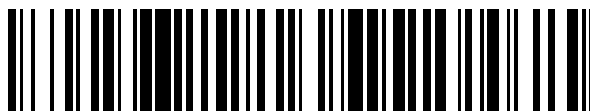


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 730**

51 Int. Cl.:

C12N 5/079 (2010.01)

C12N 5/073 (2010.01)

C12N 5/0793 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2014 PCT/JP2014/080966**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15076388**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014 E 14863861 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3072960**

54 Título: **Método para producir telencéfalo o tejido progenitor del mismo**

30 Prioridad:

22.11.2013 JP 2013242394

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

25.11.2019

73 Titular/es:

**RIKEN (50.0%)
2-1, Hirosawa, Wako-shi
Saitama 351-0198, JP y
SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**KADOSHIMA, TAISUKE;
SAKAGUCHI, HIDEYA y
SASAI, YOSHIKI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 732 730 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para producir telencéfalo o tejido progenitor del mismo

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una técnica para inducir la diferenciación de una célula madre pluripotente a telencéfalo o a un tejido progenitor del mismo *in vitro*.

Antecedentes

10 La corteza de los mamíferos tiene una estructura multicapa (capas I-VI) que se forma gradualmente durante la corticogénesis fetal (documento no de patente 1). La corteza se deriva del neuroepitelio del telencéfalo dorsal (o palio) y se evagina seguidamente para formar una vesícula cerebral semiesférica en cada lado lateral (figura 17A) (documento no de patente 2). El lado dorsocaudal de la corteza está flanqueado por el reborde cortical, mientras que su lado ventrorrostral limita con la eminencia ganglionar lateral (EGL; cuerpo estriado) y el septo a través de la paleocorteza. Entre las seis capas que se encuentran en el adulto, está presente la capa I (su primordio fetal se denomina zona marginal (ZM); figura 17B), ya que esta capa, que es la más superficial, está compuesta principalmente por células de Cajal-Retzius positivas para reelina, las cuales se derivan fundamentalmente de tejidos vecinos tales como el reborde cortical y el septo (documento no de patente 3) (en el caso de la corteza humana, algunas células positivas para reelina también parecen derivarse directamente del neuroepitelio cortical) (documento no de patente 4). El resto de las capas corticales tiene un patrón característico de generación neuronal coordinada espaciotemporalmente, denominado el patrón "de dentro afuera": cuanto más profunda es la capa, más temprano es el nacimiento de las neuronas a partir de progenitores corticales (figura 17B) (documentos no de patente 5, 6).

20 En contraste con la gran cantidad de información disponible sobre la corticogénesis del ratón, la comprensión detallada de la corticogénesis temprana humana sigue siendo difícil de alcanzar debido al limitado acceso a tejidos cerebrales fetales humanos. En nuestro estudio anterior, establecimos un método de cultivo 3D (método SFEBq) de agregados de células madre embrionarias (ME) de ratón y humanas que recapitulaba las etapas tempranas de la corticogénesis (documentos no de patente 7-9). Se ha descrito que este método también se aplica con éxito al cultivo de células madre pluripotentes inducidas (MPi) (documento no de patente 10). Dentro de este agregado flotante autoorganizado derivado de células madre embrionarias humanas (CMEh), se forma por sí mismo un neuroepitelio cortical que desarrolla espontáneamente una zona ventricular, una placa cortical y una zona marginal a los 40-45 días de cultivo. Este neuroepitelio cortical era todavía inmaduro en muchos aspectos, asemejándose a la corticogénesis humana durante el primer trimestre (figura 17C) (documento no de patente 7).

30 Recientemente, se han descrito resultados satisfactorios sobre la inducción de células gliales radiales externas (GRe) dentro del tejido cortical cerebral con estructura multicapa derivado de células madre pluripotentes humanas (documento no de patente 11). Este estudio usa un método de diferenciación no selectiva que puede obtener la especificación de regiones cerebrales de manera estocástica. Este método de diferenciación se caracteriza por el cultivo en rotación de agregados en un matraz giratorio.

35 Lista de documentos

Documentos no de patente

Documento no de patente 1: Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD. (2007) Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. 8: 427-437.

40 Documento no de patente 2: Hebert JM, Fishell G. (2008) The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. *Nat Rev Neurosci* 9: 678-685.

Documento no de patente 3: Bielle F, et al. (2005) Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci*. 8: 1002-1012.

Documento no de patente 4: Bystron I, Blakemore C, Rakic P. (2008) Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci*. 9: 110-122.

45 Documento no de patente 5: Rakic P. (1974) Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science*. 183: 425-427.

Documento no de patente 6: Shen Q. et al. (2006) The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat Neurosci* 9: 743-751.

50 Documento no de patente 7: Eiraku M. et al. (2008) Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* 3: 519-532.

Documento no de patente 8: Watanabe K. et al. (2005) Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci* 8: 288-296.

Documento no de patente 9: Nasu M, et al. (2012) Robust formation and maintenance of continuous stratified cortical neuroepithelium by laminin-containing matrix in mouse ES cell culture. PLoS One 7: e53024.

Documento no de patente 10: Mariani J. et al. (2012) Modeling human cortical development in vitro using induced pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 109: 12770-12775.

- 5 Documento no de patente 11: Lancaster M. et al. (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. Proc Natl Acad Sci USA. 109: 12770-12775.

Compendio de la invención

Problemas que ha de resolver la invención

- 10 La presente invención tiene como objetivo proporcionar una técnica para inducir más telencéfalo maduro o un tejido progenitor del mismo *in vitro* a partir de células madre pluripotentes de mamíferos.

Modo de resolver los problemas

- 15 Los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos y han conseguido una inducción tridimensional más selectiva de tejido cortical cerebral durante largo tiempo optimizando las condiciones de cultivo en un método de inducción de la autoorganización de la corteza cerebral tridimensional humana. Usando este método, la polaridad dorsoventral y la polaridad anteroposterior que se observan en el embrión *in vivo* se formaron espontáneamente con éxito en la corteza cerebral autoorganizada. Adicionalmente, usando el factor de señalización exógeno, se realizó con éxito la inducción selectiva de la diferenciación de una región neural particular a lo largo del eje dorsoventral o anteroposterior, la formación tridimensional continua de tejido cortical cerebral con el tejido adyacente, que es consistente con la relación posicional observada *in vivo*, y la autoorganización selectiva de tejidos periféricos de la corteza.
- 20

Además, cultivando de manera continua los tejidos corticales cerebrales, se formó tridimensionalmente con éxito a lo largo del eje, desde la porción superficial hasta la porción profunda, una estructura multicapa (zona ventricular, zona subventricular, zona subventricular externa, zona intermedia, subplaca, placa cortical profunda, capa cortical superficial, zona marginal) observada en la corteza cerebral humana en el segundo trimestre.

- 25 Además, al modificar las condiciones de cultivo, se realizó con éxito la inducción de tejidos distintos de la corteza cerebral, tales como ganglio basal, hipocampo, plexo coroideo y similares.

Los presentes inventores han llevado a cabo más estudios basados en los resultados mencionados anteriormente y completado la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención es como sigue:

- 30 [1] Un método de producción de un agregado celular que comprende telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o un tejido progenitor del mismo, que comprende obtener un agregado positivo para un marcador telencefálico cultivando un agregado de células madre pluripotentes en suspensión en presencia de un inhibidor de la señal de Wnt y un inhibidor de la señal de TGFβ y seguir cultivando el agregado positivo para el marcador telencefálico en suspensión en condiciones de alta presión parcial de oxígeno, en donde el tejido parcial de telencéfalo es corteza cerebral, ganglio basal, hipocampo, plexo coroideo, o un tejido progenitor de los mismos.
- 35

[2] El método de producción de [1], en donde el cultivo en suspensión en condiciones de alta presión parcial de oxígeno se realiza en presencia de un potenciador de la señal de Wnt.

- 40 [3] El método de producción de [1], en donde el cultivo en suspensión en condiciones de alta presión parcial de oxígeno se realiza en presencia de un potenciador de la señal de Wnt y una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénético óseo.

[4] Un método de producción de un agregado celular que comprende telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o un tejido progenitor del mismo, que comprende

- (I) obtener un agregado positivo para un marcador telencefálico cultivando un agregado de células madre pluripotentes en suspensión en presencia de un inhibidor de la señal de Wnt y un inhibidor de la señal de TGFβ,
- 45

(II) seguir cultivando el agregado positivo para el marcador telencefálico obtenido en (I) en suspensión, en presencia de un potenciador de la señal de Wnt y una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénético óseo, y

- (III) seguir cultivando el agregado obtenido en (II) en suspensión, en ausencia de un potenciador de la señal de Wnt y de una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénético óseo, en donde el tejido parcial de telencéfalo es corteza cerebral, ganglio basal, hipocampo o plexo coroideo; y
- 50

en donde el cultivo en suspensión en (II) y (III) se realiza en condiciones de alta presión parcial de oxígeno.

[5] El método de producción de [4], en donde el agregado celular producido comprende, en un neuroepitelio continuo, un tejido cortical cerebral o un tejido progenitor del mismo, un tejido del plexo coroideo o un tejido progenitor del mismo y un tejido hipocámpico o un tejido progenitor del mismo.

5 [6] El método de producción de [4], en donde el agregado celular producido comprende, en un neuroepitelio continuo, un tejido hipocámpico o un tejido progenitor del mismo que comprende un tejido de la circunvolución dentada o un tejido progenitor del mismo y un tejido del cuerno de Amón o un tejido progenitor del mismo.

[7] El método de producción de [6], en donde el tejido hipocámpico o un tejido progenitor del mismo comprende además reborde cortical en el neuroepitelio continuo.

10 [8] El método de producción de [4], en donde el agregado celular producido comprende tejido del cuerno de Amón o un tejido progenitor del mismo.

[9] El método de producción de [1], que comprende además tratar el agregado positivo para un marcador telencefálico con un agonista de la señal de shh; preferiblemente en donde el agregado celular obtenido comprende ganglio basal o un tejido progenitor del mismo.

15 [10] El método de producción de [1], que comprende además tratar el agregado con FGF8 en el cultivo en suspensión en condiciones de alta presión parcial de oxígeno; preferiblemente en donde el agregado celular obtenido comprende corteza cerebral rostral o un tejido progenitor de la misma.

[11] El método de producción de [1], en donde el agregado celular obtenido comprende un tejido cortical cerebral o un tejido progenitor del mismo con una estructura multicapa que comprende una zona marginal, una placa cortical, una subplaca, una zona intermedia, una zona subventricular y una zona ventricular, desde la porción superficial hasta la porción profunda.

20 [12] El método de producción de cualquiera de [1]-[11], en donde

(I) las células madre pluripotentes son células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas; o

(II) las células madre pluripotentes derivan de un ser humano.

25 [13] El método de producción de cualquiera de [1]-[12], en donde el cultivo en suspensión se realiza en ausencia de células alimentadoras.

[14] Un método de producción de una neurona hipocámpica madura que comprende:

(I) obtener un agregado celular que comprende hipocampo o un tejido progenitor del mismo por el método de producción según uno cualquiera de [1] a [13],

30 (II) dispersar el agregado celular obtenido en (I), y

(III) someter posteriormente las células dispersas a un cultivo de adhesión para inducir una neurona hipocámpica madura a partir de las células.

Efecto de la invención

35 Según la presente invención, puede inducirse selectivamente telencéfalo o un tejido parcial del mismo (corteza cerebral, ganglio basal, hipocampo, plexo coroideo, etc.), o un tejido progenitor del mismo, a partir de células madre pluripotentes durante largo tiempo.

Según la presente invención, puede inducirse selectivamente un tejido cortical cerebral o un tejido progenitor del mismo con la polaridad de los ejes dorsoventral y anteroposterior a partir de células madre pluripotentes.

40 Según la presente invención, puede inducirse selectivamente un tejido cortical cerebral o un tejido progenitor del mismo con la estructura multicapa del segundo trimestre a partir de células madre pluripotentes.

Según la presente invención, un tejido cortical cerebral o un tejido progenitor del mismo, un tejido del plexo coroideo o un tejido progenitor del mismo y un tejido hipocámpico o un tejido progenitor del mismo pueden autoorganizarse como tejidos adyacentes a partir de células madre pluripotentes en un neuroepitelio continuo.

45 Según la presente invención, puede inducirse un tejido hipocámpico o un tejido progenitor del mismo que contiene un tejido de la circunvolución dentada o un tejido progenitor del mismo y un tejido del cuerno de Amón o un tejido progenitor del mismo en un neuroepitelio continuo, a partir de células madre pluripotentes.

Según la presente invención, pueden inducirse específicamente en el exterior de la zona subventricular células progenitoras neuronales con las características de las células gliales radiales externas (GRe), las cuales están

presentes en abundancia en la corteza cerebral fetal humana y ausentes en la corteza cerebral del ratón, a partir de células madre pluripotentes humanas.

Breve descripción de los dibujos

5 La figura 1 muestra la inducción de la diferenciación de células madre humanas pluripotentes a tejidos progenitores corticales. (A) Expresión de Foxg1::venus en agregados celulares el día 26. (B) Expresión de Foxg1::venus por las células en el agregado el día 34. (C) Estructura semiesférica similar al neuroepitelio con una cavidad similar a un ventrículo cerebral formada dentro del agregado celular. (D) Expresión de Pax6 en el lado luminal de la estructura neuroepitelial. (E) Expresión de Sox2 en el lado luminal de la estructura neuroepitelial. (F) Expresión de la histona H3 fosforilada (pH3) en el lado más luminal de la estructura epitelial. (G) Expresión de Tuj1 en el lado exterior de la capa celular similar a la zona ventricular. (H) Expresión de Ctip2 en el lado exterior de la capa celular similar a la zona ventricular. (I) Aparición de células de Cajal-Retzius positivas para reelina en el lado exterior de la capa celular similar a la zona ventricular. (J) Expresión de laminina cerca de una capa superficial de los agregados.

15 La figura 2 muestra la inducción de la diferenciación de células madre pluripotentes humanas a tejidos progenitores de los ganglios basales. (A) EGL que expresa Gsh2 formada en el neuroepitelio telencefálico. (B) Neuronas GABAérgicas positivas para GAD65 presentes por debajo del neuroepitelio EGL. (C) EGM que expresa Nkx2.1 formada en el neuroepitelio telencefálico. (D) Expresión de Pax6 en agregados celulares que forman una EGM.

La figura 3 muestra la formación tridimensional continua de corteza cerebral y ganglio basal. (A) EGL que expresa Gsh2 formada en el neuroepitelio telencefálico. (B) Expresión de GAD65 en la EGL formada en el neuroepitelio telencefálico. (C) Neuroepitelio cortical positivo para Pax6 formado de manera continua con el neuroepitelio EGL.

20 La figura 4 muestra la inducción de la diferenciación de células madre pluripotentes humanas a tejido del plexo coroideo. (A) Expresión de TTR y Lmx1a en tejido del plexo coroideo inducido a partir de células madre pluripotentes. (B) Expresión de Otx2 en tejido del plexo coroideo inducido a partir de células madre pluripotentes. No se observa la expresión de Foxg1::venus.

25 La figura 5 muestra la inducción de la diferenciación de células madre pluripotentes humanas a reborde cortical. (A) Expresión de Lmx1a en reborde cortical inducido a partir de células madre pluripotentes. No se observa la expresión de TTR. (B) Expresión de Otx2 en reborde cortical inducido a partir de células madre pluripotentes. Se formaron agregados compuestos principalmente de neuroepitelio débilmente positivo para Foxg1::venus.

30 La figura 6 muestra la formación continua de plexo coroideo, tejido progenitor hipocámpico y tejido progenitor cortical. (A) Agregados celulares que contienen a la vez neuroepitelio positivo para Foxg1::venus y neuroepitelio negativo para Foxg1::venus. (B) Expresión de Bf1(Foxg1)::venus en un agregado celular que contiene plexo coroideo, tejido progenitor hipocámpico y tejido progenitor cortical. (C) Expresión de Lmx1a y Lef1 en agregados celulares que contienen plexo coroideo, tejido progenitor hipocámpico y tejido progenitor cortical.

35 La figura 7 muestra la inducción de la diferenciación de células madre pluripotentes a tejido progenitor hipocámpico. (A-D) Expresión de Bf1(Foxg1)::venus (A), Lmx1a (B), Prox1 y Zbtb20 (C) y Nrp2 (D) en un agregado celular el día 61. (E-H) Expresión de Foxg1::venus, Lmx1a y Lef1 (E), Zbtb20 (F), Prox1 (G) y Prox1 y Zbtb20 (H) en un agregado celular el día 75.

40 La figura 8 muestra un cultivo de dispersión en placa de un tejido hipocámpico 3D inducido a partir de células ME humanas. (A) Expresión del marcador de hipocampo Zbtb20 en células positivas para MAP2 con dentritas neuronales. (B) Expresión de Bf1(Foxg1)::venus en células positivas para Zbtb20. (C) Expresión del marcador de astrocitos GFAP en células positivas para Zbtb20 que tienen morfología similar a las células gliales. (D) Patrón de expresión del marcador de células granulares dentadas Prox1 y el marcador de células piramidales CA3 KA1 entre regiones de hipocampo en cultivo de dispersión. La expresión de Prox1 se observa en células compactas con un diámetro del cuerpo celular de aproximadamente 5-10 µm y la expresión de KA1 se observa en células grandes con una morfología similar a la de las células piramidales y un diámetro del cuerpo celular de 10-20 µm. (E) Expresión de Bf1(Foxg1)::venus en las células de la figura D. Barra: 200 µm (A, B), 100 µm (C), 10 µm (D, E).

50 La figura 9 muestra imágenes de calcio y análisis electrofisiológico de tejidos progenitores hipocámpicos después de un cultivo de dispersión a largo plazo. (A-A') muestra una imagen de expresión de señales y una imagen de campo claro de la misma en imágenes de calcio. (B) muestra diversos patrones de respuesta en el tiempo a señales de calcio en las células respectivas. (C-C') Imagen de campo claro en una prueba electrofisiológica. (D) Respuesta de corriente eléctrica de sodio-potasio. (E) Potencial de acción inducido. (F) Corriente sEPSC y su inhibición por DNQX. Barra: 50 µm (C, C').

55 La figura 10 muestra la inducción de la diferenciación de células madre pluripotentes humanas a un tejido progenitor cortical con una estructura multicapa similar a la del segundo trimestre. (A y A') Secciones de un neuroepitelio cortical derivado de células madre pluripotentes humanas del día 70. A' muestra inmunotinciones para Ctip2 y Pax6. Se observó una clara separación entre zona ventricular (Pax6+), zona subventricular, zona intermedia y placa cortical (Ctip2+), incluso en la vista de poca ampliación. (B-H') Inmunotinción de la corteza del día 70 con marcadores específicos de las zonas. (I) Grosor total del neuroepitelio cortical (NE cortical) y grosor de la zona ventricular (ZV) y

la placa cortical (PC) los días 70 y 91. (J-P) Inmunotinción del neuroepitelio cortical del día 91 con marcadores específicos de las zonas. (Q) Esquema de la estructura laminar observada en un cultivo a largo plazo de neuroepitelio cortical derivado de CMEh.

5 La figura 11 muestra la formación axial espontánea en la corteza cerebral y el control por un factor exógeno. (A-F) muestran la expresión de Coup-TF1 (A), Lhx2 (B), Coup-TF1 y Lhx2 (C), Coup-TF1 y Zic1 (D), Coup-TF1 y Otx2 (E), Coup-TF1 y Erk fosforilado (F) en un agregado celular el día 42. (G) Atenuación de la expresión de Coup-TF1 por el tratamiento con FGF8b. (H) Aumento de la expresión de SP8 en toda la zona ventricular por el tratamiento con FGF8b. (I) Cambios en el patrón de expresión de Coup-TF1 y Sp8 por el tratamiento con FGF8b.

10 La figura 12 muestra la polaridad axial en un neuroepitelio cortical autoorganizado a partir de CMEh. (A) Agregados de CMEh que contienen neuroepitelio cortical visualizado con foxg1::Venus el día 26. (B) Análisis FACS representativo para poblaciones positivas para foxg1::Venus. (C-J) Inmunotinción de estructuras corticales semiesféricas autoformadas a partir de CMEh foxg1::venus. ZV, zona ventricular. (K-N) Autoformación de polaridad axial observada en neuroepitelio cortical derivado de CMEh. Se localizaron tejidos similares al reborde cortical (Otx2+; M) en la región flanqueante del neuroepitelio cortical en el lado más intenso para los marcadores dorsocaudales Coup-TF1 (K) y Lhx2. (N) Un mayor nivel de las señales de pErk se observó en el lado opuesto al de la expresión de Coup-TF1. El gradiente y la polaridad de la expresión se indican por triángulos. Punta de flecha, zona ventricular (ZV) (nótese que los gradientes de expresión de los marcadores se observan en la zona ventricular). (O y P) El tratamiento con FGF8 inhibió Coup-TF1 y amplió la expresión del marcador ventrorrostral Sp8. (Barras de escala, 1 mm en A; 200 µm en C-P). Contraintinción nuclear (azul), DAPI.

20 La figura 13 muestra morfogénesis de redondeamiento asimétrico en un neuroepitelio cortical autoorganizado. (A-I) Progresión asimétrica de la morfogénesis de redondeamiento de un neuroepitelio cortical derivado de CEMh. Las flechas indican el límite de un dominio de neuroepitelio cortical en A y de un epitelio enrollado en B-D. Las puntas de flecha indican el epitelio enrollado en E. Las flechas indican movimientos de redondeamiento del neuroepitelio en F-I. (J-L) Efecto del inhibidor de ROCK Y-27632 en el enrollamiento del neuroepitelio cortical. (L) Atenuación de la morfogénesis de enrollamiento con el inhibidor de ROCK. ***P < 0,001 en el análisis de la tabla de contingencia (2 x 2) con la prueba de exactitud de Fisher. Grupo de tratamiento, n = 187 dominios neuroepiteliales; grupo de control, n = 130. (M y N) La forma enrollada se observó preferiblemente en el lado con intensa expresión de Otx2 y Coup-TF1 (marcadores dorsal y caudal). (O-Q) Formación adyacente de estructuras neuroepiteliales de la corteza (Pax6+) y EGL (Gsh2+; con neuronas GABAérgicas GAD65+ por debajo) el día 35. El lado cortical en contacto con el dominio de la EGL se hallaba opuesto al lado con intenso enrollamiento (flecha). (R) Migración nuclear intercinética en el neuroepitelio cortical derivado de CEMh el día 24 (imágenes de dos fotones). Visualizado con una mezcla parcial de CEMh marcadas con pax6::venus y CMEh sin marcar. Se generaron dos células hijas con procesos apical y basal a partir de un progenitor en división apical. (Barras de escala, 200 µm en A; 100 µm en B-H y J-N; 200 µm en O-Q). Contraintinción nuclear (azul), DAPI.

35 La figura 14 muestra la autoformación de múltiples zonas en un neuroepitelio cortical derivado de CMEh. (A y A') Secciones de neuroepitelio cortical derivado de CMEh del día 70. Se observó una clara separación entre zona ventricular (Pax6+), zona subventricular, zona intermedia y placa cortical (Ctip2+) incluso en la vista de poca ampliación. (B-H') Inmunotinción del neuroepitelio cortical del día 70 con marcadores específicos de las zonas. (I) Grosor del neuroepitelio cortical (NE cortical) y grosor de la zona ventricular (ZV) y la placa cortical (PC) los días 70 y 40 91. **P < 0,01; ***P < 0,001, pruebas t de Student entre muestras de neuroepitelio cortical del día 70 y muestras de neuroepitelio cortical del día 91 (n = 6, en cada caso). (J-O) Inmunotinción de neuroepitelio cortical del día 91 con marcadores específicos de las zonas. (P) Esquema de la estructura laminar observada en un cultivo a largo plazo de neuroepitelio cortical derivado de CMEh. (Barras de escala, 400 µm en A; 50 µm en B-H"; 100 µm en J-O). Barras en el gráfico, EEM. Contraintinción nuclear (azul), DAPI.

45 La figura 15 muestra la localización sesgada basalmente de neuronas corticales Satb2+ y Brn2+ en la placa cortical. (A-H) Las neuronas corticales positivas para Satb2 y Brn2 (marcadores de capas superficiales) se localizaron preferiblemente en la porción basal (superficial) de la placa cortical derivada de CMEh el día 91 del cultivo. La mayor parte de las células Satb2+ localizadas basalmente eran negativas para el marcador de las capas profundas Tbr1. (H) Distribución de neuronas positivas para el marcador dentro de la placa cortical. Para las posiciones relativas, se definieron los límites apical y basal de la placa cortical como 0 y 100, respectivamente. ***P < 0,001. Prueba de Mann-Whitney. Línea roja, mediana. Neuronas contadas: Tbr1+ (n = 105), Satb2+ (n = 58), Ctip2+ (n = 87) y Brn2+ (n = 86). (I-L) Estudio de marcaje de pulso doble usando EdU (día 50; rojo; n = 36) y BrdU (día 70; blanco; n = 53). Análisis por inmunotinción el día 91. El análisis estadístico se hizo como en H. (M-O) El marcador de neuronas corticales maduras CaMKIIα se expresó preferiblemente en neuronas Tbr1+ localizadas en la porción profunda de la placa cortical el día 55 112. Las neuronas corticales se cultivaron en un filtro Transwell durante los días 78-112 para asegurar la supervivencia de las neuronas maduras. (O) La representación gráfica se hizo como en H. ***P < 0,001. Prueba de Kruskal-Wallis con una prueba de comparación múltiple post hoc. Número de neuronas contadas: Tbr1+ (n = 293), Satb2+ (n = 177) y CaMKIIα (n = 132). (P) Esquema de distribuciones neuronales dentro del neuroepitelio cortical derivado de CMEh los días 91 y 112. (Barras de escala, 100 µm en A-C, E-G e I-K; 50 µm en D; 200 µm en M y N). Contraintinción nuclear (azul), DAPI.

60 La figura 16 muestra la aparición de progenitores de tipo GRe. (A-F) Porcentajes de células madre/progenitores

neurales apicales con escisiones vertical (ángulo de escisión de 60-90 °) y no vertical (0-30 ° y 30-60 °) (A y B) en el neuroepitelio cortical derivado de CMEh el día 70 (C) y el día 91 (D-F). P-vimentina, marcador de la fase M. Punta de flecha, pericentrina. Células analizadas: n = 42 (día 70) y n = 33 (día 91). (G-I) Células madre/progenitores neurales basales (Pax6+, Sox2+) y células madre/progenitores neurales intermedios (Tbr2+) en la ZSV el día 91 de cultivo. (H) Porcentajes de células madre neurales/progenitores Sox2+/Tbr2- y Sox2-/Tbr2+ dentro de todas las células madre/progenitores neurales (Sox2+ y/o Tbr2+) en la placa cortical. El porcentaje de células madre/progenitores neurales Sox2+/Tbr2- aumentó del día 70 al día 91, mientras que el de las células madre/progenitores neurales Sox2-/Tbr2+ disminuyó proporcionalmente. ***P < 0,001, pruebas t de Student entre muestras del día 70 y el día 91. Se contaron las células madre/progenitores neurales fuera de la zona ventricular de cuatro dominios de neuroepitelio cortical para cada día. (I) El día 91, las células madre/progenitores neurales Sox2+/Tbr2- tendieron a localizarse más alejadas de la superficie ventricular que las células madre/progenitores neurales Sox2-/Tbr2+ (derecha). ***P < 0,001, prueba de Mann-Whitney. Línea roja, mediana. (J-M) Las células madre/progenitores neurales Pax6+/p-vimentina+ tenían un largo proceso basal que se extendía hacia la pía, pero no un proceso apical (J y J'), mientras que estas células madre/progenitores neurales eran negativos para Tbr2 (K y K'). La mayoría (>70 %) de estas células madre/progenitores neurales que tenían un proceso basal mostró un tipo de ángulo de escisión horizontal (60-90 °; L y M) (n = 37). (Barras de escala, 100 µm en D; 25 µm en E, 50 µm en G, J y K; 10 µm en L). Barras en el gráfico, EEM. Contraintinción nuclear (azul), DAPI.

La figura 17 muestra el desarrollo del neuroepitelio cortical fetal. (A) Esquema del telencéfalo fetal en desarrollo. (B) Esquema de la estructura estratificada del neuroepitelio cortical fetal al principio del segundo trimestre de la gestación humana (aproximadamente la 13.^a semana embrionaria). (C) Esquema de la estructura laminar del neuroepitelio cortical generada en el cultivo de CMEh autoorganizativo anterior. La estructura es similar a la arquitectura cortical humana durante el primer trimestre.

La figura 18 muestra la polaridad axial en el neuroepitelio cortical derivado de CMEh. (A) Esquema de procedimientos de cultivo mejorados. (A') Comparación de la formación de agregados de CMEh el día 7. (Arriba) El cultivo anterior del presente inventor; (abajo) el cultivo mejorado, que promovió la formación de agregados lisos sin dividir a partir de CMEh disociadas. (B) Porcentajes de agregados de CMEh (día 26) que contenían neuroepitelio con señales de foxg1::Venus. ***P < 0,001, pruebas t de Student. (C) Análisis FACS representativo para poblaciones foxg1::Venus+. Gris, control (día 1 de cultivo); rojo, el día 34 de cultivo en las condiciones anteriores. (D) Señales de inmunotinción de Tbr1 en la placa cortical de neuroepitelio cortical del día 42. (E y F) Localización de marcadores regionales en el telencéfalo fetal de ratón (Foxg1; E). La expresión de Coup-TF1 en el neuroepitelio cortical es intensa en la región dorsocaudal, pero débil en la región ventrorrostral (F). (G) La inmunotinción doble de Coup-TF1 y Lhx2 mostró que sus patrones de expresión tenían un sesgo similar. (H-J) Secciones parasagitales del telencéfalo de ratón en E12.5. Gsh2, marcador de la EGL (eminencia ganglionar lateral) (H); Lmx1a, marcador del reborde cortical y el plexo coroideo (H); Otx2 y Zic1, marcadores del reborde cortical (I y J). (K) La inmunotinción doble de Coup-TF1 y Zic1 demostró que el marcador del reborde cortical Zic1 se expresaba en el tejido flanqueante del neuroepitelio cortical, en el lado con intensa expresión de Coup-TF1. (L) Efectos del tratamiento con FGF8 (días 24-42) sobre la expresión de Coup-TF1 y Sp8. Se determinaron los porcentajes de expresión polarizada (negro), amplia expresión (gris) y señales no detectables (blanco) en las secciones transversales (en la posición del eje más largo) del neuroepitelio cortical. Dado que la determinación fue de esta manera, los porcentajes de expresión polarizada podrían estar ligeramente subestimados. (Barras de escala, 1 mm en A' y B; 200 µm en D, G e I-K; 500 µm en E, F y H). Barras en el gráfico, EEM.

La figura 19 muestra la morfogénesis de redondeamiento y división apical en el neuroepitelio cortical. (A) Morfogénesis de redondeamiento espontáneo de dominios de neuroepitelio cortical en agregados de CMEh: (arriba) día 24; (abajo) día 27. aPKC, marcador apical. (B) Porcentajes de neuroepitelio Pax6+ (cortical) y Gsh2+ (eminencia ganglionar lateral) en neuroepitelio telencefálico Foxg1+ derivado de CMEh. El tratamiento con una concentración moderada de SAG (30 nM; días 15-21; columnas grises) redujo parcialmente el porcentaje de neuroepitelio Pax6+ y aumentó el del neuroepitelio Gsh2+. En estas condiciones, se encontraron dominios relativamente grandes adyacentes de NE Pax6+ y NE Gsh2+. A 500 nM, el tratamiento con SAG inhibió eficientemente la expresión de ambos Pax6 y Gsh2. **P < 0,01 y ***P < 0,001, prueba de Dunnett. (C) Expresión del marcador de la eminencia ganglionar medial Nkx2.1 en neuroepitelio cortical tratado con SAG 500 nM. El neuroepitelio Nkx2.1+ ocupó típicamente el 40-50 % del NE telencefálico Foxg1+. (D) Esquema de la morfogénesis apical en el cultivo de CMEh en comparación con la corteza fetal. (E) Divisiones simétricas de progenitores apicales cerca de la superficie luminal (apical) los días 28-29, los cuales se aproximaron a la superficie luminal antes de su división celular con un ángulo de escisión vertical (véase la figura 14 para la definición) y se movieron basalmente juntos. Visualizado mediante CMEh pax6::venus (en mezcla parcial con CMEh de tipo silvestre). (Barras de escala, 200 µm en A y C). Barras en el gráfico, EEM.

