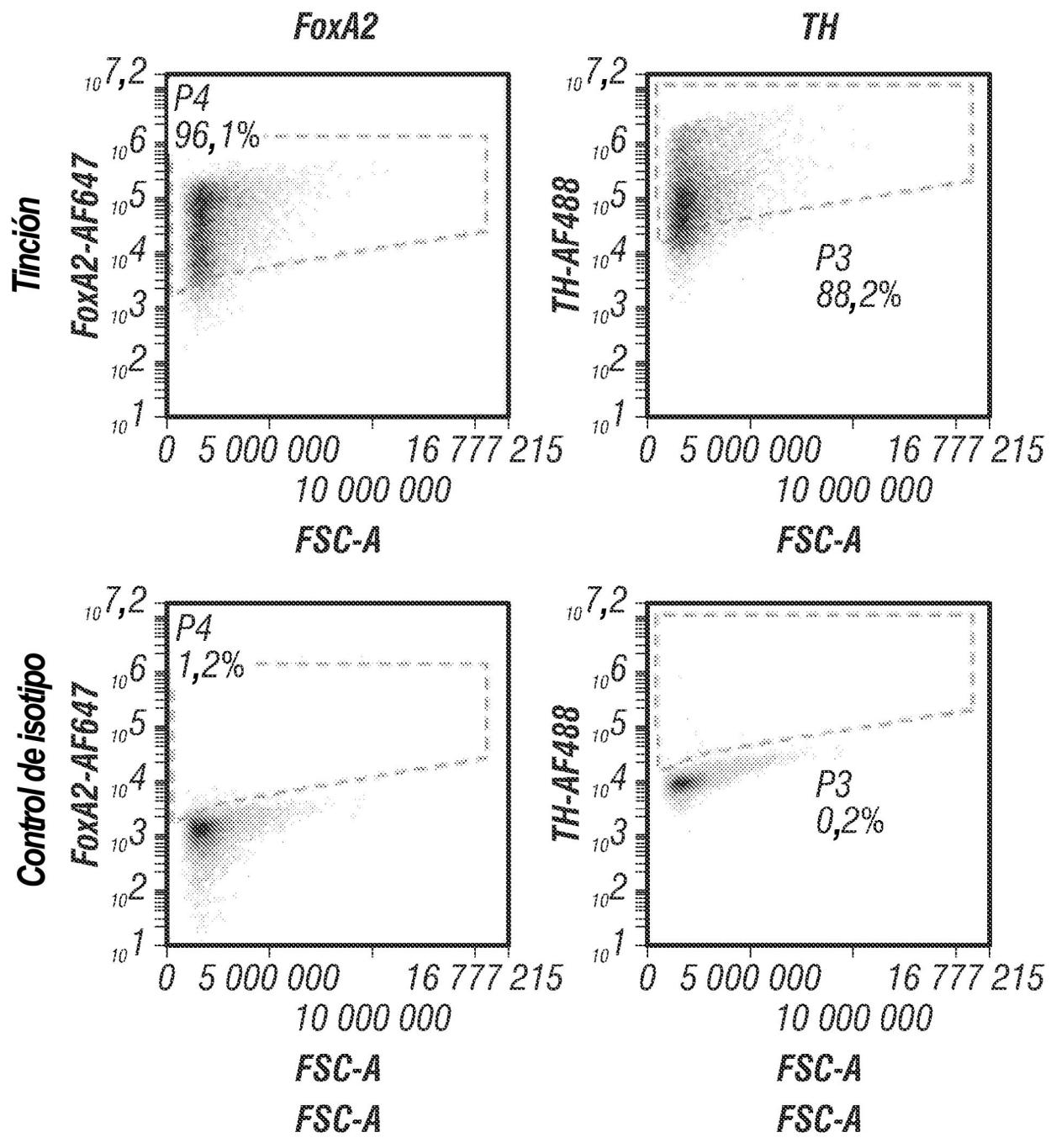
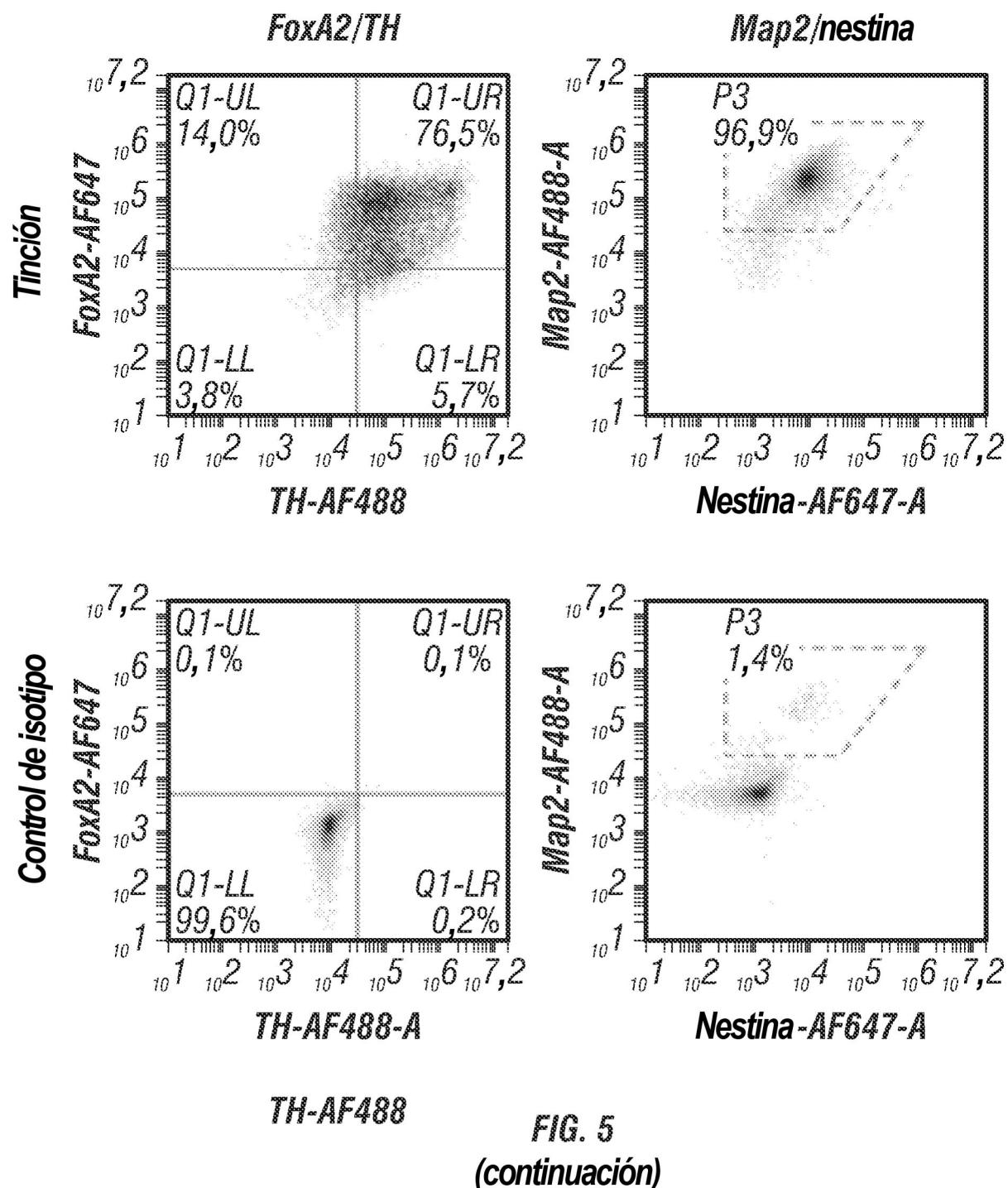


