

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 053**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0735** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2009 E 09764380 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2366022**

54 Título: **Métodos y composiciones para la unión de células y cultivo en sustratos planos**

30 Prioridad:

**20.11.2008 US 116452 P**

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

**23.09.2016**

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)  
800/850 Ridgeview Drive  
Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, YA, XIONG y  
FRYER, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 584 053 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).

**Métodos y composiciones para la unión de células y cultivo en sustratos planos****Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a métodos para el crecimiento, expansión y diferenciación de células madre pluripotentes en sustratos planos que carecen de una capa adsorbida y una capa de células de alimentación.

**10 ANTECEDENTES**

El cultivo de células mamíferas es uno de los muchos procesos en las ciencias de la vida y la salud. Los recipientes para el cultivo de células mamíferas y análisis que implica células dependientes del anclaje se hacen a menudo de cristal o un polímero como, por ejemplo, poliestireno, que frecuentemente requiere tratamiento de superficie adicional para permitir a las células unirse a la superficie del recipiente. Dichos tratamientos pueden incluir aplicar una capa adsorbida en la superficie, por ejemplo por técnicas de adsorción, injerto o polimerización de plasma. Alternativamente, el tratamiento de superficie puede ser a través de modificación química de la misma superficie del recipiente, lo que se puede conseguir por, por ejemplo, tratamientos de corona atmosférica, plasma al vacío de radiofrecuencia, descarga luminiscente de CC, y plasma de microondas.

Los métodos actuales para cultivar células madre pluripotentes, en particular células madre embrionarias (ES) requieren condiciones de cultivo complejas como, por ejemplo, cultivar las células madres embrionarias sobre una superficie de sustrato sólido con una capa de células de alimentación, o sobre una superficie de sustrato sólido con una capa adsorbida de proteína de la matriz extracelular. Los sistemas de cultivo que emplean estos métodos a menudo usan células de alimentación o proteínas de la matriz extracelular obtenidas de una especie diferente que la de las células madre que se están cultivando (material xenogénico). El medio obtenido por la exposición a células de alimentación, es decir, el medio acondicionado por las células distintas a las células ES no diferenciadas, puede usarse para cultivar las células ES, y el medio puede suplementarse con suero animal.

Por ejemplo, Reubinoff et al. (Nature Biotechnol. 18:399-404, 2000) y Thompson et al. (Science 282:1145-1147, 1998) divulgan el cultivo de líneas de células ES a partir de blastocitos humanos usando una capa de células de alimentación de fibroblastos embrionarios de ratón.

En otro ejemplo, Xu et al. (Nature Biotechnology 19: 971-974, 2001) divulga el uso de MATRIGEL® y laminina para tratar superficies de sustrato sólido antes del cultivo libre de células de alimentación de células ES humanas sin diferenciación. En otro ejemplo, Vallier et al. (J. Cell Sci. 118:4495-4509, 2005) divulga el uso de suero bovino fetal para tratar superficies de sustrato sólido antes del cultivo libre de células de alimentación de células ES humanas sin diferenciación.

En otro ejemplo, la WO2005014799 divulga medio acondicionado para el mantenimiento, proliferación y diferenciación de células mamíferas. La WO2005014799 expone: "El medio de cultivo producido de acuerdo con la presente invención es acondicionado por la actividad de secreción de células de células murinas, en particular, los hepatocitos transgénicos diferenciados e inmortalizados, denominados NMH (Hepatocitos murinos Met)."

En otro ejemplo, Wanatabe et al. (Nature Biotechnol. 35:681-686, 2007) expone "un inhibidor ROCK permite la supervivencia de células madre embrionarias humanas disociadas", y demuestra apoptosis inducida por disociación reducida, aumenta la eficiencia de clonación (de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 27%) y facilita la subclonación tras la transferencia de genes, usando fibroblastos embrionarios de ratón como células de alimentación, colágeno y MATRIGEL® como proteína de la matriz extracelular e Y-27632 o Fasudil para la inhibición de ROCK. Además, las células ES humanas disociadas tratadas con Y-27632 se protegieron de la apoptosis en cultivo de suspensión libre de suero.

En otro ejemplo, Peerani et al. (EMBO Journal 26:4744-4755, 2007) expone "La complejidad en la organización espacial de cultivos de células madre embrionarias humanas 8hESC) crea microambientes heterogéneos (nichos) que influyen en el destino de las hESC. Este estudio demuestra que la tasa y la trayectoria de la diferenciación de hESC puede controlarse diseñando las propiedades del nicho de hESC. El tamaño y la composición del nicho regulan el equilibrio entre los factores que inhiben y los que inducen la diferenciación. De manera mecánica, un gradiente espacial dependiente del tamaño del nicho de señalización de Smad 1 se genera como resultado de interacciones antagonistas entre las hESCs y el endodermo extra-embriónico derivado de hESCs (EXE). Estas interacciones están mediadas por la secreción localizada de proteína 2 morfogenética de hueso (BMP2) por ExE y su antagonista, el factor de diferenciación del crecimiento 3 (GDF3) por las hESCs. El micropatrón de las hESCs tratadas con ARN interferente pequeño (si) contra GDF3, BMP2 y Smad1, así como tratamientos con el inhibidor de quinasa asociada a Rho (ROCK) demuestran que el control independiente de la activación de Smad1 puede rescatar la diferenciación dependiente del tamaño de la colonia de las hESCs. Nuestros resultados ilustran, por primera vez, un papel para Smad1 en la integración de la información espacial y en el control dependiente del

nicho de la auto-renovación y diferenciación de hESC."

5 En otro ejemplo, Koyanagi, M et al (J Neurosci Res. 2008 Feb 1; 86(2): 270-80) expone "la Rho-GTPasa se ha visto implicada en la apoptosis de muchos tipos de células, incluyendo neuronas, pero el mecanismo por el que actúa no se entiende completamente. Aquí, investigamos los papeles de Rho y ROCK en la apoptosis durante el trasplante de células precursoras neurales derivadas de células madre embrionarias. Descubrimos que la disociación de precursores neurales activa la Rho e induce la apoptosis. El tratamiento con el exoenzima C3 inhibidor de Rho y/o el inhibidor de ROCK Y-27632 disminuye la cantidad de apoptosis inducida por disociación (anoikis) en el 20-30%. la formación de ampollas en la membrana, que es un signo morfológico temprano de la apoptosis; la escisión de la caspasa-3; y la liberación del citocromo c de la mitocondria también se reducen por la inhibición de ROCK. Estos resultados sugieren que la disociación de las células precursoras neurales provoca una vía intrínseca de muerte celular que se media al menos parcialmente a través de la vía Rho/ROCK. Además, en un modelo de trasplante animal, la inhibición de Rho y/o ROCK suprime la apoptosis aguda de células injertadas. Después del trasplante, el factor de necrosis tumoral alfa y el factor de crecimiento pro-nervioso se expresan fuertemente alrededor del injerto. La inhibición de ROCK también suprime la apoptosis potenciada por estas citoquinas inflamatorias. Tomados en conjunto, estos resultados indican que la inhibición de la señalización Rho/ROCK puede mejorar la supervivencia de células injertadas en terapia de reemplazo celular."

20 El uso de material xenogénico puede ser no adecuado para ciertas aplicaciones que utilizan células madre pluripotentes. Se pueden usar materiales alternativos. Por ejemplo, Stojkovic et al. (Stem Cells 23:895-902, 2005) divulga el uso de suero humano para tratar superficies de sustrato sólido antes del cultivo libre de células de alimentación de células Es humanas sin diferenciación.

25 Un sistema de cultivo alternativo emplea medio libre de suero suplementado con factores de crecimiento capaces de promover la proliferación de células madre embrionarias.

30 Por ejemplo, Cheon et al. (BioReprod DOI: 10.1095/biolreprod. 105.046870; 19 de Octubre del 2005) divulga un sistema de cultivo libre de suero, libre de células de alimentación en el que las células ES se mantienen en medio de reemplazo de suero sin acondicionar suplementado con diferentes factores de crecimiento capaces de activar la auto-renovación de las células ES.

35 En otro ejemplo, Levenstein et al. (Stem Cells 24:568-574, 2006) divulga métodos para el cultivo a largo plazo de células ES humanas en ausencia de fibroblastos o medio acondicionado, usando medio suplementado con factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF).

40 En otro ejemplo, la US20050148070 divulga un método de cultivar células ES humanas en medio definido sin suero y sin células de alimentación de fibroblastos, el método comprende: cultivar las células madre en un medio de cultivo que contiene albúmina, aminoácidos, vitaminas, minerales, al menos una transferrina o sustituto de transferrina, al menos una insulina o sustituto de insulina, el medio de cultivo esencialmente libre de suero fetal mamífero y conteniendo al menos 100 ng/ml de un FGF capaz de activar el receptor de señalización de FGF, en donde el factor de crecimiento se suministra desde una fuente que no sea sólo una capa de alimentación de fibroblastos, el medio apoyó la proliferación de células madre en un estado no diferenciado sin células de alimentación o medio acondicionado.

45 En otro ejemplo, la US20050233446 divulga un medio definido útil para cultivar células madre, incluyendo células madre primordiales de primate no diferenciadas. En solución, el medio es sustancialmente isotónico en comparación con las células madre que se están cultivando. En un cultivo dado, el medio particular comprende un medio base y una cantidad de cada uno de FGF básico, insulina y ácido ascórbico necesarios para apoyar el crecimiento sustancialmente indiferenciado de las células madre primordiales.

50 En otro ejemplo, la US6800480 expone: "En una realización, se proporciona un medio de cultivo celular para cultivar células madre primordiales derivadas de primate en un estado sustancialmente no diferenciado que incluye una presión osmótica baja, medio básico bajo en endotoxinas que es eficaz para apoyar el cultivo de células madre primordiales derivadas de primate. El medio básico se combina con un suero de nutrientes eficaz para apoyar el crecimiento de células madre primordiales derivadas de primate y un sustrato seleccionado del grupo consistente de células de alimentación y un componente de la matriz extracelular derivado de células de alimentación. El medio incluye además aminoácidos no esenciales, un antioxidante, y un primer factor de crecimiento seleccionado del grupo consistente de nucleósidos y una sal de piruvato."

60 En otro ejemplo, la US20050244962 expone: "En un aspecto la invención proporciona un método de cultivar células madre embrionarias de primate. Un cultivo de las células madre en un cultivo esencialmente libre de suero fetal mamífero (preferiblemente también esencialmente libre de cualquier suero animal) y en presencia de un factor de crecimiento de fibroblastos que se suministra desde una fuente que no sea sólo una capa de alimentación de fibroblastos. en una forma preferida, la capa de alimentación de fibroblastos, requerida anteriormente para sostener un cultivo de células madre, se vuelve innecesaria por la adición de suficiente factor de crecimiento de fibroblastos".

- 5 En otro ejemplo, la WO2005065354 divulga un medio de cultivo isotónico definido que está esencialmente libre de alimentadores y suero, comprendiendo: a. un medio basal; b. una cantidad de factor de crecimiento de fibroblastos básico suficiente para apoyar el crecimiento de células mamíferas sustancialmente no diferenciadas; c. una cantidad de insulina suficiente para apoyar el crecimiento de células madre mamíferas sustancialmente no diferenciadas; y d. una cantidad de ácido ascórbico suficiente para apoyar el crecimiento de células madre mamíferas sustancialmente no diferenciadas.
- 10 En otro ejemplo, la WO2005086845 divulga un método para el mantenimiento de una célula madre no diferenciada, dicho método comprendiendo exponer una célula madre a un miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento transformante beta (FGF  $\beta$ ), un miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), o nicotinamida (NIC) en una cantidad suficiente para mantener la célula en un estado no diferenciado durante un periodo de tiempo suficiente para conseguir un resultado deseado.
- 15 Las células madre pluripotentes proporcionan una fuente potencial para la investigación y la selección de fármacos. En la actualidad, el cultivo a gran escala de líneas de células ES humanas es problemático y proporciona retos sustanciales. Una solución posible para estos retos es pasar y cultivar las células ES humanas como células individuales. Las células individuales son más sensibles a técnicas de cultivo de tejido estándar como, por ejemplo, conteo, transfección y similares.
- 20 Por ejemplo, Nicolas et al. proporciona un método para producir y expandir líneas de células ES humanas a partir de células individuales que han sido aisladas por clasificación de células activada por fluorescencia seguido por la modificación genética por vectores de lentivirus (Stem Cells Dev. 16:109-118, 2007).
- 25 En otro ejemplo, la solicitud de patente US US2005158852 divulga un método "para mejorar el crecimiento y la supervivencia de células madre embrionarias humanas individuales. El método incluye el paso de obtener una célula hES no diferenciada individual; mezcla la célula no diferenciada individual con una matriz extracelular para abarcar la célula; e inocular la mezcla en células de alimentación con un medio de nutrientes en ambiente de crecimiento".
- 30 En otro ejemplo, Sidhu et al. (Stem Cells Dev. 15:61-69, 2006) describe el primer informe de tres clones de células ES humanas, hES 3.1, 3.2 y 3.3, derivadas de la línea parental hES3 clasificando preparaciones de células individuales por citometría de flujo.
- 35 Sin embargo, el paso y cultivo de células ES humanas como células individuales lleva a anomalías genéticas y la pérdida de pluripotencia. Las condiciones de cultivo son importantes en el mantenimiento de la pluripotencia y la estabilidad genética. Generalmente el paso de líneas celulares ES humanas se lleva a cabo manualmente o con agentes enzimáticos como colagenasa, liberasa o dispasa.
- 40 Por ejemplo, Draper et al. observan la presencia de "cambios en el cariotipo que implican la ganancia del cromosoma 17q en tres líneas de células madre embrionarias humanas independientes en cinco ocasiones independientes". (Nature Biotechnol. 22:53-54, 2004).
- 45 En otro ejemplo, Buzzard et al. expone, "hemos detectado sólo alguna vez un evento de cambio de cariotipo...los métodos de cultivo usados pueden haber tenido algo que ver sobre nuestros resultados, ya que nuestros métodos son claramente diferente de los usados por la mayoría de otros grupos. Típicamente pasamos células ES humanas después de 7 días diseccionando la colonia con el borde una pipeta rota...No se incorporan en este método métodos de disociación celular enzimáticos o químicos. Especulamos que esto puede explicar la resistencia citogenética relativa de las células hES (ES humanas) en nuestras manos." (Nature Biotechnol. 22:381-382,2004).
- 50 En otro ejemplo, Mitalipova et al. expone: "métodos de paso a granel...pueden perpetuar las poblaciones de células aneuploides después del paso extendido en el cultivo, puede pueden usarse durante periodos más cortos (hasta la menos 15 pases) sin comprometer los cariotipos...puede ser posible mantener un cariotipo normal en células hES bajo condiciones de propagación manual a largo plazo seguido por paso a granel limitado en experimentos que requieren cantidades mayores de células hES que las que requieren los métodos de paso manuales, solamente". (Nature Biotechnol. 23:19-20, 2005).
- 55 En otro ejemplo, Heng et al. expone "los resultados demostraron que el segundo protocolo (tripsinización con pipeteo suave) es mucho menos perjudicial para la viabilidad celular que el primer protocolo (tratamiento con colagenasa con rascado). Esto a su vez se traslado a tasas de supervivencia de congelación-descongelación más altas". (Biotechnology and Applied Biochemistry 47:33-37, 2007).
- 60 En otro ejemplo, Hasegawa et al. expone "hemos establecido sublíneas de hESC tolerantes a la disociación completa. Estas células muestran eficiencia de vuelta a colocar en placas alta y también alta eficiencia de clonación
- 65

y mantienen su capacidad para diferenciarse en las tres capas germinales". (Stem Cells 24:2649-2660, 2006).

