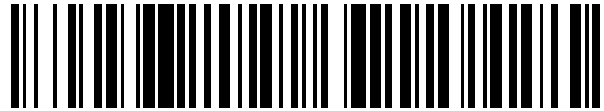


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 656**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2008 PCT/US2008/068782**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2009 WO09006399**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2008 E 08772255 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2173862**

54 Título: **Cultivo de célula madre pluripotente individual**

30 Prioridad:

01.07.2007 US 947444 P

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

25.07.2017

73 Titular/es:

**LIFESCAN, INC. (100.0%)
1000 GIBRALTAR DRIVE
MILPITAS, CA 94066, US**

72 Inventor/es:

NELSON, SHELLEY

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 626 656 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).

Cultivo de célula madre pluripotente individual

Descripción

5 La presente invención se refiere al campo de cultivo de células madre pluripotentes y métodos para facilitar el cultivo de célula madre pluripotente a niveles industriales.

Antecedentes

10 Las células madre pluripotentes, como, por ejemplo, las células madre embrionarias tienen la habilidad de diferenciarse en todos los tipos de célula adulta. Así, las células madre embrionarias pueden ser una fuente de sustitución de células y tejido para órganos que se han dañado como resultado de una enfermedad, infección o anomalía congénita. El potencial para células madre embrionarias para emplearse como una fuente de célula de sustitución se obstaculiza por la dificultad para propagar las células *in vitro* mientras se mantiene su pluripotencia.

15 Los métodos actuales para cultivar células madre embrionarias no diferenciadas requieren condiciones complejas de cultivo, como, por ejemplo, cultivar las células madre embrionarias en presencia de una capa celular alimentaria. Alternativamente, los medios obtenidos por exposición a cultivos de célula alimentaria pueden usarse para cultivar células madre embrionarias. Los sistemas de cultivo que emplean estos métodos usan a menudo células obtenidas de una especie diferente a la de las células madre que se están cultivando (células xenogénicas). Además, estos sistemas de cultivo pueden complementarse con suero animal.

20 Por ejemplo, Reubinoff et al (Nature Biotechnology 18: 399-404 (2000)) y Thompson et al (Science 6 Noviembre 1998: Vol. 282, nº 5391, págs. 1145-1147) desvelan el cultivo de líneas de células madre embrionarias de blastocistos humanos usando una capa de célula alimentaria de fibroblasto embrionario de ratón.

25 En otro ejemplo, WO2005014799 desvela un medio acondicionado para el mantenimiento, proliferación y diferenciación de células de mamíferos. WO2005014799 expone: "El medio de cultivo producido de acuerdo con la presente invención está acondicionado por la actividad de secreción celular de células murinas, en particular, aquellos hepatocitos transgénicos diferenciados e inmortalizados, llamados HME (hepatocito murino encontrado)".

30 Sin embargo, el uso de células xenogénicas, o productos de células xenogénicas, aumenta el riesgo de que las poblaciones de células madre embrionarias resultantes producidas mediante tales métodos puedan estar contaminadas por proteínas virales y/o xeno de naturaleza inmunogénico.

35 Richards et al. (Stem Cells 21: 546-556, 2003) evaluó un panel de 11 capas de células alimentarias diferentes de adultos, fetos y neonatos para su habilidad para soportar cultivo de célula madre embrionaria humana. Richards et al. expone: "las líneas de células madres embrionarias humanas cultivadas en fibroblastos alimentarios de piel adulta mantienen la morfología de célula madre embrionaria humana y se mantienen pluripotentes".

40 US6642048 desvela medios para soportar el crecimiento de células madre pluripotentes de primates (pPS) en cultivo libre de alimentación, y las líneas celulares útiles para la producción de tal medio. US6642048 expone: "Esta invención incluye líneas celulares de tipo mesenquimal y fibroblasto obtenidas de tejido embrionario o diferenciadas de células madre embrionarias. Los métodos para derivar tales líneas celulares, medios de procesamiento y células madre de crecimiento usando el medio acondicionado se describen e ilustran en esta divulgación".

45 US20020072117 desvela líneas celulares que producen medios que soportan el crecimiento de células madre pluripotentes de primates en un cultivo libre de alimentación. Las líneas celulares empleadas son líneas celulares de tipo mesenquimal y fibroblasto obtenidas de tejido embrionario, o diferenciadas de células madre embrionarias. US20020072117 también desvela el uso de las líneas celulares como una capa de célula alimentaria primaria.

50 En otro ejemplo, Wang et al. (Stem Cells 23: 1221-1227, 2005) desvela métodos para el crecimiento a largo plazo de células madre embrionarias humanas en capas de células alimentarias de células madre embrionarias humanas.

55 En otro ejemplo, Xu et al. (Stem Cells 22: 972-980, 2004) desvela el medio acondicionado obtenido de derivados de células madre embrionarias humanas que se han modificado genéticamente para sobreexpresar transcriptasa inversa de telomerasa humana.

60 En otro ejemplo, Stojkovic et al (Stem Cells 2005 23: 306-314, 2005) desvela un sistema de células alimentarias derivado de la diferenciación espontánea de células madre embrionarias humanas.

65 En un ejemplo más, Miyamoto et al (Stem Cells 22: 433-440, 2004) desvela una fuente de células alimentarias obtenidas de placenta humana.

Amit et al (Biol. Reprod 68: 2150-2156, 2003) desvela una capa de célula alimentaria derivada de prepucio humano.

5 En otro ejemplo, Inzunza et al (Stem Cells 23: 544-549, 2005) desvela una capa de célula alimentaria de fibroblastos de prepucio post-natales humanos.

10 Un sistema alternativo de cultivo emplea medio libre de suero complementado con factores de crecimiento capaces de promover la proliferación de células madre embrionarias. Por ejemplo, Choen et al. (BioReprod DOI:10.1095/biolreprod.105.046870, Octubre 19, 2005) desvela un sistema de cultivo libre de alimentación y libre de suero donde las células madre embrionarias se mantienen en un medio no acondicionado de sustitución con suero (SS) complementado con factores de crecimiento diferentes capaces de provocar la auto-renovación de célula madre embrionaria.

15 En otro ejemplo, Levenstein et al. (Stem Cells 24: 568-574, 2006) desvela métodos para el cultivo a largo plazo de células madre embrionarias humanas en ausencia de fibroblastos o medio acondicionado, usando medios complementados con FCFb.

20 En otro ejemplo, US20050148070 desvela un método para cultivar células madre embrionarias humanas en medios definidos sin suero y sin células alimentarias de fibroblasto, comprendiendo el método: 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 de mamífero y conteniendo al menos 100 ng/ml de un factor de crecimiento de fibroblasto capaz de activar un receptor señalizador de factor de crecimiento de fibroblasto, donde el factor de crecimiento se suministra de una fuente diferente a la de la capa alimentaria de fibroblasto, soportando el medio la proliferación de células madre en un estado no diferenciado sin células alimentarias o medio acondicionados.

25 En otro ejemplo, US20050233446 desvela un medio definido útil en el cultivo de células madre, que incluye células madre primordiales de primate no diferenciadas. En solución, el medio es esencialmente isotónico en comparación con células madre que se están cultivando. En un cultivo dado, el medio particular comprende un medio base y una cantidad de cada bFCF, insulina y ácido ascórbico necesaria para soportar sustancialmente el crecimiento no diferenciados de las células madre primordiales.

30 En otro ejemplo, US6800480 expone: "En una realización, se proporciona un medio de cultivo celular para hacer crecer células madre primordiales derivadas de primate en un estado sustancialmente no diferenciado que incluye una presión osmótica baja, medio básico de endotoxina bajo que es efectivo para soportar el crecimiento de células madre primordiales derivadas de primate. El medio básico se combina con un suero nutriente efectivo para soportar el crecimiento de células madre primordiales derivadas de primate y un sustrato seleccionado del grupo consistente en células alimentarias y un componente de matriz extracelular derivada de célula alimentaria. El medio incluye además aminoácidos no esenciales, un antioxidante, y un primer factor de crecimiento seleccionado del grupo consistente en nucleósidos y una sal de piruvato".

35 En otro ejemplo, US20050244962 expone: "En un aspecto la invención proporciona un método para cultivar células madre embrionarias de primate. Las células madre se cultivan en un cultivo esencialmente libre de suero fetal de mamífero (preferentemente también libre de cualquier suero animal) y en presencia de factor de crecimiento de fibroblasto que se suministra de una fuente diferente a la de una capa alimentaria de fibroblasto. En una forma preferente, la capa alimentaria de fibroblasto, previamente requerida para mantener un cultivo de célula madre, se vuelve innecesaria por la adición de suficiente factor de crecimiento de fibroblasto".