FIG. 5



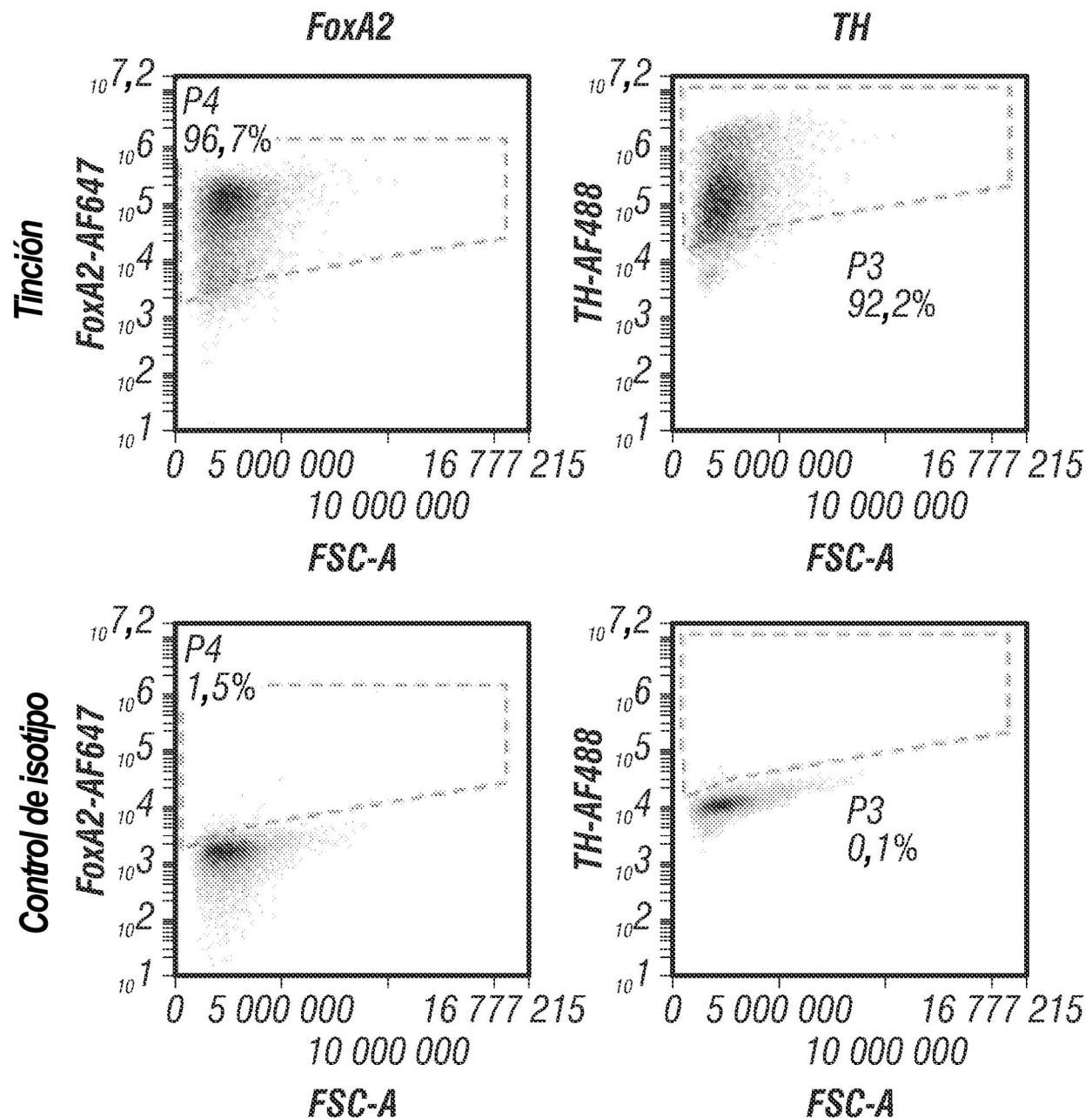