La figura 20 muestra la formación de la subplaca en el neuroepitelio cortical derivado de CMEh. (A-E) Inmunotinción de neuroepitelio cortical derivado de CMEh del día 70. (A y B) Se observaron claras separaciones de las zonas morfológicas en el neuroepitelio cortical incluso mediante una tinción simple con tubulina acetilada (Ac-tubulina); microtúbulos estabilizados), DAPI (tinción nuclear) y nestina (filamentos intermedios de los progenitores neurales). (C-E) Vistas de gran aumento de neuronas calretinina+ (C), neuritas tempranas MAP2+ (D) y de la acumulación de CSPG en la zona intermedia (E) del neuroepitelio cortical. (F) Inmunotinción de marcadores de las zonas en la corteza fetal de ratones E14.5. (G) Inmunotinción de neuroepitelio cortical derivado de CMEh del día 70. No se observó una acumulación sustancial de interneuronas GAD65+ en la placa cortical ni en los axones corticofugales TAG1+. (H-J)

Inmunotinción de neuroepitelio cortical derivado de CMEh del día 91. El neuroepitelio cortical se desarrolló bien y la estructura estratificada se volvió mucho más gruesa (H e I). La placa cortical contenía un cierto número de neuronas de capas superficiales Brn2+ (J). (K) Señales de inmunotinción de Tbr1 en neuroepitelio cortical derivado de CMEh del día 112. (L y M) Expresión del marcador de neuronas corticales maduras CaMKII α en la placa cortical del neuroepitelio cortical derivado de CMEh del día 112. La mayoría de estas neuronas CaMKII coexpresaban Tbr1 (L), pero no Satb2 (M). (Barras de escala, 50 μ m en A, B, G, L y M; 20 μ m en C-E; 100 μ m en F y H-J; 200 μ m en K).

La figura 21 muestra células madre/progenitores neurales de tipo GRe en la ZSve. (A-C) Inmunotinción de Pax6 y Sox2 en células madre/progenitores neurales basales (ZSV) dentro del neuroepitelio cortical derivado de CMEh el día 91. La mayoría de las células positivas para Sox2 expresan Pax6 (C). (D-E) Efectos de la inhibición de la señal de Notch sobre la expresión de células madre/progenitores neurales y marcadores de neuronas en el neuroepitelio cortical. El tratamiento inhibidor de Notch (DAPT 10 μ M, días 70-77) aumentó las células madre/progenitores neurales intermedios Sox2- Tbr2+, mientras que raramente quedaron células Sox2+ Tbr2- después del tratamiento (D y E). Las neuronas Satb2+ también se incrementaron por el tratamiento con DAPT (D y E). Después del tratamiento se observó un aumento del grosor del neuroepitelio cortical (F).***P < 0,001, pruebas t de Student entre el tratamiento con DAPT (n = 6) y sin DAPT (n = 5). (G) Esquema de células madre/progenitores neurales GRe en la ZSV externa fetal humana. (H y H') Las células madre/progenitores neurales fosfovimentina+ en la ZSV expresaban Sox2. (I) Células madre/progenitores neurales fosfovimentina+ en la ZSV con un proceso apical largo que se extiende hacia la superficie pial. (J) Las células madre/progenitores neurales fosfovimentina+ en la ZSV con un proceso basal contenían un centrosoma pericentrina+ en las neuronas. Durante la mitosis, se observaron dos centriolos pericentrina+ en las células en división. (K-K") A diferencia de las células madre/progenitores neurales de tipo GRe, ninguna célula madre/progenitor neural fosfovimentina+ Tbr2+ en el neuroepitelio cortical derivado de CMEh tenía un proceso basal (ni un proceso apical). (Barras de escala, 100 μ m en A-E; 25 μ m en H-K).

Descripción de realizaciones

La presente invención proporciona un método de producción de un agregado celular que comprende telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o un tejido progenitor del mismo, que comprende obtener un agregado positivo para un marcador telencefálico cultivando un agregado de células madre pluripotentes en suspensión en presencia de un inhibidor de la señal de Wnt y un inhibidor de la señal de TGF β , y seguir cultivando los agregados positivos para el marcador telencefálico en suspensión. El cultivo en suspensión posterior se realiza preferiblemente en condiciones de alta presión parcial de oxígeno.

La presente invención se explica en detalle a continuación.

(1) Célula madre pluripotente

La "célula madre pluripotente" se refiere a una célula que tiene tanto el potencial para diferenciarse a todas las células que constituyen el cuerpo (pluripotencia), como el potencial para producir células hijas con la misma potencia de diferenciación mediante división celular (competencia de autorreplicación).

La pluripotencia puede evaluarse trasplantando las células de un objetivo de evaluación a un ratón desnudo y comprobando la presencia o ausencia de formación de un teratoma que contiene células de cada una de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo).

Los ejemplos de la célula madre pluripotente incluyen la célula madre embrionaria (célula ME), la célula germinal embrionaria (célula GE), la célula madre pluripotente inducida (célula MPi) y similares, y la célula madre pluripotente no está limitada, siempre que tenga a la vez la pluripotencia y la competencia de autorreplicación. En la presente invención, se usan preferiblemente células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas.

Las células madre embrionarias (células ME) pueden establecerse cultivando, por ejemplo, un blastómero individual y similares. Como embrión temprano, también puede usarse un embrión partenogenético (Kim et al. (Science, 315, 482-486 (2007)), Nakajima et al. (Stem Cells, 25, 983-985 (2007)), Kim et al. (Cell Stem Cell, 1, 346-352 (2007)), Revazova et al. (Cloning Stem Cells, 9, 432-449 (2007)), Revazova et al. (Cloning Stem Cells, 10, 11-24 (2008)).

Hay células madre embrionarias de referencia disponibles en las organizaciones apropiadas y es posible adquirir productos comerciales. Por ejemplo, las células madre embrionarias humanas KhES-1, KhES-2 y KhES-3 están disponibles en el Institute for Frontier Medical Sciences, de la universidad de Kioto.

Pueden establecerse células germinales embrionarias (células GE) de referencia cultivando células germinales primordiales en presencia de LIF, bFGF, SCF y similares (Matsui et al., Cell, 70, 841-847 (1992), Shambloott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(23), 13726-13731 (1998), Turnpenny et al., Stem Cells, 21(5), 598-609, (2003)).

La célula madre pluripotente inducida (célula MPi) se refiere a una célula que adquiere artificialmente pluripotencia y competencia de autorreplicación por contacto con una célula somática (p. ej., un fibroblasto, una célula de la piel, un linfocito, etc.) con un factor de reprogramación nuclear. La célula MPi se obtuvo por primera vez por un método que incluía la introducción de programas de reprogramación nuclear compuestos por Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc en células somáticas (p. ej., fibroblasto, célula de la piel, etc.) (Cell, 126: p. 663-676, 2006). Posteriormente, numerosos

investigadores han hecho diversas mejoras en la combinación de factores de reprogramación y método de introducción de los factores y se han descrito diversos métodos de producción de células madre pluripotentes inducidas.

Los factores de reprogramación nuclear pueden estar constituidos por cualquier sustancia, tal como un factor proteínico o un ácido nucleico que codifica el anterior (incluidas formas incorporadas en un vector) o un compuesto de bajo peso molecular, siempre que sea una sustancia (sustancias) capaz de inducir una célula con pluripotencia y competencia de autorreplicación a partir de una célula somática tal como un fibroblasto y similares. Cuando el factor de reprogramación nuclear es un factor proteínico o un ácido nucleico que codifica el anterior, los factores de reprogramación nuclear preferidos se ilustran por las combinaciones siguientes (en adelante, solo se muestran los nombres de los factores proteínicos).

- 5
- 10 (1) Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc (en donde Sox2 puede sustituirse por Sox1, Sox3, Sox15, Sox17 o Sox18; Klf4 puede sustituirse por Klf1, Klf2 o Klf5; además, c-Myc puede sustituirse por T58A (forma mutante activa), N-Myc o L-Myc)
- (2) Oct3/4, Klf4, Sox2
- (3) Oct3/4, Klf4, c-Myc
- (4) Oct3/4, Sox2, Nanog, Lin28
- 15 (5) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Nanog, Lin28
- (6) Oct3/4, Klf4, Sox2, bFGF
- (7) Oct3/4, Klf4, Sox2, SCF
- (8) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, bFGF
- (9) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, SCF

20 Entre estas combinaciones, cuando se considera el uso de la célula MPi obtenida para una aplicación terapéutica, es preferible una combinación de los tres factores Oct3/4, Sox2 y Klf4. Por otra parte, cuando no se considera el uso de la célula MPi para una aplicación terapéutica (p. ej., se usa como una herramienta de investigación de cribado para el descubrimiento de fármacos y similares) son preferibles cuatro factores que consisten en Oct3/4, Klf4, Sox2 y c-Myc o cinco factores con la adición a los anteriores de Lin28 o Nanog.

25 La célula MPi se usa preferiblemente para el trasplante autólogo.

En la presente invención también puede usarse una célula madre pluripotente obtenida modificando los genes en un cromosoma por un método de ingeniería genética conocido. La célula madre pluripotente puede ser una célula en donde se ha insertado un gen marcador (p. ej., una proteína fluorescente tal como GFP, etc.) en un gen que codifica un marcador de diferenciación conservando el marco de lectura por un método conocido, en que puede determinarse que dicha célula ha alcanzado el estado de diferenciación correspondiente usando la expresión del gen marcador como índice.

30 Como célula madre pluripotente, pueden usarse células madre pluripotentes de animales de sangre caliente, preferiblemente células madre pluripotentes de mamíferos. Los mamíferos incluyen, por ejemplo, animales de laboratorio, incluidos roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas, así como conejos; animales domésticos tales como cerdos, vacas, cabras, caballos y ovejas; animales de compañía tales como perros y gatos; primates tales como humanos, monos, orangutanes y chimpancés. La célula madre pluripotente es preferiblemente una célula madre pluripotente de roedores (ratón, rata, etc.) o primates (humana, etc.) y más preferiblemente una célula madre pluripotente humana.

40 Las células madre pluripotentes pueden cultivarse para su mantenimiento por un método conocido de por sí. Por ejemplo, desde el punto de vista de su aplicación clínica, las células madre pluripotentes se mantienen preferiblemente en un cultivo sin suero usando sustitutos de suero tales como el sustituto de suero Knockout™ (KSR) y similares, o un cultivo sin células alimentadoras.

45 Las células madre pluripotentes para usar en la presente invención están preferiblemente aisladas. Estar "aisladas" significa que se ha llevado a cabo una operación para eliminar factores distintos de la célula o componente objetivo y que la célula o componente ya no está en un estado natural. La pureza de las "células madre pluripotentes humanas aisladas" (porcentaje del número de células madre pluripotentes humanas con respecto al número total de células) es generalmente no inferior al 70 %, preferiblemente no inferior al 80 %, más preferiblemente no inferior al 90 %, aún más preferiblemente no inferior al 99 %, lo más preferiblemente es del 100 %.

(2) Formación de un agregado de células madre pluripotentes

50 Un agregado de células madre pluripotentes puede obtenerse cultivando células madre pluripotentes dispersas en condiciones de no adhesión al recipiente de cultivo (es decir, de cultivo en suspensión) y ensamblando múltiples

células madre pluripotentes para permitir la formación del agregado.

El recipiente de cultivo usado para la formación del agregado no está particularmente limitado y los ejemplos el mismo incluyen matraces, frascos de cultivo de tejidos, placas, placas de Petri, placas de cultivo de tejidos, placas múltiples, microplacas, placas de micropocillos, microporos, multiplacas, placas de pocillos múltiples, portaobjetos con pocillos, placas de Petri, tubos, bandejas, bolsas de cultivo y botellas rotatorias. Para permitir el cultivo en condiciones no adhesivas, preferiblemente el recipiente de cultivo no permite la adherencia de las células. Los recipientes útiles que no permiten la adherencia de las células incluyen recipientes de cultivo cuyas superficies han sido tratadas artificialmente para que no se adhieran las células, recipientes de cultivo cuyas superficies no han sufrido ningún tratamiento artificial para mejorar la adhesividad de las células (p. ej., un tratamiento de recubrimiento con una matriz extracelular y similares) y similares.

El medio para usar para la formación del agregado puede prepararse usando un medio usado para cultivar células animales como medio basal. El medio basal no está particularmente limitado, siempre que pueda usarse para el cultivo de células animales y puede ser medio BME, medio BGJb, medio CMRL 1066, medio MEM de Glasgow, medio MEM Zinc Option mejorado, medio IMDM, medio 199, medio MEM de Eagle, medio α MEM, medio DMEM, medio de Ham, medio F-12 de Ham, Medio RPMI 1640, medio de Fischer, un medio mezcla de los anteriores y similares.

Para evitar una influencia negativa sobre la inducción de la diferenciación de una célula madre pluripotente a telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o a un tejido precursor del mismo, el medio usado para la formación del agregado es preferiblemente un medio sin suero. Un medio sin suero significa un medio sin un suero sin ajustar o sin purificar. Un medio que contiene componentes purificados derivados de la sangre y componentes derivados de tejidos animales (p. ej., citocina) corresponde a un medio sin suero.

El medio usado para la formación del agregado puede contener un sustituto de suero. El sustituto de suero puede ser, por ejemplo, uno que contenga, según sea apropiado, una albúmina, transferrina, ácidos grasos, un precursor de colágeno, oligoelementos, 2-mercaptoetanol o 3'-tioglicerol, o sus equivalentes y similares. Un sustituto de suero tal puede prepararse, por ejemplo, por un método descrito en el documento WO98/30679. Para facilitar una implantación más simple del método de la presente invención, pueden utilizarse sustitutos de suero disponibles comercialmente. Los ejemplos de tales sustitutos de suero disponibles comercialmente incluyen el sustituto de suero Knockout (KSR, producido por Invitrogen), un concentrado de lípidos definido químicamente (producido por Gibco Company) y Glutamax (producido por Gibco Company).

Un medio para usar para la formación del agregado puede contener otro aditivo, siempre que no afecte negativamente a la inducción de la diferenciación de las células madre pluripotentes a telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o a un tejido precursor del mismo. Los ejemplos del aditivo incluyen, pero no se limitan a insulina, una fuente de hierro (p. ej., transferrina, etc.), un mineral (p. ej., selenato de sodio, etc.), sacáridos (p. ej., glucosa, etc.), un ácido orgánico (p. ej., ácido pirúvico, ácido láctico, etc.), una proteína del suero (p. ej., albúmina, etc.), un aminoácido (p. ej., L-glutamina, etc.), un agente reductor (p. ej., 2-mercaptoetanol, etc.), vitaminas (p. ej., ácido ascórbico, d-biotina, etc.), un antibiótico (p. ej., estreptomina, penicilina, gentamicina, etc.), un agente tamponante (p. ej., HEPES, etc.) y similares.

Un medio para usar para la formación del agregado puede ser un medio mencionado a continuación usado para la inducción de la diferenciación de células madre pluripotentes a telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o a un tejido precursor del mismo.

Para la formación de un agregado de células madre pluripotentes, las células madre pluripotentes se recogen de un cultivo de traspaso y se dispersan a un estado de células individuales o un estado de células prácticamente individuales. Las células madre pluripotentes se dispersan con una disolución de disociación apropiada. Los ejemplos de la disolución de disociación incluyen EDTA, una proteasa tal como tripsina, colagenasa IV, metaloproteinasa y similares, y similares, que se usan en solitario o en una combinación apropiada. De estas, es preferible una que muestre baja toxicidad para las células y los ejemplos de una tal disolución de disociación incluyen productos disponibles comercialmente como DISPASE (EIDIA), TrypLE (Invitrogen), Accutase (MILLIPORE) y similares. Las células madre pluripotentes dispersas se suspenden en el medio mencionado anteriormente.

Para inhibir la muerte celular de las células madre pluripotentes (particularmente, células madre pluripotentes humanas) inducidas por dispersión, es preferible añadir un inhibidor de la cinasa superenrollada asociada a Rho (ROCK) desde el inicio del cultivo (JP-A-2008-99662). Se añade un inhibidor de ROCK, por ejemplo, dentro de un plazo de 15 días, preferiblemente de 10 días, más preferiblemente de 6 días, desde el inicio del cultivo. Los ejemplos del inhibidor de ROCK incluyen Y-27632 (diclorhidrato de (+)-(R)-*trans*-4--(1-aminoetil)-N-(4-piridil)ciclohexanocarboxamida) y similares. La concentración del inhibidor de ROCK usado para el cultivo en suspensión es una concentración capaz de inhibir la muerte celular de las células madre pluripotentes inducidas por dispersión. Por ejemplo, para Y-27632, esta concentración es normalmente de aproximadamente 0,1 a 200 μ M, preferiblemente de aproximadamente 2 a 50 μ M. La concentración del inhibidor de ROCK puede variarse en el periodo de adición del mismo y, por ejemplo, la concentración puede reducirse a la mitad en la segunda mitad del periodo.

Una suspensión de las células madre pluripotentes dispersas se siembra en el recipiente de cultivo mencionado anteriormente y las células madre pluripotentes dispersas se cultivan en condiciones de no adhesión al recipiente de

cultivo de las células, mediante lo cual las células madre pluripotentes se ensamblan para formar un agregado. En este caso, las células madre pluripotentes dispersas pueden sembrarse en un recipiente de cultivo comparativamente grande, tal como una placa de 10 cm, para formar simultáneamente múltiples agregados de células madre pluripotentes en un compartimento de cultivo. Sin embargo, el tamaño de los agregados y el número de células madre pluripotentes contenidas en estos pueden variar ampliamente y tal variación puede causar diferencias en los niveles de diferenciación de las células madre pluripotentes a telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o a un tejido precursor del mismo, entre agregados, lo que a su vez puede reducir la eficiencia de la inducción de la diferenciación. Por consiguiente, es preferible coagular rápidamente las células madre pluripotentes dispersas para formar un agregado en un compartimento de cultivo. Los ejemplos del método para la rápida coagulación de las células madre pluripotentes dispersas incluyen los métodos siguientes:

(1) Un método que incluye encerrar las células madre pluripotentes dispersas en un compartimento de volumen comparativamente pequeño (p. ej., no más de 1 ml, no más de 500 μ l, no más de 200 μ l, no más de 100 μ l) para formar un agregado en el compartimento. Preferiblemente, el compartimento de cultivo se mantiene en reposo después de encerrar las células madre pluripotentes dispersas. Los ejemplos del compartimento de cultivo incluyen, pero no se limitan a un pocillo en una placa de pocillos múltiples (384 pocillos, 192 pocillos, 96 pocillos, 48 pocillos, 24 pocillos, etc.), microporos, un portaobjetos con cámaras y similares, un tubo, una gota de un medio en el método de la gota colgante y similares. Las células madre pluripotentes dispersas encerradas en el compartimento se precipitan en un punto debido a la gravedad o las células se adhieren entre sí para formar un agregado en un compartimento de cultivo. La forma del fondo de la placa de pocillos múltiples, los microporos, los portaobjetos con cámaras, el tubo y similares es preferiblemente forma de U o de V para facilitar la precipitación de las células madre pluripotentes dispersas en un punto.

(2) Un método que incluye colocar las células madre pluripotentes dispersas en un tubo de centrifugación y centrifugarlas para permitir la precipitación de las células madre pluripotentes en un punto y así formar un agregado en el tubo.

El número de células madre pluripotentes para sembrar en un compartimento de cultivo no está particularmente limitado, siempre que se forme un agregado por compartimento de cultivo y pueda inducirse en el agregado la diferenciación de las células madre pluripotentes a telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o a un tejido progenitor del mismo, por el método de la presente invención. Generalmente se siembran de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 5×10^4 , preferiblemente de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 2×10^4 , más preferiblemente de aproximadamente 2×10^3 a aproximadamente $1,2 \times 10^4$ células madre pluripotentes en un compartimento de cultivo. Después, por la rápida coagulación de las células madre pluripotentes, se forma un agregado celular compuesto generalmente por de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 5×10^4 , preferiblemente de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 2×10^4 , más preferiblemente de aproximadamente 2×10^3 a aproximadamente $1,2 \times 10^4$ células madre pluripotentes por compartimento de cultivo.

El tiempo hasta la formación del agregado puede determinarse como sea apropiado siempre que se forme un agregado por compartimento y pueda inducirse en el agregado la diferenciación de las células madre pluripotentes a corteza cerebral o un tejido precursor de la misma por el método de la presente invención. Acortando el tiempo, se espera una eficiente inducción de la diferenciación al tejido cortical cerebral deseado o un tejido precursor del mismo y, por consiguiente, dicho tiempo es preferiblemente más corto. Preferiblemente, el agregado de células madre pluripotentes se forma en un plazo de 24 h, más preferiblemente en un plazo de 12 h, aún más preferiblemente en un plazo de 6 h y lo más preferiblemente en 2-3 h. El tiempo hasta la formación de agregado puede ajustarse como sea apropiado eligiendo los expertos en la técnica una herramienta para la agregación celular, las condiciones de centrifugación y similares.

Otras condiciones de cultivo, tales como la temperatura de cultivo y la concentración de CO_2 en el momento de la formación del agregado, pueden establecerse como sea apropiado. La temperatura de cultivo no está particularmente limitada y es, por ejemplo, de aproximadamente 30 a 40 °C, preferiblemente de aproximadamente 37 °C. La concentración de CO_2 es, por ejemplo, de aproximadamente el 1 al 10 %, preferiblemente de aproximadamente el 5 %.

Además, se preparan múltiples compartimentos en las mismas condiciones de cultivo y se forma un agregado de células madre pluripotentes en cada compartimento de cultivo, mediante lo cual puede obtenerse una población cualitativamente uniforme de agregados de células madre pluripotentes. Si los agregados de células madre pluripotentes son cualitativamente uniformes puede evaluarse a partir del tamaño del agregado, la masa y el número de células en el mismo, la morfología macroscópica, la morfología microscópica y su homogeneidad cuando se analizan por tinción histológica, la expresión de los marcadores de diferenciación y desdiferenciación y su homogeneidad, la regulación de la expresión de los marcadores de diferenciación y su sincronidad, la reproducibilidad de la eficiencia de diferenciación entre agregados y similares. En una realización, una población de los agregados de células madre pluripotentes para usar en el método de la presente invención contiene un número uniforme de células madre pluripotentes en los agregados. Que una población de agregados de células madre pluripotentes sea "uniforme" en un parámetro particular significa que no menos del 90 % de los agregados totales en una población de los mismos se encuentra dentro del intervalo de la media del parámetro en la población de agregados ± 10 %, preferiblemente ± 5 %.

(3) Inducción de telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o de un tejido precursor del mismo

El método de producción de la presente invención comprende cultivar un agregado de células madre pluripotentes en suspensión en presencia de un inhibidor de la señal de Wnt y un inhibidor de la señal de TGF β para dar un agregado positivo para un marcador telencefálico (la primera etapa de cultivo) y seguir cultivando el agregado positivo para el marcador telencefálico en suspensión (la segunda etapa de cultivo). El cultivo en suspensión en la segunda etapa de cultivo se realiza preferiblemente en condiciones de alta presión parcial de oxígeno. En la primera etapa de cultivo, se determina la dirección de la diferenciación de las células madre pluripotentes a región telencefálica, con lo que se induce la expresión de un gen marcador telencefálico. Sometiendo el agregado positivo para el marcador telencefálico obtenido a la segunda etapa de cultivo, se induce la posterior diferenciación a telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o a un tejido progenitor del mismo.

Los ejemplos del marcador telencefálico incluyen, pero no se limitan a Foxg1 (también denominado Bf1), Six3 y similares. Un agregado positivo para un marcador telencefálico contiene células que expresan al menos un marcador telencefálico. En una realización preferible, el agregado positivo para el marcador telencefálico es un agregado positivo para Foxg1. En el agregado positivo para el marcador telencefálico, por ejemplo, no menos del 30 %, preferentemente no menos del 50 %, más preferentemente no menos del 70 % de las células contenidas en el agregado son positivas para el marcador telencefálico.

Un tejido parcial del telencéfalo incluye, por ejemplo, corteza cerebral, ganglio basal, hipocampo, plexo coroideo y similares.

Según la presente invención, se autoorganiza telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o un tejido progenitor del mismo, dentro de un agregado de células madre pluripotentes. Según una realización de la presente invención, se cultiva en suspensión un agregado de células madre pluripotentes en presencia de un inhibidor de la señal de Wnt y un inhibidor de la señal de TGF β para dar un agregado positivo para un marcador telencefálico (p. ej., un agregado positivo para Foxg1), y el agregado positivo para el marcador telencefálico (p. ej., un agregado positivo para Foxg1) se sigue cultivando en suspensión (preferiblemente en condiciones de alta presión parcial de oxígeno), con lo cual se forma en el agregado una estructura similar al neuroepitelio positiva para el marcador telencefálico. En una realización, no menos del 70 % de las células contenidas en el agregado que contiene la estructura similar al neuroepitelio son positivas para el marcador telencefálico (p. ej., positivas para Foxg1). En una realización, la estructura similar al neuroepitelio formada en el agregado muestra una estructura epitelial columnar pseudoestratificada con una cavidad similar a un ventrículo cerebral en su interior. En una realización, la estructura neuroepitelial tiene una capa celular positiva para Pax6 y positiva para Sox2 en el lado luminal y contiene células mitóticas positivas para la histona H3 fosforilada en su parte más interna. Estas estructuras son similares a la zona ventricular de la corteza cerebral en el primer trimestre humano. En una realización, el exterior de la capa celular similar al neuroepitelio que es similar a la zona ventricular contiene células que expresan el marcador de neuronas postmitóticas Tuj1 y los marcadores de la placa cortical temprana Ctip2 y Tbr1. Este puede contener células de Cajal-Retzius positivas para reelina, que son neuronas de la capa I de la corteza cerebral, y una capa rica en laminina cerca de la capa superficial. Es decir, en una realización preferible, el agregado obtenido por el método de producción de la presente invención puede contener un tejido progenitor cortical.

“Cultivar en suspensión” un agregado de células madre pluripotentes se refiere a cultivar células madre pluripotentes en un medio en condiciones de no adhesión al recipiente de cultivo. Esto permite una formación tridimensional que es difícil de conseguir en un cultivo de adhesión convencional.

El medio usado para el cultivo en suspensión contiene un inhibidor de la señal de Wnt y un inhibidor de la señal de TGF β . Debido a la acción del inhibidor de la señal de Wnt y el inhibidor de la señal de TGF β , puede realizarse eficientemente la inducción de la diferenciación de las células madre pluripotentes a una región telencefálica.

El inhibidor de la señal de Wnt no está particularmente limitado, siempre que sea capaz de inhibir la transducción de la señal mediada por Wnt. Los inhibidores de la señal de Wnt incluyen, pero no se limitan, por ejemplo, a IWR-1-endo (4-[(3aR,4S,7R,7aS)-1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-1,3-dioxo-4,7-metano-2H-isoindol-2-il]-N-8-quinolinilbenzamida), IWP-2, XAV939, Dkk1, la proteína Cerberus, inhibidores de receptores de Wnt, receptores solubles de Wnt, anticuerpos contra Wnt, inhibidores de caseína cinasa y la proteína Wnt dominante negativa; en particular, es preferible IWR-1-endo.

El inhibidor de la señal de TGF β no está particularmente limitado, siempre que sea capaz de inhibir la transducción de la señal mediada por TGF β . Los inhibidores de la señal de TGF β incluyen, pero no se limitan, por ejemplo, a SB431542 (4-(5-benzol[1,3]dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)benzamida), LY-364947, SB-505, A-83-01 y similares; en particular, es preferible SB431542.

Una combinación preferible de un inhibidor de la señal de Wnt y un inhibidor de la señal de TGF β es IWR-1-endo y SB431542.

La concentración del inhibidor de la señal de Wnt y el inhibidor de la señal de TGF β en el medio puede determinarse apropiadamente dentro de un intervalo en el que puede inducirse en el agregado la diferenciación de las células madre pluripotentes a región telencefálica. Cuando se usa IWR-1-endo como inhibidor de la señal de Wnt, su concentración

es generalmente de 0,1-50 μM , preferiblemente de 0,3-5 μM . Cuando se usa SB431542 como inhibidor de la señal de TGF β , su concentración es generalmente de 0,1-100 μM , preferiblemente de 1-10 μM .

5 El medio para usar para el cultivo en suspensión del agregado puede prepararse usando un medio usado para cultivar células animales como medio basal. El medio basal no está particularmente limitado, siempre que pueda usarse para el cultivo de células animales y puede ser medio BME, medio BGJb, medio CMRL 1066, medio MEM de Glasgow, medio MEM Zinc Option mejorado, medio IMDM, medio 199, medio MEM de Eagle, medio α MEM, medio DMEM, medio de Ham, medio F-12 de Ham, Medio RPMI 1640, medio de Fischer, medio neurobasal un medio mezcla de los anteriores y similares. Preferiblemente, se usa el medio MEM de Glasgow.

10 Para evitar una influencia negativa sobre la inducción de la diferenciación de las células madre pluripotentes a telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o a un tejido precursor del mismo, el medio usado para el cultivo de los agregados en suspensión es preferiblemente un medio sin suero.

15 El medio usado para el cultivo en suspensión de los agregados puede contener un sustituto de suero. El sustituto de suero puede ser, por ejemplo, uno que contenga, según sea apropiado, una albúmina, transferrina, ácidos grasos, un precursor de colágeno, oligoelementos, 2-mercaptoetanol o 3'-tioglicerol, o sus equivalentes y similares. Un sustituto de suero tal puede prepararse, por ejemplo, por un método descrito en el documento WO98/30679. Para facilitar una implantación más simple de un método de la presente invención, pueden utilizarse sustitutos de suero disponibles comercialmente. Los ejemplos de tales sustitutos de suero disponibles comercialmente incluyen KSR (sustituto de suero Knockout) (producido por Invitrogen), un concentrado de lípidos definido químicamente (producido por Gibco Company) y Glutamax (producido por Gibco Company).

20 El medio usado para cultivar el agregado en suspensión puede contener otro aditivo, siempre que no ejerza una influencia negativa sobre la inducción de la diferenciación de las células madre pluripotentes a telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o a un tejido precursor del mismo. Los ejemplos del aditivo incluyen, pero no se limitan a insulina, una fuente de hierro (p. ej., transferrina, etc.), un mineral (p. ej., selenato de sodio, etc.), sacáridos (p. ej., glucosa, etc.), un ácido orgánico (p. ej., ácido pirúvico, ácido láctico, etc.), una proteína del suero (p. ej., albúmina, etc.), un aminoácido (p. ej., L-glutamina, etc.), un agente reductor (p. ej., 2-mercaptoetanol, etc.), vitaminas (p. ej., ácido ascórbico, d-biotina, etc.), un antibiótico (p. ej., estreptomocina, penicilina, gentamicina, etc.), un agente tamponante (p. ej., HEPES, etc.) y similares.

30 En una realización, para evitar una influencia negativa sobre la inducción de la diferenciación de las células madre pluripotentes a telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o a un tejido precursor del mismo, el medio usado para cultivar los agregados en suspensión es preferiblemente un medio definido químicamente sin factores de crecimiento (gfCDM) al que se añade un sustituto de suero (KSR, etc.). El "factor de crecimiento" en este caso abarca factores de formación de patrones tales como Fgf, Wnt, Nodal, Notch, Shh y similares; insulina y albúmina rica en lípidos.

35 Otras condiciones de cultivo para el cultivo en suspensión del agregado, tales como la temperatura de cultivo, la concentración de CO₂ y de O₂, pueden establecerse como sea apropiado. La temperatura de cultivo no está particularmente limitada y es, por ejemplo, de aproximadamente 30 a 40 °C, preferiblemente de aproximadamente 37 °C. La concentración de CO₂ es, por ejemplo, de aproximadamente el 1 al 10 %, preferiblemente de aproximadamente el 5 %. La concentración de O₂ es, por ejemplo, de aproximadamente el 20 %.