En otro ejemplo, la solicitud de patente US 61/030.544 proporciona métodos y composiciones para la unión celular a, cultivo sobre y desunión de una superficie de sustrato sólido que contiene al menos alrededor del 0,9% de nitrógeno a alrededor de al menos el 11% de nitrógeno y de al menos alrededor del 12% de oxígeno a al menos alrededor del 30% de oxígeno, y carece de una capa adsorbida y células de alimentación. En una realización de la presente invención, las células se tratan con un compuesto capaz de inhibir la actividad de la Rho quinasa.

Hay una necesidad significativa para métodos y composiciones para el cultivo de células, incluyendo células madre pluripotentes en ausencia de células de alimentación y una capa adsorbida, mientras se mantiene la pluripotencia de las células. La presente invención proporciona métodos para el crecimiento, expansión y diferenciación de células madre pluripotentes en sustratos planos que carecen de una capa adsorbida y una capa de células de alimentación, donde las células no requieren de tratamiento con un compuesto capaz de inhibir la actividad de la Rho quinasa para enlazar con el sustrato plano.

## SUMARIO

La presente invención se refiere a métodos para la unión, cultivo y diferenciación de células madre pluripotentes a un sustrato plano que contiene hasta alrededor del 12% de N, de al menos alrededor del 12% de O a al menos alrededor del 55% de O, un ángulo de contacto de alrededor de 18 grados a alrededor de 32 grados, y que carece de una capa adsorbida y una capa de células de alimentación.

Específicamente, la invención proporciona un método para unir células madre pluripotentes a un sustrato plano que contiene hasta alrededor del 12% de N, de al menos alrededor del 12% de O a al menos alrededor del 55% de O, un ángulo de contacto de alrededor de 18 grados a alrededor de 32 grados, y que carece de una capa adsorbida y una capa de células de alimentación que comprende los pasos de:

suspensión de células madre pluripotentes, y

- a. usar una obtenida
- b. Añadir la suspensión celular al sustrato plano y permitir que las células se unan.

## BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS DE REFERENCIA

La Figura 1 muestra el efecto del inhibidor de la Rho quinasa H-1152 en la unión de la línea de células madre embrionarias humanas H1 a sustratos planos. Panel a): representa la unión celular en membranas de éster de celulosa mixtas (membrana N° 2 en la Tabla 1). Panel b): representa la unión celular en membranas de nylon (membrana N° 4 en la Tabla 1). Panel c): representa la unión celular en membranas de acetato de celulosa (membrana N° 5 en la tabla 1). Panel d) representa al unión celular en membranas de policarbonato (membrana N° 7 en la Tabla 1). Panel e): representa la unión celular en membranas de tereftalato de polietileno (membrana N° 12 en la Tabla 1).

Figura 2: muestra el efecto del inhibidor de la Rho quinasa Y-26732 en la unión de la línea de células madre embrionarias humanas H9 con membrana de éster de celulosa mixta (membrana N° 1 en la Tabla 1). Panel a): representa la unión celular en un pocillo de control. Panel b). representa la unión celular para células tratadas con 10 µM de Y-26732. Panel c): representa la unión celular para células tratadas con 20 µM de Y-26732.

Figura 3: muestra las curvas de proliferación de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en superficie recubierta con MATRIGEL® (línea sólida) y sobre membranas de éster de celulosa mixtas (membrana N° 1 en la Tabla 1) (línea discontinua).

Figura 4: muestra los cromosomas de banda G de células representativas de las células madre embrionarias humanas de la línea H1. Panel a): representa los cromosomas de una célula cultivada en superficie recubierta con MATRIGEL® durante 10 pases. Panel b). representa los cromosomas de una célula cultivada en membranas de éster de celulosa mixtas (membrana N° 1 en la Tabla 1) durante 10 pases.

Figura 5: muestra el efecto del inhibidor de la Rho quinasa Y26732 en células de la línea de células madre embrionarias humanas H9 en la unión con membranas de policarbonato (membrana N° 7 en la Tabla 1). Panel a): representa la unión celular en un pocillo de control. Panel b): representa la unión celular después del tratamiento con 10 µM de Y-26732. Panel c): representa la unión celular después del tratamiento con 20 µM de Y-26732.

La Figura 6 muestra el efecto del inhibidor de la Rho quinasa H-1152 en la unión de las células de la línea celular de células madre embrionarias humanas H1 con membranas de policarbonato (membrana N° 7 en la

Tabla 1). Panel a): representa la unión celular en un pocillo de control. Panel b): representa la unión celular cuando se añadieron 0,03  $\mu\text{M}$  de H-1152 al medio. Panel c): representa la unión celular cuando se añadieron 0,1  $\mu\text{M}$  de H-1152 al medio. Panel d): representa la unión celular cuando se añadieron 0,3  $\mu\text{M}$  de H-1152 al medio. Panel e): representa la unión celular cuando se añadió 1  $\mu\text{M}$  de H-1152 al medio. Panel f): representa la unión celular cuando se añadieron 3  $\mu\text{M}$  de H-1152 al medio.

La Figura 7 muestra la desunión de células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 de las membranas de policarbonato (membrana N° 9 en la Tabla 1) después de la eliminación del inhibidor de la Rho quinasa H-1552 del medio de cultivo celular. Panel a): representa la unión de células cuando se mantuvieron 3  $\mu\text{M}$  de H-1152 en el medio de cultivo. Panel b): representa la desunión de células cuando se eliminó el H-1152 del medio de cultivo.

La Figura 8 muestra el efecto del tamaño del poro de la membrana y el tratamiento con inhibidor de Rho quinasa en la unión de la línea de células madre embrionarias humana H1 con los sustratos planos que comprenden lo siguiente: membrana de policarbonato N° 10 en la Tabla 1 en el panel a y c; y membrana de policarbonato N° 11 en la Tabla 1 en el panel b y d). Paneles a y b): representan la unión de células cuando se mantuvieron 3  $\mu\text{M}$  de H-1152 en el medio de cultivo. Los paneles c y d): representan la desunión de las células cuando se eliminó el H-1152 del medio de cultivo.

La Figura 9 muestra el mantenimiento de la expresión de los marcadores asociados con la pluripotencia en células de la línea de células madre embrionarias humana H1 cultivadas en membranas de policarbonato (membrana N° 8 en la Tabla 1) durante tres pases. La expresión de los genes indicados en la figura se determinó por PCR en tiempo real. Las barras sólidas representan los datos obtenidos de la línea de células madre embrionarias humana H1. Las barras discontinuas representan datos obtenidos de las células cultivadas en membranas de policarbonato.

La Figura 10 muestra la capacidad de las células de la línea de células madre embrionarias humana H1 para formar cuerpos embrioides después del cultivo durante 12 pases en membranas de policarbonato (membrana N° 8 en la Tabla 1). La figura muestra datos representativos de un experimento individual.

La Figura 11 muestra micrografías electrónicas de barrido de los sustratos planos de la presente invención.

La Figura 12 muestra micrografías electrónicas de barrido del sustrato plano ULTRAWEB™.

La Figura 13 muestra el efecto del medio definido mTESR™ en el enlace de células de la línea de células madre embrionarias humana H1 con varios sustratos planos.

## DESCRIPCION DETALLADA

Para claridad de la divulgación, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las siguientes sub-secciones que describen o ilustran ciertas características, realizaciones o aplicaciones de la presente invención.

### Definiciones

"Capa adsorbida" como se usa en la presente se refiere a un capa que está formada sobre la superficie de un sustrato sólido, uniendo moléculas a la superficie o por enlaces covalentes (también conocido como injerto) o no covalentes (también conocido como adsorción). Las moléculas utilizadas al hacer una capa adsorbida pueden, por ejemplo, ser moléculas proteicas que pueden incluir, por ejemplo, proteínas de la matriz extracelular, aminoácidos y similares, y moléculas no biológicas como, por ejemplo, polietilénimina.

"Linaje de células  $\beta$ " se refiere a células con expresión génica positiva para el factor de transcripción PDX-1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN3, NKX2.2, NKX6.1, NEUROD, ISL1, HNF-3 beta, MAFA, PAX4, o PAX6. Las células que expresan marcadores característicos del linaje de células  $\beta$  incluyen células  $\beta$ .

"Células que expresan marcadores característicos del linaje endodermo definitivo", como se usa en la presente, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox tipo Mix, FG4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99, o OTX2. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodermo definitivo incluyen células precursoras de línea primitiva, células de línea primitiva, células mesendodermo y células endodermo definitivas.

"Células que expresan marcadores del linaje endodermo pancreático", como se usa en la presente, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: PDX1, HNF1 beta, PTF1 alfa, HNF6,

NKX6.1, o HB9. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodermo pancreático incluyen células del endodermo pancreáticas, células tubulares del intestino primitivas, y células del intestino anterior posteriores.

5 "Endodermo definitivo", como se usa en la presente, se refiere a células que llevan las características de células que surgen del epiblasto durante la gastrulación y que forman el tracto gastrointestinal y sus derivados. Las células del endodermo definitivo expresan los siguientes marcadores: HNF3 beta, GATA4, SOX17, Cerberus, OTX2, gooseoid, C-Kit, CD99, y MIXL1.

10 "Célula endocrina pancreática" o "célula que expresa hormona pancreática", como se usa en la presente, se refiere a una célula capaz de expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

15 "Endodermo extraembrionario" como se usa en la presente se refiere a una población de células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX7, AFP, o SPARC.

20 "Proteínas de la matriz extracelular" se refiere a moléculas proteicas encontradas normalmente entre las células en el cuerpo o en la placenta. Las proteínas de la matriz extracelular pueden derivarse del tejido, fluidos corporales como, por ejemplo, sangre, o medio acondicionado por células no recombinantes o células recombinantes o bacterias.

25 "Marcadores" como se usa en la presente, son ácidos nucleicos o moléculas de polipéptidos que se expresan diferencialmente en una célula de interés. En este contexto, la expresión diferencial significa un nivel aumentado de un marcador positivo y un nivel disminuido de un marcador negativo. El nivel detectable del ácido nucleico o polipéptido del marcador es suficientemente alto o bajo en las células de interés en comparación con otras células, de tal manera que la célula de interés puede identificarse y distinguirse de otras células usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica.

30 "Célula de mesodermo" como se usa en la presente se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: CD48, eomesodermina (EOMES), SOX-17, DKK4, HNF3 beta, GSC, FGF17, o GATA6.

"Célula que secreta hormona pancreática" como se usa en la presente se refiere a una célula capaz de secretar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

35 "Célula de línea pre-primitiva" como se usa en la presente se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: Brachyury, proteína de homeobox tipo Mix o FG4.

40 Las células madre son células no diferenciadas definidas por su capacidad a nivel celular individual para tanto auto-renovarse como diferenciarse para producir células de la progenie, incluyendo progenitores de auto-renovación, progenitores de no renovación y células diferenciadas terminalmente. Las células madre también se caracterizan por su capacidad de diferenciarse in vitro en células funcionales de varios linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como por dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante y por contribuir sustancialmente, a la mayoría, sino todos, los tejidos después de la inyección en blastocitos.

45 Las células madre se clasifican por su potencial de desarrollo como : (1) totipotentes, significando capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias; (2) pluripotentes, significando capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias; (3) multipotentes, significando capaces de dar lugar a un subconjunto de linajes celulares, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir progenie que incluya HSC (auto-renovación), progenitores oligopotentes restringidos a células de la sangre y todos los tipos celulares y elementos (por ejemplo plaquetas) que sean componentes normales de la sangre); (4) oligopotentes, significando capaces de dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes celulares que las células madre multipotentes; y (5) unipotentes, significando capaces de dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo células madre espermatogénicas).

55 La diferenciación es el proceso por el cual, por ejemplo una célula menos especializado o sin especializar ("no comprometido") adquiere las características de una célula especializada como, por ejemplo una célula nerviosa o una célula muscular. Una célula diferenciada o de diferenciación inducida es una que ha adquirido una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término "comprometida", cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha procedido en la vía de diferenciación a un punto donde, bajo circunstancias normales, continuará diferenciándose en un tipo celular específico o subconjunto de tipos celulares y no puede, bajo circunstancias normales, diferenciarse en un tipo celular diferente o revertir a un tipo celular menos diferenciado. Desdiferenciación se refiere al proceso por el que una célula revierte a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Como se usa en la presente, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir, de que células vino y a que células puede dar lugar. El linaje de una

célula coloca la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un marcador específico del linaje se refiere a una característica asociada específicamente con el fenotipo de las células de un linaje de interés y puede usarse para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida con el linaje de interés.

5 "Superficie" como se usa en la presente se refiere a la capa más exterior de las moléculas de un recipiente o matriz de sustrato sólido pretendida para el uso en el cultivo o análisis celular. La composición elemental, la rugosidad, y la humectabilidad de la superficie pueden analizarse por Espectroscopia de Fotoelectrones por Rayos X (XPS), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), y medición del ángulo de contacto, respectivamente.

10 Se usan varios términos para describir células en cultivo. "Mantenimiento" se refiere generalmente a células colocadas en un medio de crecimiento bajo condiciones que facilitan el crecimiento y/o división celular que puede o no puede resultar en una población de células mayor. "Pase" se refiere al proceso de retirar las células de un recipiente de cultivo y colocarlas en un segundo recipiente de cultivo bajo condiciones que facilitan el crecimiento y/o división celular.

15 Una población específica de células, o una línea celular, es referida algunas veces o caracterizada por el número de veces que ha sido pasada. Por ejemplo, una población celular cultivada que ha sido pasada diez veces puede ser referida como un cultivo P10. El cultivo primario, es decir el primer cultivo después del aislamiento de las células del tejido, se designa P0. Después del primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (P1 o pase 1). Después del segundo subcultivo, las células se vuelven un cultivo terciario (P2 o pase 2), y así. Se entenderá por los expertos en la técnica que puede haber muchas duplicaciones de la población durante el periodo de pase; por lo tanto el número de duplicaciones de población de un cultivo es mayor que el número de pases. La expansión de las células (es decir, el número de duplicaciones de población) durante el periodo entre el paso depende de muchos factores, incluyendo pero no limitado a, la densidad del sembrado, sustrato, medio, condiciones de crecimiento, y el tiempo entre el pase.