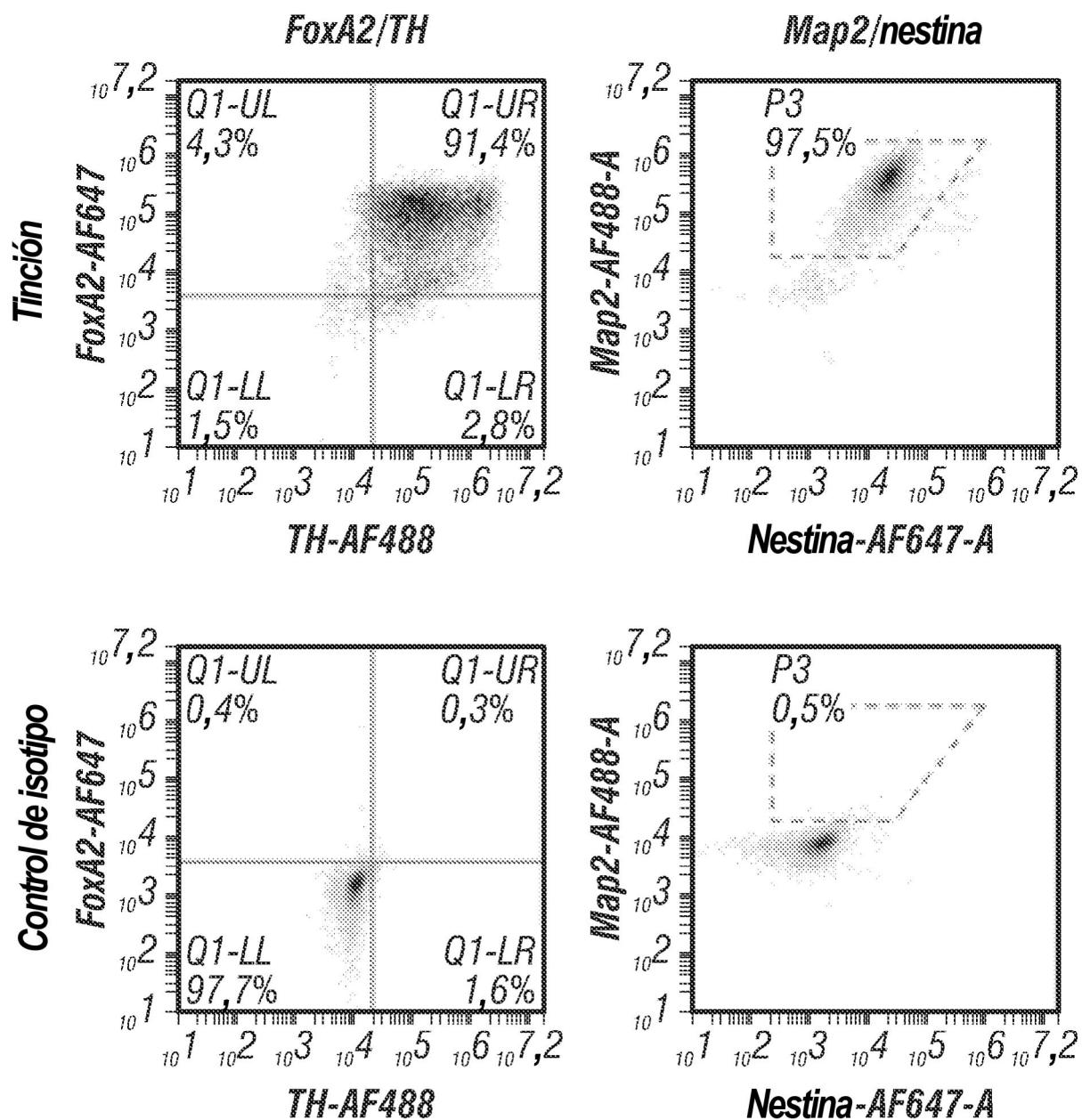


FIG. 6



**FIG. 