40 En un ejemplo más, WO2005065354 desvela un medio de cultivo definido e isotónico que está esencialmente libre de alimentación y libre de suero, que comprende: a) medio basal; b) una cantidad de FCFb suficiente para soportar el crecimiento de células madre de mamífero sustancialmente no diferenciadas; c) una cantidad de insulina suficiente para soportar el crecimiento de células madre de mamífero sustancialmente no diferenciadas; y d) una cantidad de ácido ascórbico suficiente para soportar el crecimiento de células madre de mamífero sustancialmente no diferenciadas.

45 En otro ejemplo, WO2005086845 desvela un método para mantenimiento de una célula madre no diferenciadas, comprendiendo dicho método la exposición de una célula madre a un miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento transformante beta (FCT β), un miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento de fibroblasto (FCF), o nicotinamida (NIC) en una cantidad suficiente para mantener la célula en un estado no diferenciado durante una cantidad suficiente de tiempo para conseguir un resultado deseado.

50 Las células madre embrionarias proporcionan un recurso potencial para investigación y pruebas de fármacos. En el presente, el cultivo a gran escala de líneas de células ME humanas es problemático y provoca retos sustanciales. Una posible solución a estos retos es el paso y cultivo de células madre embrionarias humanas como

células individuales. Las células individuales son más flexibles para técnicas estándares de cultivos de tejidos, como, por ejemplo, conteo, transfección y similares.

5 Por ejemplo, Nicolas et al proporciona un método para producir y expandir líneas celulares MEh a partir de células individuales que se han aislado mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (CCAF) siguiendo la modificación genética por vectores lentivirus. *Stem Cell and Development* (2007), 16(1), 109-118.

10 En otro ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos US2005158852 desvela un método “para mejorar el crecimiento y supervivencia de células madre embrionarias humanas individuales. El método incluye la etapa de obtener una célula ESH no diferenciada individual mezclando la células no diferenciada individual con una matriz extracelular (MEC) para abarcar la célula; e inoculando la mezcla en células alimentarias con un medio nutriente en un medio de crecimiento”.

15 En otro ejemplo, Sidhu, KS et al (*Stem Cells Dev.* 2006 Feb; 15 (1): 61-9.) “describe el primer informe de tres clones de células madre embrionarias humanas (CMEh), MEh 3.1, 3.2 y 3.3, que se derivan de MEh3 clasificando preparaciones de célula individual mediante citometría de flujo. La viabilidad de preparaciones de célula individual antes y después de la clasificación se quedó en >98%”.

20 Sin embargo, el paso y cultivo de células madre embrionarias humanas como células individuales lleva a anomalías genéticas y pérdidas de pluripotencia. Las condiciones del cultivo son importantes en el mantenimiento de pluripotencia y estabilidad genética. En general, el paso de líneas de células MEh se realiza manualmente o con agentes enzimáticos como colagenasa, liberasa o dispasa.

25 Por ejemplo, Drapers JS et al. señala la presencia de “cambios caritípicos que implican la adquisición de cromosoma 17q en tres líneas de célula madre embrionaria humana independiente en cinco ocasiones independientes.” (*Nat Biotechnol.* 2004 Enero; 22 (1):53-4. Epub 2003 Dic 7).

30 En otro ejemplo, Buzzard et al. expone, “solamente hemos detectado un hecho de cambio de cariotipo... los métodos de cultivo usados pueden haber tenido alguna relevancia en nuestros resultados, dado que nuestros métodos son distintivamente diferentes a los usados por la mayoría de otros grupos. Típicamente, hemos pasado células ME humanas después de 7 días diseccionando primero la colonia con el borde de una pipeta rota... No se incorporan métodos enzimáticos o químicos de disociación celular en este método. Especulamos que esto pueden explicar la resiliencia relativamente citogenética de células MEh en nuestra manos”. (*Nat Biotechnol.* 2004, Abril; 22(4):381-2; respuesta del autor 382).

35 En otro ejemplo, Mitalipova MM et al expone: “métodos de paso al por mayor... pueden perpetuar las poblaciones de célula aneuploide después de un paso extendido en cultivo, pero pueden usarse para periodos más cortos de tiempo (hasta al menos 15 pasos) sin comprometer a los cariotipos... puede ser posible mantener un cariotipo normal en células MEh bajo condiciones de propagación manual a largo plazo seguida de paso al por mayor limitado en experimentos que requieren cantidades más grandes de células MEh que los métodos manuales de paso, solos, pueden proporcionar”. (*Nat Biotechnol.* 2005 Enero; 23(1)19-20).

40 En otro ejemplo, Heng BC et al expone “los resultados demostraron que el segundo protocolo (tripsinización con uso suave de pipeta) es mucho menos perjudicial para la viabilidad celular que el primer protocolo (tratamiento de colagenasa con arañazo). Esto as su vez se tradujo a índices mayores de supervivencia de congelación-descongelación”. (*Biotechnology and Applied Biochemistry* (2007), 47(1), 33-37).

45 En otro ejemplo, Hasegawa K. et al expone: “hemos establecido sublíneas de CMEh tolerantes a disociación completa. Estas células muestran alta eficiencia en volver a colocar en placas y también alta eficiencia de clonación y mantienen su habilidad para diferenciarse en tres capas germinales”. (*Stem Cells*, 2006 Dic; 24 (12):2649-60. Epub 2006 Agosto 24).

50 Ellestrom C et al (*Stem Cells*, 2007) analiza la expansión facilitada de células madre embrionarias humanas por disociación enzimática de célula individual. Klimanskaya I et al (*Lancet*, 2005) analiza células madre embrionarias humanas derivadas sin células alimentarias. WO 01/81549 se refiere a la diferenciación dirigida de células madre pluripotentes humanas en células del linaje de hepatocito. WO 2007/139929 se refiere al método para cultivar y producir poblaciones de células individuales de células madre embrionarias humanas. Wang G et al (*Biochemical and biophysical research communications*, 2005) considera la cooperación de Noggin y bFCF para mantener la pluripotencia de células madre embrionarias humanas en ausencia de capas alimentarias. Dennis C et al (*Int. J. Dev. Bio.*, 2006) analiza las condiciones comunes de cultivo de líneas de células madre BG01 y HUES-7. Braam S et al (*Nature methods*, 2008) analiza la manipulación genética mejorada de células madre embrionarias humanas. Xu C et al (*Nature Biotech.* 2001) considera el crecimiento libre de alimentación de células madre embrionarias humanas no diferenciadas. Panchision D et al analiza que el análisis citométrico de flujo optimizado de tejido del nervioso sistema central revela relaciones funcionales nuevas entre células que expresan CD133, CD15 y CD24. EP 1873237 se refiere a métodos para hacer crecer células madre embrionarias in vitro.

Resumen de la invención

La invención proporciona un método para diferenciar células madre pluripotentes como células individuales en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático, que comprende las etapas de: (a) cultivar las células madre pluripotentes como grupos; (b) liberar las células madre pluripotentes como células individuales; (c) colocar en placas las células madre pluripotentes individuales en un sustrato de cultivo de tejido; y (d) diferenciar las células madre pluripotentes individuales.

Resumen

Aquí se describen métodos para el mantenimiento, paso y diferenciación de células madre pluripotentes que se han liberado como células individuales usando enzimas. En particular, la presente divulgación proporciona métodos para el mantenimiento, paso y diferenciación de células madre pluripotentes que se han liberado como células individuales sin la posterior pérdida de pluripotencia, y sin la adquisición de anomalías cromosómicas.

Aquí se describe un método para diferenciar células madre pluripotentes, comprendiendo las etapas de:

- a) Cultivar células madre pluripotentes como grupos,
- b) Liberar las células madre pluripotentes como células individuales,
- c) Colocar en placas las células madre pluripotentes individuales en un sustrato de cultivo de tejido, y
- d) Diferenciar las células.

También se desvela aquí un método para mantener células madre pluripotentes, comprendiendo las etapas de:

- a) Obtener células madre pluripotentes,
- b) Liberar las células madre pluripotentes como células individuales, y
- c) Colocar en placas las células madre pluripotentes sencillas en un sustrato de cultivo de tejido.