40 La primera etapa de cultivo se realiza durante un periodo suficiente para determinar la dirección de la diferenciación a región telencefálica e inducir un agregado positivo para un marcador telencefálico (p. ej., un agregado positivo para Foxg1). Un agregado positivo para un marcador telencefálico puede detectarse, por ejemplo por RT-PCR o por inmunohistoquímica usando un anticuerpo específico para el marcador telencefálico. Por ejemplo, se realiza hasta que no menos del 50 %, preferiblemente no menos del 70 % de los agregados celulares en el cultivo son positivos para el marcador telencefálico. Dado que el periodo de cultivo puede variar dependiendo de la especie animal de las células madre pluripotentes y del tipo de inhibidor de la señal de Wnt y de inhibidor de la señal de TGF β , no puede especificarse generalmente. Sin embargo, cuando se usan células madre pluripotentes humanas, por ejemplo, la primera etapa de cultivo es de 15-20 días (p. ej., de 18 días).

50 En la segunda etapa de cultivo, el agregado positivo para el marcador telencefálico obtenido en la primera etapa de cultivo se sigue sometiendo a cultivo en suspensión, con lo que se obtiene un agregado celular que comprende telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o un tejido progenitor del mismo. El cultivo en suspensión en la segunda etapa se realiza preferiblemente en condiciones de alta presión parcial de oxígeno. Al seguir cultivando los agregados positivos para el marcador telencefálico en suspensión en condiciones de alta presión parcial de oxígeno, se consigue un cultivo de mantenimiento a largo plazo de la zona ventricular contenida en los agregados, lo que permite una eficiente inducción de la diferenciación a telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o a un tejido progenitor del mismo.

55 Las condiciones de alta presión parcial de oxígeno significan unas condiciones de presión parcial de oxígeno que sobrepasan la presión parcial de oxígeno en el aire (20 %). La presión parcial de oxígeno en la segunda etapa de cultivo es, por ejemplo, del 30-60 %, preferiblemente del 35-60 %, más preferiblemente del 38-60 %.

El medio para usar en la segunda etapa de cultivo puede prepararse usando un medio usado para cultivar células animales como medio basal, al igual que para el medio usado para la primera etapa de cultivo. El medio basal no está

particularmente limitado, siempre que pueda usarse para el cultivo de células animales y puede ser medio BME, medio BGJb, medio CMRL 1066, medio MEM de Glasgow, medio MEM Zinc Option mejorado, medio IMDM, medio 199, medio MEM de Eagle, medio α MEM, medio DMEM, medio de Ham, medio F-12 de Ham, Medio RPMI 1640, medio de Fischer, medio neurobasal un medio mezcla de los anteriores y similares. Preferiblemente, se usa el medio DMEM.

- 5 En la segunda etapa de cultivo, no son necesarios el inhibidor de la señal de Wnt ni el inhibidor de la señal de TGF β usados en la primera etapa de cultivo. En una realización, el medio usado en la segunda etapa de cultivo no contiene un inhibidor de la señal de Wnt ni un inhibidor de la señal de TGF β .

10 El medio para usar en la segunda etapa de cultivo contiene preferiblemente un suplemento N2 como sustituto de suero para promover la inducción de la diferenciación a telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o a un tejido progenitor del mismo. El suplemento N2 es una composición sustituta de suero conocida que contiene insulina, transferrina, progesterona, putrescina y selenito de sodio y que puede adquirirse de Gibco/Invitrogen y similares. La cantidad del suplemento N2 que ha de añadirse puede determinarse apropiadamente de tal manera que pueda promoverse la inducción de la diferenciación a telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o a un tejido progenitor del mismo.

15 El medio para usar en la segunda etapa de cultivo contiene preferiblemente un concentrado de lípidos definido químicamente (Chemically Defined Lipid Concentrate) para el cultivo de mantenimiento de la zona ventricular durante largo tiempo. El concentrado de lípidos definido químicamente es una mezcla de lípidos que contiene colesterol, DL- α -tocoferol, ácido araquidónico, ácido linoléico, ácido linoleico, ácido mirístico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido palmitoleico y ácido esteárico, cada uno de los cuales está purificado. El concentrado de lípidos definido químicamente puede ser uno disponible comercialmente y puede adquirirse, por ejemplo, de Gibco/Invitrogen y similares.

20 Un medio para usar para el cultivo en suspensión del agregado puede contener otro aditivo, siempre que no afecte negativamente a la inducción de la diferenciación de las células madre pluripotentes a telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o a un tejido precursor del mismo. Los ejemplos del aditivo incluyen, pero no se limitan a insulina, una fuente de hierro (p. ej., transferrina, etc.), un mineral (p. ej., selenato de sodio, etc.), sacáridos (p. ej., glucosa, etc.), un ácido orgánico (p. ej., ácido pirúvico, ácido láctico, etc.), una proteína del suero (p. ej., albúmina, etc.), un aminoácido (p. ej., L-glutamina, etc.), un agente reductor (p. ej., 2-mercaptoetanol, etc.), vitaminas (p. ej., ácido ascórbico, d-biotina, etc.), un antibiótico (p. ej., estreptomocina, penicilina, gentamicina, etc.), un agente tamponante (p. ej., HEPES, etc.) y similares.

30 En una realización, para evitar una influencia negativa sobre la inducción de la diferenciación de las células madre pluripotentes a telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o a un tejido precursor del mismo, el medio usado para cultivar el agregado en suspensión es preferiblemente un medio definido químicamente sin factores de crecimiento (gfCDM) al que se añade un sustituto de suero (KSR, etc.). El "factor de crecimiento" en este caso abarca factores de formación de patrones tales como Fgf, Wnt, Nodal, Notch, Shh y similares; insulina y albúmina rica en lípidos.

En una realización preferible, el medio para la segunda etapa de cultivo contiene el suplemento N2 y el concentrado de lípidos definido químicamente.

35 En una realización, el medio para la segunda etapa de cultivo es un medio sin suero.

40 En una realización, el medio para la segunda etapa de cultivo puede contener un suero. El suero puede contribuir al cultivo de mantenimiento a largo plazo de la zona ventricular. Los ejemplos de suero incluyen, pero no se limitan a SFB y similares. El suero está preferiblemente inactivado. La concentración de suero en el medio puede ajustarse apropiadamente dentro del intervalo que contribuye al cultivo de mantenimiento a largo plazo de la zona ventricular y es generalmente del 1-20 % (v/v).

En una realización, el medio para la segunda etapa de cultivo puede contener heparina. La heparina puede contribuir al cultivo de mantenimiento a largo plazo de la zona ventricular. La concentración de la heparina en el medio puede ajustarse apropiadamente dentro del intervalo que contribuye al cultivo de mantenimiento a largo plazo de la zona ventricular y es generalmente de 0,5-50 μ g/ml, preferiblemente de 1-10 μ g/ml (p. ej., 5 μ g/ml).

45 En una realización, el medio para la segunda etapa de cultivo puede contener un componente de la matriz extracelular. El componente de la matriz extracelular puede contribuir al cultivo de mantenimiento a largo plazo de la zona ventricular. El "componente de la matriz extracelular" se refiere a diversos componentes que se encuentran generalmente en una matriz extracelular. En el método de la presente invención, es preferible un componente de la membrana basal. Los ejemplos del componente principal de la membrana basal incluyen colágeno de tipo IV, laminina, proteoglucano de sulfato de heparán y entactina. El componente de la matriz extracelular para añadir al medio puede ser uno disponible comercialmente y pueden mencionarse, por ejemplo, Matrigel (BD Bioscience), laminina humana (Sigma Ltd.) y similares. Matrigel es una preparación de la membrana basal derivada de sarcoma de ratón de Engelbreth Holm Swarm (EHS). Los principales componentes de Matrigel son colágeno de tipo IV, laminina, proteoglucano de sulfato de heparán y entactina. Además de estos, contiene TGF β , factor de crecimiento fibroblástico (FGF), activador del plasminógeno tisular y factores de crecimiento producidos naturalmente por el tumor EHS. El "producto reducido en factores de crecimiento" de Matrigel tiene menor concentración de factores de crecimiento que el Matrigel normal y la concentración estándar de los mismos es de <0,5 ng/ml de EGF, <0,2 ng/ml de NGF, <5 pg/ml de PDGF, 5 ng/ml de IGF-1 y 1,7 ng/ml de TGF β . En el método de la presente invención, es preferible el uso de un

producto reducido en factores de crecimiento.

La concentración del componente de la matriz extracelular en el medio puede ajustarse apropiadamente dentro del intervalo que contribuye al cultivo de mantenimiento a largo plazo de la zona ventricular. Cuando se usa Matrigel, se añade generalmente en un volumen de 1/500-1/20, aún más preferiblemente de 1/100 del medio de cultivo.

5 En una realización, el medio para la segunda etapa de cultivo contiene suero y heparina además del suplemento N2 y el concentrado de lípidos definido químicamente. En esta realización, el medio puede contener además una matriz extracelular. El medio para esta realización es adecuado para la observación de la inducción de la diferenciación a telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o a un tejido progenitor del mismo, durante largo tiempo. En este caso, puede usarse un medio que contiene el suplemento N2, el concentrado de lípidos definido químicamente, suero y heparina (opcionalmente además, matriz extracelular) durante todo el periodo de la segunda etapa de cultivo o el medio para esta realización puede usarse solo durante una parte del periodo. En una realización, en la segunda etapa de cultivo se usa primero un medio que contiene el suplemento N2 y el concentrado de lípidos definido químicamente y que no contiene suero, heparina ni matriz extracelular y puede cambiarse a un medio que contiene el suplemento N2, el concentrado de lípidos definido químicamente, suero y heparina (y opcionalmente matriz extracelular) sobre la marcha (p.ej., después de la fase en la que se forma una estructura semiesférica similar al neuroepitelio con una cavidad similar a un ventrículo cerebral (epitelio columnar pseudoestratificado) en los agregados positivos para Foxg1).

Otras condiciones de cultivo tales como la temperatura de cultivo y la concentración de CO₂ en la segunda etapa de cultivo pueden establecerse como sea apropiado. La temperatura de cultivo es, por ejemplo, de aproximadamente 30-40 °C, preferiblemente de aproximadamente 37 °C. La concentración de CO₂ es, por ejemplo, de aproximadamente el 1 al 10 %, preferiblemente de aproximadamente el 5 %.

La segunda etapa de cultivo se realiza durante al menos un periodo suficiente para formar una estructura semiesférica similar al neuroepitelio con una cavidad similar a un ventrículo cerebral (epitelio columnar pseudoestratificado) en el agregado positivo para Foxg1. La estructura similar al neuroepitelio puede confirmarse por observación microscópica. Dado que el periodo de cultivo puede variar dependiendo de la especie animal de las células madre pluripotentes y del tipo de inhibidor de la señal de Wnt y de inhibidor de la señal de TGFβ y similares, no puede especificarse generalmente. Sin embargo, cuando se usan células madre pluripotentes humanas, por ejemplo, la segunda etapa de cultivo es de al menos 15-20 días (p. ej., de 17 días).

En el método de la presente invención, puede inducirse la autoorganización estable de telencéfalo en un agregado celular realizando la segunda etapa de cultivo durante largo tiempo (p. ej., no menos de 20 días, preferiblemente no menos de 50 días, más preferiblemente no menos de 70 días). Cuando la segunda etapa de cultivo se realiza de manera continua, la fase de diferenciación de telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o de un tejido progenitor del mismo, contenido en el agregado celular avanza con el transcurso del tiempo. Por consiguiente, la segunda etapa de cultivo se realiza preferiblemente de manera continua hasta haber alcanzado un estado de diferenciación deseado.

En una realización, la segunda etapa de cultivo se realiza hasta que un tejido cortical cerebral o un tejido progenitor del mismo muestra una estructura multicapa que contiene una zona marginal, una zona cortical, una subplaca, una zona intermedia, una zona subventricular y una zona ventricular, desde la porción superficial hasta la porción profunda, en el agregado celular. Significativamente, la corteza cerebral o un tejido progenitor de la misma con la estructura multicapa se autoorganiza en el método de la presente invención. Dado que el periodo de cultivo necesario para mostrar la estructura multicapa puede variar dependiendo de la especie animal de las células madre pluripotentes, el tipo del inhibidor de la señal de Wnt y de inhibidor de la señal de TGFβ y similares, no puede especificarse generalmente. Sin embargo, cuando se usan células madre pluripotentes humanas, por ejemplo, la segunda etapa de cultivo se realiza durante no menos de 52 días. En general, la zona marginal contiene células de Cajal-Retzius positivas para reelina y laminina. La placa cortical incluye una placa cortical profunda positiva para Tbr1 y positiva para Ctip2 y una placa cortical superficial que contiene neuronas que expresan Satb2, y la placa cortical superficial está en contacto con la zona marginal. Cuando la diferenciación de los tejidos progenitores corticales no ha avanzado suficientemente, puede que la placa cortical superficial no se haya formado claramente; sin embargo, cuando la diferenciación avanza suficientemente (p. ej., después de no menos de 73 días de la segunda etapa de cultivo), se forman claramente tanto la placa cortical profunda como la placa cortical superficial. Inmediatamente por debajo de la placa cortical se forma una subplaca, que contiene células positivas para calretinina y positivas para MAP2 con numerosas neuritas. La zona intermedia es una capa entre la zona subventricular y la placa cortical que tiene escasas células. La zona subventricular se caracteriza por ser positiva para Tbr2. La zona ventricular se caracteriza por ser positiva para Sox2 y positiva para Pax6. En una realización, la segunda etapa de cultivo se realiza hasta que un tejido cortical cerebral o un tejido progenitor del mismo muestra una estructura multicapa que contiene una zona marginal, una placa cortical superficial, una placa cortical profunda, una subplaca, una zona intermedia, una zona subventricular externa, una zona subventricular y una zona ventricular, desde la porción superficial hasta la porción profunda, en el agregado celular (p. ej., no menos de 73 días). Tal estructura multicapa se observa *in vivo* en la corteza cerebral durante el segundo trimestre humano.

Interesantemente, cuando se usan células madre pluripotentes humanas en el método de la presente invención, hay células madre/células progenitoras neurales positivas para vimentina fosforilada, negativas para Tbr2, positivas para Sox2 y positivas para Pax6 contenidas en la zona subventricular externa (ZSve). Las células madre/células

progenitoras neurales tienen las mismas características que las células gliales radiales externas (GRe) que están presentes en abundancia en la corteza cerebral del feto humano, pero escasamente presentes en la corteza cerebral del ratón. Según la presente invención, por consiguiente, la aparición de células del tipo GRe en la zona subventricular externa, que es un fenómeno específico humano, puede recapitularse *in vitro*.

- 5 Significativamente, en el método de la presente invención, los ejes dorsoventral y anteroposterior de la corteza cerebral se forman espontáneamente. En una realización, por ejemplo, en la zona ventricular cortical contenida en el agregado celular obtenido en la segunda etapa de cultivo, la expresión de un marcador dorsocaudal (Coup-TF1, Lhx2, etc.) muestra un gradiente, siendo más intensa en un lado y más débil en el lado opuesto, y la expresión de un marcador ventrorrostral (p. ej., Sp8) muestra un patrón de gradiente inverso al del marcador dorsocaudal. Alternativamente, en
10 una realización se forma una región que expresa intensamente el marcador dorsocaudal (p. ej., Coup-TF1, Lhx2) en la zona ventricular adyacente a una región que expresa el marcador del reborde cortical (p. ej., Zic1, Otx2).

El cultivo en suspensión del agregado puede realizarse en presencia o ausencia de células alimentadoras, siempre que la inducción de la diferenciación de las células madre pluripotentes a telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o a un tejido precursor del mismo, sea posible por el método de la presente invención. Para evitar la contaminación con
15 factores indefinidos, el cultivo en suspensión del agregado se realiza preferiblemente en ausencia de células alimentadoras.

En el método de la presente invención, el recipiente de cultivo para usar para el cultivo en suspensión de los agregados no está particularmente limitado. Tal recipiente de cultivo incluye, por ejemplo, matraces, frascos de cultivo de tejidos, placas, placas de Petri, placas de cultivo de tejidos, placas múltiples, microplacas, placas de micropocillos, microporos,
20 multiplacas, placas de pocillos múltiples, portaobjetos con pocillos, placas de Petri, tubos, bandejas, bolsas de cultivo y botellas rotatorias. Para permitir el cultivo en condiciones no adhesivas, preferiblemente el recipiente de cultivo no permite la adherencia de las células. Los recipientes útiles que no permiten la adherencia de las células incluyen recipientes de cultivo cuyas superficies han sido tratadas artificialmente para que no se adhieran las células, recipientes de cultivo cuyas superficies no han sufrido ningún tratamiento artificial para mejorar la adhesividad de las
25 células (p. ej., un tratamiento de recubrimiento con una matriz extracelular y similares) y similares.

Como recipiente de cultivo para usar para el cultivo en suspensión de agregados, puede usarse uno permeable al oxígeno. Al usar un recipiente de cultivo permeable al oxígeno, puede mejorarse el suministro de oxígeno a los agregados, lo que contribuye al cultivo de mantenimiento de la zona ventricular durante largo tiempo. Particularmente,
30 en la segunda etapa de cultivo, dado que el agregado celular puede crecer hasta un tamaño que cause el riesgo de no poder suministrar suficiente oxígeno a las células en el agregado (p. ej., las células en la zona ventricular), es preferible el uso de un recipiente de cultivo permeable al oxígeno.

En el cultivo en suspensión del agregado, dicho agregado puede someterse a un cultivo estático o puede moverse intencionadamente por cultivo en rotación o cultivo en agitación, siempre que pueda mantenerse un estado no adherido del agregado al recipiente de cultivo. Sin embargo, no es necesario mover intencionadamente los agregados por cultivo
35 en rotación o cultivo en agitación. En una realización, el cultivo en suspensión en el método de producción de la presente invención se realiza por cultivo estático. El cultivo estático se refiere a un método de cultivo para cultivar agregados en un estado sin movimiento intencionado del agregado. Puede ocurrir que el agregado se mueva, por ejemplo, durante la convección del medio, junto con cambios tópicos en la temperatura del medio. Sin embargo, dado que el agregado no se mueve intencionadamente, tal caso también se incluye en el cultivo estático en la presente
40 invención. El cultivo estático puede realizarse durante todo el periodo del cultivo en suspensión o solo durante una parte del periodo. Por ejemplo, un cultivo estático puede realizarse en cualquiera de las etapas de cultivo primera y segunda mencionadas anteriormente. En una realización preferible, el cultivo estático puede realizarse durante todo el periodo del cultivo en suspensión. El cultivo estático no requiere aparatos y se espera que cause menos daños al agregado celular, y es ventajoso porque la cantidad de medio de cultivo puede ser reducida.

45 En una realización preferible, se cultiva en suspensión una población cualitativamente uniforme de agregados de células madre pluripotentes en un medio que contiene un inhibidor de la señal de Wnt y un inhibidor de la señal de TGF β . Al usar una población cualitativamente uniforme de agregados de células madre pluripotentes, puede reducirse al mínimo la diferencia entre los niveles de diferenciación a telencéfalo o una estructura parcial del mismo, o a un tejido precursor del mismo, entre los agregados y mejorarse la eficiencia de la inducción de la diferenciación deseada. El
50 cultivo en suspensión de una población cualitativamente uniforme de agregados de células pluripotentes abarca las siguientes realizaciones.

(1) Se preparan múltiples compartimentos de cultivo y se siembra una población uniforme de agregados de células madre pluripotentes de tal manera que hay un agregado de células madre pluripotentes contenido en un compartimento de cultivo (p. ej., se coloca un agregado de células madre pluripotentes en cada pocillo de una placa
55 de 96 pocillos). En cada compartimento de cultivo se cultiva en suspensión un agregado de células madre pluripotentes en un medio que contiene un inhibidor de la señal de Wnt y un inhibidor de la señal de TGF β .

(2) Una población cualitativamente uniforme de agregados de células madre pluripotentes se siembra de tal manera que hay múltiples agregados contenidos en un compartimento de cultivo (p. ej., múltiples agregados de células madre pluripotentes se colocan en una placa de 10 cm). En el compartimento de cultivo se cultivan en suspensión múltiples

agregados de células madre pluripotentes en un medio que contiene un inhibidor de la señal de Wnt y un inhibidor de la señal de TGF β .

5 Cualquiera de las realizaciones (1) y (2) puede emplearse para el método de la presente invención y la realización puede cambiarse durante el cultivo (de la realización (1) a la realización (2) o de la realización (2) a la realización (1)). En una realización, se emplea la realización de (1) en la primera etapa de cultivo y la realización de (2) en la segunda etapa de cultivo.

10 Como se menciona anteriormente, dado que en el método de la invención se induce la autoorganización del telencéfalo en un agregado celular, la fase de diferenciación a telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o a un tejido progenitor del mismo, contenido en el agregado celular avanza con el transcurso del tiempo. Por consiguiente, el periodo de cultivo y las condiciones de cultivo se ajustan preferiblemente como sea apropiado según el telencéfalo o tejido parcial del mismo, o tejido progenitor del mismo, deseado. En los apartados (4)-(11) siguientes se explica una realización de la presente invención, que es una ilustración de la presente invención y no limita dicha presente invención.

(4) Inducción de plexo coroideo

15 En la segunda etapa de cultivo del método de la presente invención, el cultivo en suspensión se realiza en presencia de un potenciador de la señal de Wnt y una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo, con lo que puede inducirse plexo coroideo o un tejido progenitor del mismo en el agregado celular.

20 El potenciador de la señal de Wnt no está particularmente limitado, siempre que pueda inducirse plexo coroideo o un tejido progenitor del mismo cuando se usa en el método mencionado anteriormente. Por ejemplo, pueden mencionarse un inhibidor de GSK-3 β , Wnt3a recombinante, un agonista de Wnt (compuesto), Dkk (inhibidor de la proteína inhibidora de Wnt), R-espondina y similares. Los ejemplos del inhibidor de GSK-3 β incluyen CHIR99021 (6-[[2-[[4-(2,4-diclorofenil)-5-(5-metil-1*H*-imidazol-2-il)-2-pirimidinil]amino]etil]amino]-3-piridincarbonitrilo), kenpaulona, 6-bromoindirubin-3'-oxima (BIO) y similares. El potenciador de la señal de Wnt es preferiblemente un inhibidor de GSK-3 β , más preferiblemente CHIR99021.

25 Cuando se usa en el método mencionado anteriormente, la concentración del potenciador de la señal de Wnt no está particularmente limitada, siempre que pueda inducirse plexo coroideo o un tejido progenitor del mismo. Cuando se usa CHIR99021, esta es generalmente de aproximadamente 0,1 μ M a 30 μ M, preferiblemente de aproximadamente 1 μ M a 10 μ M (p. ej., 3 μ M).

30 En la presente memoria, la sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo es cualquier sustancia que activa la ruta a través de la cual se transmiten las señales tras la unión de un factor morfogénico óseo y un receptor. Los ejemplos de la sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo incluyen BMP2, BMP4, BMP7, GDF5 y similares. Preferiblemente, la sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo es BMP4. Aunque BMP4 se describe fundamentalmente a continuación, la sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo para usar en la presente invención no se limita a BMP4. BMP4 es una citocina conocida y su secuencia de aminoácidos también se conoce. El BMP4 que se usa en la presente invención en BMP4 de un mamífero. Los ejemplos del mamífero incluyen animales experimentales tales como roedores tales como ratón, rata, hámster, cobaya y similares, así como conejos y similares; animales domésticos tales como cerdo, vaca, cabra, caballo, oveja y similares; animales de compañía tales como perro, gato y similares; y primates como el hombre, mono, orangután, chimpancé y similares. El BMP4 es preferiblemente BMP4 de roedores (ratón, rata, etc.) o primates (humano, etc.), lo más preferiblemente BMP4 humano. Un BMP4 humano significa que BMP4 tiene la secuencia de aminoácidos expresada naturalmente en el cuerpo humano. Los ejemplos de la secuencia de aminoácidos representativa del BMP4 humano incluyen los números de acceso del NCBI NP_001193.2 (actualizado el 15 de junio de 2013), NP_570911.2 (actualizado el 15 de junio de 2013) y NP_570912.2 (actualizado el 15 de junio de 2013), la secuencia de aminoácidos (secuencia de aminoácidos de la forma madura del BMP4 humano) obtenida eliminando la secuencia señal del extremo N (1-24) de cada una de estas secuencias de aminoácidos y similares.

35 40 45 La concentración de la sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo en el medio puede determinarse apropiadamente dentro de un intervalo en el que puede inducirse en el agregado la diferenciación de las células madre pluripotentes a plexo coroideo o un tejido precursor del mismo. Cuando se usa BMP4 como sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo, su concentración es generalmente de 0,05-10 nM, preferiblemente de 0,1-2,5 nM (p. ej., 0,5 nM).

50 En una realización preferible, un medio para usar para la inducción de plexo coroideo o un tejido progenitor del mismo puede contener el suplemento N2, el concentrado de lípidos definido químicamente, suero y heparina.

55 El cultivo en un medio que contiene un potenciador de la señal de Wnt y una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo (BMP4, etc.) no necesita realizarse durante todo el periodo hasta la inducción de plexo coroideo o un tejido parcial del mismo en la segunda etapa de cultivo y solo necesita realizarse en una parte del periodo. Por ejemplo, el cultivo en suspensión en un medio que contiene un potenciador de la señal de Wnt y una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo (BMP4, etc.) durante no menos de 3 días desde el inicio de la segunda etapa de cultivo es suficiente para inducir plexo

coroideo o un tejido progenitor del mismo y, a partir de este momento, el cultivo en suspensión puede continuarse después de cambiar el medio a otro sin un potenciador de la señal de Wnt ni una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo (BMP4, etc.).

- 5 En este caso, puede inducirse la diferenciación selectiva a plexo coroideo al prolongar el periodo de cultivo en un medio que contiene un potenciador de la señal de Wnt y una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo (BMP4, etc.) (es decir, la diferenciación a un tejido telencefálico distinto del plexo coroideo (p. ej., corteza cerebral, hipocampo) no se produce fácilmente en el mismo agregado celular). En una realización, puede inducirse plexo coroideo o un tejido progenitor del mismo en no menos del 80 % de la población de agregados celulares. Por otra parte, cuando el periodo de cultivo en un medio que contiene un potenciador de la señal de Wnt y una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo (BMP4, etc.) es breve, puede producirse fácilmente la diferenciación a un tejido telencefálico distinto del plexo coroideo (p. ej., corteza cerebral, hipocampo) en el mismo agregado celular y puede obtenerse un agregado celular que contiene plexo coroideo o un tejido progenitor del mismo, así como corteza cerebral o un tejido progenitor de la misma y/o hipocampo o un tejido progenitor del mismo en los mismos agregados celulares (descrito más adelante).
- 10
- 15 La inducción de tejido del plexo coroideo puede confirmarse usando como índice la expresión de un marcador del plexo coroideo (p. ej., TTR, Lmx1a, Otx2, etc.), la no expresión de un marcador del telencéfalo (Foxg1, etc.) o la morfología de un epitelio monocapa rugoso. El tiempo necesario para la inducción de tejido del plexo coroideo varía dependiendo de las condiciones de cultivo y del tipo de mamífero del que derivan las células madre pluripotentes, y no puede especificarse generalmente. Sin embargo, cuando se usan células madre pluripotentes humanas, se induce un tejido de plexo coroideo dentro de los agregados, por ejemplo, hacia el día 24 desde el inicio de la segunda etapa de cultivo. Seleccionando un agregado celular para el que se ha confirmado la inducción de plexo coroideo o un tejido progenitor del mismo de los múltiples agregados celulares obtenidos, puede obtenerse un agregado celular que contiene plexo coroideo o un tejido progenitor del mismo.
- 20

(5) Inducción de hipocampo

- 25 En la segunda etapa de cultivo del método de la presente invención, el cultivo en suspensión se realiza en presencia de un potenciador de la señal de Wnt, con lo cual puede inducirse hipocampo o un tejido progenitor del mismo (reborde cortical, etc.) en los agregados celulares.
- El potenciador de la señal de Wnt no está particularmente limitado, siempre que pueda inducirse hipocampo o un tejido progenitor del mismo cuando se usa en el método mencionado anteriormente. Por ejemplo, pueden mencionarse un inhibidor de GSK-3 β , Wnt3a recombinante, un agonista de Wnt (compuesto), Dkk (inhibidor de la proteína inhibidora de Wnt), R-espondina y similares. Los ejemplos del inhibidor de GSK-3 β incluyen CHIR99021 (6-[[2-[[4-(2,4-diclorofenil)-5-(5-metil-1H-imidazol-2-il)-2-pirimidinil]amino]etil]amino]-3-piridincarbonitrilo), kenpaulona, 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO) y similares. El potenciador de la señal de Wnt es preferiblemente un inhibidor de GSK-3 β , más preferiblemente CHIR99021.
- 30
- 35 Cuando se usa en el método mencionado anteriormente, la concentración del potenciador de la señal de Wnt no está particularmente limitada, siempre que pueda inducirse hipocampo o un tejido progenitor del mismo. Cuando se usa CHIR99021, esta es generalmente de aproximadamente 0,1 μ M a 30 μ M, preferiblemente de aproximadamente 1 μ M a 10 μ M (p. ej., 3 μ M).
- 40 En una realización preferible, un medio para usar para la inducción de hipocampo o un tejido progenitor del mismo puede contener el suplemento N2, el concentrado de lípidos definido químicamente, suero y heparina.
- El cultivo en un medio que contiene un potenciador de la señal de Wnt no necesita realizarse durante todo el periodo hasta la inducción de hipocampo o un tejido parcial del mismo en la segunda etapa de cultivo y solo necesita realizarse en una parte del periodo. Por ejemplo, el cultivo en suspensión en un medio que contiene un potenciador de la señal de Wnt durante no menos de 3 días desde el inicio de la segunda etapa de cultivo es suficiente para inducir hipocampo o un tejido progenitor del mismo y, a partir de este momento, el cultivo en suspensión puede continuarse después de cambiar el medio a otro sin un potenciador de la señal de Wnt.
- 45
- En este caso, puede inducirse la diferenciación selectiva a hipocampo al prolongar el periodo de cultivo en un medio que contiene un potenciador de la señal de Wnt (es decir, la diferenciación a un tejido telencefálico distinto del hipocampo (p. ej., corteza cerebral, plexo coroideo) no se produce fácilmente en el mismo agregado celular). En una realización, puede inducirse hipocampo o un tejido progenitor del mismo en no menos del 80 % de la población de agregados celulares. Por otra parte, cuando el periodo de cultivo en un medio que contiene un potenciador de la señal de Wnt es breve, puede producirse fácilmente la diferenciación a un tejido telencefálico distinto del hipocampo (p. ej., corteza cerebral, plexo coroideo) en el mismo agregado celular y puede obtenerse un agregado celular que contiene tejido hipocámpico o un tejido progenitor del mismo, así como corteza cerebral o un tejido progenitor de la misma y/o plexo coroideo o un tejido progenitor del mismo en el mismo agregado celular.
- 50
- 55 En una realización, un medio usado para la inducción de hipocampo o un tejido progenitor del mismo no contiene ninguna sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo (BMP4, etc.). Usando un medio sin ninguna sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo (BMP4,

etc.), se inhibe la inducción de la diferenciación a plexo coroideo y se hace posible la inducción selectiva de tejido hipocámpico o un tejido progenitor del mismo.

5 En otra realización, un medio usado para la inducción de hipocampo o un tejido progenitor del mismo puede contener una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénético óseo (BMP4, etc.). En este caso, disminuye la selectividad de la diferenciación a hipocampo, mientras que puede producirse fácilmente la diferenciación a un tejido telencefálico distinto del hipocampo (p. ej., plexo coroideo) en el mismo agregado celular.

10 La inducción del hipocampo o un tejido progenitor del mismo puede confirmarse usando como índice la expresión de un marcador del reborde cortical (Lmx1a, Otx2, etc.) y la expresión de un marcador telencefálico (Foxg1, etc.). El tiempo necesario para la inducción del hipocampo o un tejido progenitor del mismo varía dependiendo de las condiciones de cultivo y del tipo de mamífero del que derivan las células madre pluripotentes, y no puede especificarse generalmente. Sin embargo, cuando se usan células madre pluripotentes humanas, se induce hipocampo o un tejido progenitor del mismo dentro del agregado, por ejemplo, hacia el día 24 desde el inicio de la segunda etapa de cultivo. Seleccionando un agregado celular para el que se ha confirmado la inducción de hipocampo o un tejido progenitor del mismo de los múltiples agregados celulares obtenidos, puede obtenerse un agregado celular que contiene hipocampo o un tejido progenitor del mismo.