**Sustratos planos de la Presente Invención**

30 Los sustratos planos adecuados para el uso en la presente invención pueden estar compuestos de cualquier material que sea capaz de proporcionar un apoyo en el que se puedan unir células pluripotentes. Por ejemplo, el sustrato plano puede estar comprendido de policarbonato. Alternativamente, el sustrato plano puede estar comprendido de tereftalato de polietileno (PETE). Alternativamente, el sustrato plano puede estar comprendido de nylon. Alternativamente, el sustrato plano puede estar comprendido de acetato de celulosa. Alternativamente, el sustrato plano puede estar comprendido de un éster de celulosa mixto. Ejemplos de sustratos planos adecuados para el uso de la presente invención pueden encontrarse en la Tabla 1.

40 La presente invención se refiere a métodos para la unión, cultivo y diferenciación de células madre pluripotentes a un sustrato plano que contiene hasta alrededor del 12% de N, de al menos alrededor del 12% de O a al menos alrededor del 55% de O, un ángulo de contacto de alrededor de 18 grados a alrededor de 32 grados, y que carece de una capa adsorbida y una capa de células de alimentación. El sustrato plano que contiene de al menos alrededor del 8% de N a al menos alrededor del 12% de N, y de al menos alrededor del 12% de O a al menos alrededor de 55% de O puede ser una superficie fibrosa rugosa o, alternativamente, una superficie lisa.

45 En una realización, la presente invención proporciona un método para unir células madre pluripotentes a un sustrato plano que contiene hasta alrededor del 12% de N, de al menos alrededor del 12% de O a al menos alrededor del 55% de O, un ángulo de contacto de alrededor de 18 grados a alrededor de 32 grados, y que carece de una capa adsorbida y una capa de células de alimentación, que comprende los pasos de:

- 50 a. Obtener una suspensión de células madre pluripotentes, y
- b. Añadir la suspensión celular al sustrato plano y permitir que se unan las células.

55 En una realización, las células madre pluripotentes se mantienen en el cultivo después de que las células se unan a la superficie. En una realización, las células madre pluripotentes se diferencian en el sustrato plano después de que las células se unan a la superficie.

60 En una realización, la unión de las células madre pluripotentes a un sustrato plano que contiene hasta alrededor del 12% de N, de al menos alrededor del 12% de O a al menos alrededor del 55% de O, un ángulo de contacto de alrededor de 18 grados a alrededor de 32 grados, y que carece de una capa adsorbida y una capa de células de alimentación se potencia tratando las células con un compuesto capaz de inhibir la actividad de la Rho quinasa. El compuesto capaz de inhibir la Rho quinasa puede eliminarse de las células después de que se hayan unido.

65 El compuesto capaz de inhibir la Rho quinasa se selecciona del grupo consistente de: Y-27632, Fasudil, H-1152 e Hidroxifasudil.

En una realización, el compuesto capaz de inhibir la actividad de la Rho quinasa puede usarse en una concentración de alrededor de 0,1  $\mu\text{M}$  a alrededor de 100  $\mu\text{M}$ . En una realización, el al menos un compuesto capaz de inhibir la actividad de la Rho quinasa se usa a una concentración de alrededor de 10  $\mu\text{M}$ .

5

*Caracterización de los Sustratos Planos de la Presente Invención.*

En una realización, la composición elemental de la superficie de los sustratos plano de la presente invención puede analizarse por Espectroscopia de Fotoelectrones por Rayos X (XPS). La XPS, también conocida como Espectroscopia de Electrones para Análisis Químico (ESCA), se usa como un método para determinar qué elementos o átomos están presentes en la superficie de un sustrato sólido (se pueden detectar todos los elementos en concentraciones mayores de 0,1 por ciento atómico, excepto hidrógeno y helio), y para determinar el ambiente de enlace de dichos elementos o átomos.

10

En una realización, la rugosidad de la superficie de los sustratos planos de la presente invención puede analizarse por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). Los átomos o moléculas de la superficie con resolución lateral menor de 1  $\text{\AA}$  y una resolución lateral menor de 0,1  $\text{\AA}$  pueden formarse en imágenes por AFM.

15

En una realización, la humectabilidad de la superficie de los sustratos planos de la presente invención puede analizarse midiendo el ángulo de contacto. Por ejemplo, la medición del ángulo de contacto por el método de la gota sésil estática proporciona información de la interacción entra la superficie de un sustrato sólido y un líquido. El ángulo de contacto describe la forma de una gota líquida que reposa en la superficie del sustrato sólido, y es el ángulo de contacto del líquido sobre la superficie del sustrato sólido, medido dentro del líquido en la línea de contacto donde se encuentran el líquido, sólido y gas. Una superficie con un ángulo de contacto del agua mayor de 90° se denomina hidrófoba, y una superficie con un ángulo de contacto del agua menor de 90° se denomina hidrófila. En superficies extremadamente hidrófilas, es decir, superficies que tienen una alta afinidad para el agua, una gotita de agua se esparce completamente (un ángulo de contacto efectivo de 0°).

20

25

En una realización, la densidad de carga negativa de la superficie de los sustratos plano de la presente invención puede analizarse midiendo la reactividad de la superficie con cristal violeta. El cristal violeta lleva una carga positiva, que le permite enlazarse con moléculas y partes de moléculas cargadas negativamente, por ejemplo grupos funcionales cargados negativamente en una superficie de polímero. Una superficie con una reactividad de cristal violeta alta tiene una densidad más alta de cargas negativas que una superficie con una reactividad de cristal violeta baja, dado que las superficies tienen la misma rugosidad y por lo tanto área.

30

35

### **Células Madre Pluripotentes**

*Caracterización de Células Madre Pluripotentes*

Las células madre pluripotentes pueden expresar uno o más de los antígenos embrionarios específicos de la etapa (SSEA) 3 y 4, y marcadores detectables usando anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81 (Thomson et al., Science 282:1145, 1998). La diferenciación de células madre pluripotentes in vitro resulta en la pérdida de la expresión de SSEA-4, Tra- 1-60, y Tra-1-81 y la expresión aumentada de SSEA-1. Las células madre pluripotentes no diferenciadas tienen típicamente actividad de fosfatasa alcalina, que puede detectarse fijando las células con un 4% de formaldehído y después desarrollándolas con Vector Red como un sustrato, como se describe por el fabricante (Vector Laboratories, Burlingame Calif.). Las células madre pluripotentes no diferenciadas también expresan típicamente OCT-4 y TERT como se detectan por RT-PCR.

40

45

Otro fenotipo deseable de células madre pluripotentes propagadas es un potencial para diferenciarse en células de las tres capas germinales: tejidos endodermo, mesodermo y ectodermo. La pluripotencia de las células madre puede confirmarse, por ejemplo, inyectando las células en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID), fijando los teratomas que forman usando un 4% de formaldehído, y después examinándolos histológicamente para evidencia de los tipos celulares de las tres capas germinales. Alternativamente, la pluripotencia puede determinarse por la creación de cuerpos embrioides y evaluando los cuerpos embrioides para la presencia de marcadores asociados con las tres capas germinales.

50

55

Las líneas de células madre pluripotentes propagadas pueden cariotiparse usando una técnica de bandedo G estándar y compararse con cariotipos publicados de las especies de primates correspondientes. es deseable obtener células que tengan un "cariotipo normal", lo que significa que las células son euploides, en donde están presentes todos los cromosomas humanos y no están alterados notablemente.

60

*Fuentes de Células Madre Pluripotentes*

Los tipos de células madre pluripotentes incluyen líneas establecidas de células pluripotentes derivadas de tejido formado después de la gestación, incluyendo tejido pre-embriionario (como por ejemplo un blastocito), tejido

65

embrionario, o tejido fetal tomado en cualquier momento de la gestación, típicamente pero no necesariamente antes de aproximadamente de 10 a 12 semanas de gestación. Ejemplos no limitativos son líneas establecidas de células madre embrionarias humanas o células germinales embrionarias humanas. También se contempla el uso de las composiciones de esta divulgación durante el establecimiento o estabilización inicial de tales células, en cuyo caso las células de la fuente serán células pluripotentes primarias tomadas directamente de los tejido de la fuente. También son adecuadas las células tomadas de una población de células madre pluripotentes ya cultivada en ausencia de células de alimentación. También son adecuadas líneas de células madre embrionarias humanas mutantes. También son adecuadas células madre pluripotentes derivadas de células no pluripotentes como, por ejemplo, una célula somática adulta.

#### *Cultivo de Células Madre Pluripotentes*

En una realización, las células madre pluripotentes se cultivan sobre una capa de células de alimentación o proteína de la matriz extracelular que apoya las células madre pluripotentes de varias maneras, antes de cultivar de acuerdo con los métodos de la presente invención. Por ejemplo, las células madre pluripotentes se cultivan en una capa de células de alimentación que apoya la proliferación de células madre pluripotentes sin experimentar diferenciación sustancial. El crecimiento de células madre pluripotentes en una capa de células de alimentación sin diferenciación se apoya usando (i) Obtención de un recipiente de cultivo que contiene una capa de células de alimentación; y (ii) un medio acondicionado cultivando anteriormente con otro tipo de células, o un medio no acondicionado, por ejemplo, libre de suero o incluso químicamente definido.

En otro ejemplo, las células madre pluripotentes se cultivan en un sistema de cultivo que está esencialmente libre de células de alimentación, pero no obstante apoya la proliferación de células madre pluripotentes sin experimentar diferenciación sustancial. El crecimiento de células madre pluripotentes en cultivo libre de células de alimentación sin diferenciación se apoya usando (i) una capa adsorbida sobre una superficie de sustrato sólido con una o más proteínas de la matriz extracelular; y (ii) un medio acondicionado cultivando previamente con otro tipo de célula, o un medio no acondicionado, por ejemplo, libre de suero o incluso químicamente definido.

En una realización alternativa, las células madre pluripotentes se cultivan en una superficie plana que comprende un éster de celulosa mixto en un medio acondicionado cultivando previamente con otro tipo de célula, o un medio no acondicionado, por ejemplo, libre de suero o incluso químicamente definido.

*Medio de cultivo:* Un ejemplo de medio de cultivo celular adeudado para su uso en la presente invención se puede encontrar en la US20020072117. Otro ejemplo de medio de cultivo celular adeudado para su uso en la presente invención se puede encontrar en la US664208. Otro ejemplo de medio de cultivo celular adeudado para su uso en la presente invención se puede encontrar en la WO2005014799. Otro ejemplo de medio de cultivo celular adeudado para su uso en la presente invención se puede encontrar en Xu et al (Stem Cells 22: 972-980, 2004). Otro ejemplo de medio de cultivo celular adeudado para su uso en la presente invención se puede encontrar en la US20070010011. Otro ejemplo de medio de cultivo celular adeudado para su uso en la presente invención se puede encontrar en Cheon et al. (BioReprod DOI:10.1095/biolreprod.105.046870; 19 Oct 2005). Otro ejemplo de medio de cultivo celular adeudado para su uso en la presente invención se puede encontrar en Levenstein et al. (Stem Cells 24: 568-574, 2006). Otro ejemplo de medio de cultivo celular adeudado para su uso en la presente invención se puede encontrar en la US20050148070. Otro ejemplo de medio de cultivo celular adeudado para su uso en la presente invención se puede encontrar en la US20050233446. Otro ejemplo de medio de cultivo celular adeudado para su uso en la presente invención se puede encontrar en la US6800480. Otro ejemplo de medio de cultivo celular adeudado para su uso en la presente invención se puede encontrar en la US20050244962. Otro ejemplo de medio de cultivo celular adeudado para su uso en la presente invención se puede encontrar en la WO2005065354. Otro ejemplo de medio de cultivo celular adeudado para su uso en la presente invención se puede encontrar en la WO2005086845.

Los medios de cultivo adecuados también pueden hacerse de los siguientes componentes, como por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Gibco # 11965-092; medio de Eagle modificado por Dulbecco con Knockout (KO DMEM), Gibco # 10829-018; medio basal DMEM de Ham F12/50%; 200 mM de L-glutamina, Gibco # 15039-027; solución de aminoácidos no esencial, Gibco 11140-050;  $\beta$ -mercaptoetanol, Sigma # M7522; factor de crecimiento de fibroblastos básico recombinante humano (bFGF), Gibco # 13256-029.

#### *Diferenciación de Células Madre Pluripotentes*

En una realización de la presente invención, las células madre pluripotentes se propagan en cultivo, mientras mantienen se pluripotencia. Los cambios en la pluripotencia de las células con el tiempo pueden determinarse detectando cambios en los niveles de expresión de los marcadores asociados con la pluripotencia. Alternativamente, los cambios en la pluripotencia pueden monitorizarse detectando cambios en los niveles de expresión de marcadores asociados con la diferenciación o marcadores asociados con otro tipo de célula.

- 5 En una realización alternativa, las células madre pluripotentes se propagan en el cultivo y después se tratan de una manera que promueve su diferenciación en otro tipo de célula. El otro tipo de célula puede ser una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodermo definitivo. Alternativamente, el tipo de célula puede ser una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodermo pancreático. Alternativamente, el tipo de célula puede ser una célula que expresa marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. Alternativamente, el tipo de célula puede ser una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células  $\beta$ .
- 10 Las células madre pluripotentes tratadas de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden diferenciarse en una variedad de otros tipos de células por cualquier medio adecuado en la técnica.
- 15 Por ejemplo, las células madre pluripotentes tratadas de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden diferenciarse en células neurales, células cardíacas, hepatocitos y similares.
- 20 Por ejemplo, las células madre pluripotentes tratadas de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden diferenciarse en progenitores neurales y cardiomiocitos de acuerdo con los métodos descritos en la WO2007030870.
- 25 En otro ejemplo, las células madre pluripotentes tratadas de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden diferenciarse en hepatocitos de acuerdo con los métodos descritos en la patente US 6.458.589.
- 30 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodermo definitivo de acuerdo con los métodos descritos en D'Amour et al., Nature Biotechnol. 23:1534-1541, 2005.
- 35 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodermo definitivo de acuerdo con los métodos descritos en Shinozaki et al., Development 131:1651-1662, 2004.
- 40 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodermo definitivo de acuerdo con los métodos descritos en McLean et al., Stem Cells 25:29-38, 2007.
- 45 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodermo definitivo de acuerdo con los métodos descritos en D'Amour et al., Nature Biotechnol. 24:1392-1401, 2006.
- 50 Los marcadores característicos del linaje endodermo definitivo se seleccionan del grupo consistente de SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox tipo Mix, FGF4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 y OTX2. Para su uso en la presente invención es adecuada una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endodermo definitivo. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodermo definitivo es una célula precursora de línea primitiva. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodermo definitivo es una célula del mesendodermo. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodermo definitivo es una célula del endodermo definitivo.
- 55 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodermo pancreático de acuerdo con los métodos descritos en D'Amour et al., Nature Biotechnol. 24:1392-1401, 2006.
- 60 Los marcadores característicos del linaje endodermo pancreático se selecciona del grupo consistente de PDX1, HNF1 beta, PTF1 alfa, HNF6, HB9 y PROX1. Para su uso en la presente invención es adecuada una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endodermo pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodermo pancreático es una célula del endodermo pancreático.
- 65 Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático por cualquier método de la técnica.
- Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodermo endocrino de acuerdo con los métodos descritos en D'Amour et al., Nature Biotechnol. 24:1392-1401, 2006.
- Los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo consistente de

NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4 y PTF-1 alfa. En una realización una célula endocrina pancreática es capaz de expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático. Para su uso en la presente invención es adecuada una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endocrino pancreático es una célula del endocrino pancreático. La célula del endocrino pancreático puede ser una célula que expresa hormonas pancreáticas. Alternativamente, la célula del endocrino pancreático puede ser una célula que secreta hormonas pancreáticas.