También se desvela aquí un método para pasar células madre pluripotentes, comprendiendo las etapas de:

- a) Obtener grupos de células madre pluripotentes,
- b) Liberar las células madre pluripotentes como células individuales,
- c) Colocar en placas las células madre pluripotentes individuales en un sustrato de cultivo de tejido,
- d) Dejar que las células madre pluripotentes se expandan,
- e) Liberar las células madre pluripotentes individuales, y
- f) Colocar en placas las células madre pluripotentes individuales en un nuevo sustrato de cultivo de tejido.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Una imagen en aumento 4x de células ME humanas H9ccp33 que han crecido en un factor de crecimiento reducido 1:30 MATRIGEL™ en un medio acondicionado con MEF.

Figura 2: Porcentaje de células que expresan CXCR4 después de tratamiento de diferenciación para derivar endodermo definitivo. Gris oscuro: una media de seis experimentos de diferenciación DE con grupos de células H1 (H1 cc) entre los pasos 45 y 55. Negro: una media de dos experimentos de diferenciación DE con células individuales H1 (H1 sc) en los pasos 47 y 54. Blanco: una media de dos experimentos de diferenciación DE con grupos de células H9 (H9 cc) entre los pasos 37 y 55. Gris claro: Una media de tres experimentos de diferenciación DE con células individuales H9 (H9 sc) entre los pasos 36 y 48. Las barras de error representan la desviación estándar de experimentos de réplica.

Figura 3: Análisis de expresión de gen por PCR a tiempo real después de exposición de 14 a 17 días del protocolo de diferenciación endocrina pancreática. Se analizaron células individuales H9 y grupos de células en el paso 37. La continuación de los grupos de células p47 y H9 p37 y las células individuales de la fase de endodermo pancreático. La expresión Pdx1 después de días 14 y 17. La expresión de gen para los marcadores indicados para células no tratadas se fijó en un valor de uno para cada conjunto de datos.

Figura 4: Se muestra una imagen en aumento 4x de células individuales ME humanas H9scp22 en un factor de crecimiento reducido 1:30 MATRIGEL™ en un medio acondicionado con MEF.

Figura 5: Evaluación por CCAF para expresión marcadora de pluripotencia de células MEh. El porcentaje de células positivas para los marcadores indicados se enumera en eje X.

Figura 6: Expansión cromosómica de células individuales MEh H9 al pasar 38 veces como grupos seguido de 20 pasos como células individuales.

Figura 7: Comparación de células individuales H9 y grupos de células durante la diferenciación de endodermo definitivo. El porcentaje de células positivas para CXCR4 se muestran después de que las células se expongan al protocolo de diferenciación de endodermo definitivo. N=2 para H9sc-p y N=5 para H9cc. Las barras de error representan la desviación estándar de experimentos de réplica.

Figura 8: aumento en marcadores de endodermo pancreático después de que las células individuales H9 (paso 22) se hayan diferenciado. El análisis de expresión de gen por PCR a tiempo real se muestra después de 11, 14 o 17 días de diferenciación endocrina pancreática. Los valores para días 14 y 17 son una media de dos pocillos de una placa de 6 pocillos.

Figura 9: Las células individuales MEh pueden diferenciarse en MEFS. CCAF es el resultado de células H1scp4 que crean en alimentadores MEF y se diferenciaron en endodermo definitivo. El marcador de endodermo definitivo CXCR4 (CD184) se expresa en 89% de las células contra 0% de células no diferenciadas (véase figura 5).

Figura 10: Las células individuales MEh (H9scp18) pueden diferenciarse en un formato con 96 pocillos para endodermo definitivo. Se muestran los datos de inmunofluorescencia para detección positiva de Sox17. Se trataron ocho pocillos con medio acondicionado con MEF durante la duración del experimento: medio MEF. Ocho pocillos se trataron con el medio basal de diferenciación sin componentes: sin comp. Se calculó el promedio de los conjuntos de datos de réplica de ocho pocillos para cada barra de datos. Se trataron un total de 40 pocillos con inhibidor Wnt3a o Gsk3b y se calculó el promedio para cada conjunto de datos. Las barras de error representan la desviación estándar de experimentos de réplica.

Figura 11: Análisis de farmacóforo con células individuales MEh (H9scp19). Se probaron un total de 13 compuestos de molécula pequeña experimentales para su habilidad para sustituir Wnt3a en el protocolo de diferenciación de endodermo definitivo. Se muestran tres compuestos efectivos. Los conjuntos de datos representan un promedio de células positivas Sox17 en dos o más pocillos. Las células tratadas con medio acondicionado con MEF o medio basal se usaron como controles negativos.

Figura 12: Evaluación de eficiencia de transfección entre grupos de células H9p33 MEh y células individuales. CMV-GFP se transfectaron en células usando ocho µl Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlesbad, CA) y de cuatro a ocho µg ADN, barras blanca y gris respectivamente.

Figura 13: Micrógrafos de fase de células MEh H1 que han crecido en MEFs y después han pasado a MATRIGEL™ como grupos o células individuales. Las células MEh H1 del paso 37 pasaron de MEFs a MATRIGEL™ con colonias diferenciadas muy empaquetadas de Colagenasa con algunas células sueltas diferenciadas. Las células MEh H1 pasaron una vez con forma Accutase™ o TrypLE™ un cultivo monocapa con bolsillos de células diferenciadas muy empaquetadas.

Figura 14: Las células MEh H1 pasaron directamente a MATRIGEL™ de MEFS como células individuales espontáneamente diferenciadas. Panel A: el porcentaje de células que quedan en la población después de dos pasos con Accutase™ de MEFs a MATRIGEL™. Panel B: Expresión de marcadores de pluripotencia y diferenciación en células MEh después de dos pasos con Accutase™ de MEFs a MATRIGEL™. Panel C: Micrógrafos de fase de células MEh después de dos pasos con Accutase™ de MEFs a MATRIGEL™.

Descripción detallada

Para claridad de la divulgación, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención está dividida en las siguientes subsecciones que describen o ilustran ciertas características, realizaciones o aplicaciones de la presente invención.

Definiciones

Las células madre son células no diferenciadas definidas por su habilidad en el nivel de célula individual para auto-renovarse y diferenciarse para producir células progenie, incluyendo progenitores auto-renovadores, progenitores no renovadores y células completamente diferenciadas. Las células madre también se caracterizan por su habilidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de varios linajes de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar origen a tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante y para contribuir sustancialmente, si no a todos, los tejidos después de la inyección en blastocitos.

Las células madre se clasifican por su potencial de desarrollo como: (1) totipotentes, lo que significa que pueden dar origen a todos los tipos de células embrionarias y extra-embrionarias; (2) pluripotentes, lo que significa que pueden dar origen a todos los tipos de células embrionarias; (3) multipotentes, lo que significa que pueden dar lugar a un subconjunto de linajes celulares, pero todos en un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, células madre hematopoyéticas (CMH) pueden producir progenie que incluye HSC (auto-renovación), progenitores oligopotentes restringidos por células sanguíneas y todos los tipos de células y elementos (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre); (4) oligopotentes, lo que significa que pueden dar origen a

un subconjunto más estricto de linajes celulares que las células madre pluripotentes; y (5) unipotentes, lo que significa que pueden dar origen a un único linaje celular (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

5 La diferenciación es un proceso por el que un células no especializada (“no comprometida”) o menos especializada adquiere las características de una célula especializada como, por ejemplo, una célula de un nervio o una célula de un músculo. Una célula diferenciada o inducida por diferenciación es una que ha tomada una posición más especializada (“comprometida”) en el linaje de una célula. El término “comprometida”, cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha continuado en la vía de la diferenciación hasta un punto donde, bajo circunstancias normales, continuará hasta diferenciarse en un tipo específico de célula, y no puede, bajo 10 circunstancias normales, diferenciarse en un tipo diferente de célula o volver a un tipo de célula menos diferenciado. La desdiferenciación se refiere al proceso por el que una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) en el linaje de una célula. Como aquí se usa, el linaje de una célula define la herencia de la célula, esto es, de qué célula viene y a qué célula dará origen. El linaje de una célula coloca a la célula en un plan hereditario de desarrollo y diferenciación. Un marcador específico de linaje se refiere a una característica específicamente asociada con el fenotipo de un linaje de interés y puede usarse para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida con el linaje de interés. 15

Se usan varios términos para describir células en cultivo. “Mantenimiento” se refiere a células colocada en un medio de crecimiento bajo condiciones que facilitan el crecimiento y/o división de células, que pueden o no dar como resultado una población mayor de células. “Paso” se refiere al proceso de retirar células de un recipiente de cultivo y colocarlos en un segundo recipiente de cultivo bajo condiciones que facilitan el crecimiento y/o división de células. 20