(6) Inducción de plexo coroideo, tejido progenitor hipocámpico y tejido progenitor cortical

15 En la segunda etapa de cultivo del método de la presente invención, el cultivo en suspensión se realiza transitoriamente en presencia de un potenciador de la señal de Wnt y una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénético óseo, con lo que pueden inducirse plexo coroideo (o un tejido progenitor del mismo), hipocampo (o tejido progenitor) y corteza cerebral (o un tejido progenitor del mismo) en un agregado celular.

20 Es decir, en la segunda etapa de cultivo, el cultivo en suspensión se realiza en presencia de un potenciador de la señal de Wnt y una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénético óseo, y el agregado celular obtenido se sigue cultivando en ausencia de un potenciador de la señal de Wnt y de una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénético óseo. Como resultado, se forman plexo coroideo (o tejido progenitor del mismo), un tejido hipocámpico (o tejido progenitor) y un tejido cortical cerebral (o un tejido progenitor del mismo) en el neuroepitelio continuo contenido en el agregado celular obtenido. En una realización, pueden inducirse plexo coroideo (o un tejido progenitor del mismo), un tejido hipocámpico (o tejido progenitor) y un tejido cortical cerebral (o un tejido progenitor del mismo) en un neuroepitelio continuo en no menos del 80 % de la población de agregados celulares.

25 Aunque sin limitarse a la teoría, puede fluir una señal denominada actividad organizadora debido a una serie de operaciones que incluyen la formación de tejido del plexo coroideo por el tratamiento con un potenciador de la señal de Wnt y una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénético óseo y la eliminación de estos factores (promoción por adición y recuperación por eliminación) (método de inducción-reversión), y puede conseguirse la autoorganización apropiada de tejido del plexo coroideo, reborde cortical, tejido de la circunvolución dentada y tejido del cuerno de Amón.

30 El potenciador de la señal de Wnt no está particularmente limitado, siempre que puedan inducirse plexo coroideo (o un tejido progenitor del mismo), hipocampo (o tejido progenitor) y corteza cerebral (o un tejido progenitor de la misma) en un agregado celular cuando se usa en el método mencionado anteriormente y, por ejemplo, pueden mencionarse un inhibidor de GSK-3 β , Wnt3a recombinante, un agonista de Wnt (compuesto), Dkk (inhibidor de la proteína inhibidora de Wnt), R-espondina y similares. Los ejemplos del inhibidor de GSK-3 β incluyen CHIR99021, kenpaulona, 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO) y similares. El potenciador de la señal de Wnt es preferiblemente un inhibidor de GSK-3 β , más preferiblemente CHIR99021.

35 La concentración del potenciador de la señal de Wnt no está particularmente limitada, siempre que puedan inducirse plexo coroideo (o un tejido progenitor del mismo), hipocampo (o tejido progenitor) y corteza cerebral (o un tejido progenitor de la misma) en un agregado celular cuando se usa en el método mencionado anteriormente. Cuando se usa CHIR99021, esta es generalmente de aproximadamente 0,1 μ M a 100 μ M, preferiblemente de aproximadamente 1 μ M a 30 μ M (p. ej., 3 μ M).

40 Los ejemplos de la sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénético óseo incluyen BMP2, BMP4, BMP7, GDF5 y similares. Preferiblemente, la sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénético óseo es BMP4.

45 La concentración de la sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénético óseo en un medio no está particularmente limitada, siempre que puedan inducirse plexo coroideo (o un tejido progenitor del mismo), hipocampo (o tejido progenitor) y corteza cerebral (o un tejido progenitor de la misma) en un agregado celular cuando se usa en el método mencionado anteriormente. Cuando se usa BMP4 como sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénético óseo, su concentración es generalmente de 0,05 -10 nM, preferiblemente de 0,1-2,5 nM (p. ej., 0,5 nM).

50 En una realización preferible, un medio para usar en la segunda etapa de cultivo en esta metodología puede contener

el suplemento N2, el concentrado de lípidos definido químicamente, suero y heparina.

Dado que el periodo de cultivo en un medio que contiene un potenciador de la señal de Wnt y una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo (BMP4, etc.) varía dependiendo de las condiciones de cultivo y del tipo de mamífero del que derivan las células madre pluripotentes, no puede especificarse generalmente. Sin embargo, cuando se usan células madre pluripotentes humanas, es generalmente de 1-7 días, preferiblemente de 2-4 días (p. ej., 3 días).

Dado que el periodo de cultivo después de eliminar el potenciador de la señal de Wnt y la sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo (BMP4, etc.) varía dependiendo de las condiciones de cultivo y del tipo de mamífero del que derivan las células madre pluripotentes, no puede especificarse generalmente. Sin embargo, cuando se usan células madre pluripotentes humanas, es generalmente de no menos de 10 días, preferiblemente de no menos de 14 días.

La formación continua de plexo coroideo (o un tejido progenitor del mismo), hipocampo (o tejido progenitor) y un tejido cortical cerebral (o un tejido progenitor del mismo) en un agregado celular puede confirmarse usando como índice la expresión de marcadores para cada tejido. Por ejemplo, se forman de manera continua en el mismo neuroepitelio una región de plexo coroideo positiva para Lmx1a y negativa para Foxg1, una región de reborde cortical débilmente positiva para Foxg1 que expresa Lmx1a y Otx2, una región de tejido progenitor hipocámpico positiva para Lef1 y positiva para Foxg1 y tejido progenitor cortical negativo para Lef1 y positivo para Foxg1, en una configuración mutuamente adyacente similar a la observada *in vivo*.

Seleccionando de la población de agregados celulares obtenida un agregado celular, en donde se forman plexo coroideo (o un tejido progenitor del mismo) hipocampo (o tejido progenitor) y corteza cerebral (o un tejido progenitor de la misma) en un neuroepitelio continuo, puede obtenerse el agregado celular deseado.

(7) Formación tridimensional continua de cada región del tejido hipocámpico

De manera similar a (6), en la segunda etapa de cultivo del método de la presente invención, el cultivo en suspensión se realiza transitoriamente en presencia de un potenciador de la señal de Wnt y una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo, con lo que puede inducirse un tejido hipocámpico o un tejido progenitor del mismo que contiene de manera continua un tejido de la circunvolución dentada (o un tejido progenitor del mismo) y un tejido del cuerno de Amón (o un tejido progenitor del mismo) en un agregado celular. La diferenciación de un tejido del cuerno de Amón (o un tejido progenitor del mismo) a partir de células madre pluripotentes no ha sido descrita hasta el momento.

Es decir, en la segunda etapa de cultivo, el cultivo en suspensión se realiza en presencia de un potenciador de la señal de Wnt y una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo, y el agregado celular obtenido se sigue cultivando en condiciones de alta presión parcial de oxígeno y en ausencia de un potenciador de la señal de Wnt y de una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo. Como resultado, se forman un tejido hipocámpico o un tejido progenitor del mismo que contiene un tejido de la circunvolución dentada (o un tejido progenitor del mismo) y un tejido del cuerno de Amón (o un tejido progenitor del mismo) en el neuroepitelio continuo en el agregado celular obtenido. Además, como resultado del cultivo, puede obtenerse un agregado celular que contiene un tejido del cuerno de Amón (o un tejido progenitor del mismo).

Aunque sin limitarse a la teoría, puede fluir una señal denominada actividad organizadora debido a una serie de operaciones que incluyen la formación de tejido del plexo coroideo por el tratamiento con un potenciador de la señal de Wnt y una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo y la eliminación de estos factores (promoción por adición y recuperación por eliminación) (método de inducción-reversión), y puede conseguirse la autoorganización apropiada de tejido del plexo coroideo, reborde cortical, tejido de la circunvolución dentada y tejido del cuerno de Amón.

El potenciador de la señal de Wnt no está particularmente limitado, siempre que puedan inducirse un tejido de la circunvolución dentada (o un tejido progenitor del mismo) y un tejido del cuerno de Amón (o un tejido progenitor del mismo) en un agregado celular cuando se usa en el método mencionado anteriormente y, por ejemplo, pueden mencionarse un inhibidor de GSK-3 β , Wnt3a recombinante, un agonista de Wnt (compuesto), Dkk (inhibidor de la proteína inhibidora de Wnt), R-espondina y similares. Los ejemplos del inhibidor de GSK-3 β incluyen CHIR99021, kenpaulona, 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO) y similares. El potenciador de la señal de Wnt es preferiblemente un inhibidor de GSK-3 β , más preferiblemente CHIR99021.

La concentración del potenciador de la señal de Wnt no está particularmente limitada, siempre que puedan inducirse un tejido de la circunvolución dentada (o un tejido progenitor del mismo) y un tejido del cuerno de Amón (o un tejido progenitor del mismo) en un agregado celular cuando se usa en el método mencionado anteriormente. Cuando se usa CHIR99021, esta es generalmente de aproximadamente 0,1 μ M a 30 μ M, preferiblemente de aproximadamente 1 μ M a 10 μ M (p. ej., 3 μ M).

Los ejemplos de la sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogénico óseo incluyen BMP2, BMP4, BMP7, GDF5 y similares. Preferiblemente, la sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal

del factor morfogenético óseo es BMP4.

La concentración de la sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogenético óseo en un medio no está particularmente limitada, siempre que puedan inducirse un tejido de la circunvolución dentada (o un tejido progenitor del mismo) y un tejido del cuerno de Amón (o un tejido progenitor del mismo) en un agregado celular cuando se usa en el método mencionado anteriormente. Cuando se usa BMP4 como sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogenético óseo, su concentración es generalmente de 0,05 -10 nM, preferiblemente de 0,1-2,5 nM (p. ej., 0,5 nM).

En una realización preferible, un medio para usar en la segunda etapa de cultivo en esta metodología puede contener el suplemento N2, el concentrado de lípidos definido químicamente, suero y heparina.

En otra realización preferible, un medio para usar en la segunda etapa de cultivo en esta metodología puede contener el suplemento B27, L-glutamina y suero.

Dado que el periodo de cultivo en un medio que contiene un potenciador de la señal de Wnt y una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogenético óseo (BMP4, etc.) varía dependiendo de las condiciones de cultivo y del tipo de mamífero del que derivan las células madre pluripotentes, no puede especificarse generalmente. Sin embargo, cuando se usan células madre pluripotentes humanas, es generalmente de 1-7 días, preferiblemente de 2-4 días (p. ej., 3 días).

Dado que el periodo de cultivo después de eliminar el potenciador de la señal de Wnt y la sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogenético óseo (BMP4, etc.) varía dependiendo de las condiciones de cultivo y del tipo de mamífero del que derivan las células madre pluripotentes, no puede especificarse generalmente. Sin embargo, cuando se usan células madre pluripotentes humanas, es generalmente de no menos de 40 días, preferiblemente de no menos de 51 días.

La formación continua de un tejido de la circunvolución dentada (o un tejido progenitor del mismo) y un tejido del cuerno de Amón en un agregado celular puede confirmarse usando como índice la expresión de marcadores para cada tejido. Por ejemplo, el tejido de la circunvolución dentada (o un tejido progenitor del mismo) puede especificarse por ser positivo para Lef1 (marcador de tejido progenitor hipocámpico), positivo para Zbtb20, positivo para Prox1 y similares. El cuerno de Amón (o un tejido progenitor del mismo) puede especificarse por ser positivo para Lef1 (marcador del tejido progenitor hipocámpico), débilmente positivo para Zbtb20 y similares.

En una realización, un agregado celular obtenido por la presente invención contiene también, además de un tejido de la circunvolución dentada (o un tejido progenitor del mismo) y un tejido del Cuerno de Amón (o un tejido progenitor del mismo), reborde cortical en el neuroepitelio continuo en el agregado celular. Es decir, en el neuroepitelio continuo pueden inducirse un tejido hipocámpico o un tejido progenitor del mismo que contiene tejido de la circunvolución dentada (o un tejido progenitor del mismo), tejido del cuerno de Amón (o un tejido progenitor del mismo) y reborde cortical.

En una realización, un agregado celular obtenido por el presente método muestra un gradiente de intensidad de expresión en el que la expresión de Zbtb20 es más intensa en una parte (el tejido de la circunvolución dentada o un tejido progenitor del mismo) adyacente a la región del plexo coroideo (positiva para Lmx1a, negativa para Foxg1) o al reborde cortical (positivo para Lmx1a, débilmente positivo para Foxg1) y se vuelve más débil a medida que la parte se aleja de aquí en el neuroepitelio positivo para Lef1.

En otra realización, se forma un tejido de la circunvolución dentada o un tejido progenitor del mismo (p. ej., positivo para Zbtb20, positivo para Prox1) entre un tejido del cuerno de Amón o un tejido progenitor del mismo (p. ej., débilmente positivo para Zbtb20) y el reborde cortical y el plexo coroideo. Es decir, se forman un tejido de la circunvolución dentada (o un tejido progenitor del mismo), un tejido del cuerno de Amón (o un tejido progenitor del mismo) y reborde cortical de manera continua en el neuroepitelio en una posición mutuamente adyacente similar a la que se observa *in vivo*.

Seleccionando de la población de agregados celulares obtenida un agregado celular, en donde se forman un tejido de la circunvolución dentada (o un tejido progenitor del mismo) y un tejido del cuerno de Amón (o un tejido progenitor del mismo) en un neuroepitelio continuo, puede obtenerse el agregado celular deseado.

(8) Inducción de tejido de ganglio basal

En el método de la presente invención, se trata un agregado celular con un agonista de la señal de Sonic hedgehog (Shh), mediante lo cual puede inducirse ganglio basal o un tejido progenitor del mismo en el agregado celular.

El agonista de la señal de Shh no está particularmente limitado, siempre que pueda inducirse ganglio basal o un tejido progenitor del mismo cuando se usa en el método mencionado anteriormente. Por ejemplo, pueden mencionarse las proteínas pertenecientes a la familia Hedgehog (p. ej., Shh), un agonista del receptor de Shh, purmorfamina, SAG (N-metil-N'-(3-piridinilbencil)-N'-(3-clorobenzo[b]tiofeno-2-carbonil)-1,4-diaminociclohexano) y similares. El agonista de la señal de Shh es preferiblemente SAG.

La concentración del agonista de la señal de Shh no está particularmente limitada, siempre que pueda inducirse un tejido de ganglio basal o un tejido progenitor del mismo cuando se usa en el método mencionado anteriormente. Cuando se usa SAG, esta es generalmente de 1 nM a 10 μ M.

5 Cuando se usa SAG en una concentración comparativamente baja (p. ej., de 1 nM a 75 nM, preferiblemente de 25 nM a 50 nM), se induce preferentemente la eminencia ganglionar lateral (EGL) del ganglio basal en el neuroepitelio telencefálico. Por otra parte, cuando se usa SAG en una concentración comparativamente alta (p. ej., de 100 nM a 10 μ M, preferiblemente de 250 nM a 1 μ M), se induce preferentemente la eminencia ganglionar medial (EGM) en el neuroepitelio telencefálico.

10 Un agregado celular para someter al tratamiento con el agonista de la señal de Shh es preferiblemente un agregado celular positivo para un marcador telencefálico. El tratamiento con el agonista de la señal de Shh (cultivo en un medio que contiene el agonista de la señal de Shh) puede realizarse en una sola o en las dos etapas de cultivo primera y segunda. El cultivo en un medio que contiene un agonista de la señal de Shh puede realizarse durante todo el periodo de cultivo hasta la inducción del tejido de ganglio basal o solo en una parte del periodo.

15 En una realización, el tratamiento con el agonista de la señal de Shh se realiza transitoriamente durante 3-10 días (p. ej., 7 días) desde la última fase de la primera etapa de cultivo hasta la primera fase de la segunda etapa de cultivo, donde se expresa un marcador telencefálico en los agregados celulares.

La inducción de ganglio basal o un tejido progenitor del mismo puede confirmarse usando como índice la expresión de un marcador de tejido de ganglio basal. Como marcador de la eminencia ganglionar lateral (EGL) pueden mencionarse Gsh2 y GAD65. Como marcador de la eminencia ganglionar medial (EGM) puede mencionarse Nkx2.1.

20 El tiempo necesario para la inducción de ganglio basal o un tejido progenitor del mismo varía dependiendo de las condiciones de cultivo y del tipo de mamífero del que derivan las células madre pluripotentes y no puede especificarse generalmente. Sin embargo, cuando se usan células madre pluripotentes humanas, se induce ganglio basal o un tejido progenitor del mismo dentro del agregado, por ejemplo, a los 24 días del inicio de la segunda etapa de cultivo. En una realización, puede inducirse ganglio basal o un tejido progenitor del mismo en no menos del 70 % de la población de agregados celulares. Seleccionando un agregado celular para el que se ha confirmado la inducción de ganglio basal o un tejido progenitor del mismo de los múltiples agregados celulares obtenidos, puede obtenerse un agregado celular que contiene ganglio basal o un tejido progenitor del mismo.

30 En una realización preferida, el ganglio basal (o un tejido progenitor del mismo) (p. ej., EGL, EGM) inducido por el presente método se forma de manera continua con la corteza cerebral (o un tejido progenitor de la misma) en un agregado celular. Es decir, se forman ganglio basal (o un tejido progenitor del mismo) (p. ej., EGL, EGM) y corteza cerebral (o un tejido progenitor de la misma) en el neuroepitelio continuo contenido en el agregado celular obtenido. En una realización, pueden inducirse ganglio basal (o un tejido progenitor del mismo) (p. ej., EGL, EGM) y corteza cerebral (o un tejido progenitor de la misma) en un neuroepitelio continuo en no menos del 50 % de la población de agregados celulares.

35 (9) Regulación exógena de la formación de los ejes en la corteza cerebral

40 Como se menciona anteriormente, en el método de la presente invención, se forman espontáneamente los ejes dorsoventral y anteroposterior de la corteza cerebral. En una realización, en la zona ventricular cortical contenida en el agregado celular obtenido en la segunda etapa de cultivo, la expresión del marcador dorsocaudal (Coup-TF1, Lhx2, etc.) muestra un gradiente, siendo más intensa en un lado y más débil en el lado opuesto, y la expresión del marcador rostral (p. ej., SP8) muestra un patrón de gradiente inverso al del marcador dorsocaudal. Por reacción con FGF8, que se sabe que es importante para la adquisición de la especificidad rostral de la corteza cerebral, puede rostralizarse toda la zona ventricular de la corteza cerebral.

45 El tratamiento con FGF8 puede realizarse usando un medio que contiene FGF8 en la segunda etapa de cultivo. La concentración de FGF8 en el medio es una concentración suficiente para la rostralización y es generalmente de 10-1000 ng/ml, preferiblemente de 50-300 ng/ml.

El tratamiento con FGF8 se realiza durante toda o parte de la segunda etapa de cultivo.

50 La rostralización de toda la zona ventricular de la corteza cerebral puede confirmarse sobre la base de la atenuación general de la expresión de un marcador dorsocaudal (Coup-TF1, Lhx2, etc.), un aumento general de un marcador rostral (p. ej., Sp8) en toda la zona ventricular y similares. Esto indica la posibilidad de que una región del lóbulo frontal, el lóbulo occipital y similares a lo largo del eje dorsoventral de la corteza cerebral puedan controlarse selectivamente e inducirse por un tratamiento con FGF8.

(10) Inducción de neuronas hipocámpicas

55 Un agregado celular que contiene hipocampo o un tejido progenitor del mismo obtenido por el método de cualquiera de los puntos anteriores (5)-(7) se dispersa y las células dispersas se someten después a un cultivo de adhesión *in vitro*, con lo cual pueden obtenerse neuronas hipocámpicas maduras. La presente invención también proporciona tal

método de producción de neuronas hipocámpicas.

En el método de producción, se usa preferiblemente un agregado celular que contiene hipocampo o un tejido progenitor del mismo obtenido por el método del punto (7) mencionado anteriormente (un agregado celular que contiene un tejido hipocámpico o un tejido progenitor del mismo que contiene un tejido de la circunvolución dentada (o un tejido progenitor del mismo) y un tejido del cuerno de Amón (o un tejido progenitor del mismo) de manera continua).

Un agregado celular que contiene hipocampo o un tejido progenitor del mismo se trata con una disolución de disociación celular apropiada y se dispersa a un estado de células individuales o un estado de células prácticamente individuales. Los ejemplos de la disolución de disociación celular incluyen una disolución acuosa fisiológica que contiene un quelante como EDTA, etc.; una proteasa como papaína, tripsina, colagenasa IV, metaloproteinasa y similares, y similares, que se usan solos o en una combinación apropiada.

Las células dispersas se suspenden en un medio apropiado para el cultivo de las células y se siembran en un recipiente de cultivo. Como recipiente de cultivo, pueden usarse recipientes de cultivo adhesivos usados generalmente para el cultivo de adhesión de las células. Los ejemplos del recipiente de cultivo incluyen, pero no se limitan a una placa, placa de Petri, matraz, placa de pocillos múltiples, portaobjetos con cámaras y similares.

Para mejorar la adhesividad para las células, una superficie del recipiente de cultivo puede recubrirse con una matriz extracelular tal como laminina, fibronectina, colágeno, preparación de membrana basal y similares; o un polímero tal como poli-L-lisina, poli-D-lisina, poli-L-ornitina y similares. En una realización, una superficie de un recipiente de cultivo se recubre directa o indirectamente con laminina y fibronectina. El recubrimiento indirecto puede realizarse, por ejemplo, recubriendo primeramente una superficie del recipiente de cultivo con poli-L-lisina para formar una subcapa de poli-L-lisina y aplicando laminina y fibronectina sobre la subcapa.

El medio para usar para el cultivo de adhesión de las células dispersas puede prepararse con un medio usado para el cultivo de células animales (preferiblemente neuronas) como medio basal. El medio basal no está particularmente limitado, siempre que pueda usarse para el cultivo de células animales (preferiblemente neuronas) y puede ser DMEM, medio F-12 de Ham, medio Neurobasal, IMDM, M199, EMEM, α MEM, medio de Fischer, un medio mezcla de estos y similares. Preferiblemente se usa medio Neurobasal.

Para promover la maduración de neuronas hipocámpicas, el medio contiene preferiblemente el suplemento B27 como sustituto de suero. El suplemento B27 es una composición conocida que incluye biotina, L-carnitina, corticosterona, etanolamina, D(+)-galactosa, glutatión reducido, ácido linoleico, ácido linoléico, progesterona, putrescina, acetato de retinilo, selenio, triyodo-L-tironina, vitamina E, acetato de vitamina E, albúmina bovina, catalasa, insulina, superóxido dismutasa, transferrina y similares. Para evitar la inhibición de la maduración de neuronas hipocámpicas, es preferible el uso de un suplemento B27 sin vitamina A, el cual es dicha composición sin acetato de retinilo. La cantidad del suplemento B27 que ha de añadirse se determina apropiadamente de tal manera que promueva la maduración de neuronas hipocámpicas.

En una realización, para promover la maduración de neuronas hipocámpicas, el medio puede contener BDNF. Cuando se incluye BDNF, su concentración en el medio no está particularmente limitada, siempre que se promueva la maduración de neuronas hipocámpicas. En general, no es inferior a 1 ng/ml, preferiblemente no inferior a 10 ng/ml, más preferiblemente no inferior a 20 ng/ml. El límite superior de la concentración de BDNF no está particularmente limitado, siempre que se promueva la maduración de neuronas hipocámpicas. Dado que la actividad está saturada incluso cuando se añade BDNF en exceso, su concentración generalmente no es superior a 1000 ng/ml, preferiblemente no superior a 100 ng/ml. BDNF está preferiblemente aislado.

En una realización, para promover la maduración de neuronas hipocámpicas, el medio puede contener NT-3. Cuando se incluye NT-3, su concentración en el medio no está particularmente limitada, siempre que se promueva la maduración de neuronas hipocámpicas. En general, no es inferior a 1 ng/ml, preferiblemente no inferior a 10 ng/ml, más preferiblemente no inferior a 20 ng/ml. El límite superior de la concentración de NT-3 no está particularmente limitado, siempre que se promueva la maduración de neuronas hipocámpicas. Dado que la actividad está saturada incluso cuando se añade NT-3 en exceso, su concentración generalmente no es superior a 1000 ng/ml, preferiblemente no superior a 100 ng/ml. NT-3 está preferiblemente aislado.

En una realización, el medio puede contener un suero. El suero puede contribuir a la maduración de neuronas hipocámpicas. Los ejemplos del suero incluyen, pero no se limitan a SFB y similares. El suero está preferiblemente inactivado. La concentración del suero en el medio puede ajustarse apropiadamente dentro del intervalo en el que puede contribuir al cultivo de maduración de la zona ventricular durante largo tiempo. Generalmente es del 1-20 % (v/v).

En una realización, el medio puede contener otro aditivo, siempre que no ejerza ninguna influencia negativa en la maduración de neuronas hipocámpicas. Los ejemplos del aditivo incluyen, pero no se limitan a insulina, una fuente de hierro (p. ej., transferrina, etc.), un mineral (p. ej., selenato de sodio, etc.), sacáridos (p. ej., glucosa, etc.), una proteína del suero (p. ej., albúmina, etc.), un aminoácido (p. ej., L-glutamina, etc.), un agente reductor (p. ej., 2-mercaptoetanol, etc.), vitaminas (p. ej., ácido ascórbico, d-biotina, etc.), un antibiótico (p. ej., estreptomocina, penicilina, gentamicina, etc.), un agente tamponante (p. ej., HEPES, etc.) y similares.

En una realización preferible, un medio para usar para el cultivo de adhesión de las células dispersas contiene el suplemento B27. Preferiblemente, el suplemento B27 no contiene vitamina A. El medio puede contener además SFB y L-glutamina.

5 En otra realización preferible, un medio para usar para el cultivo de adhesión de las células dispersas contiene el suplemento B27, BDNF y NT-3. Preferiblemente, el suplemento B27 no contiene vitamina A. El medio puede contener además SFB y L-glutamina.

10 Para inhibir la muerte celular de las células dispersas, puede añadirse un inhibidor de la cinasa superenrollada asociada a Rho (ROCK) desde el inicio del cultivo de adhesión. El inhibidor de ROCK se añade, por ejemplo, en un plazo de 15 días, preferiblemente de 10 días, más preferiblemente de 6 días, desde el inicio del cultivo. Los ejemplos del inhibidor de ROCK incluyen Y-27632 (dihidrato de (+)-(R)-trans-4--(1-aminoetil)-N-(4-piridil)ciclohexanocarboxamida) y similares. La concentración del inhibidor de ROCK usado para el cultivo en suspensión es una concentración capaz de inhibir la muerte celular. Por ejemplo, para Y-27632, esta concentración es normalmente de aproximadamente 0,1 a 200 μM , preferiblemente de aproximadamente 2 a 50 μM . La concentración del inhibidor de ROCK puede modificarse dentro del periodo de adición. Por ejemplo, la concentración puede reducirse a la mitad en la última fase del periodo.

15 Otras condiciones de cultivo de las células dispersas en el cultivo de adhesión, tales como la temperatura de cultivo, la concentración de CO_2 y similares, pueden establecerse como sea apropiado. La temperatura de cultivo no está particularmente limitada y es, por ejemplo, de aproximadamente 30 a 40 $^{\circ}\text{C}$, preferiblemente de aproximadamente 37 $^{\circ}\text{C}$. La concentración de CO_2 es, por ejemplo, de aproximadamente el 1 al 10 %, preferiblemente de aproximadamente el 5 %.

20 En un plazo de 2-3 días desde el inicio del cultivo de adhesión, las células sembradas se adhieren a una superficie del recipiente de cultivo y comienzan a extender neuritas.

Aunque el periodo del cultivo de adhesión de las células dispersas no está particularmente limitado, siempre que sea suficiente para la diferenciación de las células dispersas a neuronas hipocámpicas maduras, generalmente es de no menos de 50 días, preferiblemente no menos de 80 días, más preferiblemente no menos de 100 días.

25 En una realización, el cultivo de adhesión de las células dispersas se realiza hasta la aparición de neuronas hipocámpicas maduras. La aparición de neuronas hipocámpicas maduras puede confirmarse mediante un marcador específico de neuronas hipocámpicas. Una neurona hipocámpica madura es, por ejemplo, positiva para Zbtb20 y Foxg1 y puede especificarse como una célula que tiene una dendrita positiva para MAP2. Por consiguiente, en una realización, el cultivo de adhesión de las células dispersas se realiza hasta que se confirma la aparición de una célula que es positiva para Zbtb20 y Foxg1 y tiene una dendrita positiva para MAP2.

La neurona hipocámpica madura mencionada anteriormente abarca células granulares dentadas del hipocampo (células comparativamente pequeñas con forma circular positivas para Prox1) y células piramidales de la región CA3 del hipocampo (células comparativamente grandes positivas para KA1).

35 Además de neuronas hipocámpicas, pueden inducirse astrocitos positivos para Zbtb20 y GFAP. La presente invención también proporciona un método de producción del astrocito.

Las células dispersas individuales forman pequeñas masas y se extienden neuritas entre las neuronas hipocámpicas maduras inducidas.

40 La neurona hipocámpica madura así inducida es funcional y produce respuestas de corriente eléctrica de sodio y potasio, un potencial de acción inducido y/o una corriente postsináptica excitadora espontánea (sEPSC) debido a la estimulación del potencial eléctrico. Estas actividades neurales pueden confirmarse usando la técnica de pinzamiento zonal de membrana.

La neurona hipocámpica madura inducida puede usarse también directamente para un análisis funcional y similares, o puede despegarse y aislarse del recipiente de cultivo usando una disolución de disociación celular apropiada.

45 (11) Uso de telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o un tejido progenitor del mismo, aislado de un agregado celular

50 En otro aspecto, puede aislarse telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o un tejido progenitor del mismo, de un agregado celular obtenido como se menciona anteriormente. La presente invención proporciona un agregado celular, telencéfalo o un tejido parcial del mismo, y un tejido progenitor del mismo, obtenidos por el método de la presente invención mencionado anteriormente. En otra realización, la presente invención proporciona una neurona hipocámpica obtenida por el método de la presente invención mencionado anteriormente.

El agregado celular, telencéfalo o un tejido parcial del mismo, tejidos progenitores del mismo y la neurona hipocámpica obtenidos por la presente invención pueden usarse para tratamientos de trasplante. Por ejemplo, el agregado celular, telencéfalo o un tejido parcial del mismo (corteza cerebral, ganglio basal, plexo coroideo, hipocampo, etc.), tejidos progenitores del mismo o la neurona hipocámpica obtenidos por la presente invención pueden usarse como fármaco

5 terapéutico para enfermedades que resultan de trastornos del telencéfalo (corteza cerebral, ganglio basal, plexo cororoideo, hipocampo, etc.) o para complementar las partes dañadas correspondientes en el estado dañado del telencéfalo (corteza cerebral, ganglio basal, plexo cororoideo, hipocampo, etc.). Trasplantando el agregado celular, telencéfalo o un tejido parcial del mismo (corteza cerebral, ganglio basal, plexo cororoideo, hipocampo, etc.), o un tejido precursor del mismo, o la neurona hipocámpica obtenidos por la presente invención a pacientes con enfermedades que resultan de trastornos del telencéfalo o de un telencéfalo dañado, pueden tratarse las enfermedades que resultan de los trastornos del telencéfalo o de daños en el telencéfalo. Como enfermedades que resultan de los trastornos del telencéfalo, pueden mencionarse la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, enfermedades isquémicas cerebrales (p. ej., apoplejía cerebral), epilepsia, traumatismo craneoencefálico, la enfermedad de las neuronas motoras, la enfermedad neurodegenerativa y similares. Como estados que requieren la administración de estas células, pueden mencionarse aquellos después de un procedimiento neuroquirúrgico (p. ej., después de la extirpación de un tumor cerebral).

15 En el tratamiento de trasplante, el rechazo del injerto debido a la diferencia de los antígenos de histocompatibilidad, es frecuentemente problemático, en que este problema, sin embargo, puede solucionarse usando una célula madre pluripotente (p. ej., una célula madre pluripotente inducida) establecida a partir de una célula somática del receptor del trasplante. Es decir, en una realización preferida, una célula madre pluripotente (p. ej., una célula madre pluripotente inducida) establecida a partir de una célula somática del receptor se usa como célula madre pluripotente en el método de la presente invención y se produce telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o un tejido precursor del mismo, o una neurona hipocámpica que es del mismo tipo inmunológico que el receptor y se trasplanta al receptor.