En un aspecto de la presente invención, la célula del endocrino pancreático es una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células  $\beta$ . Una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células  $\beta$  expresa PDX1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN3, NKX2.2, NKX6.1, NEUROD, ISL1, HNF3 beta, MAFA, PAX4 y PAX6. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células  $\beta$  es una célula  $\beta$ .

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero no se limita, con los siguientes ejemplos.

## EJEMPLOS

### Ejemplo de Referencia 1: Unión de Células Madre Embrionarias Humanas con los Sustratos Planos de la Presente Invención

El inhibidor de la Rho quinasa Y26732 ha demostrado que potencia la unión de células madre embrionarias humanas en placas modificadas de superficie (ver Solicitud de Patente U.S. Nº 61/030.544). El propósito de los estudios de la presente invención era determinar la capacidad de las células madre embrionarias humanas de unirse a otras superficies planas. Las superficies planas probadas en la presente invención se muestran en la Tabla 1.

Antes de probarlas, las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 se expandieron en placas de cultivo de tejido recubiertas con una dilución 1:30 de factor de crecimiento-MATRIGEL® reducido. Las células se sembraron en placas de cultivo de 100 mm en 10 ml de medio acondicionado con MEF suplementado con 20 ng/ml de bFGF (MEF-CM/bFGF). Las células se cultivaron a 37° C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada día con MEF-CM/bFGF fresco. Una vez que las células alcanzaron aproximadamente un 80% de confluencia, las células se pasaron por tratamiento con 1 mg/ml de LIBERASE durante 5 minutos a 37° C. La digestión se paró retirando el enzima de la placa y enjuagando las células con MEF-CM-bFGF. Las células se recolectaron por raspado manual en 10 ml de MEF-CM/bFGF y se transfirieron a un tubo cónico de 50 ml. Las células se centrifugaron a 200x g (1000 rpm) en una centrifuga de mesa para formar un pellet. Después de que se retirase el sobrenadante, las células se resuspendieron en 40 ml de MEF-CM/bFGF y se distribuyeron equitativamente en cuatro placas de cultivo de 100 mm recubiertas con una dilución 1:30 de factor de crecimiento-MATRIGEL® reducido.

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 se sembraron en varios sustratos planos expuestos en la Tabla 1, a una densidad de 100.000 células/cm<sup>2</sup>. Los sustratos planos carecían de una capa adsorbida y una capa de células de alimentación de fibroblastos. Las células se cultivaron en MEF-CM/bFGF como se ha descrito anteriormente. Se determinó el efecto del inhibidor de la Rho quinasa H-1152 en la unión de las células con los sustratos planos. Se añadieron 3  $\mu$ M de H-1152 al medio usado para sembrar las células. Se permitió que las células se uniesen durante 24 horas. Después de este tiempo, las células se fijaron con un 4% de paraformaldehído durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se tiñeron con un 1% de hematoxilina, y se determinó el número de células por microscopía de luz. Los pocillos que contenían vehículo se incluyeron como un control.

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 se unieron a las membranas siguientes de una manera independiente del inhibidor de la Rho quinasa: membrana de éster de celulosa mixta (membrana Nº 2, Figura 1, panel a); membrana de nylon (membrana Nº 4, Figura 1, panel b) y membrana de acetato de celulosa (membrana Nº 5, Figura 1, panel c). La unión de las células con estas membranas se potencia por la adición de 3  $\mu$ M de H-1152 (ver Figura 1, paneles a-c).

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 requerían la presencia de 3  $\mu$ M de H-1152 para unirse a los siguientes sustratos planos: membrana de policarbonato (membrana Nº 7, Figura 1, panel d) y membrana de Tereftalato de polietileno (membrana Nº 12, Figura 1, panel e). LA eliminación del H-1152 del medio de cultivo llevó a la desunión de las células H1 de ambos tipos de membranas. No se observó unión a estas membranas en ausencia de H-1152.

### Ejemplo de Referencia 2: El Efecto del Tratamiento con Rho quinasa en la Unión de Células Madre Embrionarias Humanas con Sustratos Planos que Comprenden Ésteres de Celulosa Mixta (Membrana Nº 1).

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H9 se cultivaron en placas recubiertas con

MATRIGEL® antes de la manipulación experimental. Las células se sembraron en una membrana de éster de celulosa mixta (membrana N° 1) a una densidad de 150.000 células/cm<sup>2</sup> en medio condicionado con MEF. El sustrato plano carecía de una capa adsorbida y una capa de células de alimentación de fibroblastos. Se examinó el efecto del tratamiento con inhibidor de la Rho quinasa en la unión del sustrato plano. Las células se trataron con 0, 10 o 20 µM de Y26732. Después de 24 horas, las células se fijaron con un 4% de paraformaldehído, se enjuagaron con PBS, se secaron con aire, se tiñeron con colorante de cristal violeta. El número de células se determinó por microscopía de luz. Los pocillos que contenían vehículo se incluyeron como un control.

Se observó que las células se unieron con el sustrato plano en ausencia de Y26732 (Figura 2, panel a). La adición de Y26732 aumentó la unión de células con el sustrato plano a 10 y 20 µM (Figura 2, paneles b y c). La eliminación de Y26732 del medio de cultivo durante 24 horas no resultó en la desunión de las células del sustrato plano.

### **Ejemplo de Referencia 3: El Efecto del Cultivo en la Membrana de Sustrato Plano N° 1 en la Tasa de Proliferación de las Células Madre embrionarias Humanas.**

Se comparó la tasa de proliferación de las células de la línea de células madre embrionarias humanas cultivadas en placas recubiertas con MATRIGEL® y células cultivadas en la Membrana 1. Las células se sembraron a densidades iguales en ambos sustratos. Las células se liberaron de los sustratos por tratamiento TrypLE para crear una suspensión celular individual para determinar el número de células. Las muestras de las células se tomaron en los momentos indicados en la Figura 3. Se observó que las células proliferaban a tasas comparables. El tiempo de duplicación es de alrededor de 1,151 días y 1,138 días en MATRIGEL® y en la Membrana N° 1, respectivamente.

### **Ejemplo de Referencia 4: Las Células Madre Embrionarias Humanas Mantienen su Pluripotencia para Tres Pases en Sustratos Planos que Comprenden Ésteres de Celulosa Mixta (Membrana N° 1).**

Se sembraron células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en un sustrato plano que comprendía membranas de éster de celulosa mixta (membrana N° 1) a una densidad de 75.000 células/cm<sup>2</sup> en MEF-Cm que contenía 20 ng/ml de bFGF. Las células se cultivaron durante 5 ó 6 días antes de pasarlas para alcanzar aproximadamente del 75 al 90% de confluencia de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. El medio de cultivo se cambió todos los días. Después de cultivar durante 3 pases, las células se recolectaron y se determinó la expresión de los marcadores asociados con la pluripotencia por citometría de flujo. Como se muestra en la Tabla 2, más del 95% de las células mantuvieron la expresión de los marcadores de superficie celular asociados con la pluripotencia, incluyendo Tra1-60, Tra1-81, SSEA-3 y SSEA-4, indicando que las células eran todavía pluripotentes.

### **Ejemplo de Referencia 5: Las células Madre Embrionarias Humanas Mantienen un Cariotipo Estable durante Diez Pases en sustratos Planos que Comprenden Ésteres de Celulosa Mixta (Membrana N° 1).**

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 se cultivaron o en placas de cultivo recubiertas con MATRIGEL® o en membrana de ésteres de celulosa mixta durante 10 pases. Las células se cultivaron de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. El cariotipo se determinó por análisis citogenético analizando veinte células de metafase de banda G. Los cromosomas de banda G de una célula representativa cultivada en placas de cultivo recubiertas con MATRIGEL® (Figura 4, panel a) y las de otra célula cultivada en membrana de celulosa mixta (Figura 4, panel b) demuestran un cariotipo masculino normal.

El cariotipo también se determinó examinando doscientos núcleos en interfase por fluorescencia en hibridación in situ (FISH) usando una sonda 12 p y una sonda 17q de los cromosomas para identificar poblaciones muy pequeñas de células con cambios en el número de copia 12 y 17 de los cromosomas que no pueden detectarse por citogenéticas rutinarias. En células cultivadas en MATRIGEL® y en membranas de ésteres de celulosa mixta, no se detectaron células anormales con trisomía 12 y/o 17.

### **Ejemplo de Referencia 6: Las Células Madre Embrionarias Humanas Son Capaces de Diferenciarse a Células Productoras de Insulina en Sustratos Planos que Comprenden Ésteres de Celulosa Mixta (Membrana N° 1).**

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 se sembraron en un sustrato plano que comprendía ésteres de celulosa mixta (Membrana N° 1) a una densidad de 150.000 células/cm<sup>2</sup> en medio acondicionado con MEF que contenía 20 ng/ml de bFGF. Las células se diferenciaron a células productoras de insulina tratando las células de acuerdo con el protocolo de diferenciación esbozado en la Tabla 3. Las células se cultivaron en medio acondicionado con MEF que contenía 20 ng/ml de bFGF durante 3 a 4 días para alcanzar aproximadamente del 75 al 90% de confluencia. Las células se trataron en medio DMEM-F12 que contenía un 2% de Albúmina de Suero Bovino Libre de Ácidos Grasos (FAF-BSA), 100 ng/ml de activina A y 20 ng/ml de Wnt3A durante dos días, seguido por tratamiento con medio DMEM-F12, 2% de Albúmina de Suero Bovino Libre de Ácidos Grasos (FAF-BSA) y 100 ng/ml de activina A durante otros dos días. Después, las células se trataron en medio

DMEM-F12 que contenía un 2% de BSA, 20 ng/ml de FGF7 y 250 nM de Ciclopamina-KADD durante tres días, seguido por el tratamiento en medio DMEM-F12 que contenía un 1% de suplemento B27, 20 ng/ml de FGF7, 250 nM de Ciclopamina-KADD, 2  $\mu$ M de ácido retinoico (RA) y 100 ng/ml de Noggin durante 4 días. Las células se trataron en medio DMEM-F12 que contenía 1% de suplemento B27, 1  $\mu$ M de inhibidor 2 de ALK5 (Axxora N° de Cat: ALX-270-445-M001), 100 ng/ml de Noggin, 100 ng/ml de Netrin-4, 50 ng/ml de Exendin-4, y 1  $\mu$ M de DAPT durante 3 días. Las células se cultivaron en medio DMEM-F12, 1% de suplemento de B27 y 1  $\mu$ M de inhibidor 2 de ALK5 durante 7 días y en medio DMEM-F12 que contenía un 1% de suplemento de B27 durante otros 7 días.

Al final del protocolo de diferenciación, las muestras de ARN se recogieron para determinar la expresión de los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. Se observó un número de CT para la insulina de alrededor de 17. El valor de CT correspondiente para GAPDH fue de alrededor de 19; estos datos sugieren que las células expresaron altos niveles de insulina después del tratamiento.

#### **Ejemplo de Referencia 7: Las Células Madre Embrionarias Humanas se Unen con Superficies Planas que Comprenden Membranas de Policarbonato de una Manera Dependiente del Inhibidor de la Rho quinasa**

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H9 se sembraron en un sustrato plano que comprendía policarbonato (Membrana N° 7) a una densidad de 150.000 células/cm<sup>2</sup> en medio acondicionado MEF. Se examinó el efecto del tratamiento con inhibidor de la Rho quinasa en la unión: Se añadió el inhibidor de la Rho quinasa Y26732 al medio de cultivo a concentración de 0, 10 o 20  $\mu$ M. Después de 24 horas, las células en la membrana se fijaron con un 4% de formaldehído a temperatura ambiente, se enjuagaron con PBS, se secaron con aire, se tiñeron con colorante de cristal violeta. El número de células se determinó por microscopía de luz. Los pocillos que contenían vehículo se incluyeron como un control.

Las células no se unen a la membrana en las placas de control (Figura 5, panel a). La adición de Y26732 resultó en la unión de las células en las membranas (Figura 5, paneles b y c).

En un experimento separado, se determinó el efecto del inhibidor de la Rho quinasa H-1152 en la unión de las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 con la Membrana N° 7. Las células se sembraron en un sustrato plano que comprendía membranas de policarbonato (membrana N° 7) a una densidad de 150.000 células/cm<sup>2</sup> en MEF-CM que contenía 20 ng/ml de bFGF. Se añadió el inhibidor de la Rho quinasa H-1152 al medio de cultivo a una concentración de 0, 0,03, 0,1, 0,3 y 3  $\mu$ M. Después de 24 horas, las células en la membrana se fijaron con un 4% de paraformaldehído, se enjuagaron con PBS, se secaron con aire, se tiñeron con colorante de cristal violeta. El número de células se determinó por microscopía de luz. Los pocillos que contenían vehículo se incluyeron como un control.

Las células no se unen a la membrana en la placa de control (Figura 6, panel a) y en las placas con 0,03 ó 0,1  $\mu$ M de H-1152 (Figura 6, paneles b y c). Sin embargo, se observó unión en los cultivos tratados con 0,3, 1 y 3  $\mu$ M de H-1152 (Figura 6, paneles d-f).