6**  
**(continuación)**

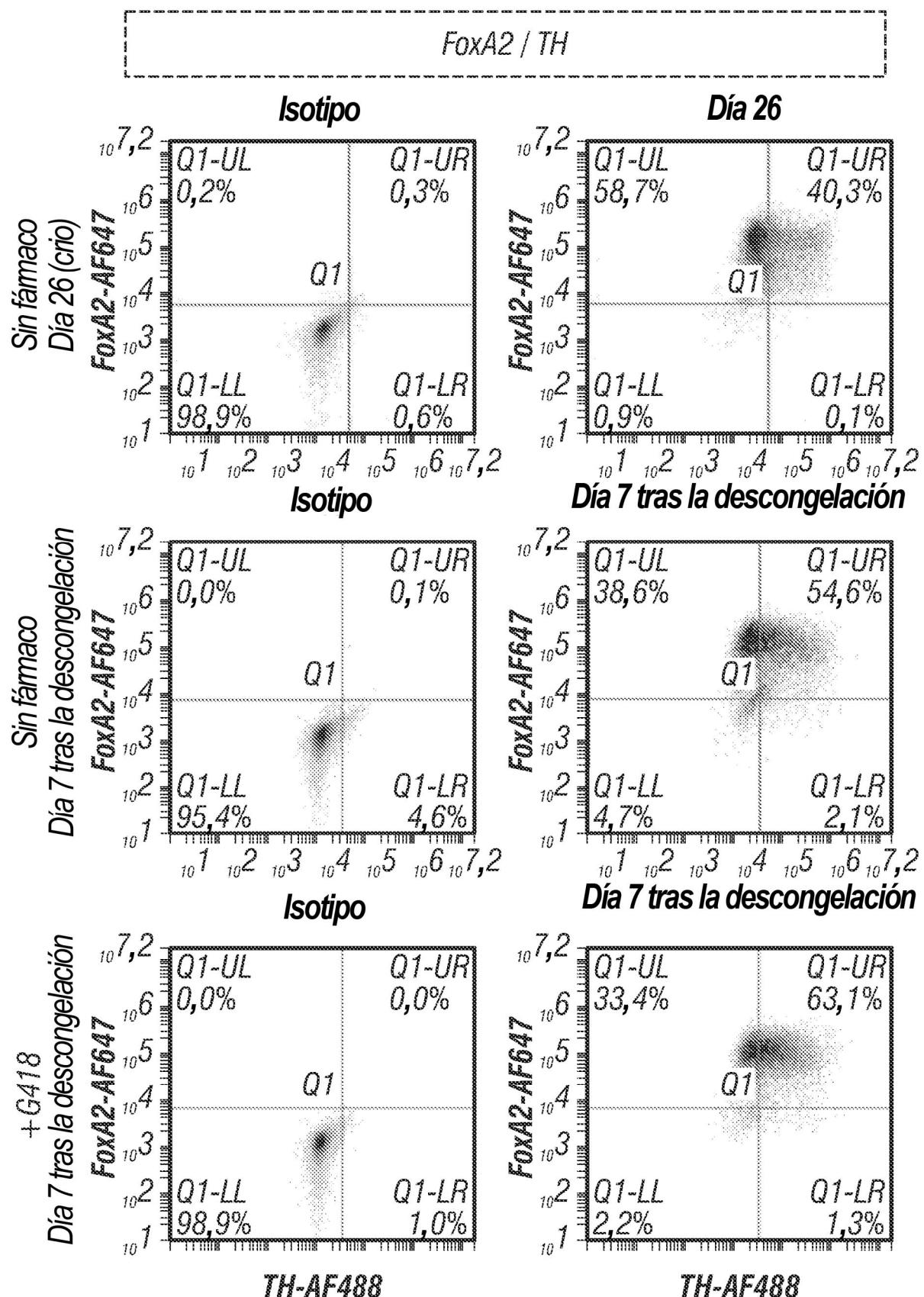