20 Además, el agregado celular, telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o un tejido precursor del mismo, o la neurona hipocámpica que se obtienen por la presente invención pueden usarse para cribado y evaluación de fármacos. Particularmente, dado que el telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o un tejido precursor del mismo, que se obtiene por la presente invención tiene una estructura superior extremadamente similar a la del telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o un tejido precursor del mismo, *in vivo*, puede aplicarse para cribado para identificar un fármaco terapéutico para enfermedades que resultan de trastornos del telencéfalo y telencéfalo dañado, pruebas de efectos secundarios y toxicidad (p. ej., una prueba sustitutiva de la prueba de estimulación de la córnea) de productos farmacéuticos, así como para el desarrollo de un nuevo método terapéutico para enfermedades del telencéfalo y similares.

30 La presente invención se explica en más detalle a continuación por referencia a los ejemplos siguientes, que son meras ilustraciones y no limitan el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo de referencia 1

Formación tridimensional selectiva de tejido progenitor cortical a partir de células madre pluripotentes humanas

Método

35 Se dispersaron células ME humanas (KhES-1; con un gen de la proteína fluorescente Venus insertado en un gen específico del telencéfalo, Foxg1) para obtener células individuales mediante un tratamiento con tripsina y, según el método SFEBq (Nakano et al., Cell StemCell, 2012), se formaron agregados que se sometieron al cultivo de agregados en suspensión a 37 °C en presencia del 5 % de CO₂ para la inducción de la diferenciación. Las 9000 células ME humanas dispersas se sembraron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en V a la que se había aplicado un recubrimiento superficial poco adsorbente para las células y el medio G-MEM (Gibco/Invitrogen) sin factores de crecimiento y enriquecido con el 20 % de KSR (sustituto de suero Knockout), una disolución de aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Gibco/Invitrogen), una disolución de piruvato de sodio 1 mM (Sigma) y 2-mercaptoetanol 0,1 mM se usó como medio para inducción de la diferenciación. Para inhibir la muerte celular inducida por la dispersión, se añadió el inhibidor de ROCK Y-27632 durante los primeros 3 días de inducción de la diferenciación y su concentración se redujo a la mitad durante los 3 días siguientes. Del día 0 al día 18 desde el inicio de la inducción de la diferenciación se añadió el inhibidor de la señal de Wnt IWR-1-endo (3 μM) y el inhibidor de la señal de TGFβ SB431542 (5 μM) y se dejaron reaccionar. El día 18 desde el inicio de la inducción de la diferenciación se transfirieron estos agregados a una placa de Petri sobre la que se había aplicado un recubrimiento superficial poco adhesivo para las células y se realizó el cultivo en suspensión a 37 °C, en presencia del 5 % de CO₂ y el 40 % de O₂. Del día 18 al día 35 se usó el medio DMEM/F12 (Gibco/Invitrogen) enriquecido con el 1 % del suplemento N2 (Gibco/Invitrogen) y el 1 % de concentrado de lípidos (concentrado de lípidos definido químicamente, Gibco/Invitrogen). A partir del día 35 se usó el medio enriquecido además con el 10 % de FSB, 5 μg/ml de heparina y el 1 % Matrigel reducido en factores de crecimiento (BD Bioscience). El agregado se analizó los días 1 y 34 desde el inicio de la inducción de la diferenciación y se analizó por inmunohistoquímica el día 42.

55 Resultados

A partir de los 18 días desde el inicio de la inducción de la diferenciación, se observó intensa fluorescencia de Foxg1::venus en el agregado. A los 26 días desde el inicio de la inducción de la diferenciación, se observó intensa fluorescencia de Foxg1::venus con buena reproducibilidad en no menos del 90 % de los agregados (figura 1A). A los

34 días desde el inicio de la inducción de la diferenciación, se observó fluorescencia de Foxg1::venus en el 75 % de las células totales. Todos los agregados eran positivos para Foxg1::venus (figura 1B). El agregado positivo para Foxg1::venus contenía una estructura similar al neuroepitelio (epitelial columnar pseudoestratificada) con una cavidad similar a un ventrículo en su interior. La estructura neuroepitelial tenía una capa de células de alta densidad celular positiva para Pax6 y Sox2 en el lado luminal (figura 1 D y E), mientras que en su parte más interna se encontraron células en mitosis positivas para la histona H3 fosforilada (figura 1F). Estas estructuras eran similares a la zona ventricular cortical en el primer trimestre. El exterior de la capa celular similar a la zona ventricular expresó un marcador de neuronas postmitóticas, Tuj1, y los marcadores de la placa cortical temprana Ctip2 y Tbr1. Este contenía células de Cajal-Retzius positivas para reelin, que son neuronas de la capa I de la corteza cerebral, y una capa rica en laminina cerca de la superficie. Por lo tanto, se demostró la formación de un tejido progenitor cortical en el agregado cultivado. Tal autoorganización de un tejido progenitor cortical en el primer trimestre humano se observó con buena reproducibilidad.

Ejemplo de referencia 2

Formación tridimensional de tejido progenitor de ganglios basales a partir de células madre pluripotentes humanas

Método

Hasta el día 35 de la inducción de la diferenciación, las células se cultivaron en condiciones de cultivo similares a las del ejemplo 1. Es decir, se cultivaron agregados de células ME humanas en una placa de 96 pocillos de fondo en V hasta los 18 días de la inducción de la diferenciación, los agregados suspendidos se transfirieron a una placa de Petri (6 cm de diámetro) no adhesiva para las células y se realizó el cultivo en suspensión a 37 °C en presencia del 5 % de CO₂ y el 40 % de O₂ desde el día 18 hasta el día 35 de la inducción de la diferenciación. Sin embargo, se añadió el agonista de la señal de Sonic hedgehog (Shh), SAG, al medio de cultivo del ejemplo 1 en una concentración final de 30 nM o 500 nM solo en el periodo desde el día 15 hasta el día 21 y se dejó reaccionar. El agregado se analizó por inmunohistoquímica el día 35.

Resultados

Al hacer reaccionar el agonista de la señal de Shh SAG 30 mM, se formó una eminencia ganglionar lateral (EGL) que expresaba Gsh2 en el neuroepitelio telencefálico positivo para Foxg1::venus (puntas de flecha en la figura 2 A, B). El neuroepitelio EGL positivo para Gsh2 se observó con buena reproducibilidad en estas condiciones en no menos del 70 % de los agregados. La EGL fetal produce neuronas estriatales que son neuronas GABAérgicas. De forma similar, se observaron neuronas GABAérgicas positivas para GAD65 por debajo del neuroepitelio EGL derivado de células ME humanas (figura 2B).

Por otra parte, al hacer reaccionar el agonista de la señal de Shh SAG 500 mM, el neuroepitelio telencefálico positivo para Foxg1::venus en el agregado formó una eminencia ganglionar medial (EGM) que expresaba Nkx2.1 (figura 2 C, D). El neuroepitelio EGM positivo para Foxg1::venus y positivo para Nkx2.1 se observó con buena reproducibilidad en estas condiciones en no menos del 80 % de los agregados. En el cerebro fetal, la EGM es un tejido progenitor del globo pálido y de interneuronas corticales. Se demostró que el presente método de cultivo podía inducir eficientemente los tejidos progenitores de ganglios basales EGL y EGM.

Ejemplo de referencia 3

Formación tridimensional continua de corteza cerebral y ganglio basal

Método

Hasta el día 35 de la inducción de la diferenciación, las células se cultivaron en condiciones de cultivo similares a las del ejemplo 2. Es decir, se cultivaron agregados de células ME humanas en una placa de 96 pocillos de fondo en V hasta los 18 días de la inducción de la diferenciación, los agregados suspendidos se transfirieron a una placa de Petri (9 cm de diámetro) no adhesiva para las células y se realizó el cultivo en suspensión a 37 °C en presencia del 5 % de CO₂ y el 40 % de O₂ desde el día 18 hasta el día 35 de la inducción de la diferenciación. Sin embargo, solo se añadió el agonista de la señal de Shh, SAG, al medio de cultivo en una concentración de 30 mM en el periodo desde el día 15 hasta el día 21 de la inducción de la diferenciación. El agregado se analizó por inmunohistoquímica el día 35.

Resultados

Como se muestra en el ejemplo 2, al hacer reaccionar el agonista de la señal de Shh SAG 30 mM, el neuroepitelio telencefálico fue positivo para Foxg1::venus y expresaba los marcadores de la eminencia ganglionar lateral (EGL) Gsh2 y GAD65 (figura 3 A, B). El neuroepitelio EGL se formó de manera continua con neuroepitelio cortical negativo para Gsh2 y positivo para el marcador de la corteza cerebral Pax6 (figura 3C). Estos resultados demuestran que se forman corteza cerebral y ganglio basal de manera continua en un agregado. Tal autoformación continua de corteza cerebral y ganglio basal en un agregado se observó con buena reproducibilidad en no menos del 50 % de los agregados.

Ejemplo de referencia 4

Formación tridimensional selectiva de tejido del plexo coroideo a partir de células madre pluripotentes humanas

Método

5 Después de su cultivo en una placa de 96 pocillos de fondo en V en las condiciones de cultivo del ejemplo 1 hasta los 18 días de la inducción de la diferenciación, los agregados suspendidos se transfirieron a una placa de Petri (9 cm de diámetro) y se realizó el cultivo en suspensión a 37 °C en presencia del 5 % de CO₂ y el 40 % de O₂. El medio de cultivo usado para el cultivo fue el medio DMEM/F12 (Gibco/Invitrogen), enriquecido con el 1 % del suplemento N2 (Gibco/Invitrogen), el 1 % de concentrado de lípidos (concentrado de lípidos definido químicamente, Gibco/Invitrogen), el 10 % de SFB, 5 µg/ml de heparina, el inhibidor de GSK-3β CHIR99021 3 µM y BMP4 0,5 nM desde el día 18 hasta el día 42, y los agregados se analizaron por inmunohistoquímica el día 42.

Resultados

15 En el cultivo en las condiciones mencionadas anteriormente, no se observó fluorescencia intensa de Bf1(Foxg1)::venus en el agregado ni siquiera a los 18 días del inicio de la inducción de la diferenciación. Dado que estos agregados formaron un epitelio monocapa rugoso y expresaban los marcadores del plexo coroideo TTR, Lmx1a y Otx2 (figura 4 A, B), se consideró que se había inducido un tejido del plexo coroideo en estas condiciones. La autoformación de tejido del plexo coroideo en estas condiciones se observó con buena reproducibilidad en no menos del 80 % de los agregados.

Ejemplo de referencia 5

Formación selectiva de reborde cortical (tejido progenitor fimbrial) a partir de células madre pluripotentes humanas

Método

20 Se cultivaron agregados celulares en una placa de 96 pocillos de fondo en V en las condiciones de cultivo del ejemplo 1 hasta el día 18 de la inducción de la diferenciación y después los agregados suspendidos se transfirieron a una placa de Petri (9 cm de diámetro) y se realizó el cultivo en suspensión a 37 °C en presencia del 5 % de CO₂ y el 40 % de O₂. El medio de cultivo usado para el cultivo desde el día 18 hasta el día 42 fue el medio DMEM/F12 (Gibco/Invitrogen) enriquecido con el 1 % del suplemento N2 (Gibco/Invitrogen), el 1 % de concentrado de lípidos (concentrado de lípidos definido químicamente, Gibco/Invitrogen), el 10 % de SFB, 5 µg/ml de heparina, el inhibidor de GSK-3β CHIR99021 3 µM (potenciador de la señal de Wnt) y los agregados se analizaron por inmunohistoquímica el día 42.

Resultados

30 Como se menciona anteriormente, en el cultivo en las condiciones que incluían un potenciador de la señal de Wnt desde el día 18 se formaron agregados que contenían principalmente neuroepitelio que expresaba los marcadores del reborde cortical Lmx1a y Otx2 y que eran débilmente positivos para Foxg1::venus (figura 5 A, B). El neuroepitelio no expresó el marcador del plexo coroideo TTR (figura 5A). A partir de tal patrón de expresión de marcadores, se considera que en estas condiciones se ha inducido selectivamente un tejido progenitor fimbrial, reborde cortical. La formación selectiva de reborde cortical en estas condiciones se observó con buena reproducibilidad en no menos del 80 % de los agregados.

Ejemplo de referencia 6

Formación tridimensional continua de plexo coroideo, tejido progenitor hipocámpico y tejido progenitor cortical

Método

40 Se cultivaron agregados de células ME humanas en una placa de 96 pocillos de fondo en V en las condiciones de cultivo del ejemplo 1 hasta los 18 días de la inducción de la diferenciación. A continuación, los agregados suspendidos se transfirieron a una placa de Petri (9 cm de diámetro) y se realizó el cultivo en suspensión a 37 °C en presencia del 5 % de CO₂ y el 40 % de O₂. El medio de cultivo usado para el cultivo desde el día 18 hasta el día 35 fue el medio DMEM/F12 (Gibco/Invitrogen) enriquecido con el 1 % del suplemento N2 (Gibco/Invitrogen), el 1 % de concentrado de lípidos (concentrado de lípidos definido químicamente, Gibco/Invitrogen), el 10 % de SFB y 5 µg/ml de heparina. Sin embargo, el inhibidor de GSK-3β CHIR99021 3 µM y BMP4 0,5 nM solo se añadieron al medio de cultivo en el periodo desde el día 18 hasta el día 21 y se dejaron reaccionar. Aunque estas sustancias promueven la diferenciación a plexo coroideo y reborde cortical, como se muestra en los ejemplos 4 y 5, en el cultivo del ejemplo 6 su acción se limitó a 3 días y se eliminaron del cultivo a partir del día 21. Estos agregados se analizaron por inmunohistoquímica el día 35.

Resultados

50 Como se menciona anteriormente, en el cultivo en las condiciones en las que el potenciador de la señal de Wnt y la señal BMP solo se incluyen transitoriamente y se eliminan a continuación, el agregado mostró la formación de neuroepitelio positivo para Foxg1::venus y neuroepitelio negativo para Foxg1::venus (figura 6A) los días 21-27 del

cultivo y estos constituían un neuroepitelio continuo. Un estado tal que contenía a la vez neuroepitelios adyacentes positivo y negativo para Foxg1::venus se observó con buena reproducibilidad en no menos del 80 % de los agregados. El neuroepitelio negativo para Foxg1::venus tenía una estructura que sobresalía fuera del agregado, y cuya punta tenía una estructura semiesférica. El día 35 desde el inicio de la inducción de la diferenciación se habían formado de manera continua en estos agregados una región de plexo coroideo positiva para Lmx1a y negativa para Foxg1::venus, una región de reborde cortical que expresaba Lmx1a y Otx2 y era débilmente positiva para Foxg1::venus, una región de tejido progenitor hipocámpico positiva para Lef1 y positiva para Foxg1::venus y un tejido progenitor cortical negativo para Lef1 y positivo para Foxg1::venus (figura 6 B, C). Tal autoformación continua de plexo coroideo, un tejido progenitor hipocámpico y un tejido progenitor cortical en un agregado se observó con buena reproducibilidad en no menos del 80 % de los agregados.

Ejemplo de referencia 7-1

Formación tridimensional continua de cada región del tejido hipocámpico

Método

Después del cultivo en una placa de 96 pocillos con fondo en V en las condiciones de cultivo del ejemplo 1 hasta los 18 días de la inducción de la diferenciación, los agregados suspendidos se transfirieron a una placa de Petri (9 cm de diámetro) no adhesiva para las células y se realizó el cultivo en suspensión a 37 °C en presencia del 5 % de CO₂ y el 40 % de O₂. El medio de cultivo usado para el cultivo a partir del día 18 fue cualquiera de los dos medios siguientes:

1) medio DMEM/F12 (Gibco/Invitrogen) enriquecido con el 1 % del suplemento N2 (Gibco/Invitrogen), el 1 % de concentrado de lípidos (concentrado de lípidos definido químicamente, Gibco/Invitrogen), el 10 % de SFB y 5 µg/ml de heparina

2) medio Neurobasal (Gibco/Invitrogen) enriquecido con el 2 % del suplemento B27 sin vitamina A (Gibco/Invitrogen), L-glutamina 2 mM y el 10 % de SFB.

De manera similar al ejemplo 6, se añadieron el inhibidor de GSK-3β CHIR99021 3 µM y BMP4 0,5 nM a estos medios de cultivo y se dejaron reaccionar solo en el periodo desde el día 18 hasta el día 21. Estos agregados se analizaron por inmunohistoquímica los días 61 y 75.

Resultados

En un cultivo que usaba el medio de cultivo de cualquiera de los puntos 1) y 2) mencionados anteriormente, al cultivarlo de manera continua hasta el día 61, se formó un neuroepitelio positivo para el marcador de tejido progenitor hipocámpico Lef1 y positivo para Foxg1::venus en los agregados (figura 7 A, B). El neuroepitelio contenía numerosas células nerviosas positivas para el marcador de tejido progenitor hipocámpico Nrp2 (figura 7D). El neuroepitelio también contenía numerosas células positivas para el marcador de neuronas y células progenitoras hipocámpicas Zbtb20 (figura 7C). En el tejido progenitor hipocámpico fetal se observó un gradiente de intensidad de expresión, en el que la expresión de Zbtb20 en la zona ventricular y subventricular del neuroepitelio es intensa en el tejido progenitor de la circunvolución dentada (la parte adyacente al plexo coroideo y el reborde cortical) y débil en el tejido progenitor del cuerno de Amón (la parte alejada del plexo coroideo y el reborde cortical). De manera similar, en el neuroepitelio positivo para Lef1 formado a partir de células ME humanas se observó un gradiente de intensidad de expresión, en el que la expresión de Zbtb20 era más intensa en una parte adyacente a las regiones del plexo coroideo (positiva para Lmx1a, negativa para Foxg1::venus) y el reborde cortical (positiva para Lmx1a, débilmente positiva para Foxg1::venus) y se debilitaba a medida que se alejaba de estas (figura 7 A, B, C). Cuando el cultivo se continuó en las mismas condiciones hasta el día 75, se confirmó la formación de una región que expresaba a la vez Zbtb20 y Prox1, característico de las neuronas de la circunvolución dentada, (Figura 7E, CD) entre la región del cuerno de Amón débilmente positiva para Zbtb20 (figura 7E, CA) y el reborde cortical (figura 7E, reborde) y el plexo coroideo (figura 7E, PC). Esto indica que en los tejidos hipocámpicos se forman de manera continua regiones que se están convirtiendo posiblemente en tejido de la circunvolución dentada y tejido del cuerno de Amón.

Ejemplo de referencia 7-2

Neuronas hipocámpicas maduras obtenidas por la formación tridimensional continua de cada región del tejido hipocámpico y un cultivo de dispersión

Método

Se indujeron tejidos hipocámpicos continuos por el método del ejemplo 7-1, los agregados celulares obtenidos durante los días 60-90 se dispersaron como células individuales con una disolución de disociación celular tal como una disolución enzimática de papaína (SUITOMO BAKELITE, MB-X9901) y similares, y las células se sembraron en una placa de vidrio, un porta objetos y similares para realizar un cultivo plano. Antes de realizar el cultivo, la superficie del vidrio se recubrió con poli-D-lisina (200 µg/ml a 4 °C durante la noche y con laminina a 20 µg/ml/fibronectina a 8 µg/ml a 37 °C durante la noche.

El medio de cultivo usado fue medio Neurobasal (Gibco/Invitrogen) enriquecido con el 2 % del suplemento B27 sin vitamina A (Gibco/Invitrogen), L-glutamina 2 mM y el 10 % de SFB. Las células se cultivaron en estas condiciones de cultivo plano adheridas a la superficie del vidrio durante 2-3 días después de la dispersión y empezaron a extender neuritas, que se analizaron por inmunohistoquímica entre el día 140 y el día 197.

5 Resultados

Las células dispersas como células individuales formaron fácilmente pequeños agregados y se extendieron neuritas entre las neuronas de las mismas (figura 8A). El marcador del hipocampo Zbtb20 fue positivo en casi todas las células (figura 8B) y Foxg1:: venus también fue positivo el día 197 (figura 8B). Aunque se encontraron otras células difusas distintas de las neuronas con dendritas positivas para MAP2, dado que estas células también eran Zbtb20 (+), tenían una forma similar a las células gliales y eran positivas para GFAP, se sugirió que eran astrocitos (figura 8C). Las células positivas para Zbtb20 contenían células positivas para el marcador de la circunvolución dentada Prox1 y células positivas para el marcador de la región CA3 del hipocampo KA1, en que las células positivas para Prox1 son células circulares comparativamente pequeñas que sugieren células granulares, mientras que las células positivas para KA1 tenían una forma comparativamente grande similar a las células piramidales (figura 8 D-E). Se consideró que esto era consistente con la formación de células granulares en la circunvolución dentada y células piramidales en la región CA *in vivo*. La proporción de las células positivas para Zbtb20 fue aproximadamente del 80 % y esta tasa de expresión se observó con buena reproducibilidad.

A partir de estos resultados, basándose en la expresión de los marcadores y la morfología celular se sugirió que podían inducirse células granulares de la circunvolución dentada del hipocampo y células piramidales de la región CA3 del hipocampo.

Ejemplo de referencia 7-3

Análisis funcional de neuronas hipocámpicas maduras obtenidas por un cultivo de dispersión de tejido hipocámpico inducido tridimensionalmente

Método

Se sometieron tejidos hipocámpicos continuos a un cultivo de dispersión por un método similar al del ejemplo 7-1. En este experimento, se realizó un cultivo plano mediante siembra en una placa, un portaobjetos y similares de vidrio o plástico. Para el cultivo, se recubrió una superficie de vidrio o plástico con poli-D-lisina (100 µg/ml) a 37 °C durante 3 h y con laminina a 20 µg/ml/fibronectina a 8 µg/ml durante la noche a 37 °C.

El medio de cultivo usado para los días 1-2 de la dispersión fue medio Neurobasal (Gibco/Invitrogen) enriquecido con el 2 % del suplemento B27 sin vitamina A (Gibco/Invitrogen), L-glutamina 2 mM, el 1 % de SFB, 20 ng/ml de BDNF, 20 ng/ml de NT-3 y 10 µg de Y-27632. A partir del día 3 de cultivo se usó medio Neurobasal (Gibco/Invitrogen) enriquecido con el 2 % del suplemento B27 sin vitamina A (Gibco/Invitrogen), L-glutamina 2 mM, el 10 % de SFB, 20 ng/ml de BDNF y 20 ng/ml de NT-3 y la mitad del medio se cambió cada tres días. Los días 30-60 desde la dispersión, las células se incubaron en fluo4-AM (life technologies, F-14201) (5 µM) a 37 °C durante 45 min, se lavaron con el medio y se sometieron al análisis funcional de imágenes de calcio usando LCM. Además, las células obtenidas por cultivo de dispersión por el mismo método se analizaron electrofisiológicamente por la técnica del pinzamiento zonal de membrana. La medición se realizó por pinzamiento zonal en células enteras y el electrodo de vidrio (valor de la resistencia del electrodo 3-6 MΩ) se usó después de llenar su interior con una disolución tampón interna (K-gluconato 120 mM, KCl 10 mM, EGTA 10 mM y un tampón que contenía Hepes 10 mM ajustado a pH 7,2 con KOH) y el interior de la cámara con una disolución tampón externa (NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 2 mM, glucosa 10 mM, NaH₂PO₄ 1 mM y un tampón que contenía Hepes 10 mM ajustado a pH 7,4 con NaOH). La medición se realizó mediante EPC10 (HEKA). Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Los componentes de capacitancia de la membrana se compensaron y el experimento se realizó en condiciones en las que el valor de la resistencia en serie caía por debajo de 3 veces el valor de la resistencia del electrodo. El potencial eléctrico de las corrientes eléctricas de sodio y potasio dependientes del potencial eléctrico se mantuvo en -60 mV y la medición se realizó con estimulación de -80 mM a +60 mV por -10 mV. Para la sEPSC, la corriente eléctrica se midió manteniendo el voltaje a -60 mM y el medicamento usado fue DNQX (sigma, D0540) a una concentración final de 10 µM. Como potencial de acción, se midió el potencial de membrana con estimulación hiperpolarizante.

Resultados

En las imágenes de calcio después de transcurrir 30-31 después de la dispersión, muchas neuronas mostraron actividad de disparo asociada con la afluencia de calcio (figura 9 A, A') y pudieron confirmarse diversos patrones de actividad en el tiempo para cada célula (figura 9B). En el pinzamiento zonal de membrana realizado el día 53 después de la dispersión se observaron respuestas de corrientes eléctricas de sodio y potasio, un potencial de acción inducido y una corriente postsináptica excitadora espontánea (sEPSC) debido a la estimulación con el potencial eléctrico (figura 9 C-E). Se observó que la sEPSC era inhibida por el antagonista del receptor de glutamato del tipo AMPA, DNQX (figura 9F).

Estos experimentos sugieren que se encontró actividad neural espontánea en las neuronas obtenidas en el ejemplo 7

y que estas células mostraron actividad en respuesta a la estimulación y que se obtuvo un nervio funcional que también tenía una red sináptica.

Ejemplo de referencia 8

5 Formación tridimensional de corteza cerebral con una estructura multicapa del segundo trimestre a partir de células madre pluripotentes humanas

Método

Hasta el día 35 de la inducción de la diferenciación, las células se cultivaron en las condiciones de cultivo del ejemplo 1. Es decir, se cultivaron agregados de células ME humanas en una placa de 96 pocillos de fondo en V hasta los 18 días de la inducción de la diferenciación, los agregados suspendidos se transfirieron a una placa de Petri (9 cm de diámetro) no adhesiva para las células y se realizó el cultivo en suspensión a 37 °C en presencia del 5 % de CO₂ y el 40 % de O₂. Para mantener los agregados en estado saludable durante largo tiempo, a partir del día 35, los agregados se dividieron a la mitad cada 2 semanas y el cultivo se continuó en el medio de cultivo descrito en el ejemplo 1. A partir del día 56 de la diferenciación de la inducción, los agregados celulares se transfirieron a una placa de cultivo no adhesiva para las células y altamente permeable al oxígeno (6 cm de diámetro, SARSTEDT) para continuar el cultivo. A partir del día 70 de la inducción de la diferenciación, la concentración de Matrigel reducido en factores de crecimiento (BD Bioscience) se cambió al 2 % y se continuó el cultivo. Estos agregados se analizaron por inmunohistoquímica el día 70 y el día 91.

Resultados

Al cultivarlos en las condiciones mencionadas anteriormente, los agregados mostraron una estructura morfológica claramente en capas el día 70 desde el inicio de la inducción de la diferenciación (figura 10 A-B'). En la capa superficial más externa de la estructura en capas se acumuló laminina y se formó una zona marginal que contenía células de Cajal-Retzius positivas para reelina (figura 10 C, C'). Inmediatamente por debajo de la zona marginal se observó una placa cortical que contenía neuronas de la placa cortical profunda positivas para Tbr1 y positivas para Ctip2 (figura 10 D, D'). En este momento, pocas neuronas expresaban el marcador de la placa cortical superficial Satb2 (figura 10E). En el lado luminal se formaron una delgada zona ventricular con una alta densidad celular que contenía células progenitoras neuronales positivas para Pax6 y positivas para Sox2 (figura 10 F, F') y una zona subventricular que contenía células positivas para Tbr2 por encima (figura 10G). Entre la placa cortical y la zona subventricular se desarrolló una región de células esparcidas muy similar a la zona intermedia en el segundo trimestre. Por debajo de la placa cortical se formó una capa celular positiva para calretinina y positiva para MAP2 que contenía numerosas neuritas (figura 10 H, H'). Dado que en esta capa celular se observó la acumulación de proteoglicano de sulfato de condroitina (CSPG) (figura 10H"), se sugirió la formación de una subplaca. El día 91 desde el inicio de la inducción de la diferenciación, el tejido cortical cerebral con la estructura multicapa se volvió más grueso (figura 10I) y tenía una zona ventricular desarrollada positiva para Sox2 y positiva para Pax6, así como una zona subventricular positiva para Tbr2 incluso en esta fase (figura 10 J, K, M). La placa cortical engrosó de manera similar (figura 10I) y se aclaró que no solo contenía neuronas de la placa cortical profunda positivas para Tbr1 y positivas para Ctip2, sino también muchas neuronas de la placa cortical superficial positivas para Satb2 y positivas para Brn2 (figura 10 L-O). Una subplaca positiva para calretinina se observó por debajo de la placa cortical incluso en esta fase (figura 10P). Por consiguiente, el presente método de cultivo ha permitido la formación tridimensional de un tejido con la estructura multicapa mostrada en la corteza cerebral del segundo trimestre humano, junto con el eje de las porciones superficial-profunda mostrado en la figura 10Q.

Ejemplo de referencia 9

Formación de un eje espontáneo de la corteza cerebral y control exógeno del mismo

Método

Hasta el día 42 de la inducción de la diferenciación, las células se cultivaron en condiciones de cultivo similares a las del ejemplo 1. Es decir, se cultivaron agregados de células ME humanas en una placa de 96 pocillos de fondo en V hasta los 18 días de la inducción de la diferenciación, los agregados suspendidos se transfirieron a una placa de Petri (9 cm de diámetro) no adhesiva para las células y se realizó el cultivo en suspensión desde el día 18 al día 42 de la inducción de la diferenciación a 37 °C en presencia del 5 % de CO₂ y el 40 % de O₂. El medio de cultivo usado fue el mismo usado en el ejemplo 1. Para estudiar la influencia de un factor exógeno, se añadieron 200 ng/ml de FGF8b al medio de cultivo y se dejaron reaccionar desde el día 24 hasta el día 42. En todas las condiciones, los agregados se analizaron por inmunohistoquímica el día 42.