#### **Ejemplo de Referencia 8: La Eliminación del Inhibidor de la Rho quinasa del Medio de Cultivo Resulta en la Desunión de las Células Madre Embrionarias Humanas de los Sustratos Planos que Comprende Membranas de Policarbonato.**

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 se sembraron en un sustrato plano que comprendía policarbonato (Membrana N° 9) a una densidad de 100.000 células/cm<sup>2</sup>, en medio acondicionado con MEF que contenía 20 ng/ml de bFGF y 3  $\mu$ M de inhibidor de la Rho quinasa H-1152. Las células se cultivaron durante 24 horas. Después de este tiempo, el medio de cultivo se reemplazó con medio acondicionado con MEF que contenía 20 ng/ml de bFGF, careciendo de H-1152. Después de 24 horas, las células en la membrana se fijaron con un 4% de paraformaldehído, se enjuagaron con PBS, se secaron con aire, se tiñeron con colorante de cristal violeta. El número de células se determinó por microscopía de luz. Los pocillos que contenían H-1152 se incluyeron como un control. La Eliminación del H-1152 del medio de cultivo resultó en la desunión de las células del sustrato plano (Figura 7).

#### **Ejemplo de Referencia 9: La Porosidad del Sustrato Plano Afecta a la Unión de las Células Madre Embrionarias Humanas**

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en el pase 42 se sembraron sobre los siguientes sustratos planos: Membrana N° 10 (tamaño de poro 0,4  $\mu$ m); y Membrana N° 11 (tamaño de poro 3  $\mu$ m). Las células se sembraron a una densidad de 100.000 células/cm<sup>2</sup>, en medio acondicionado con MEF que contenía 20 ng/ml de bFGF. También se examinó el efecto de la inhibición de la Rho quinasa en la unión de las células con los sustratos planos. El medio de cultivo celular se suplementó con .3  $\mu$ M de H-1152. Después de 24 horas, el medio de cultivo se reemplazó con medio acondicionado con MEF que contenía 20 ng/ml de bFGF, careciendo de H-1152. Después de otras 24 horas de cultivo, las células en la membrana se fijaron con un 4% de paraformaldehído, e enjuagaron con PBS, se secaron con aire, se tiñeron con colorante de cristal violeta. El número de células se

determinó por microscopía de luz. Los pocillos que contenían 1  $\mu\text{M}$  de H-1152 se incluyeron como un control. El número de células se determinó por microscopía de luz. Los pocillos que contenían vehículo se incluyeron como un control.

5 Se unieron un mayor número de células a la Membrana N° 10 (Figura 8, panel a) que a la Membrana N° 11 (Figura 8, panel b). La presencia de 1  $\mu\text{M}$  de H-1152 en el medio de cultivo se requiere para mantener la unión de las células H1 en las membranas (Figura 8, panel a y b). La eliminación de H-1152 del medio de cultivo resultó en la desunión de las células de la Membrana N° 10 y la Membrana N° 11 (Figura 8, panel c y d).

10 **Ejemplo de Referencia 10: Las Células Madre Embrionarias Humanas Mantienen su Pluripotencia Después de Múltiples Pases en Sustratos Planos que Comprenden Membranas de Policarbonato.**

15 Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 se sembraron en un sustrato plano que comprende membrana de policarbonato (Membrana N° 8). Las células se cultivaron en medio acondicionado con MEF que contenía 20 ng/ml de bFGF, suplementado con 3  $\mu\text{M}$  de H-1152. El medio de cultivo celular se cambió diariamente. Las células se pasaron por la eliminación del H-1152 del medio, y las células se eliminaron del sustrato plano por agitación suave. Las células se cultivaron durante 3 pases y se recogieron para citometría de flujo y análisis RT-PCT cuantitativo. Como se muestra en la Tabla 4, más del 95% de las células expresaron marcadores de superficie celulares asociados con la pluripotencia, incluyendo Tra1-60, Tra1-81, SSEA-3 y SSEA-4, como se determina por citometría de flujo. La Figura 9 muestra los resultados del RT-PCR cuantitativo, indicando múltiples genes expresados en la H1 cultivada en membranas de policarbonato durante 3 pases a niveles comparables como en las células H1 no diferenciadas.

25 En un estudio separado, las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 se sembraron en un sustrato plano que comprendía membrana de policarbonato (Membrana N° 8). Las células se cultivaron en medio acondicionado con MEF que contenía 20 ng/ml de bFGF, suplementado con 1  $\mu\text{M}$  de H-1152. El medio de cultivo celular se cambió diariamente. Las células se pasaron por la eliminación de H-1152 del medio, y las células se retiraron del sustrato plano por agitación suave. Las células se cultivaron durante 9 pases y se recolectaron por citometría de Flujo. Como se muestra en la Tabla 5, más del 95% de las células expresaron marcadores de superficie celulares asociados con la pluripotencia, incluyendo Tra1-60, Tra1-81, SSEA-3 y SSEA-4.

35 Un método alternativo para evaluar la pluripotencia es a través de la capacidad de las células para formar cuerpos embrioides. Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 se sembraron en sustratos planos que comprendían membranas de policarbonato (Membrana N° 8). Las células se cultivaron en medio acondicionado con MEF que contenía 20 ng/ml de bFGF, suplementado con 3  $\mu\text{M}$  de H-1152. El medio de cultivo celular se cambió diariamente. Las células se pasaron por la eliminación de H-1152 del medio, y las células se retiraron del sustrato plano por agitación suave. Las células se cultivaron durante 12 pases.

40 La formación de cuerpos embrioides se consiguió por el protocolo siguiente. Las células H1 se recolectaron y cultivaron en medio DMEM/F12 suplementado con un 20% de suero bovino fetal en Ultra Low Cluster Plate (Corning N° de Cat.: 3471). Las células se alimentaron en días alternos cambiando el 50% del medio. Los cuerpos embrioides se formaron después de 14 días (Figura 10).

45 **Ejemplo de Referencia 11: Las Células Madre Embrionarias Humanas son Capaces de Formar Endodermo Definitivo después de Cultivarse en Sustratos Planos que Comprenden Membranas de Policarbonato.**

50 Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 se sembraron en un sustrato plano que comprendía policarbonato (Membrana N° 8). Las células se cultivaron inicialmente en medio acondicionado con MEF que contenía 20 ng/ml de bFGF, suplementado con 3  $\mu\text{M}$  de H-1152. Las células se cultivaron después en medio acondicionado con MEF que contenía 20 ng/ml de bFGF, suplementado con 1  $\mu\text{M}$  de H-1152 durante 10 pases antes de la manipulación experimental.

55 Las células se sembraron después en placas de cultivo de tejido de 100 mm, recubiertas con una dilución 1:30 de MATRIGEL®. Las células se cultivaron en medio acondicionado con MEF que contenía 20 ng/ml de bFGF durante 3 días. Después, las células se trataron en DMEM/F12, suplementado con un 2% de Albúmina de Suero Bovino libre de ácidos grasos, 100 ng/ml de activina A y 20 ng/ml de Wnt3a durante dos días y después se trataron con DMEM/F12, suplementado con un 2% de Albúmina de Suero Bovino libre de ácidos grasos y 100 ng/ml de activina A durante otros dos días. Después de este tiempo, las células se liberaron por tratamiento TRYPLE para formar una única suspensión celular y se determinó la expresión de los marcadores característicos del linaje endodermo característico por citometría de flujo.

60 Más del 90% de las células son CD99 y CXCR4 (CD184) doble positivo y el 12% de las células son CD9 positivo CXCR4 negativo, como se muestra en la Tabla 6. Estos datos sugieren que las células retienen la capacidad de diferenciarse en endodermo definitivo.

65

**Ejemplo 12: Propiedades Físicas de los Sustratos Planos de la Presente Invención**

Se determinó la química de superficie en los sustratos planos de la presente invención. Las Tablas 7-10 representan el análisis por Espectroscopia de Fotoelectrones de rayos X (XPS) y el ángulo de contacto. Para la XPS, se usó una profundidad de análisis de aproximadamente 50-100 Å. Típicamente, el 95% de la señal se origina desde dentro de esta profundidad.

Las membranas 1-3 contenían concentraciones similares de oxígeno, carbono (principalmente como C-O y C-(C,H), probablemente O-C-O), y nitrógeno (como NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub> y posiblemente C-N, y R<sub>4</sub>-N<sup>+</sup>). La membrana 3 también contenía concentraciones de traza de Na<sup>+</sup> y SO<sub>x</sub> y una concentración más alta de C-(C,H). La membrana 4 contenía C-(C,H), C-(O,N), y (O,N)-C=O y posiblemente una traza de sodio. La membrana 5 contenía principalmente C-O y también C-(C,H) y O-C-O y/o O-C=O. También se detectaron concentraciones de traza de Na<sup>+</sup> y SO<sub>x</sub>. Las membranas 6-11 contenían C-(C,H), C-O, O-C=O, C-N, CO<sub>3</sub>, p-p\*, y concentraciones de traza de R<sub>4</sub>-N<sup>+</sup>, SO<sub>x</sub>, y o Na<sup>+</sup> o Cr<sup>3+</sup>. La superficie de la membrana 6 puede también contener una concentración de traza de cloro. Las concentraciones de traza de cromo se detectaron sólo en las membranas 10 y 11, mientras que el Na<sup>+</sup> se detectó en las membranas 6-9. La superficie de la membrana 12 contenía C-(C,H), C-O, O-C=O, y pi-pi+ consistente con PET. También se detectaron concentraciones de traza de nitrógeno y sodio.

La Figura 11 muestra las micrografías electrónicas de barrido de los sustratos planos de la presente invención. Se observaron dos tipos de morfologías. Uno tipo estaba caracterizado por una red abierta de fibras. El segundo tipo estaba caracterizado por una lámina lisa con orificios circulares dispersados a través de la superficie.

La Tabla 10 muestra las mediciones del ángulo de contacto de las superficies de la presente invención. Las superficies 1 a 5 tenían mediciones del ángulo de contacto de alrededor de 18° a alrededor de 32°. Las células madre pluripotentes no requerían la presencia de un inhibidor de la actividad de la Rho quinasa para unirse a las superficies 1-5.

Las superficies 6 a 12 tenían mediciones del ángulo de contacto mayores de 32°. Las células madre pluripotentes requerían de la presencia de un inhibidor de la Rho quinasa para unirse a estas superficies.

**Ejemplo 13: Unión de Células Madre Pluripotentes a un Sustrato Plano que consiste de una Poliamina.**

El sustrato plano consistente de poliamina se fabricó de acuerdo con los métodos descritos en la US6743273 y Schindler M et al, Biomaterials 26(28): 5624-5631; 2005. El sustrato plano está disponible comercialmente, vendido bajo la marca ULTRAWEB™. las superficies sintéticas ULTRAWEB™ están compuestas de nanofibras de poliamida electrohiladas orientadas aleatoriamente con un diámetro de fibra medio de 280 nm. La distribución del tamaño de fibra está entre 200 y 400 nm. La primera ULTRAWEB™ probada tenía una superficie ligeramente hidrófila (catálogo #3870XX1) mientras que la segunda superficie, superficie (catálogo #3871XX!) era ligeramente hidrófila y estaba recubierta con un material de poliamina que proporcionaba las nanofibras con un grupo de amina libre para una carga positiva neta. Ambas superficies son altamente efectivas en la absorción de proteínas a través de interacciones hidrófobas. En la Figura 12 se muestran micrografías electrónicas de barrido de 5 micras de resolución y de ampliación 10.000X. Sin embargo, las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 fueron incapaces de unirse a cualquiera de las superficies ULTRAWEB™ probadas.

**Ejemplo de Referencia 14: El Efecto del uso del Medio Definido en la Unión de Células Madre Pluripotentes con los Sustratos Planos de la Presente Invención.**

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 se sembraron en los siguientes sustratos planos: Membrana 1 (éster de celulosa mixta), Membrana 4 (nylon), Membrana 5 (acetato de celulosa) y nitrocelulosa. Las células se sembraron a una dilución 1:3 en el medio definido mTESR™ y se cultivaron durante 24 horas. Los cultivos paralelos en medio acondicionado con MEF se incluyeron como controles. El cultivo de las células en mTESR™ no afectó a la capacidad de las células de unirse con las superficies planas. Las células fueron capaces de unirse a las membranas 1, 4 y 5, y nitrocelulosa. La membrana que mostró el mayor enlace de células usando mTESR™ fue la membrana 4, seguida por la Membrana , que fue igual que la de nitrocelulosa, seguida por la Membrana 1.

Tabla 1: Caracterización de membranas adecuadas para el uso en la presente invención.

Membrana	Vendedor	Número de Catálogo	Composición química	Hidrofobicidad	Porosidad	Superficie	Capacidad de enlace a BSA	Unión de Células hES
1	Millipore	PIHA03050	Ésteres de celulosa mixta	Hidrófila	0.45 micrómetros	Áspera, fibrosa	Mayor de 160 microgramos por centímetro cuadrado	Independiente de Rho quinasa
2	Pall	66276	Ésteres de celulosa mixta	Hidrófila	0.8 micrómetros	Áspera, fibrosa		Independiente de Rho quinasa
3	Steriltech	MCE4525100	Ésteres de celulosa mixta	Hidrófila	0.45 micrómetros	Áspera, fibrosa	Aproximadamente 160 microgramos por centímetro cuadrado	Independiente de Rho quinasa
4	Steriltech	NY4525100	Nylon	Hidrófila	0.45 micrómetros	Áspera, fibrosa	Mayor de 120 microgramos por centímetro cuadrado	Independiente de Rho quinasa
5	Steriltech	CA0225100	Cellulose Acetate	Hidrófila	0.2 micrómetros	Áspera, fibrosa	3.8 microgramos por centímetro cuadrado	Independiente de Rho quinasa
6	Steriltech	PCT0425100	Policarbonato	Hidrófila	0.4 micrómetros	Lisa, delgada, tipo cristal	Menor de 5 microgramos por centímetro cuadrado	Dependiente de Rho quinasa
7	Millipore	PIHP03050	Policarbonato	Hidrófila	0.4 micrómetros	Lisa, delgada, tipo cristal	Menor de 5 microgramos por centímetro cuadrado	Dependiente de Rho quinasa
8	Millipore	ATTP04700	Policarbonato	Hidrófila	0.8 micrómetros	Lisa, delgada, tipo cristal	Menor de 5 microgramos por centímetro cuadrado	Dependiente de Rho quinasa
9	Coming	3420	Policarbonato	Hidrófila	3 micrómetros	Lisa, delgada, tipo cristal	Menor de 5 microgramos por centímetro cuadrado	Dependiente de Rho quinasa
10	Nunc	137060	Policarbonato	Hidrófila	0.4 micrómetros	Lisa, delgada, tipo cristal	Menor de 5 microgramos por centímetro cuadrado	Dependiente de Rho quinasa
11	Nunc	137435	Policarbonato	Hidrófila	3 micrómetros	Lisa, delgada, tipo cristal	Menor de 5 microgramos por centímetro cuadrado	Dependiente de Rho quinasa
12	Millipore	PISP30R48	Tereftalato de polietileno	Hidrófila	3 micrómetros	Lisa, delgada, tipo cristal	Menor de 5 microgramos por centímetro cuadrado	Dependiente de Rho quinasa