Una población específica de células, o una línea celular, a veces es referida o caracterizada por el número de veces que ha pasado. Por ejemplo, una población de células cultivadas que ha pasado diez veces puede ser referida como un cultivo P10. El cultivo primario, esto es, el primer cultivo después del aislamiento de células de tejido, se designa P0. Después del primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (P1 o paso 1). Después del segundo subcultivo, las células se vuelven un cultivo terciario (P2 o paso 2) y etcétera. Aquellos expertos en la técnica entenderán que puede haber muchas duplicaciones de poblaciones durante el periodo de paso; por lo tanto, el número de duplicaciones de poblaciones en un cultivo es mayor que el número de pasos. La expansión de células (esto es, el número de duplicaciones de cultivo) durante el periodo entre pasos depende de muchos factores, incluyendo aunque sin limitarse a, densidad de siembra, sustrato, medio, condiciones de crecimiento y tiempo entre pasos. 25 30

“PAF” o “proteína alfa-fetoproteína” como aquí se usa, se refiere a un antígeno producido al inicio del desarrollo del hígado. PAF también puede expresarse en células embrionarias. 35

“Linaje de célula β” se refiere a células con expresión de gen positivo para el factor de transcripción PDX-1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN-3, Nkx2.2, Nkx.6.1, NeuroD, Isl-1, HNF-3 beta, MAFA, Pax4 y Pax6. Las células que expresan marcadores característicos del linaje de célula β incluyen células β. 40

“Braquiuria”, como aquí se usa, es un miembro de la familia del gen T-box. Es el marcador para la sucesión primitiva y las células de mesodermo. 45

“Células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo” como aquí se usa, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX-17, GATA-4, HNF-3 beta, Cer1, Nodal, FGF8, Braquiuria, proteína homeobox de tipo mezcla, FGF4, CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA-6, CXCR4, C-Kit, CD99 u OTX22. Las células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo incluyen células precursoras de la sucesión primitiva, células de sucesión primitiva, células de mesendodermo y células de endodermo definitivo. 50

“CD99” como aquí se usa se refiere a la proteína codificada por el gen con el número de accesión NM_002414. 55

“Células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático” como aquí se usa, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: PDX-1, HNF-1beta, PTF-1 alfa, HNF-6 o HB9. Las células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático incluyen células de endodermo pancreático. 60

“Células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático”, como aquí se usa, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: MGN-3, NeuroD, Islet-1, PDX-1, NKX6.1, Pax-4 o PTF-1 alfa. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático incluyen células endocrinas pancreáticas, células que expresan hormona pancreática y células que secretan hormona pancreática y células del linaje de célula β. 65

“CXCR4”, como aquí se usa, se refiere al receptor de factor 1 derivado de célula estromal (SDF-1), también conocidos como “LESTR” o “fusina”. En el embrión de ratón que está formando la gástrula, se expresa CXCR4 en el endodermo definitivo y mesodermo pero no en el endodermo embrionario.

5 “Endodermo definitivo” como aquí se usa, se refiere a células que tienen las características de células que surgen del epiblasto durante la gastrulación y que forman el tracto gastrointestinal y sus derivados. Las células de endodermo definitivo expresan los siguientes marcadores: CXCR4, HNF-3 beta, GAT-4, SOX-17, Cerberus, OTX2, goosecoid, c-Kit, CD99 y Mix11.

10 “Endodermo embrionario”, como aquí se usa, se refiere a una población de células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX-7, AFP y SPARC.

15 “GATA-4” y “GATA-6” son miembros de la familia de factor de transcripción GATA. Esta familia del factor de transcripción está inducida por la señalización de TGF-β y contribuye al mantenimiento de marcadores de endodermo temprano.

“GLUT-2”, como aquí se usa, se refiere a la molécula transportadora de glucosa que se expresa en numerosos tejidos fetales y de adulto, incluyendo páncreas, hígado, intestino, cerebro y riñón.

20 “Goosecoid” o “GSC”, como aquí se usa, se refiere a un factor de transcripción de homeodominio expresado en el borde dorsal del blastoporo.

25 “Islet-1” o “Isl-1”, como aquí se usa, es un miembro de la familia LIM/homeodominio de factores de transcripción, y se expresa en el páncreas que se está desarrollando.

“MafA”, como aquí se usa, es un factor de transcripción expresado en el páncreas, y controla la expresión de genes incluidos en la biosíntesis y secreción de insulina.

30 “Marcadores”, como aquí se usa, son moléculas de ácido nucleico o polipéptido que se expresan diferencialmente en una célula de interés. En este contexto, la expresión diferencial significa un mayor nivel para un marcador positivo y un menor nivel para un marcador negativo. El nivel detectable del ácido nucleico o polipéptido marcador es suficientemente más alto o más bajo en las células de interés en comparación con otras células, de tal manera que las células de interés puedan identificarse y distinguirse de otras células usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica.

35 “Célula de mesendodermo”, como aquí se usa, se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: CD48, eomesodermina (EOMES), SOX-17, DKK4, HNF-3 beta, GSC, FGF17, GATA-6.

“Nodal”, como aquí se usa, es un miembro de la superfamilia TGF beta de proteínas.

40 “Oct-4” es un miembro del factor de transcripción del dominio PAU y es ampliamente considerado como el distintivo de células madre pluripotentes. La relación de Oct-4 con células madre pluripotentes está indicada por su expresión firmemente restringida para células madre pluripotentes no diferenciadas. Después de la diferenciación para linajes somáticos, la expresión de Oct-4 desaparece rápidamente.

45 “Célula endocrina pancreática” o “células que expresa hormona pancreática”, como aquí se usa, se refiere a una célula capaz de expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

50 “Célula que secreta hormona pancreática”, como aquí se usa, se refiere a una célula capaz de secretar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

55 “Pax-4” y “Pax-6”, como aquí se usan, son factores de transcripción específicos de célula β pancreática que están implicados en desarrollo del islote.

“PDX-1”, como aquí se usa, se refiere a un factor de transcripción de homeodominio implicado en el desarrollo del páncreas.

60 “Célula de sucesión pre-primitiva”, como aquí se usa, se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: Nodal o FGF8.

“Célula de sucesión primitiva”, como aquí se usa, se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: Braquiuria, proteína homeobox de tipo mezcla o FGF4.

65 “PTF-1 alfa”, como aquí se usa, se refiere a una proteína básica hélice-curva-hélice de 48 Kd que es una subunidad de enlace con ADN específico de secuencia del factor 1 de transcripción de páncreas trimérico (PTF1).

“SPARC”, como aquí se usa, es también conocido como “proteína secretada ácido y rica en cisteína”.

5 “SSEA-1” (Antígeno embrionario específico de fase 2) es un antígeno de superficie glicolípido presente en la superficie de células madre de teratocarcinoma murino (EC), células de germen embrionario murino y humano (EG), y células madre embrionarias murinas (ES).

10 “SSEA-3” (Antígeno embrionario específico de fase 3) es un antígeno de superficie glicolípido presente en la superficie de células madre de teratocarcinoma humano (EC), células de germen embrionario humano (EG), y células madre embrionarias humanas (ES).

15 “SSEA-4” (Antígeno embrionario específico de fase 4) es un antígeno de superficie glicolípido presente en la superficie de células madre de teratocarcinoma humano (EC), células de germen embrionario humano (EG), y células madre embrionarias humanas (ES).

“TRA1-60” es un antígeno relacionado con sulfato de queratina que se expresada en la superficie de células madre de teratocarcinoma humano (EC), células de germen embrionario humano (EG), y células madre embrionarias humanas (ES).

20 “TRA1-81” es un antígeno relacionado con sulfato de queratina que se expresada en la superficie de células madre de teratocarcinoma humano (EC), células de germen embrionario humano (EG), y células madre embrionarias humanas (ES).

25 “TRA2-49” es una isozima de fosfatasa alcalina expresada en la superficie de células madre de teratocarcinoma humano (EC), células de germen embrionario humano (EG), y células madre embrionarias humanas (ES).

30 Aquí se desvelan métodos para el mantenimiento, paso y diferenciación de células madre pluripotentes que se han liberado como células individuales usando enzimas. En particular, aquí se desvelan métodos para el mantenimiento, paso y diferenciación de células madre pluripotentes que se han liberado como células individuales sin la posterior pérdida en pluripotencia, y sin la adquisición de anomalías cromosómicas.