Resultados

Como marcador dorsocaudal que se expresa y forma un gradiente desde el lado dorsocaudal al lado rostral en la zona ventricular cortical en el primer trimestre, se conocen Coup-TF1 y Lhx2. Por otro lado, como marcador rostral que muestra un gradiente inverso, se conoce Sp8. Cuando no se hace reaccionar un factor exógeno, el marcador dorsocaudal Coup-TF1 se expresó más intensamente en un lado y más débilmente en el lado opuesto también en la

- zona ventricular cortical inducida a partir de las células madre pluripotentes humanas (figura 11A). La expresión del marcador rostral Sp8 mostró un gradiente inverso al de Coup-TF1 (figura 11A) y la expresión del otro marcador dorsocaudal Lhx2 mostró el mismo gradiente que Coup-TF1 (figura 11 B, C). En un tejido telencefálico *in vivo*, el lado dorsocaudal de la corteza cerebral es adyacente al reborde cortical. Además, en la zona ventricular cortical inducida a partir de células madre pluripotentes humanas, se formó una región en la que se expresaban intensamente los marcadores dorsocaudales Coup-TF1 y Lhx2 adyacente a una región que expresaba los marcadores del reborde cortical Zic1 y Otx2 (figura 11 D, E). Esto sugiere que la corteza cerebral inducida a partir de células madre pluripotentes humanas adquirió espontáneamente polaridad desde el lado dorsocaudal hasta el lado rostral de manera autoorganizada en estas condiciones.
- 5
- 10 Se sabe que FGF8 es importante para adquirir la especificidad hacia el lado rostral de la corteza cerebral *in vivo*. Cuando no se hizo reaccionar ningún factor exógeno en el cultivo de agregados, la Erk fosforilada causada por la señal de FGF se acumuló fuertemente en el lado rostral, donde la expresión del marcador dorsocaudal Coup-TF1 es débil (figura 11F). Por otra parte, cuando se hizo reaccionar un FGF8b exógeno, la expresión general de Coup-TF1 se atenuó y, a la inversa, la expresión de Sp8 aumentó en toda la zona ventricular (figura 11 G-I). Esto sugiere que la regionalidad del lóbulo frontal, el lóbulo occipital y similares a lo largo del eje dorsoventral o el eje anteroposterior de la corteza cerebral puede controlarse selectivamente al añadir una señal exógena y conducir así a la inducción.
- 15

Ejemplo de referencia 10

Método

Cultivo de mantenimiento y diferenciación de CMEh

- 20 Se usaron células ME humanas (CMEh) (KhES-1) según las directivas de investigación con CMEh del gobierno japonés. Las CMEh se mantuvieron con fibroblastos embrionarios de ratón (FER) inactivados por tratamiento con mitomicina como alimentadores en medio DMEM/F12 (Sigma) enriquecido con el 20 % (v/v) de sustituto de suero Knockout (KSR; Invitrogen), glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Invitrogen), 5 ng/ml de bFGF recombinante humano (Wako), 2-mercaptoetanol (2-ME) 0,1 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina, a 37 °C con el 2 % de CO₂. Para su traspaso, las CMEh se separaron y recuperaron en bloque de las células alimentadoras tratándolas con PBS que contenía el 0,25 % de tripsina, 0,1 mg/ml de colagenasa IV, el 20 % de KSR y CaCl₂ 1 mM, a 37 °C durante 7 min. Los grupos de CMEh separadas se disgregaron en trozos más pequeños (varias docenas de células) mediante un pipeteo suave. Los trasposos se realizaron con una relación de división de 1:3-1:4.
- 25

- 30 Para el cultivo SFEBq, las CMEh se disociaron a células individuales con TrypLE Express (Gibco/Invitrogen) que contenía 0,05 mg/ml de ADNasa I (Roche) e Y-2732 10 µM, y se sembraron en cada pocillo de placas de 96 pocillos de fondo en V recubiertas superficialmente para baja adhesión celular usando un medio de diferenciación de corteza que contenía Y-2732 20 µM para su agregación. El medio de diferenciación cortical fue G-MEM (Gibco/Invitrogen) enriquecido con el 20 % de KSR (sustituto de suero Knockout), aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Gibco/Invitrogen), piruvato 1 mM (Sigma), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Definiendo el día en que se inició el cultivo SFEBq como día 0, se añadieron al cultivo IWR1e (inhibidor de Wnt) y SB431542 (inhibidor de TGFβ) para alcanzar 3 µM y 5 µM, respectivamente, desde el día 0 hasta el día 18.
- 35

- El neuroepitelio cortical inducido a partir de las CMEh se sometió a cultivo en las condiciones siguientes. En día 18, los agregados celulares se transfirieron a una placa de Petri de 9 cm (con recubrimiento superficial no adhesivo para las células) y se siguieron cultivando en medio DMEM/F12 (Gibco/Invitrogen) enriquecido con el 1 % del suplemento N2 (Gibco/Invitrogen), el 1 % de concentrado de lípidos (concentrado de lípidos definido químicamente, Gibco/Invitrogen), 0,25 mg/ml de Fungizone, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, a 37 °C en presencia del 5 % de CO₂ y el 40 % de O₂. A partir del día 35 se añadieron también al medio el 10% de SFB, 5 µg/ml de heparina y el 1 % de Matrigel reducido en factores de crecimiento (BD Biosciences). Para prevenir la muerte celular en las porciones centrales de los agregados celulares, estos se cortaron a la mitad con unas pinzas finas bajo un microscopio de disección cada 2 semanas a partir del día 35 y se cultivaron usando una placa de cultivo lumox (SARSTEDT; permeable al O₂) a partir del día 56. A partir del día 70, la concentración de Matrigel se aumentó (hasta el 2 % final) y se añadió el suplemento B27 (Gibco/Invitrogen) al medio.
- 40
- 45

La inducción anterior del neuroepitelio cortical se realizó añadiendo FGF8b recombinante humano (Gibco, 200 ng/ml) durante los días 24-42 del cultivo. Los agregados celulares se fijaron el día 42 del cultivo.

- 50 La ventralización del neuroepitelio cortical se realizó añadiendo el agonista de Hedgehog SAG (30 nM o 500 nM) durante los días 15-21 del cultivo. Los agregados celulares se fijaron el día 35 del cultivo.

Resultados

Polaridad intracortical en el NE cortical autoorganizado

- 55 Para el cultivo SFEBq mejorado (figura 18 A, A'), se sembraron 9000 CMEh disociadas en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en V poco adhesiva para las células (documento 15) y se cultivaron en medio G-MEM-KSR enriquecido con el inhibidor de la cinasa Rho (Y-27632) (16) (figura 18A). Después, los agregados celulares se

transfirieron a placas de cultivo no adhesivas para las células de 9 cm y se cultivaron en presencia del 40 % de O₂. La adición de un concentrado de lípidos (día 18), el 10 % de SFB, heparina y una baja concentración de Matrigel (1 %) (día 35) se realizó para el mantenimiento a largo plazo de la zona ventricular, mientras que la adición del inhibidor de TGFβ (SB431542) y el inhibidor de Wnt (IWR1e) durante los primeros 18 días se realizó para la inducción eficiente de la región telencefálica.

En estas condiciones mejoradas de cultivo, todos los agregados derivados de CMEh contenían neuroepitelio positivo para foxg1::Venus (marcador telencefálico) (documento 2) el día 26 (figura 12A y figura 18B) y el 75 % o más de las células totales (día 34) expresaron foxg1::Venus el día 34. Por el contrario, en el método previo, la eficiencia para las células positivas para foxg1::Venus fue del 30-40 % de las células totales (figura 12B y figura 18C). El neuroepitelio positivo para foxg1::Venus contenía una estructura semiesférica similar al neuroepitelio (epitelial columnar pseudoestratificada) con una cavidad similar a un ventrículo en su interior (figura 12C; día 42). Esta estructura neuroepitelial tenía una capa de células de alta densidad celular positiva para Pax6 y Sox2 en el lado luminal (figura 12 D, E), mientras que en su parte más interna se encontraron células positivas para la histona H3 fosforilada en mitosis (figura 12F). Estas estructuras eran similares a la zona ventricular cortical en el primer trimestre. El exterior de la capa celular similar a la zona ventricular expresó el marcador de neuronas postmitóticas Tuj1 (PC; figura 12G) y los marcadores de la placa cortical temprana Ctip2 y Tbr1 (documentos 1 a 2) (figura 12H y figura 18D). La capa neuronal también contenía células de Cajal-Retzius positivas para reelina (figura 12I) y una capa rica en laminina cerca de la superficie (figura 12J). Por consiguiente, en este neuroepitelio derivado de CMEh se produce una laminación autoorganizativa.

Interesantemente, el neuroepitelio cortical autoorganizado mostró frecuentemente una polaridad axial. La expresión de Coup-TF1 en la zona ventricular (figura 12K, rojo), que forma un gradiente de expresión de dorsocaudal a rostroventral en el cerebro fetal (figura 18 E y F) fue más intensa en un lado del neuroepitelio cortical derivado de CMEh, mientras que el marcador ventrorrostral Sp8 se expresó con un patrón de gradiente de expresión inverso (figura 12K, blanco). Consistentemente con este fenómeno, la expresión de Lhx2 (que forma un gradiente de expresión de expresión de dorsal a ventral *in vivo*) fue también intensa en el mismo lado de Coup-TF1 (figura 12L y figura 18G). El patrón de expresión en gradiente inverso de Coup-TF1 y Sp8 se observó ya el día 35. En el embrión de ratón, el área cortical dorsocaudal está flanqueada por el reborde cortical (figura 18 H-J) que posteriormente da lugar a la región fimbrial del hipocampo. Consistentemente con este fenómeno, los marcadores corticales Otx2 y Zic1 se expresaron en la región flanqueante del neuroepitelio en el lado de la intensa expresión de Coup-TF1 (figura 12M y figura 18K).

Estos resultados indican que el neuroepitelio derivado de CMEh adquiere espontáneamente una polaridad intracortical dorsocaudal-rostroventral. En el embrión de ratón, FGF8 promueve la especificación rostral de la corteza (documento 17). Interesantemente, se observó un alto nivel de señales de Erk fosforilada (que actúa a continuación de la señalización de FGF) en el neuroepitelio cortical derivado de CMEh en el lado opuesto al de la expresión de Coup-TF1 (figura 12N). A la inversa, el tratamiento de la corteza derivada de CMEh con FGF8 exógeno causó una amplia expresión de Sp8 a expensas de la expresión de Coup-TF1 (figura 12 O y P y figura 18L), lo que sugiere un papel activo de la señalización de FGF-MAPK en esta autoorganización.

Cambio morfológico del neuroepitelio cortical autoorganizado con una curvatura específica de la región

La expresión del marcador telencefálico Foxg1 se detectó primeramente en el neuroepitelio derivado de CMEh (positivo para N-cadherina y positivo para Sox2) alrededor de los días 18-20. El lado apical (positivo para aPKC) del neuroepitelio se localizó en la superficie del agregado (figura 13A, abajo). El día 21, el neuroepitelio empezó a volverse parcialmente discontinuo y disgregarse en varios neuroepitelios grandes (figura 13A). Seguidamente, estos neuroepitelios corticales segregados adquirieron una curvatura apicalmente cóncava (figura 13 B-D y figura 19A, arriba).

Cada dominio compartimentalizado del neuroepitelio cortical tenía una estructura curvada asimétrica. Un extremo del neuroepitelio se caracterizó por una forma enrollada (figura 13 B-D, puntas de flecha), mientras que el otro lado se caracterizó por ser romo. Una miosina activa (indicada por MLC2 fosforilada) se acumuló uniformemente en toda la superficie apical de la región cortical, incluido el extremo romo (figura 13C). En las imágenes en tiempo real, el lado enrollado de la región cortical se aproximó al otro extremo y eventualmente se puso en contacto con este (figura 13 E y F). Durante este proceso, el cuerpo principal del neuroepitelio en la región cortical se desplazó en la misma dirección que el lado enrollado (figura 2 E-H). La morfogénesis de redondeamiento generó eventualmente una estructura cortical semiesférica con un lumen en su interior para el día 27 (figura 13I y figura 19A, abajo).

El cambio morfológico del dominio cortical con enrollamiento se atenuó por la adición de un inhibidor de ROCK (figura 13 J-L) que inhibe la ruta Rho-ROCK de la miosina necesaria para causar una constricción apical. El lado enrollado del neuroepitelio expresó marcadores del lado dorsocaudal (Otx2 y Coup-TF1; figura 13 M y N), lo que indica que el extremo enrollado corresponde al lado dorsocaudal.

Cuando el neuroepitelio se ventralizó débilmente (documentos 18, 19) mediante un agonista de Hedgehog (SAG 30 nM durante los días 15-21), una porción sustancial de neuroepitelio que expresaba foxg1::Venus expresó Gsh2, un marcador de la EGL (documento 20) (figura 13O, punta de flecha, y figura 19B). Por debajo de este neuroepitelio EGL se generaron neuronas GABAérgicas positivas para GAD65, como se observa *in vivo* (documento 19) (figura 11P,

rojo), mientras que el resto del neuroepitelio telencefálico era ampliamente positivo para el marcador cortical Pax6 (figura 13Q). La adición de altas concentraciones de SAG indujeron el marcador de la EGM Nkx2.1 a expensas de la expresión de Pax6 y Gsh2 (figura 19 B y C). Significativamente, el neuroepitelio tratado con baja concentración de SAG mostró la formación continua de dominios corticales EGL (positivos para Gsh2) (positivos para Pax6), como se observa *in vivo*, lo que sugiere que las condiciones de cultivo mejoradas permiten la formación continua de estructuras de palio-subpalio en un agregado por autoorganización. En este neuroepitelio de extensión continua, el lado enrollado del neuroepitelio cortical (figura 13 O-Q, flechas) se hallaba opuesto a la unión corteza-EGL, lo que es consistente con la idea de que los lados enrollado y no enrollado representan los lados dorsal y ventral, respectivamente, del neuroepitelio cortical.

En el embrión, la corteza en desarrollo se evagina mediante un marcado redondeamiento del neuroepitelio del palio, mientras que el palio embrionario es inmóvil, porque está fijado a los tejidos vecinos. La curvatura de la región neuroepitelial embrionaria desde el palio medial (región hipocámpica) hasta la parte dorsal de la corteza es particularmente marcada (figura 17A). Dado que la posición del lado dorsocaudal del neuroepitelio cortical derivado de CMEh no es fija y se mueve en el presente sistema de cultivo tridimensional, se produce un cambio morfológico con redondeamiento. Es posible inferir que esto refleja la marcada acción de redondeamiento de la corteza dorsal embrionaria (figura 19D).

Estos resultados demuestran que el neuroepitelio cortical derivado de CMEh forma por sí mismo un neuroepitelio en forma de cúpula por cambios morfológicos con redondeamiento asimétrico a lo largo del eje dorsoventral-ventrorrostral autoadquirido. Siguiendo este cambio topológico, la superficie apical del neuroepitelio se localiza dentro de las semiesferas corticales. En imágenes en tiempo real, las células madre neurales se dividieron frecuentemente en la superficie luminal, mientras experimentaban un movimiento nuclear repetitivo hacia arriba y hacia abajo (figura 13R y figura 19E; las divisiones celulares fueron mayoritariamente simétricas en estas fases).

Separación morfológica de tres zonas neuronales corticales

Las condiciones de cultivo mejoradas permitieron que el neuroepitelio cortical derivado de CMEh creciera incluso más allá del día 42. El día 70, el grosor del neuroepitelio cortical derivado de CMEh era de 200 μm o mayor (figura 14 A y A'). En esta fase, el neuroepitelio estaba morfológicamente estratificado en una zona ventricular, zona subventricular, zona intermedia, placa cortical y zona marginal (figura 14 B-G y figura 20 A y B). La capa más superficial de la zona marginal acumulaba laminina y contenía células positivas para reelina (células CR) (figura 14C y C'). La placa cortical se formó por debajo de la zona marginal y contenía neuronas corticales de capas profundas positivas para Tbr1 y Ctip2 (figura 14 D y D'). La población de neuronas que expresaba Satb2, un marcador de la placa cortical superficial (documento 21) era todavía relativamente pequeña en esta fase (figura 14E). El día 70, la zona ventricular luminal mostró un grosor de ~ 100 μm y contenía células madre/progenitores neurales positivos para Pax6 y positivos para Sox2 (figura 14 F y F') o células denominadas gliales radiales (documento 22). En la parte superior de la misma se formó una zona subventricular que contenía células positivas para Tbr2 (figura 14G).

En esta fase, entre la placa cortical y la zona subventricular se desarrolló una zona de células escasas similar a la zona intermedia del segundo trimestre. Inmediatamente por debajo de la placa cortical se formó una capa de células positivas para calretinina con neuritas masivas positivas para MAP2 extendiéndose en esta zona intermedia (figura 14 H y H' y figura 20 C y D). Estas características se asemejan a las de las neuronas de la subplaca (p. ej., neuronas pioneras tempranas para las conexiones talamocorticales), que es prominente en la corteza humana fetal (documentos 23-25). Los proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) se acumulan en la subplaca embrionaria y la zona inmediatamente subyacente (figura 20F, abajo derecha, corchete) (documento 26). De manera similar, se observó una intensa acumulación de CSPG en las zonas correspondientes del neuroepitelio cortical derivado de CMEh (figura 14H" y figura 20E). Estos resultados demuestran que el neuroepitelio cortical derivado de CMEh puede organizar por sí mismo no solo la placa cortical y la zona marginal, sino también la subplaca y la zona intermedia en el mismo orden apicobasal que el embrión. En esta fase, no se observó ninguna acumulación sustancial de interneuronas positivas para GAD65 en la corteza ni de axones corticofugales positivos para TAG1 (figura 20G).

Para el día 91, el neuroepitelio cortical alcanzó un grosor de 300-350 μm , pero todavía contenía una zona ventricular bien desarrollada (figura 14 I-K y figura 20 H e I). La placa cortical también se volvió mucho más gruesa (~ 150 μm ; figura 14I) y contenía un cierto número de neuronas de capas superficiales (positivas para Satb2 y positivas para Brn2), además de neuronas de las capas profundas de la placa cortical positivas para Tbr1 y positivas para Ctip2 (figura 14 L-N y figura 20J). Las neuronas de la subplaca (positivas para calretinina) todavía se observaron por debajo de la placa cortical (figura 14O).

La separación estructural de las capas morfológicas observada en el cultivo a largo plazo (resumida en la figura 14P) se asemeja a la histología de la corteza fetal humana durante las fases tempranas del segundo trimestre (documentos 25, 27). Además, dentro de la placa cortical derivada de CMEh, las neuronas de las capas superficiales (positivas para Satb2 y positivas para Brn2) se localizan con preferencia más superficialmente que las neuronas de las capas profundas (positivas para Tbr1 y positivas para Ctip2) (figura 15 A-H). Adicionalmente, cuando se realizó una tinción de un día con EdU el día 50 y después con BrdU el día 70, las células marcadas con EdU y BrdU se localizaron preferentemente en los lados profundo y superficial, respectivamente, el día 91 (figura 15 I-L). Estos resultados indican que existe una tendencia sesgada en la localización de las neuronas, reminiscente del patrón de dentro afuera durante

la corticogénesis fetal (documentos 5, 6), en la que las neuronas corticales nacidas más tarde se localizan en el exterior y las neuronas nacidas antes están en el interior. Consistente con esta idea, el día 112, el marcador de neuronas corticales maduras CaMKII α se observó preferentemente en la porción de dos tercios lumbales de la corteza derivada de CMEh, que predominantemente expresaba Tbr1 pero no Satb2 (figura 15 M-O y figura 20K). De hecho, a nivel celular, la mayoría de estas neuronas CaMKII α coexpresaban Tbr1 pero no Satb2 (figura 20 L y M; figura 15P para un resumen).

Aparición de células madre/progenitores neurales específicos humanos en la zona subventricular externa (ZSve)

Finalmente, se investigó la dinámica de las células madre/progenitores neurales corticales en la corteza derivada de CMEh cultivada a largo plazo. Los estudios *in vivo* anteriores revelaron que la división no vertical de las células madre neurales lumbales aumenta en una fase avanzada y que muchos de los progenitores neurales apicales se producen a través de divisiones asimétricas (documentos 28, 29). En el presente cultivo, las células madre neurales lumbales en proliferación se dividían preferentemente el día 70 con un plano de escisión "vertical" (60-90 °; figura 16 A-C), lo que causaba una segregación de las células hijas paralela a la superficie luminal. En cambio, el día 91, las células madre neurales en proliferación (positivas para fosfovimentina) mostraron mayor frecuencia de divisiones no verticales (figura 16 D-F).

Tanto el día 70 como el 91, la ZSV contenía un cierto número de progenitores intermedios positivos para Tbr2, negativos para Sox2 y negativos para Pax6 (figura 14 G y M). Interesantemente, el día 91, la porción externa de la ZSV acumuló otra población de células madre/progenitores neurales positivos para fosfovimentina que eran negativos para Tbr2, positivos para Sox2 y positivos para Pax6 (figura 16 G-G' y figura 21 A-C). La población de estas células era relativamente pequeña en porcentaje el día 70 y se hizo prominente el día 91 (figura 16H). El día 91, esta población de células negativas para Tbr2 y positivas para Sox2 estaba sesgada hacia una localización más apical, en contraste con la localización sesgada luminalmente de los progenitores intermedios positivos para Tbr2 y negativos para Sox2 (figura 16I, derecha). Interesantemente, estos dos tipos de células madre/progenitores neurales respondieron de manera diferente al inhibidor de la señal de Notch, que reduce fuertemente las células madre/progenitores neurales al inducir una diferenciación neuronal precoz. El inhibidor de la señal de Notch aumentó los progenitores intermedios positivos para Tbr2 y negativos para Sox2, mientras que apenas quedaron células negativas para Tbr2 y positivas para Sox2 después del tratamiento (figura 21 D-F).

Estudios recientes han descrito que una población de células madre/progenitores neurales negativos para Tbr2, positivos para Sox2 y positivos para Pax6 distintos de los progenitores intermedios positivos para Tbr2 se acumula en la ZSve en las últimas fases de la corticogénesis humana (figura 21G) (documentos 11, 12). Se piensa que estas células madre/progenitores neurales denominados GRe (o células madre de la ZSve) (documentos 11, 12) contribuyen a la generación masiva de neuronas de las capas superficiales, que es característica de la corteza humana. Las células GRe tienen un proceso que se extiende hacia la superficie apical y carecen de un proceso luminal a diferencia de los progenitores lumbales. De manera similar, las células madre/progenitores neurales negativos para Tbr2, positivos para Sox2 y positivos para Pax6 en el neuroepitelio cortical derivado de CMEh también tenían el día 91 un proceso apical pero no un proceso luminal (figura 16 J-K' y figura 21 H, H' e I). Estas células tenían un cuerpo basal positivo para pericentrina en el soma localizado en la ZSV (figura 21J), a diferencia de las células madre neurales lumbales, cuyos cuerpos basales se localizan cerca de la superficie luminal. Al igual que en las células GRe *in vivo*, el plano de escisión de las células de tipo GRe derivadas de CMEh tendía a ser horizontal (figura 16 L y M). No se encontraron procesos apicales en los progenitores positivos para Tbr2 (positivos para fosfovimentina; figura 21 K-K'), como es el caso para los progenitores intermedios *in vivo*.

Estos resultados tomados en conjunto indican que el neuroepitelio cortical autoorganizado recapitula la dinámica de las células madre/progenitores neuronales observada en las fases avanzadas de la corticogénesis humana, incluida la aparición de progenitores de tipo GRe.

En este estudio, se demostró que el neuroepitelio cortical derivado de CMEh puede ejecutar sus programas internos para autoorganizar el patrón axial y la separación de múltiples zonas observados en el cerebro fetal humano. El sistema de cultivo de la presente invención permitió el crecimiento saludable de neuroepitelio cortical derivado de CMEh a largo plazo en condiciones de cultivo en suspensión, incluso durante más de 13 semanas. Eventualmente, el neuroepitelio cortical adquirió un grosor de aproximadamente 350 μ m y contenía una estructura laminar múltiple como la observada en la corteza fetal en el segundo trimestre humano (que comienza a partir de la 11.^a semana embrionaria) (documento 30). Esto supone un claro contraste con la limitación del cultivo 3D anterior, que podía mantener el neuroepitelio cortical hasta la maduración del tejido correspondiente al primer trimestre. El método de cultivo de la presente invención también recapituló otro aspecto de la neocorticogénesis del segundo trimestre humano, es decir, la aparición de células madre/progenitores neurales de tipo GRe el día 91 (semana 13) del cultivo. Estas observaciones sugieren también que la velocidad de desarrollo en el tejido autoorganizado en el método de la presente invención es aproximadamente comparable a la del desarrollo en el cerebro fetal.

Un efecto importante de este cultivo es que la corticogénesis programada internamente prosigue en el neuroepitelio en extensión continua durante largo tiempo. El mecanismo de autoformación de esta polaridad intracortical es un tema interesante para futuras investigaciones. Además, el cambio morfológico de redondeamiento en el neuroepitelio cortical derivado de CMEh muestra movimientos asimétricos a lo largo de la polaridad autoformada.

Además de a la polaridad dentro del neuroepitelio cortical, el sistema de cultivo de la presente invención es aplicable también al estudio de la especificación dorsoventral de toda la región telencefálica. Notablemente, en condiciones parcialmente ventralizadas (figura 13 O-Q), el neuroepitelio cortical derivado de CMEh recapituló la corteza y la EGL (cuerpo estriado) en posiciones adyacentes, como se observan *in vivo*, por autoorganización, mientras que las señales aún más intensas de Hedgehog indujeron la formación de EGM.

El sistema de cultivo optimizado indicado en este estudio permitió la recapitulación de la compleja formación laminar de la corteza: es decir, la formación de una zona ventricular, zona subventricular, zona intermedia, subplaca, placa cortical y zona marginal. La subplaca es una estructura particularmente predominante en los primates (a veces, denominada también capa VII) y se piensa que se forma con las neuronas de nacimiento temprano dentro de la corteza (p. ej., neuronas pioneras) (documentos 24, 25). Aunque la subplaca solo está presente de manera transitoria en la corteza fetal, algunos de sus derivados existen en el cerebro adulto como neuronas intersticiales en la sustancia blanca de los adultos (documento 33). Dado que la subplaca desaparece postnatalmente, su investigación no es fácil, especialmente en humanos, y por tanto, nuestro sistema debería ser importante para estudiar esta capa neuronal poco entendida. Adicionalmente, nuestro sistema de cultivo puede ser aplicable a estudios de la formación laminar de dentro afuera en la corteza fetal humana, incluida la patogénesis de la lisencefalia.

Finalmente, nuestro sistema es muy ventajoso para estudiar el papel de las células madre/progenitores neurales GRe en la corticogénesis humana. Es presumiblemente ventajosa para la corteza humana girencefálica la participación de este tipo de células madre/progenitores neurales que siguen dividiéndose repetidamente para generar un cierto número de neuronas superficiales. Hasta la fecha, no se han descrito marcadores moleculares específicos para demarcar las células GRe y la distinción entre las células GRe y las células madre neurales lumbales (los dos tipos son positivos para Sox2, positivos para Pax6 y negativos para Tbr2) depende fundamentalmente de su morfología celular, comportamiento y localización. Por consiguiente, la extensión del estudio de las células GRe ha sido bastante limitado en el caso de cultivos de disociación que carecen de contexto topológico. En cambio, el sistema de cultivo de la presente invención proporciona una gran ventaja a este respecto, ya que tiene el contexto 3D de la corteza humana en desarrollo. Muy recientemente, se ha descrito una observación similar de la aparición de células GRe en el tejido cortical estratificado generado a partir de células madre pluripotentes humanas (documento 34). Este estudio usa un método de diferenciación no selectiva que puede obtener estadísticamente la diferenciación de regiones cerebrales (a diferencia de nuestro cultivo de diferenciación selectivo para la corteza de manera reproducible).

Aunque la presente invención se ha descrito con énfasis en las realizaciones preferidas, es evidente para los expertos en la técnica que las realizaciones preferidas pueden modificarse.

Documentos de referencia

- 1 Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD. (2007) Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 8:427-437.
- 2 Hebert JM, Fishell G. (2008) The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. *Nat Rev Neurosci* 9:678-685.
- 3 Bielle F, et al. (2005) Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci.* 8:1002-1012.
- 4 Bystron I, Blakemore C, Rakic P. (2008) Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci.* 9:110-122.
- 5 Rakic P. (1974) Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science.* 183:425-427.
- 6 Shen Q. et al. (2006) The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat Neurosci*9:743-751.
- 7 Eiraku M. et al. (2008) Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* 3: 519-532.
- 8 Watanabe K. et al. (2005) Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci* 8:288-296.
- 9 Nasu M, et al. (2012) Robust formation and maintenance of continuous stratified cortical neuroepithelium by laminin-containing matrix in mouse ES cell culture. *PLoS One* 7:e53024.
- 10 Mariani J. et al. (2012) Modeling human cortical development in vitro using induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.*109:12770-12775.
- 11 Hansen DV, Lui JH, Parker PR, Kriegstein AR. (2010) Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 464:554-561.

- 12 Fietz SA, et al.(2010) OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat Neurosci.* 13:690-699.
- 13 Wang X, Tsai JW, LaMonica B, Kriegstein AR. (2011) A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat Neurosci.* 14:555-561.
- 5 14 Shitamukai A, Konno D, Matsuzaki F. (2011) Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. *J Neurosci.* 31:3683-3695.
- 15 Nakano T, et al.(2012) Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell* 10:771-785.
- 10 16 Watanabe K, et al. (2007) A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnol.* 25:681-686.
- 17 Storm EE, et al. (2006) Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers. *Development* 133:1831-1844.
- 18 Fuccillo M, Rallu M, McMahon AP, Fishell G (2004) Temporal requirement for hedgehog signaling in ventral telencephalic patterning. *Development* 131:5031-5040.
- 15 19 Danjo T, et al. (2011) Subregional specification of embryonic stem cell-derived ventral telencephalic tissues by timed and combinatory treatment with extrinsic signals. *J Neurosci.* 31:1919-1933.
- 20 Yun K, Potter S, Rubenstein JL (2001) Gsh2 and Pax6 play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Development* 128:193-205.
- 20 21 Alcamo EA, et al.(2008) Satb2 regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Neuron* 57:364-377.
- 22 Doetsch F. (2003) The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci.* 6:1127-1134.
- 23 Kostovic I, Rakic P. (1990) Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J Comp Neurol.* 297:441-470.
- 25 24 Wang WZ, et al.(2010) Subplate in the developing cortex of mouse and human. *J Anat.* 217:368-380.
- 25 Judas M, Sedmak G, Kostovic I. (2013) The significance of the subplate for evolution and developmental plasticity of the human brain. *Front Hum Neurosci.* 7:423.
- 26 Sheppard AM, Pearlman AL. (1997) Abnormal reorganization of preplate neurons and their associated extracellular matrix: an early manifestation of altered neocortical development in the reeler mutant mouse. *J Comp Neurol.* 378:173-179.
- 30 27 Bayer SA and Altman J. (2005) *Atlas of Human Central Nervous System Development, volume 3: The Human Brain During the Second Trimester* (CRC Press, Boca Raton)
- 28 LaMonica BE, Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. (2013) Mitotic spindle orientation predicts outer radial glial cell generation in human neocortex. *Nat Commun.* 4:1665.
- 35 29 Taverna E, Huttner WB. (2010) Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron* 67:906-914.
- 30 Bayatti N, et al. (2008) A molecular neuroanatomical study of the developing human neocortex from 8 to 17 postconceptional weeks revealing the early differentiation of the subplate and subventricular zone. *Cereb Cortex* 18:1536-1548.
- 31 Letinic K, Zoncu R, Rakic P. (2002) Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature.* 417:645-649.
- 40 32 Rakic S, Zecevic N. (2003) Emerging complexity of layer I in human cerebral cortex. *Cereb Cortex.* 13:1072-1083.
- 33 Judas M, Sedmak G, Pletikos M. (2010) Early history of subplate and interstitial neurons: from Theodor Meynert (1867) to the discovery of the subplate zone (1974). *J Anat.* 217(4) :344-367.
- 34 Lancaster MA, et al. (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* 501:373-379.
- 45 35 Bayer SA and Altman J. (2004) *Atlas of Human Central Nervous System Development, volume 2: The Human Brain During the Third Trimester* (CRC Press, Boca Raton)

Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, puede inducirse telencéfalo o un tejido parcial del mismo (corteza cerebral, ganglio basal, hipocampo, plexo coroideo, etc.) con una estructura de orden superior al igual que el telencéfalo *in vivo*, o un tejido progenitor del mismo, a partir de células madre pluripotentes *in vitro*. Por consiguiente, la presente invención es útil para la práctica de la medicina regenerativa en la región de los nervios craneales.

5

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método de producción de un agregado celular que comprende telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o un tejido progenitor del mismo, que comprende obtener un agregado positivo para un marcador telencefálico cultivando un agregado de células madre pluripotentes en suspensión en presencia de un inhibidor de la señal de Wnt y un inhibidor de la señal de TGF β y seguir cultivando el agregado positivo para el marcador telencefálico en suspensión en condiciones de alta presión parcial de oxígeno, en donde el tejido parcial de telencéfalo es corteza cerebral, ganglio basal, hipocampo, plexo coroideo, o un tejido progenitor de los mismos.
- 2.** El método de producción según la reivindicación 1, en donde el cultivo en suspensión en condiciones de alta presión parcial de oxígeno se realiza en presencia de un potenciador de la señal de Wnt.
- 10 **3.** El método de producción según la reivindicación 1, en donde el cultivo en suspensión en condiciones de alta presión parcial de oxígeno se realiza en presencia de un potenciador de la señal de Wnt. y de una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogenético óseo.
- 4.** Un método de producción de un agregado celular que comprende telencéfalo o un tejido parcial del mismo, o un tejido progenitor del mismo, que comprende
- 15 (I) obtener un agregado positivo para un marcador telencefálico cultivando un agregado de células madre pluripotentes en suspensión en presencia de un inhibidor de la señal de Wnt y un inhibidor de la señal de TGF β ,
- (II) seguir cultivando el agregado positivo para el marcador telencefálico obtenido en (I) en suspensión, en presencia de un potenciador de la señal de Wnt y una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogenético óseo, y
- 20 (III) seguir cultivando el agregado obtenido en (II) en suspensión, en ausencia de un potenciador de la señal de Wnt y de una sustancia activadora de la ruta de transducción de la señal del factor morfogenético óseo, en donde el tejido parcial de telencéfalo es corteza cerebral, ganglio basal, hipocampo o plexo coroideo; y
- en donde el cultivo en suspensión en (II) y (III) se realiza en condiciones de alta presión parcial de oxígeno.
- 25 **5.** El método de producción según la reivindicación 4, en donde el agregado celular producido comprende, en un neuroepitelio continuo, un tejido cortical cerebral o un tejido progenitor del mismo, un tejido del plexo coroideo o un tejido progenitor del mismo y un tejido hipocámpico o un tejido progenitor del mismo.
- 6.** El método de producción según la reivindicación 4, en donde el agregado celular producido comprende, en un neuroepitelio continuo, un tejido un tejido hipocámpico o un tejido progenitor del mismo que comprende un tejido de la circunvolución dentada o un tejido progenitor del mismo y un tejido del cuerno de Amón o un tejido progenitor del mismo.
- 30 **7.** El método de producción según la reivindicación 6, en donde el tejido hipocámpico o un tejido progenitor del mismo comprende además reborde cortical en el neuroepitelio continuo.
- 8.** El método de producción según la reivindicación 4, en donde el agregado celular producido comprende tejido del cuerno de Amón o un tejido progenitor del mismo.
- 35 **9.** El método de producción según la reivindicación 1, que comprende además tratar el agregado positivo para un marcador telencefálico con un agonista de la señal de shh; preferiblemente en donde el agregado celular obtenido comprende ganglio basal o un tejido progenitor del mismo.
- 10.** El método de producción según la reivindicación 1, que comprende además tratar el agregado con FGF8 en el cultivo en suspensión en condiciones de alta presión parcial de oxígeno; preferiblemente en donde el agregado celular obtenido comprende corteza cerebral rostral o un tejido progenitor de la misma.
- 40 **11.** El método de producción según la reivindicación 1, en donde el agregado celular obtenido comprende un tejido cortical cerebral o un tejido progenitor del mismo con una estructura multicapa que comprende una zona marginal, una placa cortical, una subplaca, una zona intermedia, una zona subventricular y una zona ventricular, desde la porción superficial hasta la porción profunda.
- 45 **12.** El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde
- (I) las células madre pluripotentes son células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas; o
- (II) las células madre pluripotentes derivan de un ser humano.
- 13.** El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el cultivo en suspensión se realiza en ausencia de células alimentadoras.
- 50 **14.** Un método de producción de una neurona hipocámpica madura que comprende:

(I) obtener un agregado celular que comprende hipocampo o un tejido progenitor del mismo por el método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13,

(II) dispersar el agregado celular obtenido en (I), y

5 (III) someter posteriormente las células dispersadas a un cultivo de adhesión para inducir una neurona hipocámpica madura a partir de las células.