**Tabla 2: Expresión de los marcadores de superficie celular asociados con la pluripotencia de la línea de células madre embrionarias humanas H1 después de propagarse en membranas de ésteres de celulosa mixta durante 3 pases, como se determina por citometría de flujo**

	Marcadores de Superficie	Porcentaje de células positivas
5	Tra1-60	98.4%
	Tra1-81	98.8%
10	SSEA-3	97.5%
	SSEA-4	98.1%

**Tabla 3: Protocolo para tratar células madre embrionarias humanas para inducir la diferenciación en células productoras de insulina**

Tiempo	Tratamiento
20	2 días
	Medio DMEM-F 12 2% Albúmina de Suero Bovino Libre de Ácidos Grasos (FAF-BSA) 100 nanogramos por mililitro ActivinA 20 nanogramos por mililitro Wnt3A
25	2 días
	Medio DMEM-F 12 2% Albúmina de Suero Bovino Libre de Ácidos Grasos (FAF-BSA) 100 nanogramos por mililitro ActivinA
30	3 días
	Medio DMEM-F 12 2% BSA 20 nanogramos por mililitro FGF7 250 nanomoles Cyclopamine-KAAD
35	4 días
	Medio DMEM-F 12 1% de suplemento de B27 20 nanogramos por mililitro FGF7 250 nanomoles Cyclopamine-KAAD 2 micromoles Retinal Acid (RA) 100 nanogramos por mililitro Noggin
45	3 días
	Medio DMEM-F 12 1% de suplemento de B27 1 micromoles ALK5 inhibitor 2 100 nanogramos por mililitro Noggin 100 nanogramos por mililitro Netrin-4 50 nanogramos por mililitro Exendin-4 1 micromoles DAPT
50	7 días
	Medio DMEM-F 12 1% de suplemento de B27 1 micromoles inhibidor 2 de ALK5
55	7 días
	Medio DMEM-F 12 1% de suplemento de B27

**Tabla 4: Expresión de marcadores de superficie asociados con la pluripotencia en la línea de células madre embrionarias humanas H1 después de cultivarse en membranas de policarbonato durante 3 pases, como se determina por citometría de flujo.**

Marcadores de superficie	Porcentaje de células positivas
Tra1-60	97.0%
Tra1-81	96.0%
SSEA-3	97.6%
SSEA-4	97.2%

**Tabla 5: Expresión de marcadores de superficie asociados con la pluripotencia en la línea de células madre embrionarias humanas H1 después de propagarse en membranas de policarbonato durante 9 pases, como se determina por citometría de flujo.**

Marcadores de superficie	Porcentaje de células positivas
Tra1-60	96.8%
Tra1-81	96.9%
SSEA-3	95.0%
SSEA-4	99.7%

**Tabla 6: Expresión de marcadores de superficie asociados con el endodermo definitivo en la línea de células madre embrionarias humanas H1. Las células se propagaron en membranas de policarbonato durante 10 pases y se trataron para la diferenciación del endodermo definitivo.**

	células CD9 negativas	células CD9 positivas	células CD99 negativas	células CD99 positivas
células CXCR4 positivas	69.4%	7.6%	0.9%	76.8%
células CXCR4 negativas	12.0%	11.0%	5.1%	17.1%

**Tabla 7: Química de superficie (concentración atómica en %)**

Muestra	C	N	O	Na	S	Cr
1	39.3	8.8	51.9	-	-	-
2	38.2	9.6	52.1	-	-	-
3	41.3	8.5	49.1	0.7	0.5	-
4	75.9	11.9	12.2	?	-	-
5	59.5	-	40.3	0.2	0.1	-
6*	82.0	3.5	14.2	0.2	0.1	-
7	79.1	0.8	19.6	0.3	0.2	-
8	82.2	3.1	14.3	0.2	0.2	-
9	77.2	1.1	21.5	0.1	0.1	-
10	76.2	2.9	20.0	-	0.6	0.3
11	80.4	0.6	18.5	-	0.2	0.3
12	70.2	0.2	29.5	0.1?	-	-

Tabla 8: Concentraciones (en %) de Grupos Funcionales de Carbono

Muestra	C-(C,H)		C-(O,N)		O-C-O / O-C=O		CO <sub>3</sub>		pi-pi*	
	B.E.	Átomos%	B.E.	Átomos%	B.E.	Átomos%	B.E.	Átomos%	B.E.	Átomos%
1	284.8	2.3	287.0	29.7	288.4	7.3	-	-	-	-
2	284.8	1.7	287.1	30.0	288.5	6.5	-	-	-	-
3	284.8	7.6	287.0	27.1	288.4	6.6	-	-	-	-
4	284.8	51.8	285.9	12.9	287.7	11.2	-	-	-	-
5	284.8	14.9	286.3	28.8	288.5	15.8	-	-	-	-
6	284.8	55.5	286.1	18.2	287.6	2.8	290.9	4.2	292.4	1.3
7	284.8	56.5	286.4	13.6	288.3	1.4	290.4	2.8	291.3	4.7
8	284.8	55.8	286.1	17.4	287.5	2.8	290.8	4.1	292.1	2.1
9	284.8	54.1	286.4	13.0	288.5	2.1	290.4	3.1	291.2	4.9
10	284.8	52.5	286.3	13.6	288.6	3.4	290.6	4.2	291.9	2.6
11	284.8	60.8	286.4	11.7	288.6	0.2 <sup>?</sup>	290.7	4.8	292.0	2.8
12	284.8	39.2	286.4	15.5	288.8	13.2	290.5	0.5 <sup>?</sup>	291.6	1.9

Tabla 9: Concentraciones (en %) de Grupos Funcionales de Nitrógeno

Muestra	C-N		R <sub>4</sub> -N <sup>+</sup>		NO <sub>2</sub>		NO <sub>3</sub>	
	B.E.	Átomos%	B.E.	Átomos%	B.E.	Átomos%	B.E.	Átomos%
1	400.0	0.1 <sup>?</sup>	401.6	0.1 <sup>?</sup>	404.5	0.5	407.5	8.1
2	-	-	-	-	404.6	0.4	407.5	9.2
3	400.0	0.1 <sup>?</sup>	401.7	0.1 <sup>?</sup>	404.4	0.4	407.4	7.8
4	400.0	11.9	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	400.0	3.5	-	-	-	-	-	-
7	400.0	0.4	401.7	0.3	406.1	0.1 <sup>?</sup>	-	-
8	400.0	2.9	401.8	0.1 <sup>?</sup>	-	-	408.3	0.1 <sup>?</sup>
9	400.0	0.6	401.7	0.4	405.8	0.1 <sup>?</sup>	-	-
10	400.0	2.1	401.5	0.8	-	-	-	-
11	400.0	0.2 <sup>?</sup>	401.8	0.4	-	-	-	-
12	400.0	0.1 <sup>?</sup>	401.7	0.1 <sup>?</sup>	-	-	-	-

**Tabla 10: Mediciones del ángulo de contacto de las placas de la presente invención**

	Lectura del Angulo de Contacto Agua (°)				Lectura del Angulo de Contacto (°)				Comentarios	
	Número de muestra	1	2	3	Media	1	2	3		Media
5	1	110.9	-	-	110.9	18.32	-	-	18.32	
10	2	55.4	59.96	60.44	58.6	28.13	-	-	28.13	
	3	25.54	19.79	-	22.67	29.76	25.53	-	27.65	
	4	29.36	31.24	32.89	31.16	31.09	25.88	-	28.49	
15	5	-	-	-	-	-	-	-	-	No se puede medir
	6	90.42	-	-	-	32.07	-	-	32.07	
	7	63.59	-	-	-	49.49	-	-	49.49	
20	8 brillo	58.8	-	-	58.8	41.29	-	-	41.29	La muestra tenía apariencia brillante
	8 mate	72.69	-	-	72.69	43.3	-	-	43.3	La muestra tenía apariencia mate
25	9	71.89	-	-	71.89	33.82	-	-	33.82	
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	No se puede medir
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	No se puede medir
30	12	76.96	65.187	-	71.07	46.31	-	-	46.31	-

Aunque se han ilustrado los varios aspectos de la invención anteriores en referencia a los ejemplos y realizaciones preferidas, se apreciará que el alcance de la invención se define no sólo por la descripción anterior si no por las siguientes reivindicaciones interpretadas apropiadamente bajo los principios de la ley de patentes.

40

45

50

55

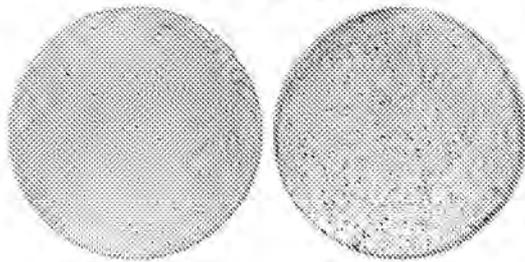
60

65

**Reivindicaciones**

- 5      **1.** Un método para unir células madre pluripotentes a un sustrato plano que contiene hasta alrededor del 12% de N, de al menos alrededor del 12% de O a al menos alrededor del 55% de O, un ángulo de contacto de alrededor de 18 grados a alrededor de 32 grados, y que carece de una capa adsorbida y una capa de células de alimentación, que comprende los pasos de:
- 10            a. usar una suspensión obtenida de células madre pluripotentes, y  
              b. añadir la suspensión de células al sustrato plano y permitir que las células se unan.
- 15      **2.** El método de la reivindicación 1, en el que las células se mantienen en el cultivo después de que se han unido al sustrato.
- 20      **3.** El método de la reivindicación 1, en el que las células se diferencian después de que se han unido al sustrato.
- 25      **4.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la unión de las células madre pluripotentes al sustrato se potencia tratando la suspensión de células con un compuesto capaz de inhibir la actividad de la Rho quinasa.
- 30      **5.** El método de la reivindicación 4, en el que el compuesto capaz de inhibir la actividad de la Rho quinasa se elimina después de que las células madre pluripotentes se unan al sustrato.
- 35      **6.** El método de la reivindicación 4 ó 5, en el que el compuesto capaz de inhibir la actividad de la Rho quinasa se selecciona del grupo consistente de: Y-27632, Fasudil, H-1152 e Hidroxifasudil.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