35 En una realización, la presente invención proporciona un método para diferenciar células madre pluripotentes como células individuales en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático, que comprende las etapas de:

- a) Cultivar células madre pluripotentes como grupos,
- b) Liberar las células madre pluripotentes como células individuales,
- c) Colocar en placas las células madre pluripotentes individuales en un sustrato de cultivo de tejido, y
- d) Diferenciar las células madre pluripotentes individuales.

40 Los grupos de células madre pluripotentes pueden liberarse como células individuales mediante tratamiento enzimático. El tratamiento enzimático puede ser mediante TrypLe™Express, alternativamente mediante TrypLe™Select, alternativamente mediante Tripsina o alternativamente mediante Tripsina/EDTA.

45 El tratamiento enzimático puede durar durante aproximadamente de dos a cinco minutos. Alternativamente, el tratamiento enzimático dura aproximadamente cinco minutos.

50 Las enzimas pueden usarse en una concentración de desde aproximadamente 0,5 g/L a aproximadamente 2,5 g/L enzima.

En una realización, los grupos de células madre pluripotentes se liberan como células individuales usando TrypLe™EXPRESS.

55 En una realización, las células madre individuales son células madre embrionarias. En una realización alternativa, las células madre embrionarias son humanas.

60 En una realización, las células pluripotentes individuales liberadas se colocan en placas en un sustrato de cultivo de tejido. El sustrato puede ser MATRIGEL™, alternativamente el sustrato puede ser fibronectina, alternativamente el sustrato puede ser laminina, alternativamente el sustrato puede ser suero humano o alternativamente el sustrato puede ser colágeno.

65 En una realización, las células pluripotentes individuales liberadas se colocan en placas en un soporte tridimensional. El soporte puede incorporarse con al menos un agente farmacéutico que facilita la supervivencia y función de células pluripotentes individuales liberadas. Los materiales adecuados para el soporte para su uso con fines de la presente invención incluyen materiales sintéticos y naturales en forma de espumas, esponjas, geles, hidrogeles, textiles y estructuras no tejidas.

En una realización el sustrato de cultivo de tejido es MATRIGEL™. El MATRIGEL™ puede usarse en una dilución desde aproximadamente 1:30 a aproximadamente 1:10. En una realización, el MATRIGEL™ se usa en una dilución 1:10.

5

Aquí se desvela un método para mantener células madre pluripotentes, comprendiendo las etapas de:

- a) Obtener células madre pluripotentes,
- b) Liberar las células madre pluripotentes como células individuales, y
- c) Colocar en placas las células madre pluripotentes individuales en un sustrato de cultivo de tejido.

10

Los grupos de células madre pluripotentes pueden liberarse como células individuales mediante tratamiento enzimático. El tratamiento enzimático puede ser mediante TrypLe™Express, alternativamente mediante TrypLe™Select, alternativamente mediante Tripsina o alternativamente mediante Tripsina/EDTA.

15

El tratamiento enzimático puede durar durante aproximadamente de dos a cinco minutos. Alternativamente, el tratamiento enzimático dura aproximadamente cinco minutos.

Las enzimas pueden usarse en una concentración de desde aproximadamente 0,5 g/L a aproximadamente 2,5 g/L enzima.

20

Los grupos de células madre pluripotentes se liberan como células individuales usando TrypLe™Express.

Las células madre individuales son células madre embrionarias. En una realización alternativa, las células madre embrionarias son humanas.

25

Las células pluripotentes individuales liberadas se colocan en placas en un sustrato de cultivo de tejido. El sustrato puede ser MATRIGEL™, alternativamente el sustrato puede ser MATRIGEL™ reducido con factor de crecimiento, alternativamente el sustrato puede ser fibronectina, alternativamente el sustrato puede ser laminina, alternativamente el sustrato puede ser suero humano o alternativamente el sustrato puede ser colágeno.

30

Las células pluripotentes individuales liberadas se colocan en placas en un soporte tridimensional. El soporte puede incorporarse con al menos un agente farmacéutico que facilita la supervivencia y función de células pluripotentes individuales liberadas. Los materiales adecuados para el soporte para su uso con fines de la presente invención incluyen materiales sintéticos y naturales en forma de espumas, esponjas, geles, hidrogeles, textiles y estructuras no tejidas.

35

El sustrato de cultivo de tejido es MATRIGEL™ reducido con factor de crecimiento. El MATRIGEL™ reducido con factor de crecimiento puede usarse en una dilución desde aproximadamente 1:30 a aproximadamente 1:10. En una realización, el MATRIGEL™ se usa en una dilución 1:30.

40

Las células madre pluripotentes individuales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo. Alternativamente, las células madre pluripotentes individuales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático. Alternativamente, las células madre pluripotentes individuales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.

45

Aquí se desvela un método para pasar células madre pluripotentes, comprendiendo las etapas de:

- a) Obtener grupos de células madre pluripotentes,
- b) Liberar las células madre pluripotentes como células individuales,
- c) Colocar en placas las células madre pluripotentes individuales en un sustrato de cultivo de tejido,
- d) Dejar que las células madre pluripotentes se expandan,
- e) Liberar las células madre pluripotentes individuales, y
- f) Colocar en placas las células madre pluripotentes individuales en un nuevo sustrato de cultivo de tejido.

50

Los grupos de células madre pluripotentes pueden liberarse como células individuales mediante tratamiento enzimático. El tratamiento enzimático puede ser mediante TrypLe™Express, alternativamente mediante TrypLe™Select, alternativamente mediante Tripsina o alternativamente mediante Tripsina/EDTA.

55

El tratamiento enzimático puede durar durante aproximadamente de dos a cinco minutos. Alternativamente, el tratamiento enzimático dura aproximadamente cinco minutos. Las enzimas pueden usarse en una concentración de desde aproximadamente 0,5 g/L a aproximadamente 2,5 g/L enzima.

60

Los grupos de células madre pluripotentes se liberan como células individuales usando TrypLe™Express.

Las células pluripotentes individuales crecen en una densidad de aproximadamente 70 a 80% antes de que las células se vuelvan a someter a paso enzimático a un nuevo sustrato de cultivo de tejido. Las células madre pluripotentes pueden pasar una vez, o pueden pasar más de una vez usando los métodos aquí desvelados.

5 Las células madre individuales son células madre embrionarias. En una realización alternativa, las células madre embrionarias son humanas.

10 Las células pluripotentes individuales liberadas se colocan en placas en un sustrato de cultivo de tejido. El sustrato puede ser MATRIGEL™, alternativamente el sustrato puede ser MATRIGEL™ reducido con factor de crecimiento, alternativamente el sustrato puede ser fibronectina, alternativamente el sustrato puede ser laminina, alternativamente el sustrato puede ser suero humano o alternativamente el sustrato puede ser colágeno.

15 Las células pluripotentes individuales liberadas se colocan en placas en un soporte tridimensional. El soporte puede incorporarse con al menos un agente farmacéutico que facilita la supervivencia y función de células pluripotentes individuales liberadas. Los materiales adecuados para el soporte para su uso con fines de la presente invención incluyen materiales sintéticos y naturales en forma de espumas, esponjas, geles, hidrogeles, textiles y estructuras no tejidas.

20 El sustrato de cultivo de tejido es MATRIGEL™ reducido con factor de crecimiento. El MATRIGEL™ reducido con factor de crecimiento puede usarse en una dilución desde aproximadamente 1:30 a aproximadamente 1:10. En una realización, el MATRIGEL™ se usa en una dilución 1:30.

25 **Otros métodos para aislamiento, expansión y cultivo de células madre pluripotentes**

Caracterización de células madre pluripotentes

30 Las células madre pluripotentes pueden expresar uno o más antígenos embrionarios específicos de fase (SSEA) 3 y 4, y marcadores detectables que usan anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81 (Thomson et al., Science 282:1145, 1998). La diferenciación de células madre pluripotentes *in vitro* da como resultado la pérdida de expresión de SSEA-4, Tra-1-60 y Tra-1-80 (si está presente) y el aumento de expresión de SSEA-1. Las células madre pluripotentes no diferenciadas pueden tener típicamente actividad de fosfatasa alcalina, que puede detectarse fijando las células con 4% paraformaldehído y después desarrollarlas con Vector Rojo como sustrato, como lo describe el fabricante (Vector Laboratories, Burlingame Calif.). Las células madre pluripotentes no diferenciadas también expresan típicamente Oct-5 y TERT, como lo detecta RT-PCR.

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

45 Las líneas de células madre pluripotentes propagadas pueden estar cariotipadas usando una técnica de G-bandeo y se comparó con cariotipos publicados de la correspondiente especie de primate. Es deseable obtener células que tengan un "cariotipo normal", lo que significa que las células son euploides, donde todos los cromosomas humanos están presentes y no se alteran notablemente.