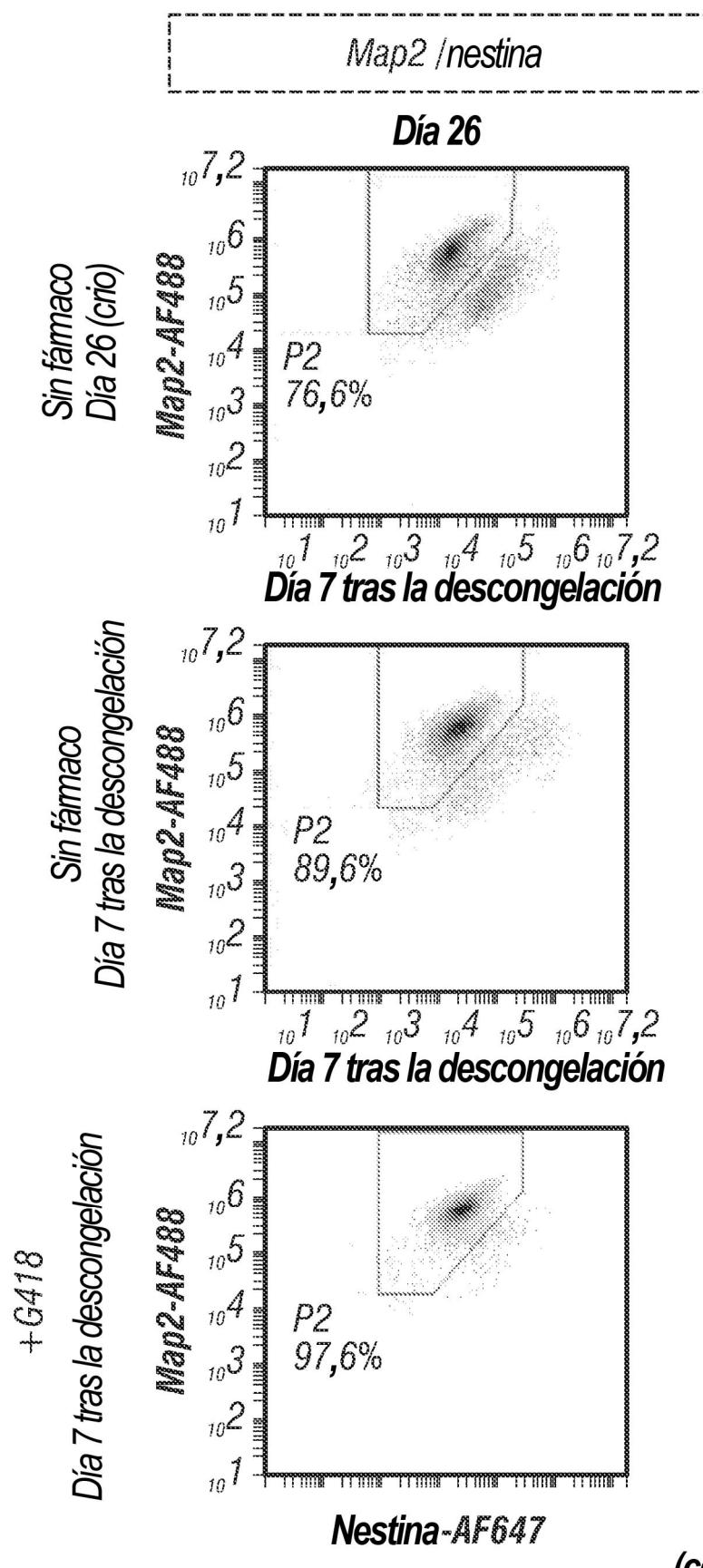


FIG. 7



**FIG. 7**  