**FIG. 1A**

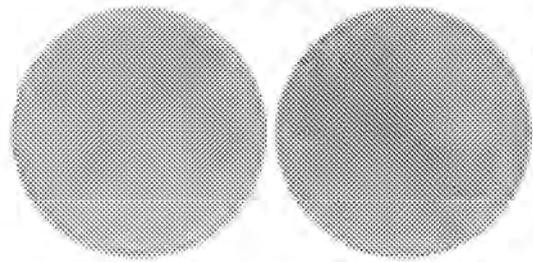


Control

3 micromoles  
H-1152

Esteres de celulosa mixta

**FIG. 1D**

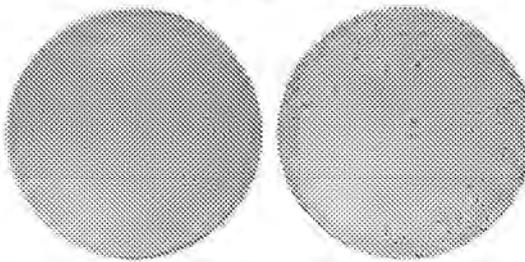


Control

3 micromoles  
H-1152

Policarbonato

**FIG. 1B**

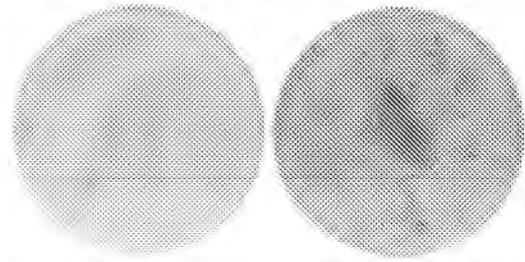


Control

3 micromoles  
H-1152

Nylon

**FIG. 1E**

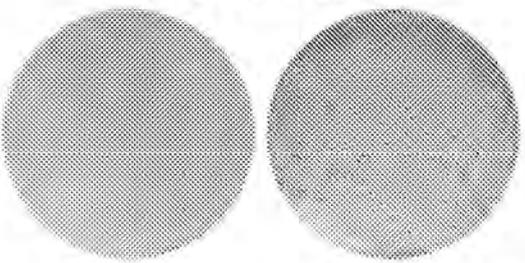


Control

3 micromoles  
H-1152

Tereftalato de polietileno

**FIG. 1C**

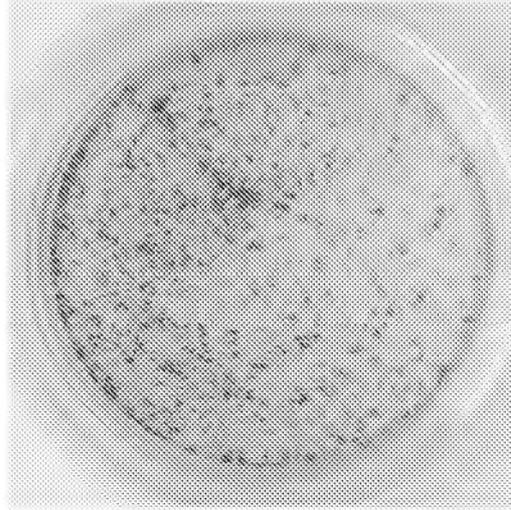


Control

3 micromoles  
H-1152

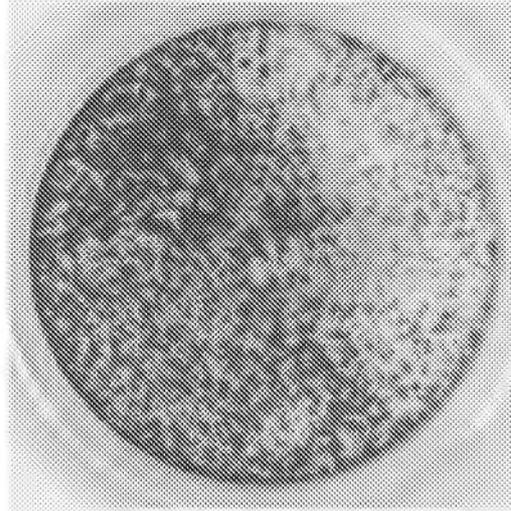
Acetato de Celulosa

FIG. 2A



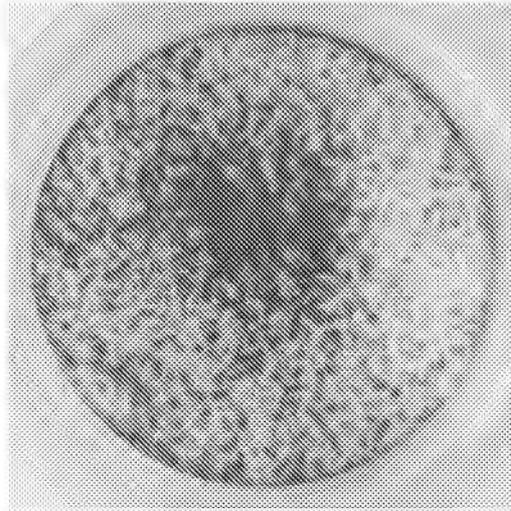
Control

FIG. 2B



10 micromoles  
Y26732

FIG. 2C



20 micromoles  
Y26732

FIG. 3

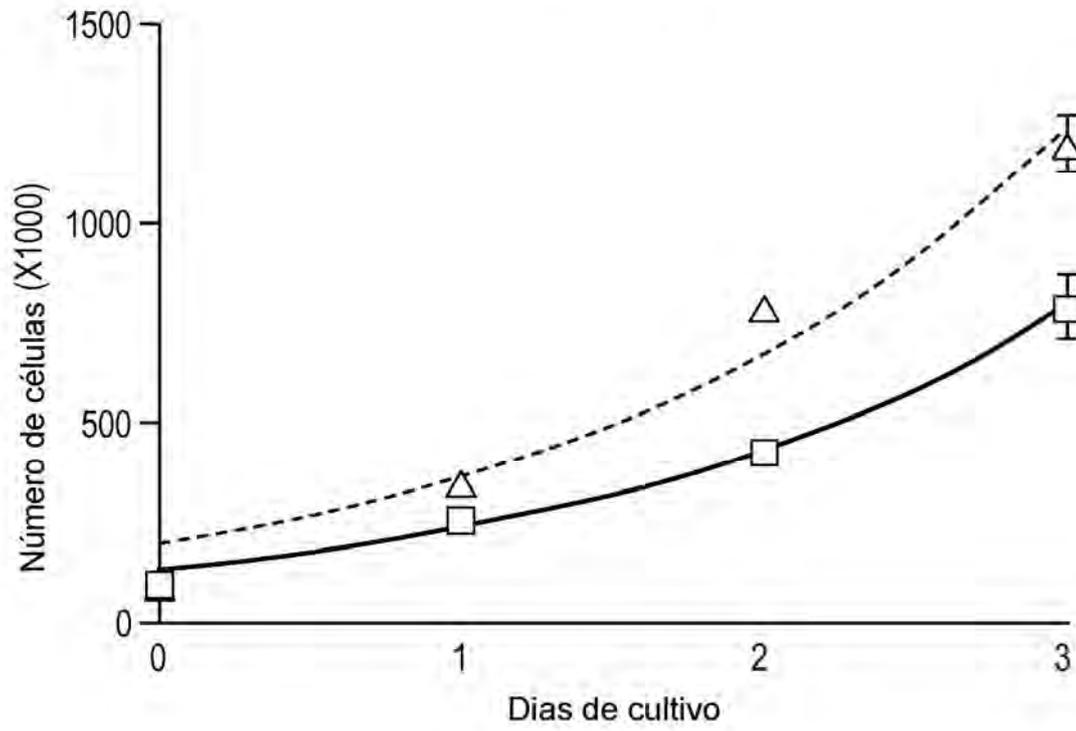


FIG. 4B

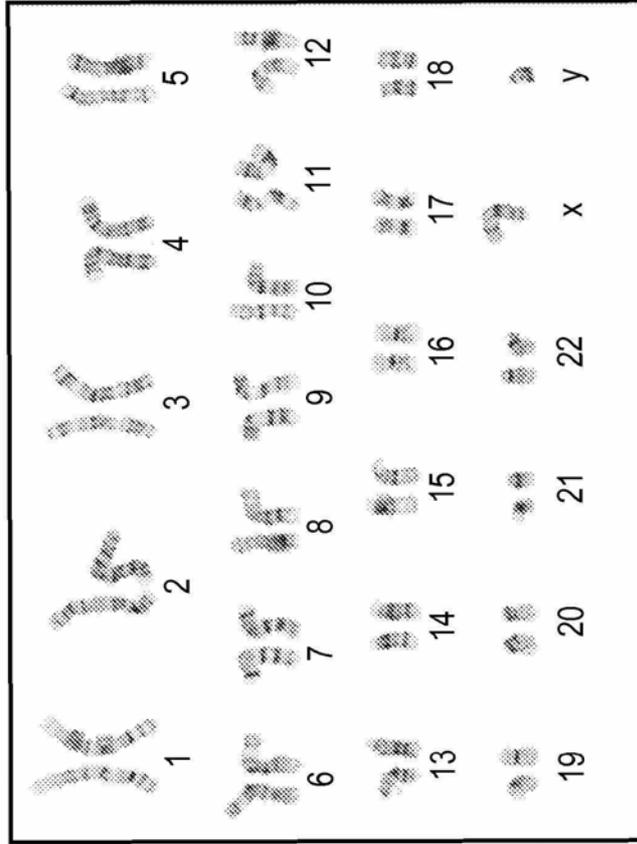


FIG. 4A

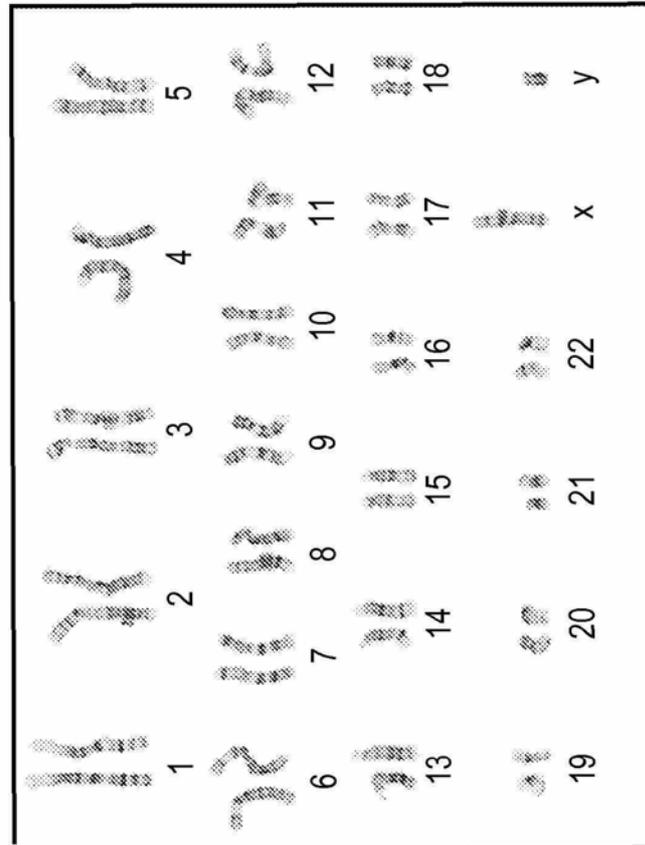
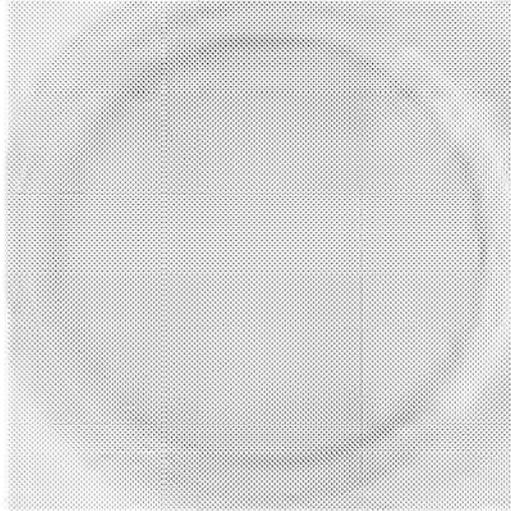
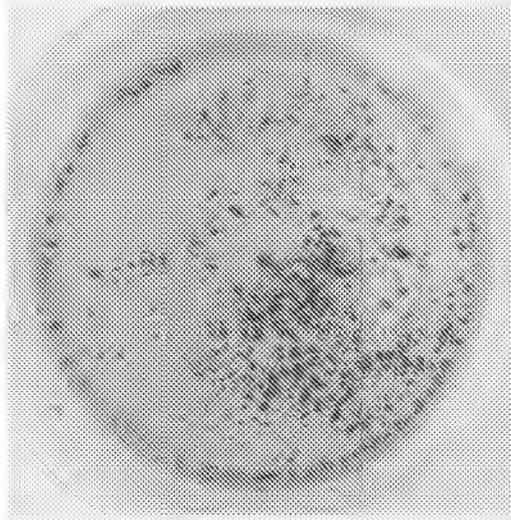