50 *Fuentes de células madre pluripotentes*

55 Se desvelan tipos de células madre pluripotentes que incluyen líneas de células pluripotentes derivadas de tejido formado después de la gestación, que incluye tejido pre-embionario (como, por ejemplo, un blastocisto). Los ejemplos de referencia no limitativos incluyen líneas establecidas de células pluripotentes derivadas de tejido embionario, o tejido fetal tomado en cualquier momento durante la gestación, típicamente, aunque no necesariamente, antes de aproximadamente la semana 10-12 de gestación. Los ejemplos de referencia no limitativos establecen líneas de células madre embrionarias humanas o células germinales embrionarias humanas, como por ejemplo las líneas de células madre embrionarias humanas H1, H7 y H9 (WiCell). También se contempla el uso de las composiciones de esta divulgación durante el establecimiento inicial o estabilización de tales células, en cuyo caso las células fuente serían células pluripotentes primarias tomadas directamente de los tejidos fuente. También son adecuadas células tomadas de una población de células madre pluripotentes ya cultivadas en ausencia de células alimentarias. También son adecuadas líneas de células madre embrionarias humanas. Un ejemplo de referencia no limitativo de una línea celular madre embrionaria humana es BG01v (BresaGen, Atenas, GA).

65 *Cultivo de células madre pluripotentes*

- 5 En una realización, las células madre pluripotentes se cultivan típicamente en una capa de células alimentarias que soportan las células madre pluripotentes de varias maneras. Alternativamente, las células madre pluripotentes se cultivan en un sistema de cultivo que está esencialmente libre de células alimentarias, pero sin embargo soporta la proliferación de células madre pluripotentes sin sufrir una diferenciación sustancial. El crecimiento de células madre pluripotentes en cultivo libre de alimentación sin diferenciación se soporta usando un medio acondicionado por un cultivo previo con otro tipo de célula. Alternativamente, el crecimiento de células madre pluripotentes en un cultivo libre de alimentación sin diferenciación se soporta usando un medio químicamente definido.
- 10 Por ejemplo, Reubinoff et al (Nature Biotechnology 18: 399-404 (2000)) y Thompson et al (Science 6 Noviembre 1998: Vol. 282. Nº 5391, págs. 1145-1147) desvelan el cultivo de líneas de células madre pluripotentes de blastocistos humanos usando una capa de célula alimentaria de fibroblasto embrionario de ratón.
- 15 Richards et al, (Stem Cells 21: 546-556, 2003) evaluó un panel de 11 capas de células alimentarias humanas diferentes de adulto, fetal y neonatal para su habilidad para soportar un cultivo de células madre pluripotentes humanas. Richards et al, expone: "las líneas celulares madre embrionarias humanas cultivadas en alimentadores de fibroblasto de piel de adulto retienen morfología de célula madre embrionaria humana y se mantienen pluripotentes".
- 20 US20020072117 desvela líneas celulares que producen medios que soportan el crecimiento de células madre pluripotentes de primate en cultivo libre de alimentación. Las líneas celulares empleadas son mesenquimales y líneas celulares de tipo fibroblasto obtenidas de tejido embrionario o diferenciadas de células madre embrionarias. US20020072117 también desvela el uso de las líneas celulares como una capa de célula alimentaria primaria.
- 25 En otro ejemplo, Wang et al (Stem Cells 23: 1221-1227, 2005) desvela métodos para crecimiento a largo plazo de células madre pluripotentes humanas en capas de células alimentarias derivadas de células madre embrionarias humanas.
- 30 En otro ejemplo, Stojkovic et al. (Stem Cells 2005 23: 306-314, 2005) desvela un sistema de célula alimentarias derivado de la diferenciación espontanea de células madre embrionarias humanas.
- En un ejemplo más, Miyamoto et al (Stem Cells 22: 433-440, 2004) desvela una fuente de células alimentarias obtenidas de placenta humana.
- 35 Amit et al (Biol. Reprod 68: 2150-2156, 2003) desvela una capa de célula alimentaria derivada de prepucio humano.
- En otro ejemplo, Inzunza et al. (Stem Cells 23: 544-549, 2005) desvela una capa de célula alimentaria de fibroblastos de prepucio post-natal humano.
- 40 US6642048 desvela medios que soportan el crecimiento de células madre pluripotentes de primate (MPP) en un cultivo libre de alimentación, y líneas celulares útiles para la producción de tal medio. US6642048 expone: "Esta invención incluye líneas celulares mesenquimales y de tipo de fibroblasto obtenidas a partir de tejido embrionario o diferenciadas de células madre embrionarias. Los métodos para derivar tales líneas celulares, medios de procesamiento y células madre en crecimiento que usan el medio acondicionado se describen e ilustran en esta divulgación".
- 45 En otro ejemplo, WO2005014799 desvela un medio acondicionado para el mantenimiento, proliferación y diferenciación de células de mamíferos. WO2005014799 expone: "El medio de cultivo producido de acuerdo con la presente invención está acondicionado por la actividad de secreción celular de células murinas, en particular aquellos hepatocitos transgénicos diferenciados e inmortalizados, llamados HME (Hepatocito Murino Encontrado)".
- 50 En otro ejemplo, Xu et al (Stem Cells 22: 972-989, 2004) desvela medio acondicionado obtenido a partir de derivados de célula madre embrionaria humana que se han modificado genéticamente para sobreexpresar transcriptasa inversa de telomerasa humana.
- 55 En otro ejemplo, US20070010011 desvela un medio de cultivo químicamente definido para el mantenimiento de células madre pluripotentes.
- 60 Un sistema de cultivo alternativo emplea medio libre de suero complementado con factores de crecimiento capaces de promover la proliferación de células madre embrionarias. Por ejemplo, Cheon et al (BioReprod DOI:10.1095/bioreprod.105.046870, Octubre 19, 2005) desvela un sistema de cultivo libre de alimentación y libre de suero donde la células madre se mantienen en un medio no acondicionado con sustitución de suero (SS) complementado con diferentes factores de crecimiento capaces de provocar la auto-renovación de célula madre embrionaria.
- 65

En otro ejemplo, Levesnstein et al (Stem Cells 24: 568-574, 2006) desvela métodos para el cultivo a largo plazo de células madre embrionarias humanas en ausencia de fibroblastos o medio acondicionado, usando medio complementado con FCFb.

5 En otro ejemplo, US2005014070 desvela un método para cultivar células madre embrionarias humanas en medio definido sin suero y sin células alimentarias de fibroblasto, comprendiendo el método: cultivar las células madre en un medio de cultivo que contienen albúmina, aminoácidos, vitaminas, minerales, al menos una transferrina o un sustituto de transferrina, , al menos una insulina o sustituto de insulina, el medio de cultivo esencialmente libre de suero fetal de mamífero y conteniendo al menos 100 ng/ml de un factor de crecimiento de fibroblasto capaz de
10 activar un receptor señalizador de factor de crecimiento de fibroblasto, donde el factor de crecimiento se suministra de una fuente diferente a la de la capa alimentaria de fibroblasto, soportando el medio la proliferación de células madre en un estado no diferenciado sin células alimentarias o medio acondicionados.

15 En otro ejemplo, US20050233446 desvela un medio definido útil en el cultivo de células madre, que incluye células madre primordiales de primate no diferenciadas. En solución, el medio es esencialmente isotónico en comparación con células madre que se están cultivando. En un cultivo dado, el medio particular comprende un medio base y una cantidad de cada FCFb, insulina y ácido ascórbico necesaria para soportar sustancialmente el crecimiento no diferenciados de las células madre primordiales.

20 En otro ejemplo, US6800480 expone: "En una realización, se proporciona un medio de cultivo celular para hacer crecer células madre primordiales derivadas de primate en un estado sustancialmente no diferenciado que incluye una presión osmótica baja, medio básico de endotoxina bajo que es efectivo para soportar el crecimiento de células madre primordiales derivadas de primate. El medio básico se combina con un suero nutriente efectivo para soportar el crecimiento de células madre primordiales derivadas de primate y un sustrato seleccionado del grupo
25 consistente en células alimentarias y un componente de matriz extracelular derivada de célula alimentaria. El medio incluye además aminoácidos no esenciales, un antioxidante, y un primer factor de crecimiento seleccionado del grupo consistente en nucleósidos y una sal de piruvato".