**(continuación)**

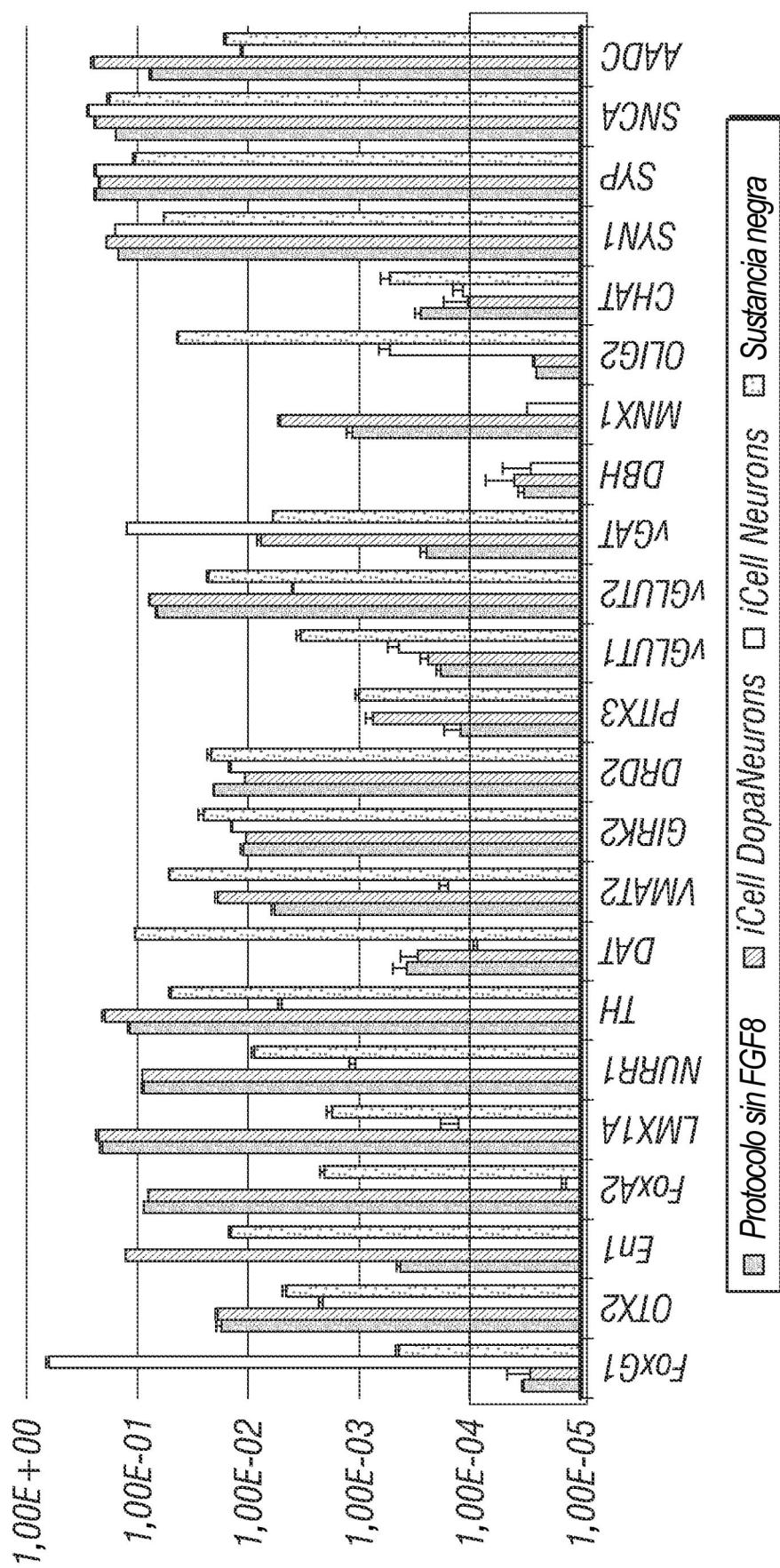
*Comparación de la expresión génica de variaciones del protocolo*

FIG. 8