Figura 1

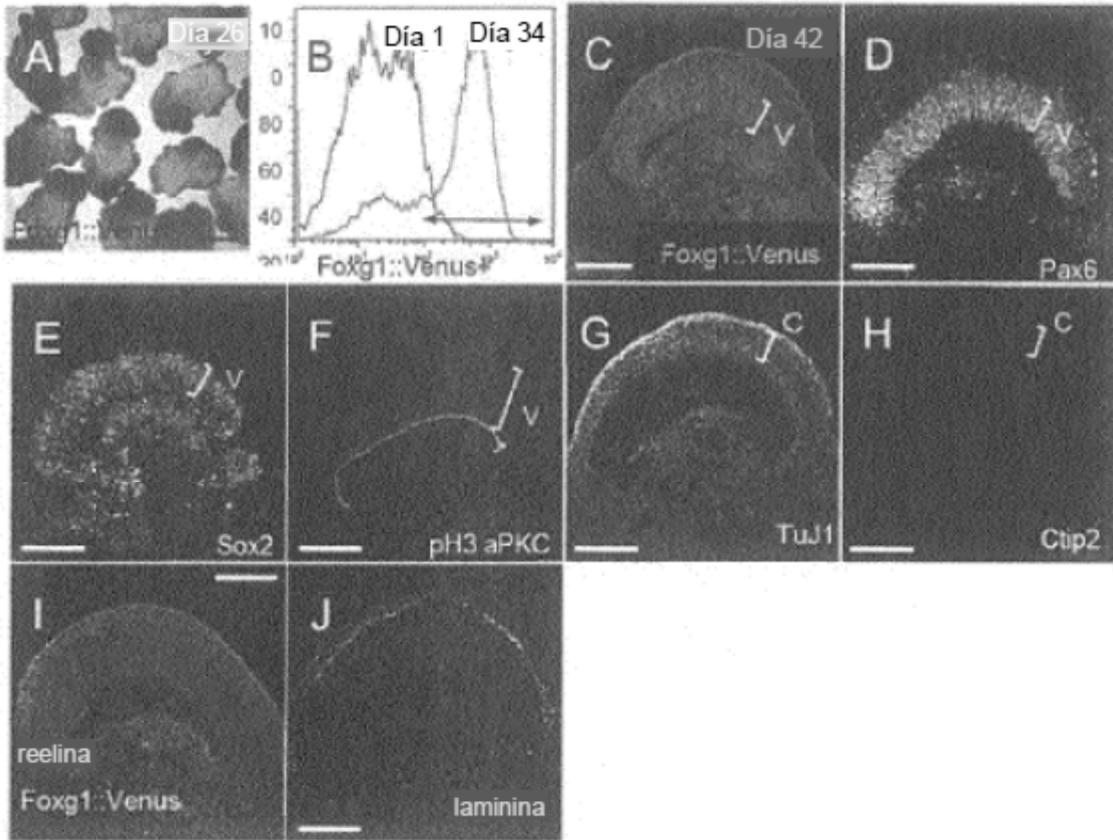


Figura 2

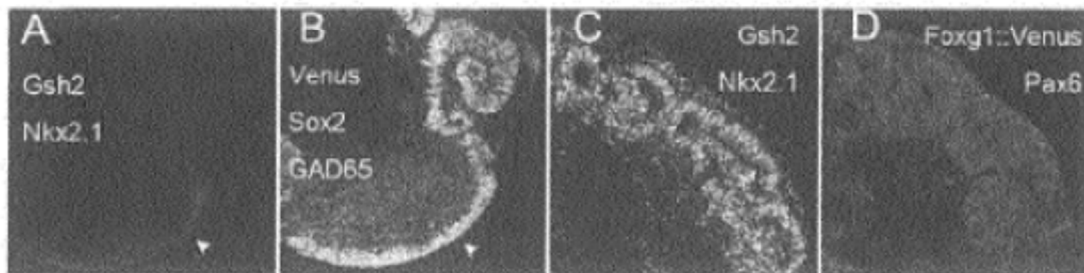


Figura 3

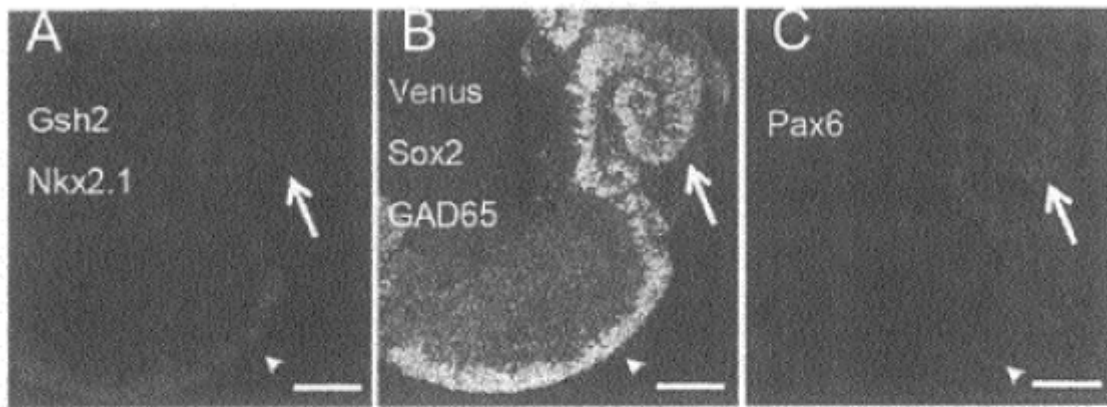


Figura 4

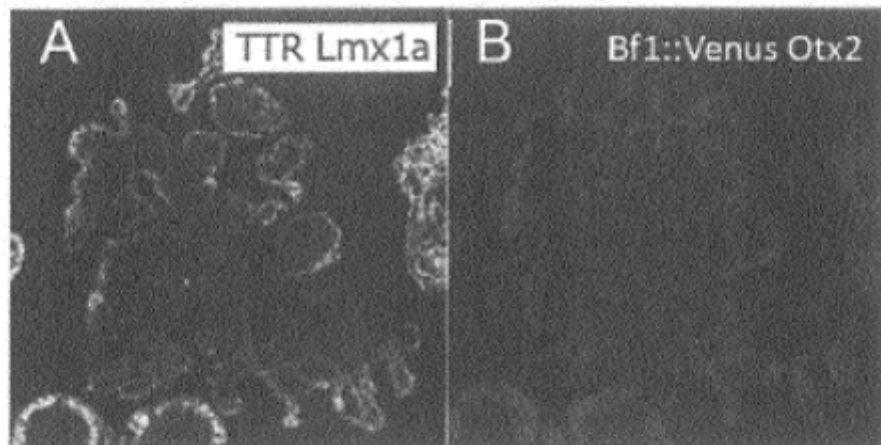


Figura 5

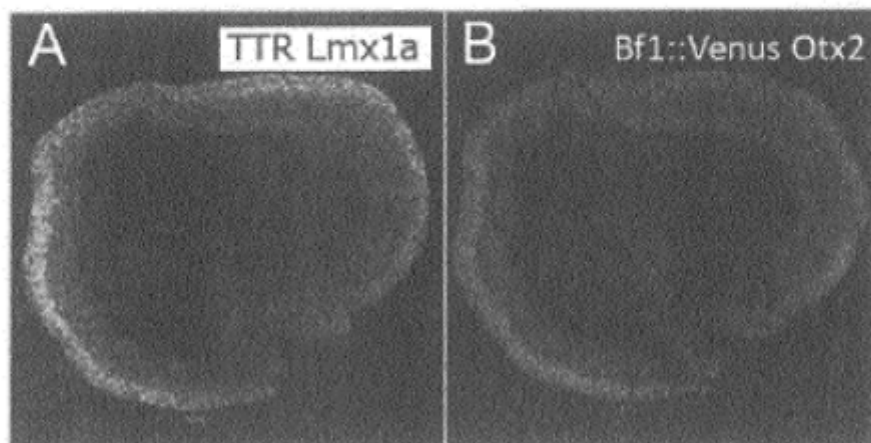


Figura 6

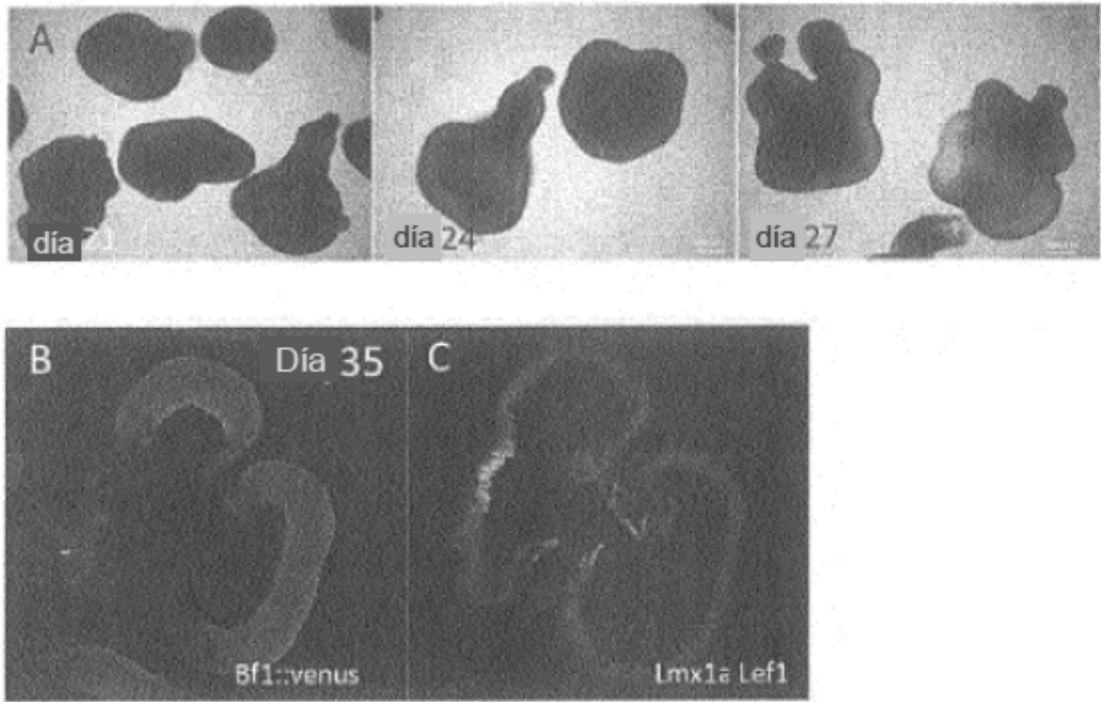


Figura 7

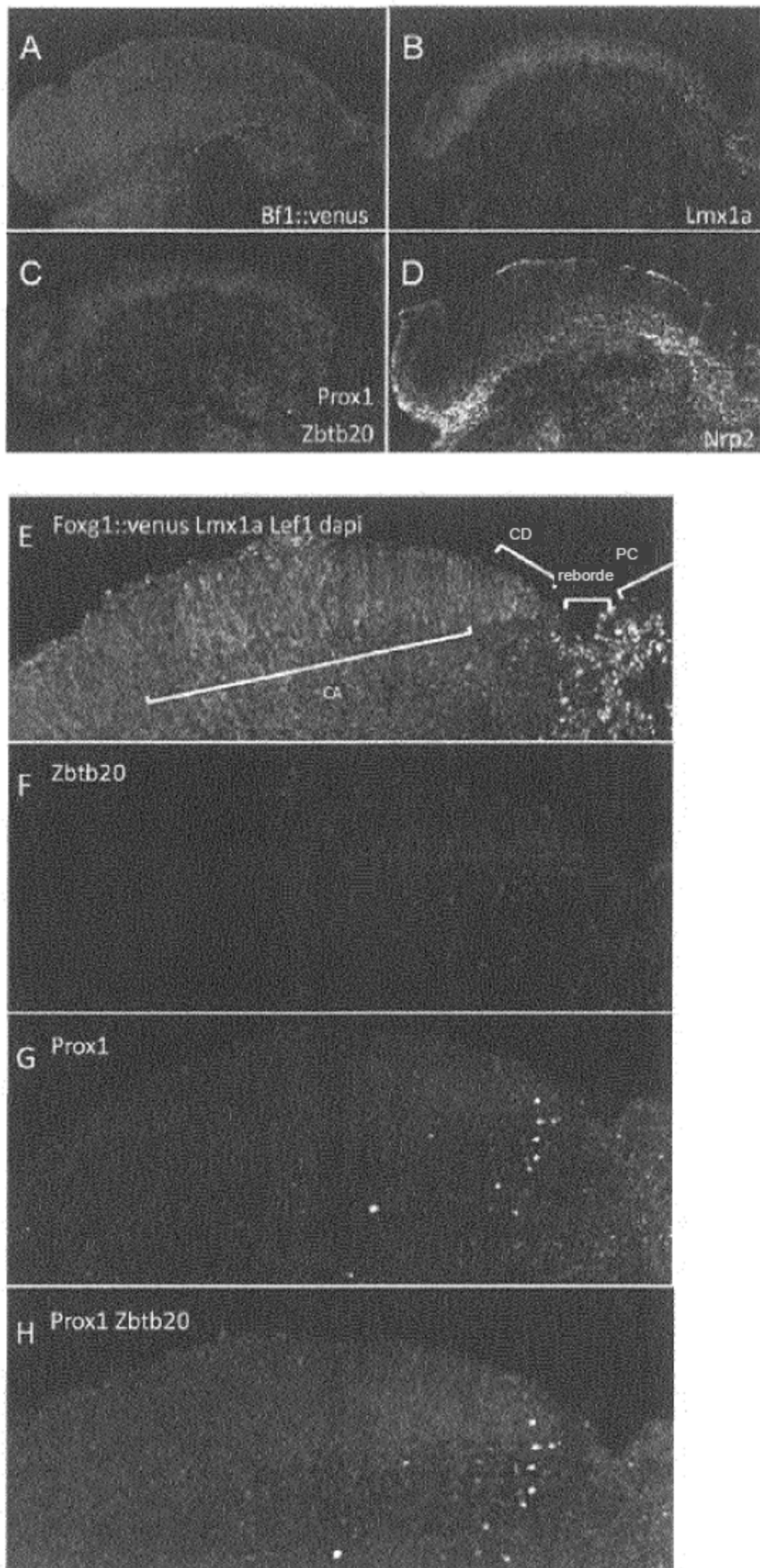


Figura 8

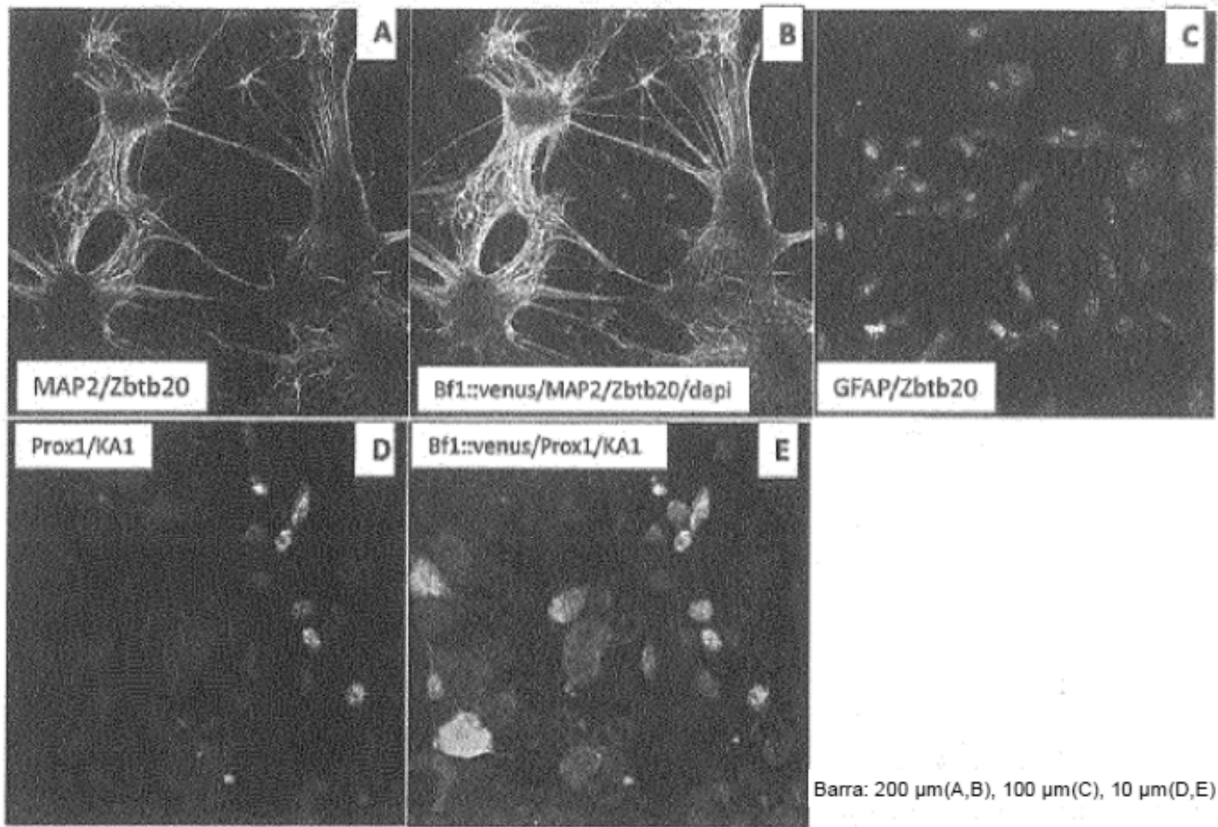


Figura 9

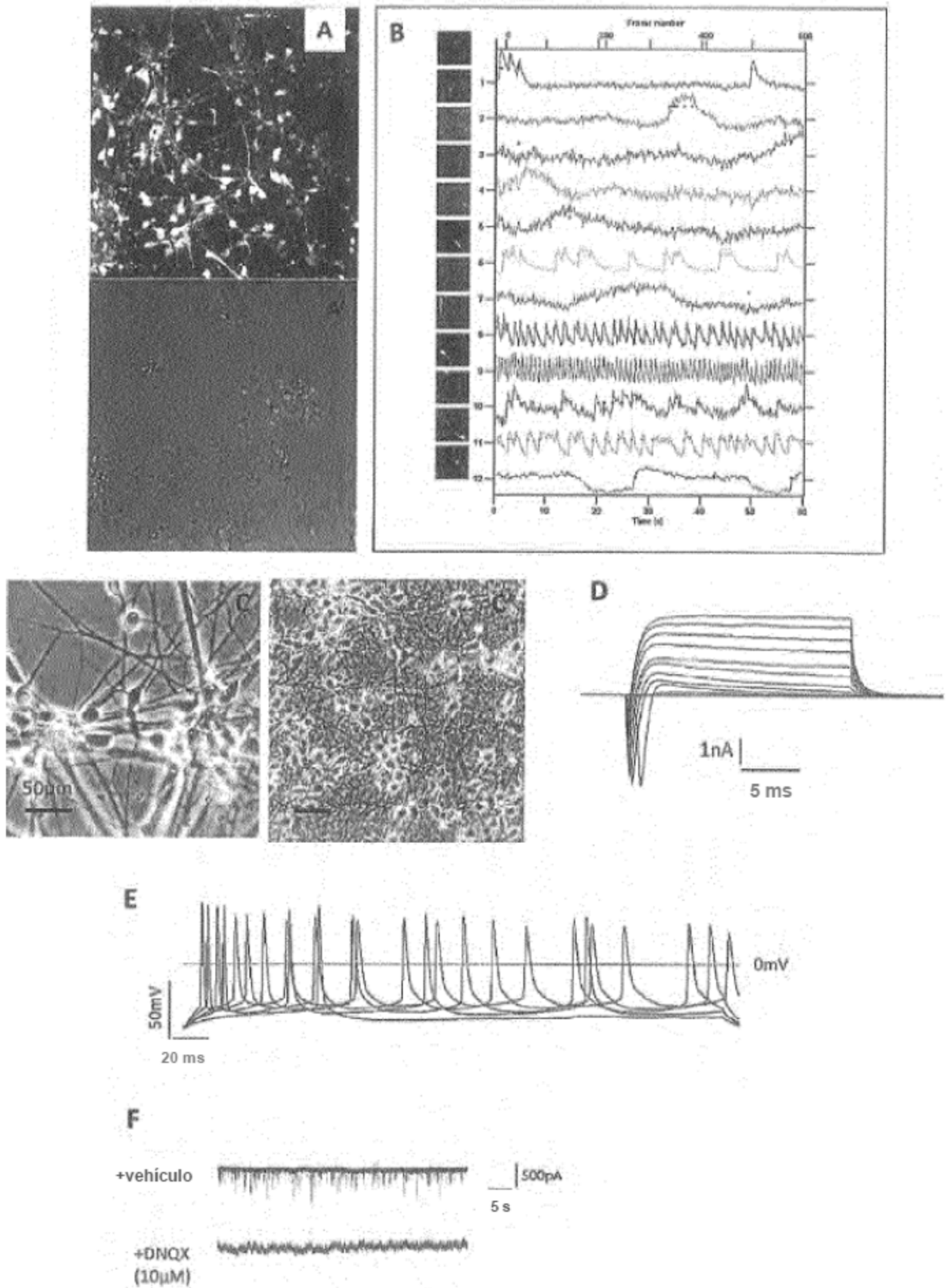


Figura 10

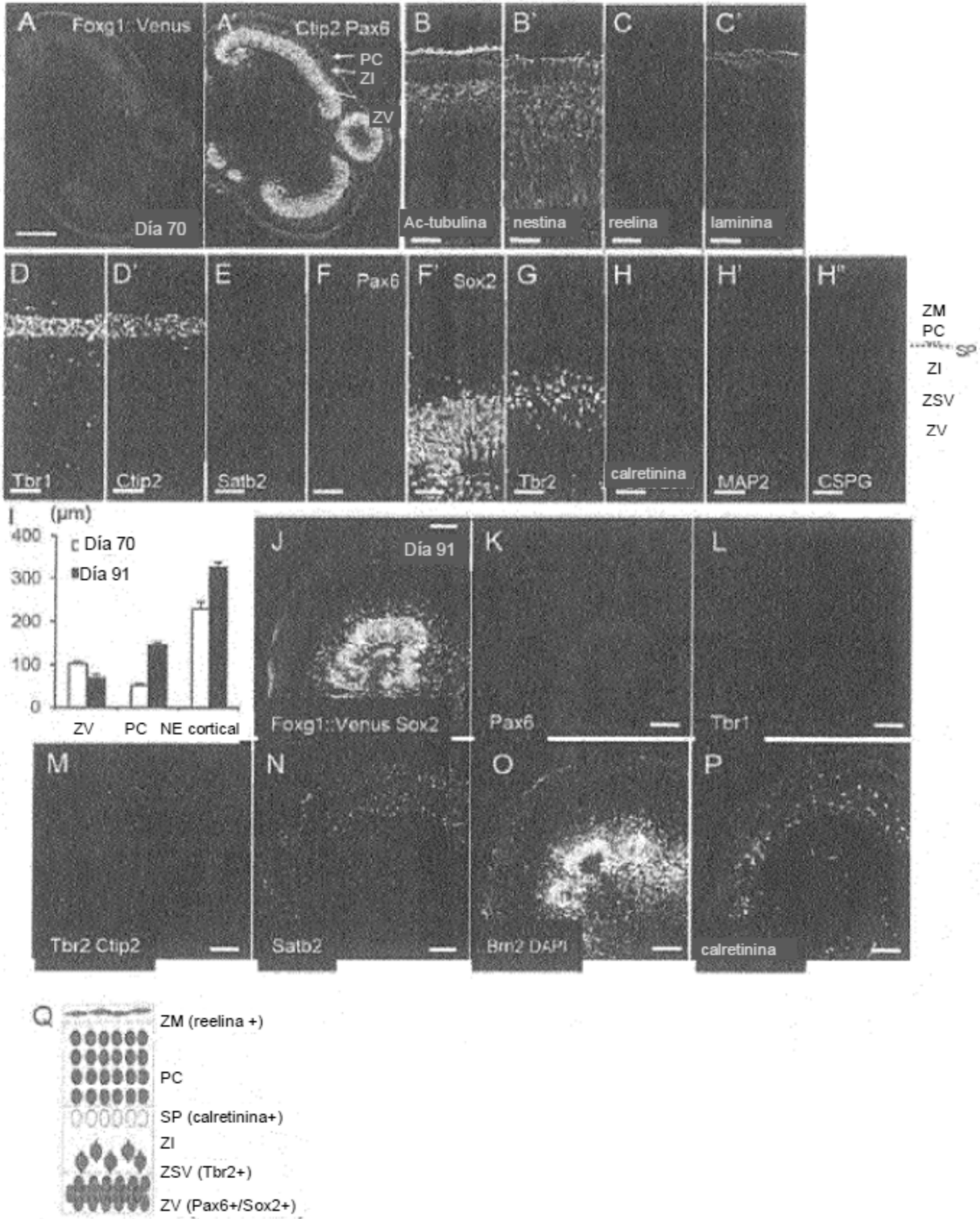


Figura 11

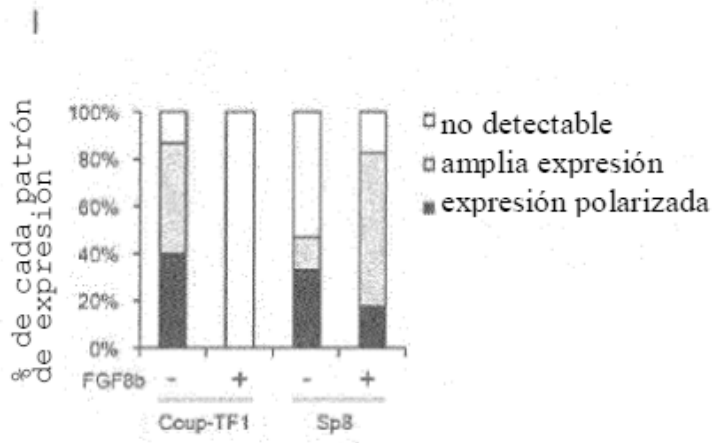
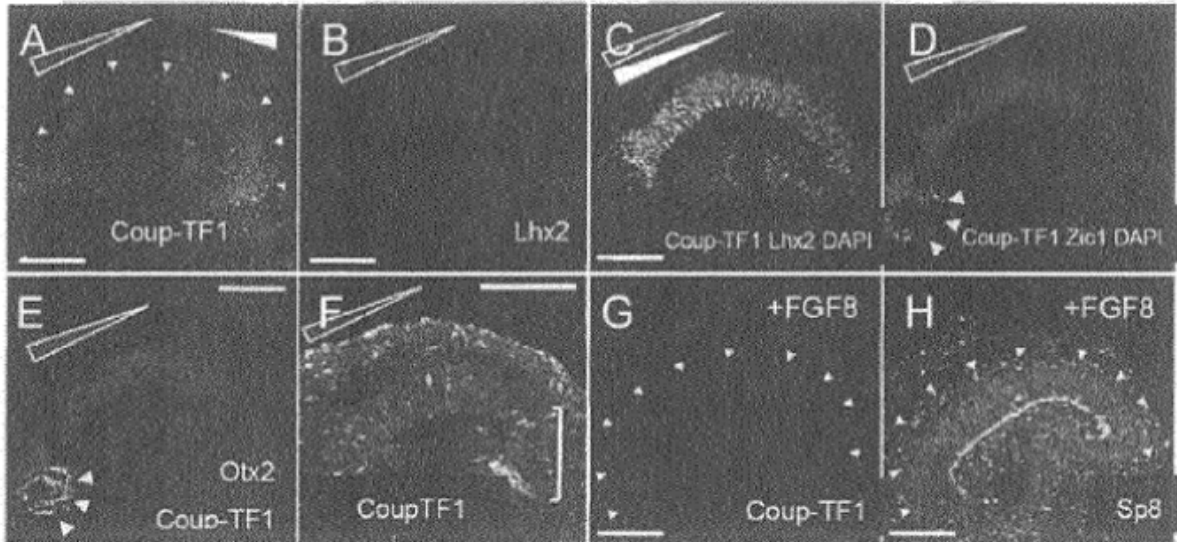