FIG. 5A



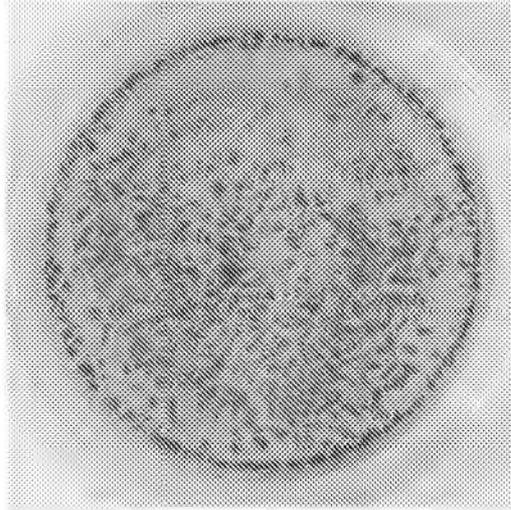
Control

FIG. 5B



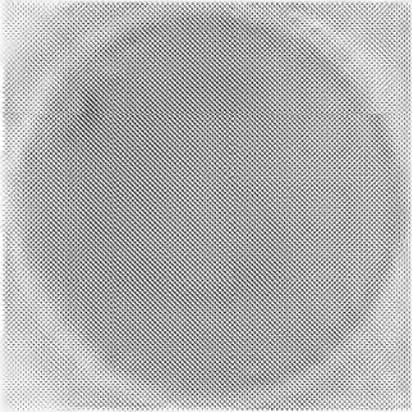
10 micromoles  
H-1152

FIG. 5C



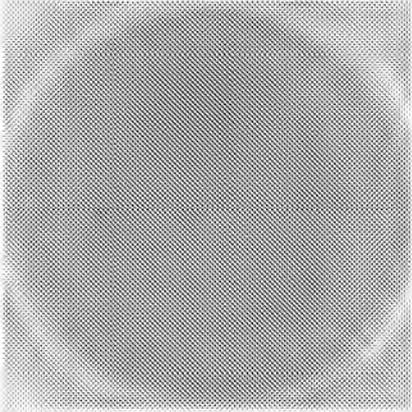
20 micromoles  
H-1152

FIG. 6A



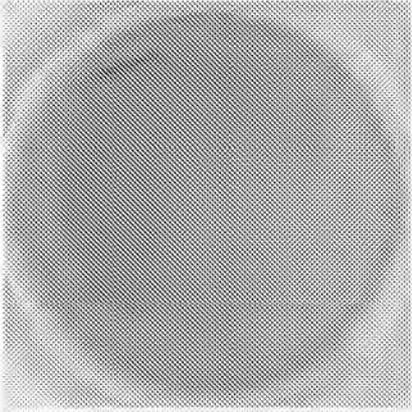
Control

FIG. 6B



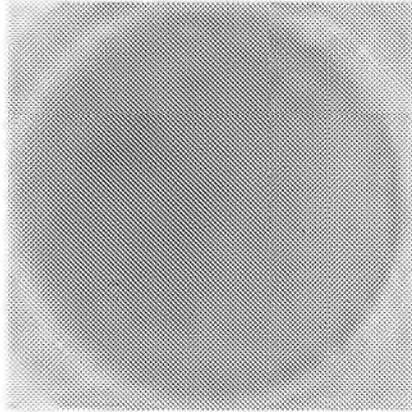
0.03 micromoles  
H-1152

FIG. 6C



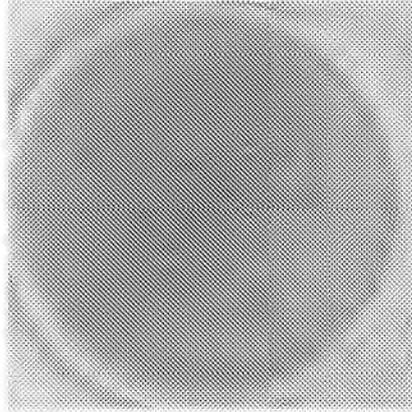
0.1 micromoles  
H-1152

FIG. 6D



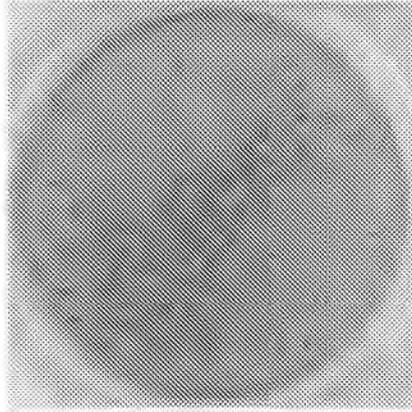
0.3 micromoles  
H-1152

FIG. 6E



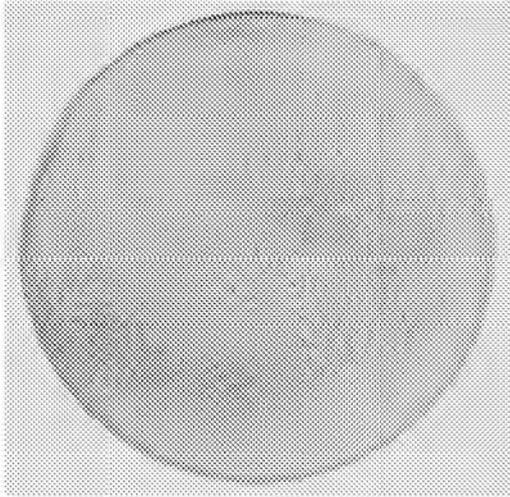
1 micromol  
H-1152

FIG. 6F



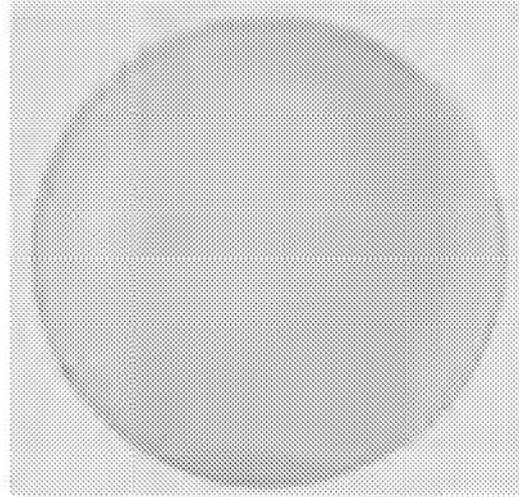
3 micromoles  
H-1152

FIG. 7A



3 micromoles  
H-1152

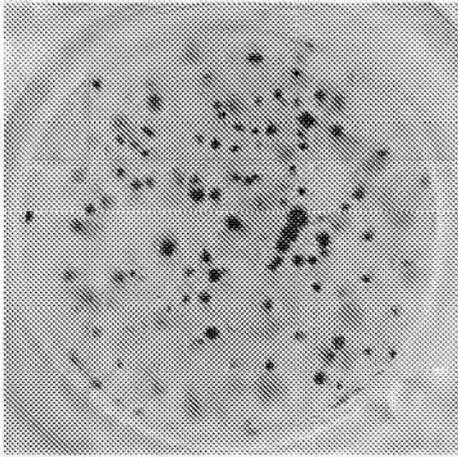
FIG. 7B



0 micromoles  
H-1152

**FIG. 8A**

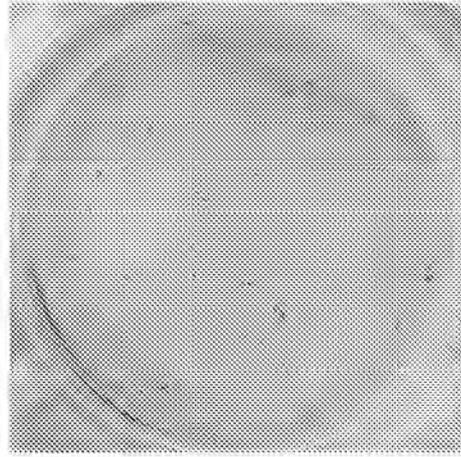
+ H-1152



0.8 micrómetros

**FIG. 8B**

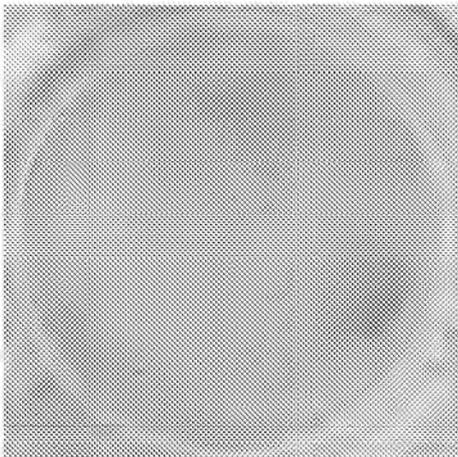
+ H-1152



3 micrómetros

**FIG. 8C**

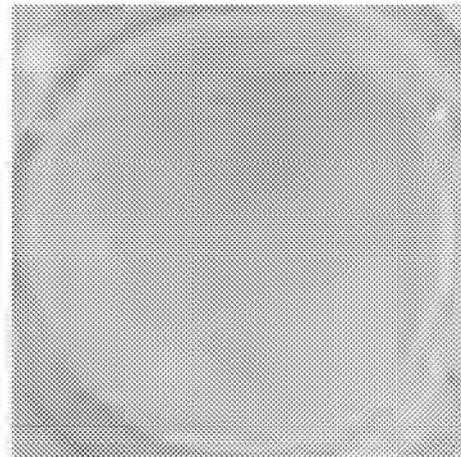
- H-1152



0.8 micrómetros

**FIG. 8D**

- H-1152



3 micrómetros

FIG. 9

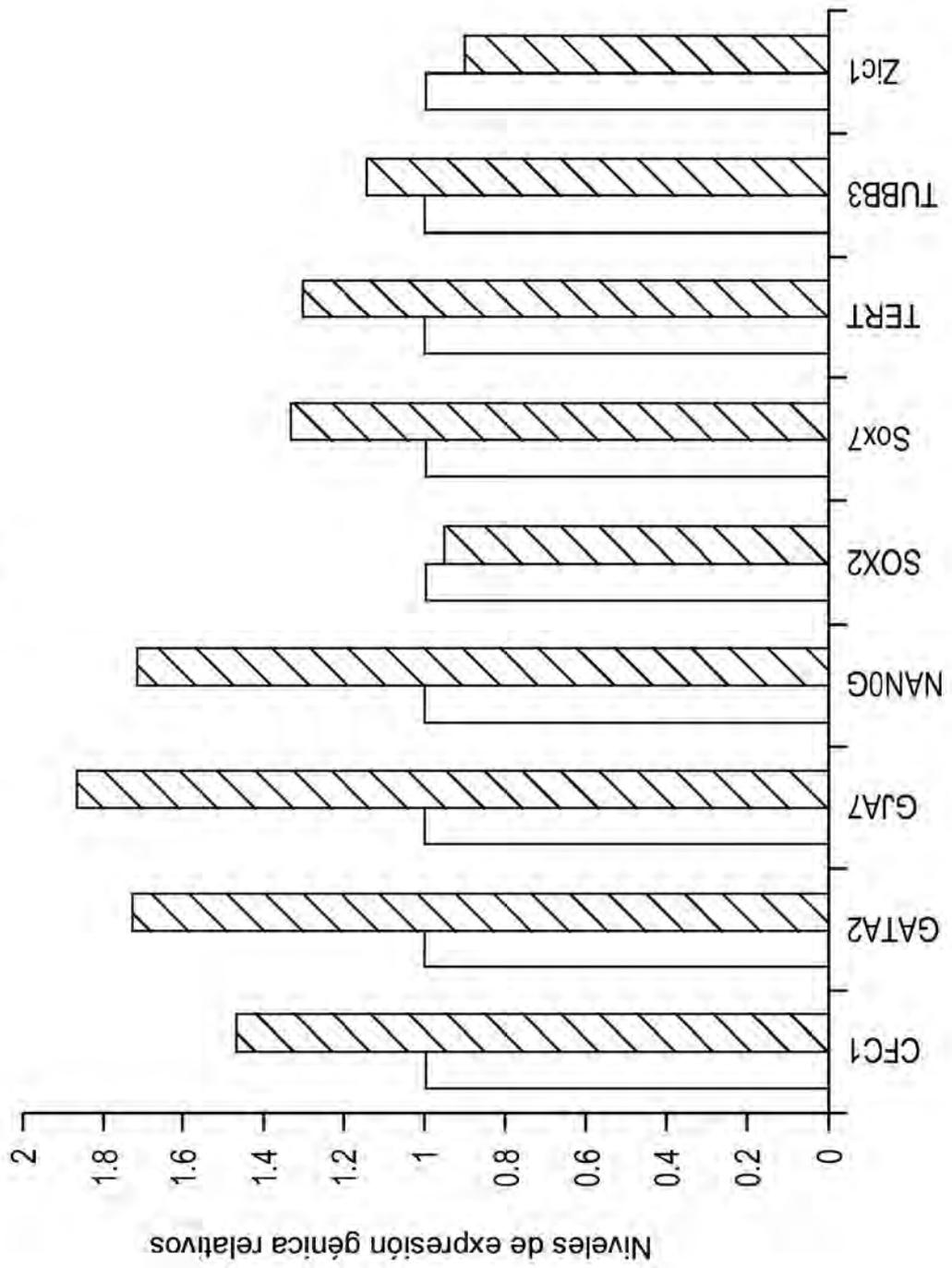


FIG. 10

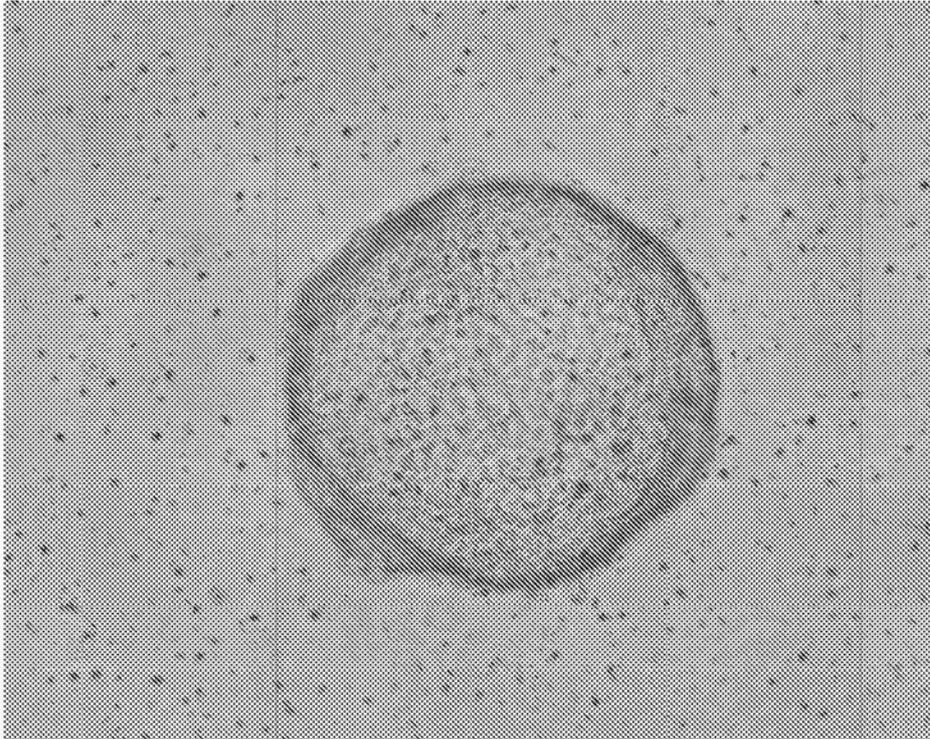


FIG. 11

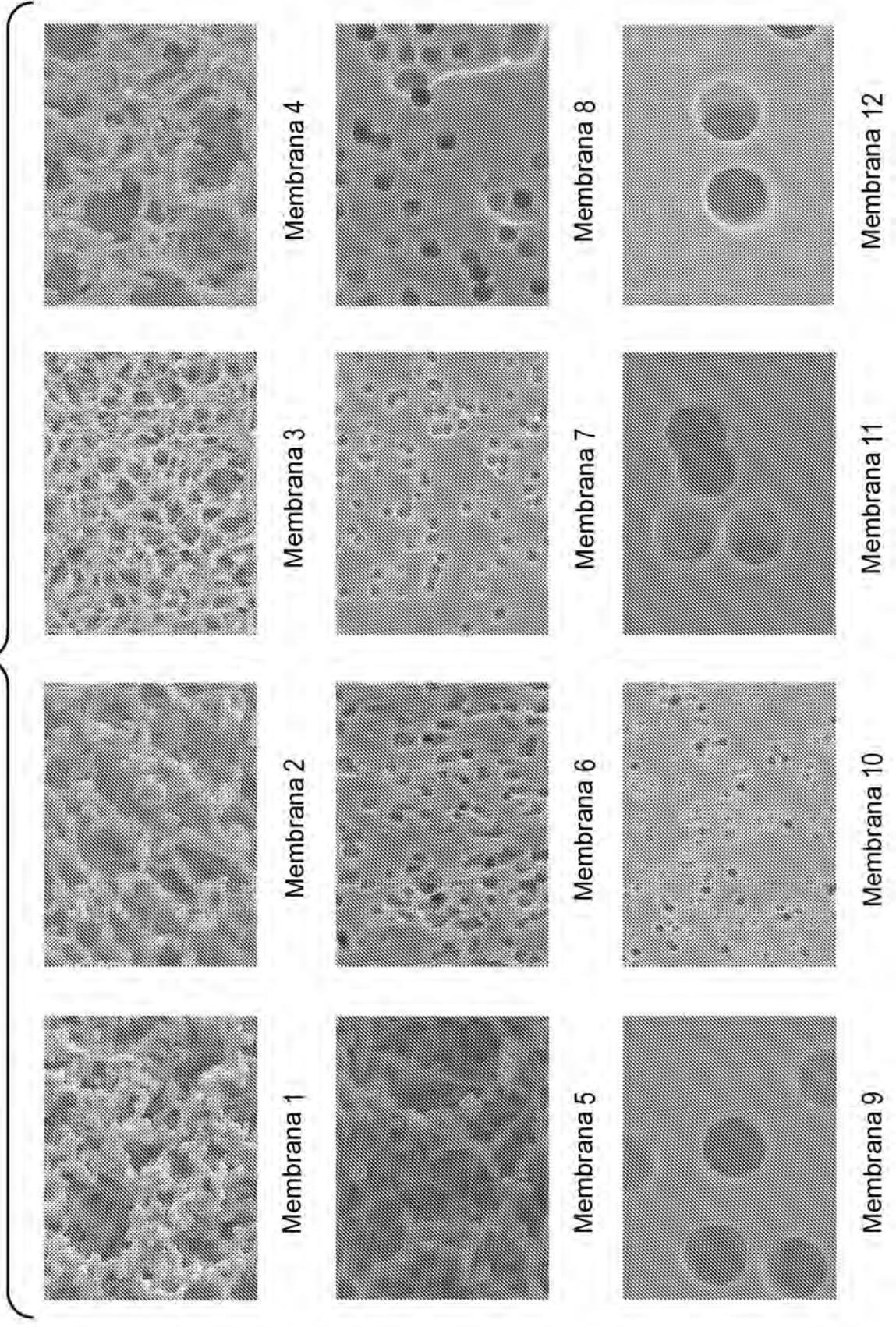


FIG. 12A

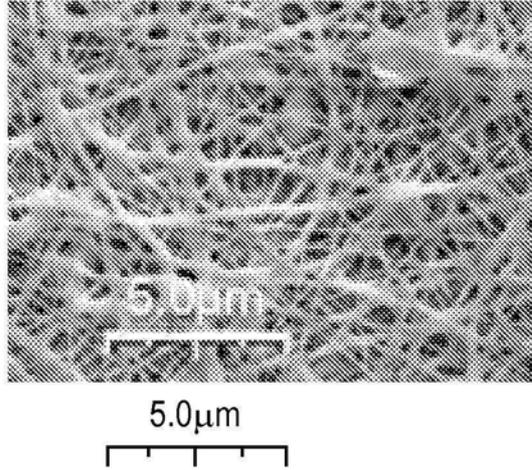


FIG. 12B

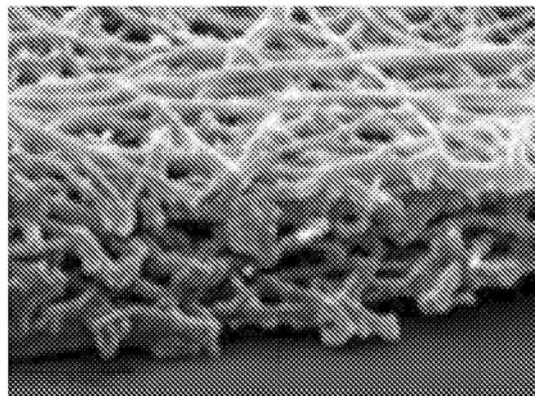


FIG. 13