30 En otro ejemplo, US20050244962 expone: "En un aspecto la invención proporciona un método para cultivar células madre embrionarias de primate. Las células madre se cultivan en un cultivo esencialmente libre de suero fetal de mamífero (preferentemente también libre de cualquier suero animal) y en presencia de factor de crecimiento de fibroblasto que se suministra de una fuente diferente a la de una capa alimentaria de fibroblasto. En una forma preferente, la capa alimentaria de fibroblasto, previamente requerida para mantener un cultivo de célula madre, se vuelve innecesaria por la adición de suficiente factor de crecimiento de fibroblasto".
35

En un ejemplo más, WO2005065354 desvela un medio de cultivo definido e isotónico que está esencialmente libre de alimentación y libre de suero, que comprende: a) medio basal; b) una cantidad de FCFb suficiente para soportar el crecimiento de células madre de mamífero sustancialmente no diferenciadas; c) una cantidad de insulina suficiente para soportar el crecimiento de células madre de mamífero sustancialmente no diferenciadas; y d) una cantidad de ácido ascórbico suficiente para soportar el crecimiento de células madre de mamífero sustancialmente no diferenciadas.
40

45 En otro ejemplo, WO2005086845 desvela un método para mantenimiento de una célula madre no diferenciadas, comprendiendo dicho método la exposición de una célula madre a un miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento transformante beta (FCT β), un miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento de fibroblasto (FCF), o nicotinamida (NIC) en una cantidad suficiente para mantener la célula en un estado no diferenciado durante una cantidad suficiente de tiempo para conseguir un resultado deseado.

50 Las células madre pluripotentes pueden colocarse en placas en un sustrato de cultivo adecuado. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es un componente de matriz extracelular, como por ejemplo, aquellos derivados de membrana base o que pueden formar parte de enlaces receptor-ligando de molécula de adhesión. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es MATRIGEL™ (Becton Dickenson). MATRIGEL™ es una preparación soluble de células tumorales Engelbreth-Holm-Swarm que gelifica a temperatura ambiente para formar una membrana base reconstituida.
55

Otros componentes de matriz extracelular y mezclas de componentes son adecuados como alternativa. Dependiendo del tipo de célula que está proliferando, puede incluir laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, heparán sulfato y similares, o solo o en varias combinaciones.

60 Las células madre pluripotentes pueden colocarse en placas en el sustrato en una distribución adecuada y en presencia de un medio que promueva la supervivencia, propagación y retención celular de las características deseadas. Todas estas características se benefician de la atención cuidadosa a la distribución de siembra y un experto en la técnica puede determinarlas fácilmente.

65 El medio de cultivo adecuado puede hacerse de los siguientes componentes, como, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (MEMD), Gibco # 11965-092; medio de Eagle modificado por Dulbecco Knockout

(MEMD KO), Gibco # 10829-0108; Ham's F12/50% MEMD medio basal; 200 mM L-glutamina, Gibco # 15039-027; solución de aminoácido no esencial, Gibco 11140-050; β -mercaptoetanol, Sigma # M7522; factor de crecimiento de fibroblasto básico recombinante humano (FCFb), Gibco # 13256-029.

5 Diferenciación de células madre pluripotentes

De acuerdo con la presente divulgación, las células madre pluripotentes se propagan en el cultivo, mientras mantienen su pluripotencia. Los cambios en la pluripotencia de las células con el tiempo pueden determinarse detectando cambios en los niveles de expresión de marcadores asociados con pluripotencia. Alternativamente, los cambios en la pluripotencia pueden determinarse detectando cambios en los niveles de expresión de marcadores asociados con diferenciación o marcadores asociados con otro tipo de célula.

Las células madre pluripotentes se propagan en cultivo y después se tratan de una manera que se promueve su diferenciación en otro tipo de célula. El otro tipo de célula puede ser una célula que exprese marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo. Alternativamente, el tipo de célula puede ser una célula que exprese marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático. Alternativamente, el tipo de célula puede ser una célula que exprese marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. Alternativamente, el tipo de célula puede ser una célula que exprese marcadores característicos del linaje de célula β .

Las células madre pluripotentes tratadas de acuerdo con los métodos de la presente divulgación pueden diferenciarse en una variedad de otros tipo de células mediante cualquier método adecuado en la técnica. Por ejemplo, las células madre pluripotentes de acuerdo con los métodos de la presente divulgación pueden diferenciarse en células neurales, células cardíacas, hepatocitos y similares.

Por ejemplo, las células madre pluripotentes tratadas de acuerdo con los métodos de la presente divulgación pueden diferenciarse en progenitores neurales y cardiomiocitos de acuerdo con los métodos desvelados en WO2007030870.

En otro ejemplo, las células madre pluripotentes de acuerdo con los métodos de la presente divulgación pueden diferenciarse en hepatocitos de acuerdo con los métodos desvelados en la patente de Estados Unidos 6.458.589.

35 Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo

Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo por medio de cualquier método en la técnica.

Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en D'Amour et al., Nature Biotechnology 23, 1534-1541 (2005).

Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en Shinozaki et al., Development 131, 1651-1662 (2004).

Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en MacLean, Stem Cells 25,29-38 (2007).

Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en D'Amour et al., Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006).

Los marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo se seleccionan del grupo consistente en SOX17, GAT4, Hnf-3beta, GSC, Cer1, Nodal, FGF8, Braquiuria, proteína homeobox de tipo mezcla, FGF4, CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA-6, CXCR4, C-Kit, CD99 u OTX22. Adecuada para su uso en la presente divulgación es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo. En un aspecto de la presente divulgación, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo es una célula precursora de sucesión primitiva. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo es una célula de mesendodermo. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo es una célula de endodermo definitivo.

65 Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático

Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático por medio de cualquier método en la técnica.

5 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático de acuerdo con los métodos desvelados en D'Amour et al., Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006).

10 Los marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático se seleccionan del grupo consistente en Pdx1, HNF-1beta, PTF1a, HNF-6, HB9 y PROX1. Adecuada para su uso en la presente divulgación es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático es una célula de endodermo pancreático.

15 **Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático**

Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático por medio de cualquier método en la técnica.

20 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático de acuerdo con los métodos desvelados en D'Amour et al., Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006).

25 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático mediante los métodos desvelados en Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006).

30 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático mediante los métodos desvelados en D'Amour et al., Nature Biotechnology 2006.

35 Los marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo se seleccionan del grupo consistente en NGN-3, NeuroD, Isl1, Pdx-1, NKX6.1, Pax-4 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. Adecuada para su uso en la presente invención es 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 endocrina pancreática. La célula endocrina pancreática puede ser una célula que expresa hormona pancreática.

40 En un aspecto de la presente invención, la célula endocrina pancreática es una célula que expresa marcadores característicos del linaje de célula β . Una célula que expresa marcadores característicos del linaje de célula β expresa Pdx1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN-3, Nkx2.2, Nkx6.1, NeuroD, Isl1, HNF-3 beta, MAFA, Pax4 y Pax6. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de célula β es una célula β .

45 **Soportes tridimensionales**

50 Los materiales de soporte para su uso para fines de la presente invención incluyen materiales sintéticos y naturales en forma de espumas, esponjas, geles, hidrogeles, textiles, y estructuras no tejidas, que se han usado in vitro e in vivo para reconstruir o regenerar tejido biológico, así como para entregar agentes quimiotácticos para inducir crecimiento de tejido, y adecuados para su uso en la práctica de métodos de la presente invención. Véase, por ejemplo, los materiales desvelados en patente de Estados Unidos 5.770.417, patente de Estados Unidos 6.022.74, patente de Estados Unidos 5.567.612, patente de Estados Unidos 5.759.830, patente de Estados Unidos 6.626.950, patente de Estados Unidos 6.534.084, patente de Estados Unidos 6.306.424, patente de Estados Unidos 6.365.149, patente de Estados Unidos 6.599.323, patente de Estados Unidos 6.656.488, solicitud publicada de Estados Unidos 2004/0062753 A1, patente de Estados Unidos 4.557.264 y patente de Estados Unidos 6.333.029.

60 Para formar un soporte incorporado con un agente farmacéutico, el agente farmacéutico puede mezclarse con la solución de polímero antes de formar el soporte. Alternativamente, un agente farmacéutico puede estar cubierto en un soporte fabricado, preferentemente en presencia de un transportador farmacéutico. El agente farmacéutico puede estar presente como un líquido, un sólido finamente dividido o cualquier otra forma física apropiada. Alternativamente, pueden añadirse excipientes al soporte para alterar la velocidad de liberación del agente farmacéutico. En una realización alternativa, el soporte está incorporado con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto antiinflamatorio desvelado en la patente de Estados Unidos 6.509.369.