Figura 12

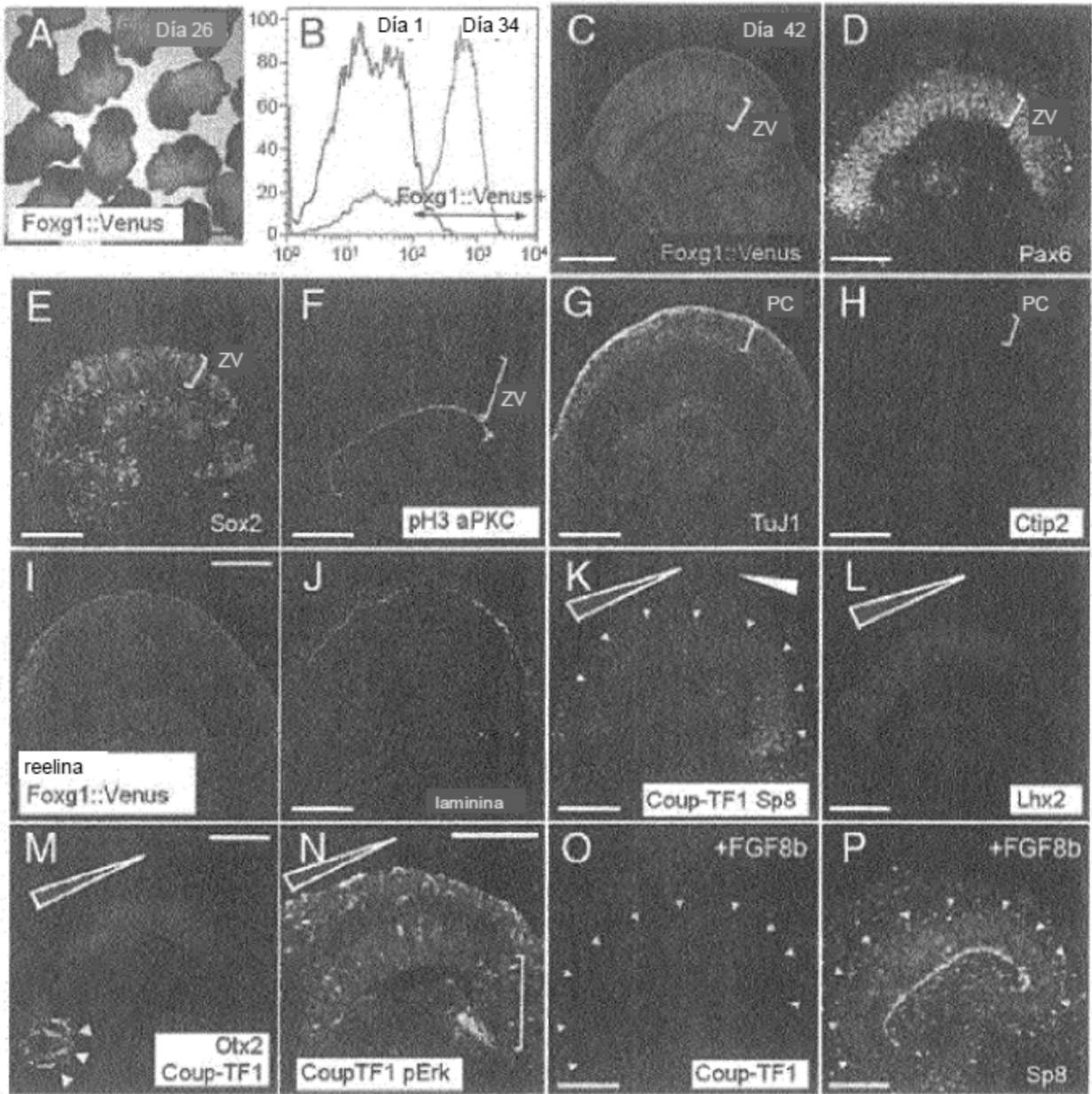


Figura 13

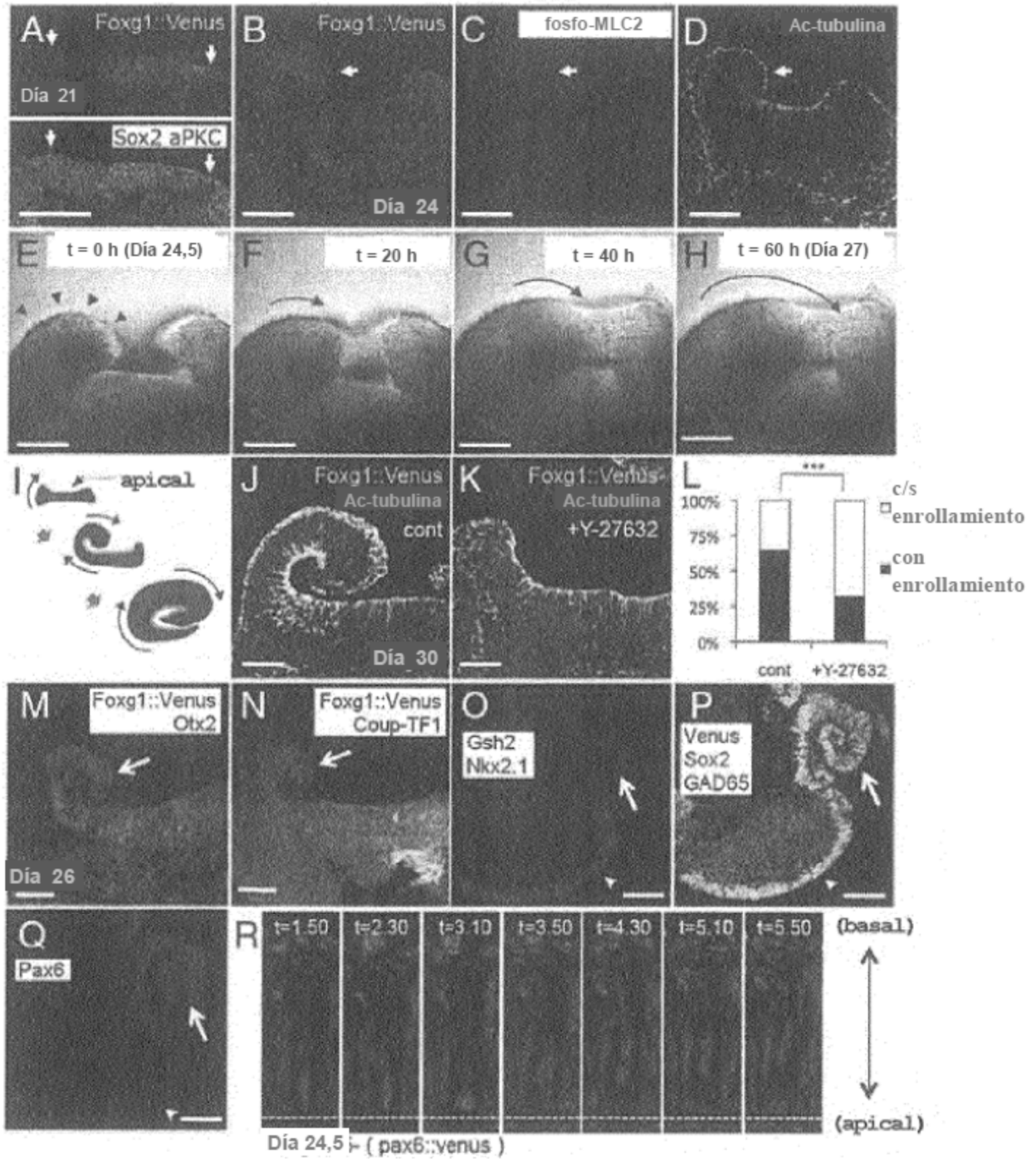


Figura 14

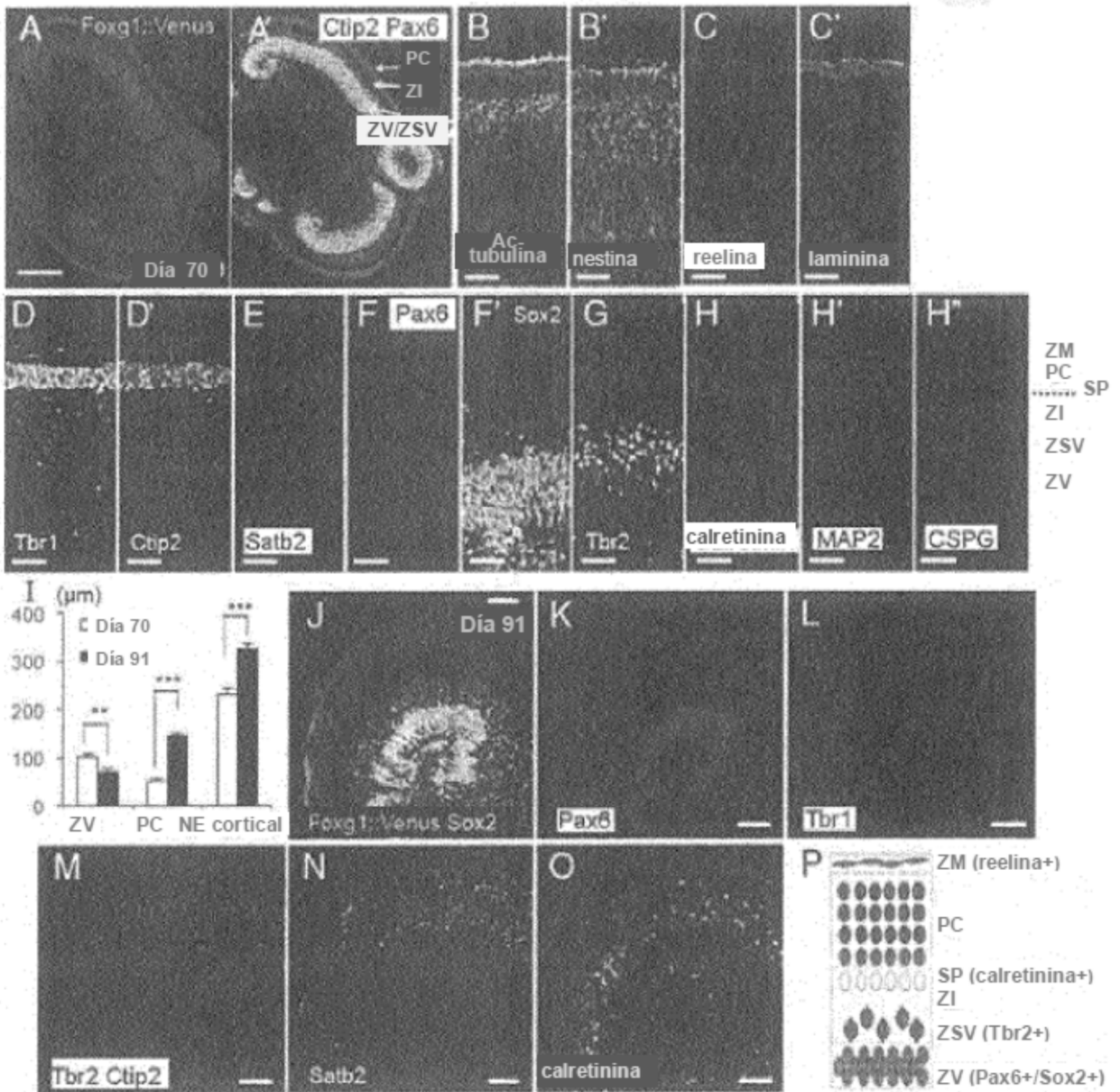


Figura 15

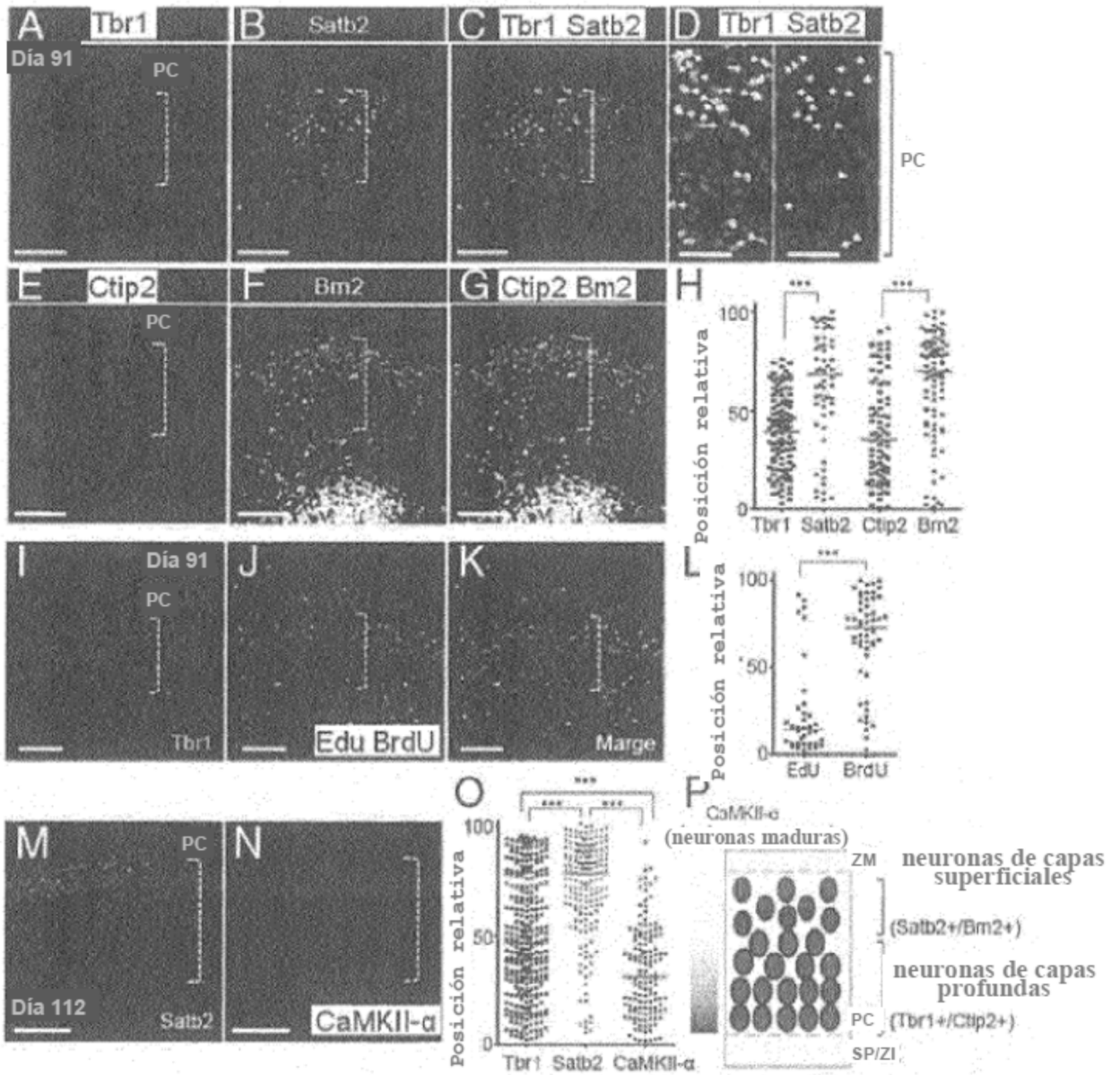


Figura 16

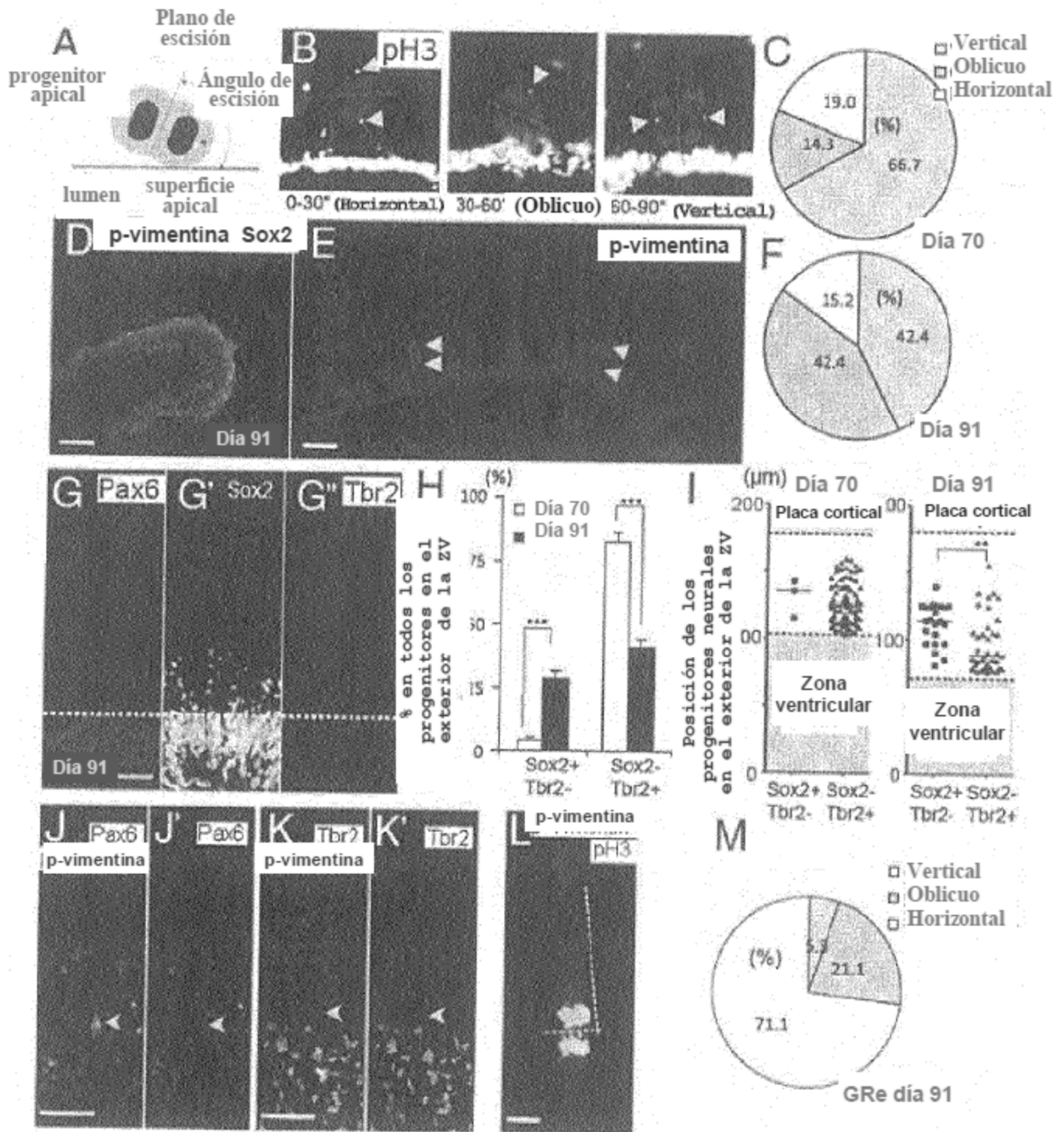
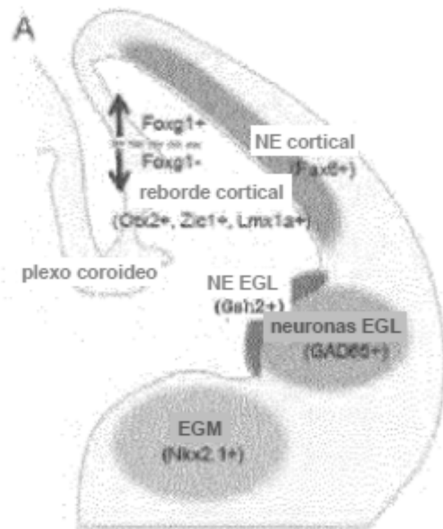
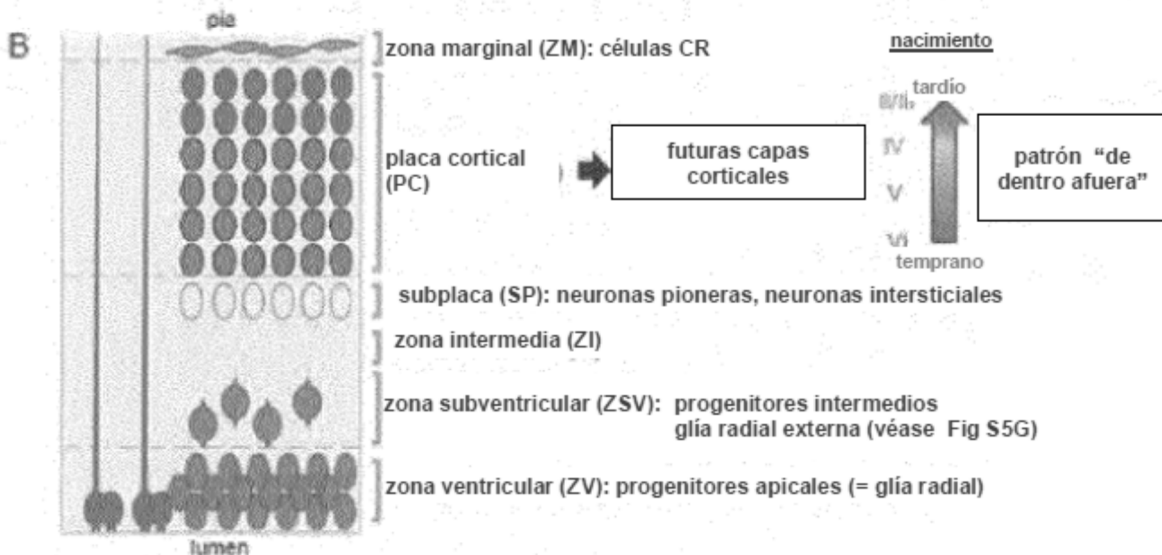


Figura 17

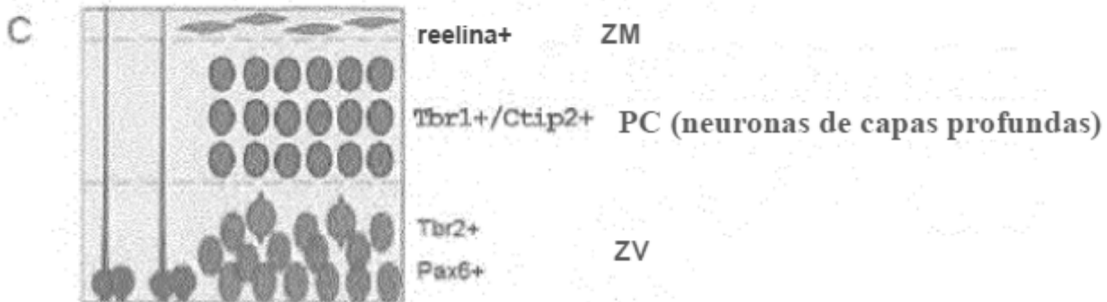


EGL: eminencia ganglionar lateral → cuerpo estriado, etc.

EGM: eminencia ganglionar medial
 → globo pálido, interneuronas corticales*, etc.
 (* en la corteza humana, también se sugiere que la ZV/ZSV es una fuente de interneuronas corticales) (31, 32)



laminación cortical a mitad de la gestación



NE cortical laminar autoformado en el cultivo anterior

Figura 18

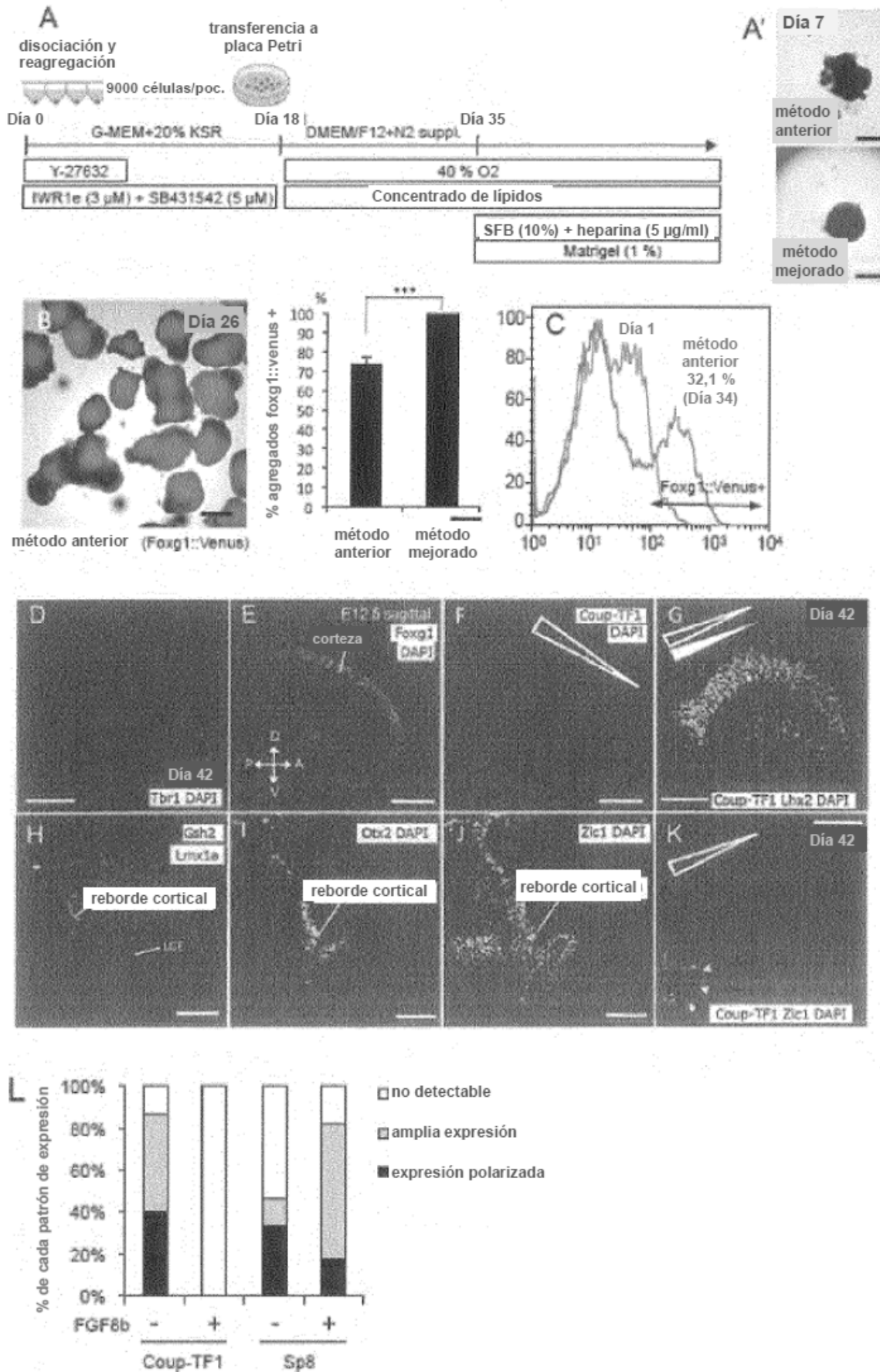


Figura 19

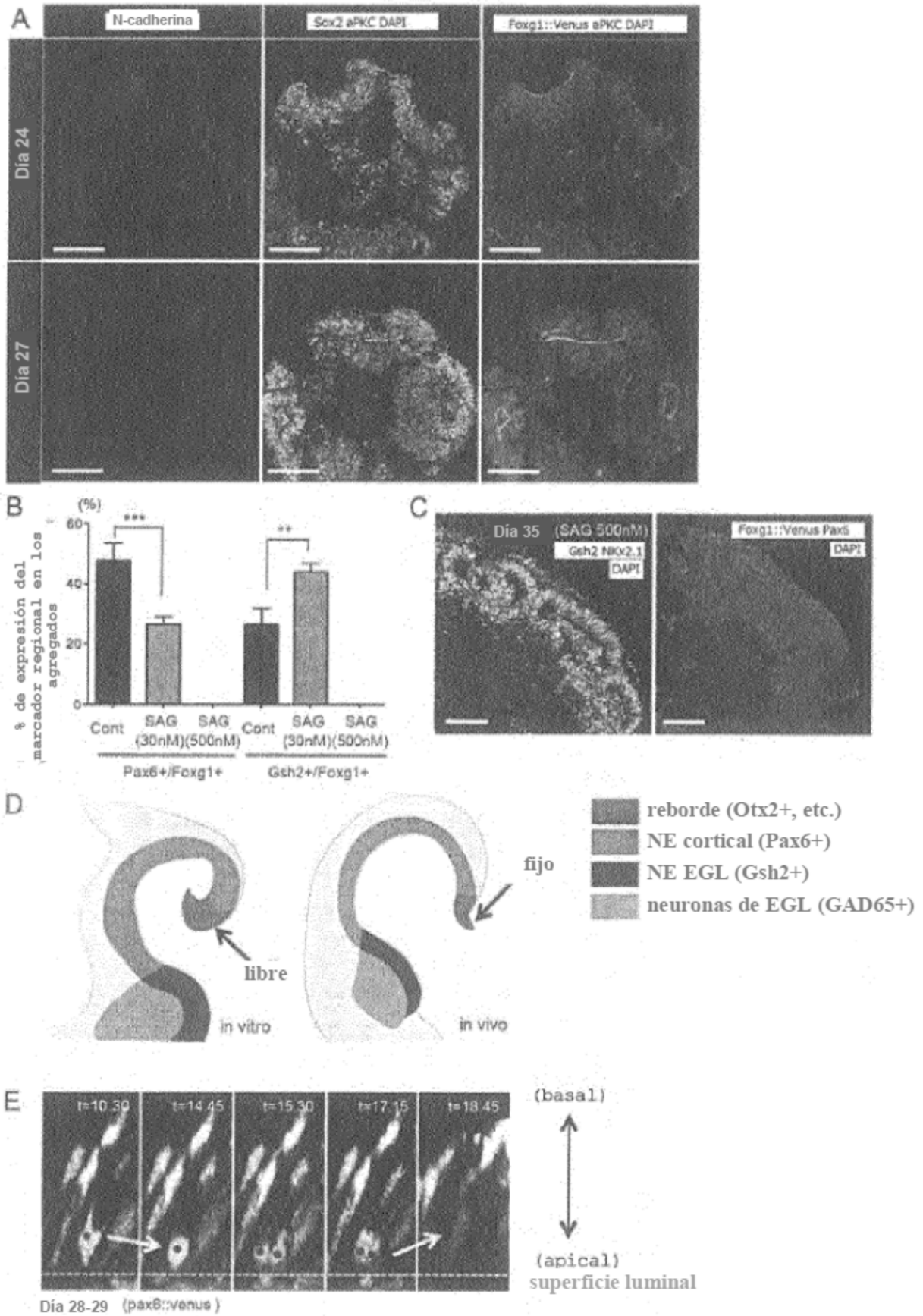


Figura 20

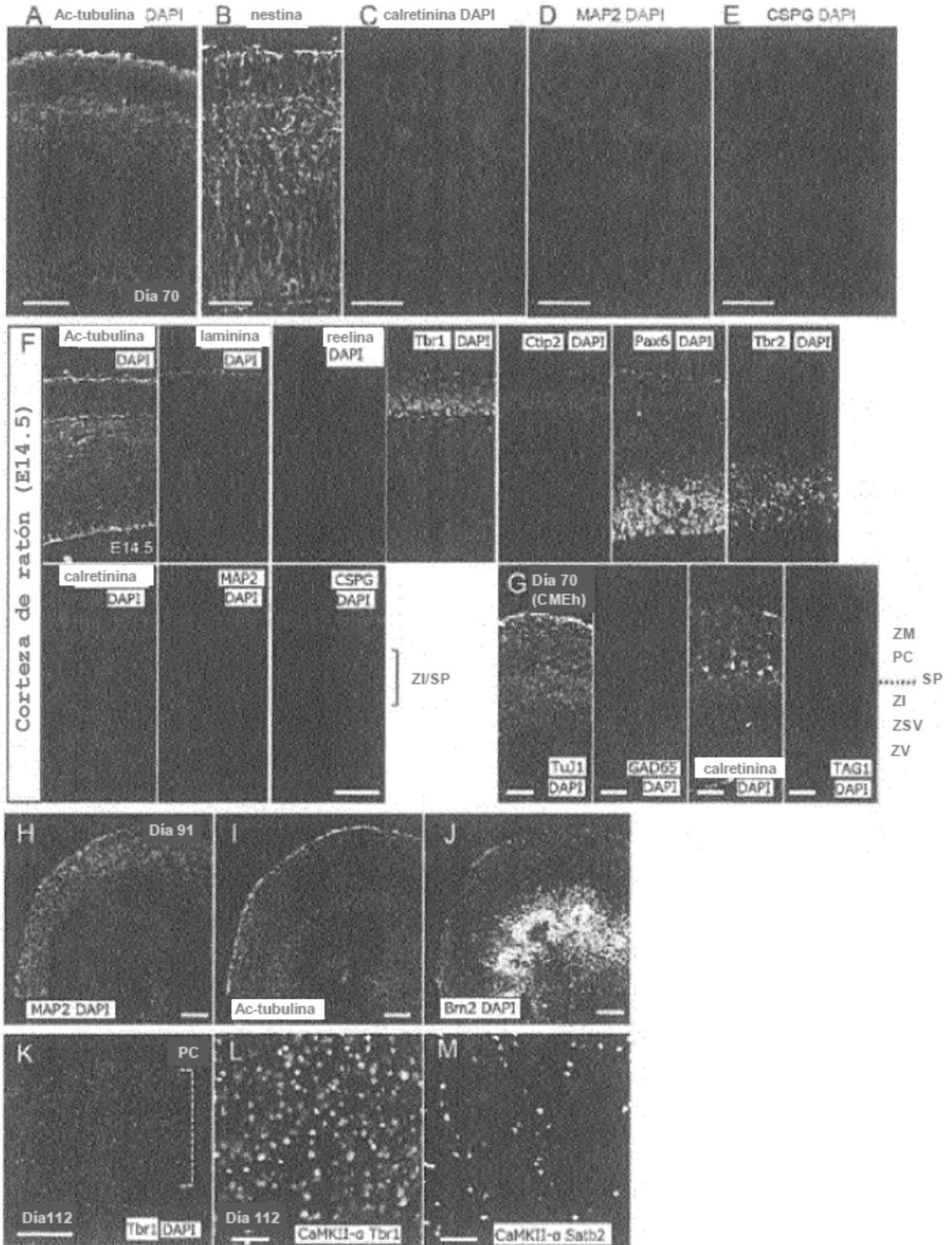


Figura 21