65

El soporte puede estar incorporado con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto anti-apoptótico, como por ejemplo, compuestos desvelados en la patente de Estados Unidos 6.793.945.

5 El soporte puede estar incorporado con al menos un compuesto farmacéutico que es un inhibidor de fibrosis, como por ejemplo, compuestos desvelados en la patente de Estados Unidos 6.331.298.

10 El soporte puede estar incorporado con al menos un compuesto farmacéutico que es capaz de mejorar la angiogénesis, como por ejemplo, compuestos desvelados en la solicitud publicada de Estados Unidos 2004/0220393 y la solicitud publicada de Estados Unidos 2004/0209901.

15 El soporte puede estar incorporado con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto inmunodepresivo, como por ejemplo, compuestos desvelados en la solicitud publicada de Estados Unidos 2004/0171623.

La presente invención se ilustra además, aunque no se limita por, los siguientes ejemplos:

EJEMPLOS

20 Ejemplo 1

Paso y mantenimiento de CMEh como grupos celulares

25 Las líneas de células madre embrionarias humanas H1 y H9 se mantuvieron en fibroblastos embrionarios de ratones (FER) primarios inactivados con mitomicina C. Las células MEh se cambiaron de alimentadores FER a MATRIGEL™ durante paso repetidos.

30 Baño de MATRIGEL™ de platos de cultivo de tejido: MATRIGEL™ reducido con factor de crecimiento (Becton-Dickinson, Bedford, Mass) se congeló a 4 °C y después de diluyó 1:30 en DMEM frío/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se añadieron volúmenes suficientes para cubrir a cada uno de los platos de 6 cm (2ml) o cada pocillo de una placa de 6 pocillos (1mL) y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se usaron después de unas horas o se almacenaron a 4 °C hasta dos semanas.

35 Cultivo de célula madre embrionaria humana: Colonias de células madre embrionarias humanas no diferenciadas (H9 y H1) se cosecharon de capas alimentadoras mediante incubación en 1 mg/ml colagenasa IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en DMEM/F12 durante 10 minutos, seguido de descarte con una pipeta. Los grupos de células se transformaron en pellets mediante centrifugación a 1000 rpm durante cuatro minutos y el pellet se dispersó suavemente con una pipeta de 2 ml para romper colonias en pequeños grupos de células. Estos grupos de células se sembraron en platos cubiertos con MATRIGEL™ en FER-CM complementado con FCFb (8ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN); 50-150 colonias por plato de 6 cm en 5ml de medio de crecimiento. El medio se cambió a diario. Las colonias en MATRIGEL™ en FER-CM se hicieron más grandes y pasaron cuando ocuparon el 70-80% del área de superficie, aproximadamente cada 3-4 días. Las células MEh en las colonias tenían una alta proporción de núcleo con citoplasmo y tuvieron nucléolos prominentes, similares a las células MEh mantenidas en alimentadores (Figura 1). Las células diferenciadas representaron menos del 5% del total de células en el cultivo.

45 Para paso rutinario de células en FER-CM en MATRIGEL™, las células se incubaron en 1mg/ml colagenasa IV en DMEM/F12 hasta 60 minutos y se retiraron de los platos mediante corrientes energías de DMEM/F12 con descarte. Las células se transformaron en pellets, dispersaron y sembraron en una proporción de 1:3 o 1:4.

50 Ejemplo 2

Paso de células madre embrionarias humanas como células individuales: Evaluación de enzimas

55 Para facilitar la manipulación de células MEh, las técnicas de paso pueden usar otras soluciones enzimáticas que necesitan menor tiempo de incubación y no incluyen la etapa de descarte. Además, el paso de células como grupos de células no permite la cuantificación numérica de las células que se siembran. Hay disponibles muchas soluciones enzimáticas para liberar células individuales en una etapa rápida. Una enzima de rápida actuación que provoque el mínimo daño a la célula y no impida la unión de las células o el crecimiento celular se identificó mediante el siguiente experimento.

60 Las células madre embrionarias humanas H9p33 que crecieron en grupos en un plato con 6 pocillos se incubaron con las siguientes enzimas: TrypLE™ Express, TrypLE™ Select, tripsina/EDTA (0,05%) o tripsina (0,25%) durante dos minutos a 36 °C. Todas las enzimas liberaron las células después de dos minutos excepto tripsina. La liberación con tripsina se consiguió después de cinco minutos a 36 °C. Las células se sembraron en 200.000 células/pocillo en una p laca con 6 pocillos cubierta con MATRIGEL™ y se dejaron expandir durante tres días. Las

5 células madre embrionarias humanas también pasaron como grupos con colagenasa (30 minutos de incubación) y se volvieron a sembrar en una dilución 1:5 en pocillos cubiertos con MATRIGEL™, similar a las células cuantificadas con TrypLE™ Express. Después de tres días, las CMEh se liberaron mediante una incubación de cinco minutos con TrypLE™ Express. Las células se incubaron con 0,01% azul de tripano y después se contabilizaron (Tabla 1). La
 10 viabilidad celular inmediatamente después de la liberación fue mayor que el 98% para todas las enzimas testadas. El paso de célula madre embrionarias humanas con colagenasa es el método estándar de paso. Después de tres días de cultivo, tanto TrypLE™ Select como TrypLE™ Express produjeron recuentos de células recuperadas similares a colagenasa. Tripsina/EDTA y tripsina fueron significativamente menos efectivos en el mantenimiento de unión celular/crecimiento. TrypLE™ Select y TrypLE™ Express fueron las mejores enzimas evaluadas y se volvieron a probar en un experimento de curso de tiempo, Ejemplo 3.

Ejemplo 3

15 **Paso de células madre embrionarias humanas como células individuales: Optimización de tiempo de exposición de enzima**

TrypLE™ Select y TrypLE™ Express demostraron ser óptimos para todas las enzimas testadas. Para determinar el tiempo ideal de incubación para estas enzimas con células MEh, TrypLE™ Select y TrypLE™ Express se incubaron con grupos H9p34 de CMEh durante dos minutos o 10 minutos a 37 °C. Alícuotas de 200.000
 20 células/pocillo se sembraron en una placa con 6 pocillos. Las células crecieron durante tres días seguido de liberación con TrypLE™ Express en presencia de azul de tripano 0,01%.

La viabilidad celular fue mayor que el 98% para ambas enzimas para ambos tiempo de incubación. La Tabla II indica el número de células/pocillo recuperadas 36 horas después de la siembra. Las células que pasaron con TrypLE™ Express alcanzaron la densidad inicial de siembra después de tres días. Esto indica que la mayoría de células no se vuelven a unir después de la siembra; sin embargo, las células que no se unen son capaces de proliferar y expandirse. Asumiendo que las células se expanden a la misma velocidad una vez se unen, estos datos demuestran que un tratamiento de dos minutos con TrypLE™ Express da como resultado el mejor índice de unión.
 30 Los tratamientos con TrypLE™ Express durante dos minutos se usaron después para hacer células individuales en todos los experimentos posteriores.

Ejemplo 4

35 **Diferenciación de células madre embrionarias humanas – células individuales y grupos celulares para endodermo definitivo**

Las células madre embrionarias pueden diferenciarse en múltiples linajes celulares. Las células ME humanas que pasan como células individuales ofrecen una mejora significativa para ayudar en la cuantificación de entrada celular y facilitar su manipulación. Se determinó habilidad para estas células MEh individuales para diferenciarse.
 40

Siembra de grupos celulares y células individuales: Una placa de 6 cm de grupos de células H9 o H1 en factor de crecimiento reducido MATRIGEL™ se incubó con 2ml colagenasa (1 mg/ml) en DMEM:F12 hasta 60 minutos a 37 °C. Las células se retiraron con pipeta y se descartaron y centrifugaron durante 4 minutos a 900 rpm. Los grupos de células se sembraron después en una placa con 6 pocillos cubierta con 1:12 o 1:30 factor de crecimiento reducido MATRIGEL™. Este método de paso dio como resultado grupos de células de siembra (gc). Alternativamente, una placa de 6 cm de grupos de células H9 o H1 en factor de crecimiento reducido MATRIGEL™ se incubaron con TrypLE™ Express (2ml) durante 5 minutos a 37 °C y se dispersaron con pipeta. Después de la centrifugación a 900 rpm durante 4 minutos, las células se sembraron después en una placa con 6 pocillos cubierta con 1:10 de factor de crecimiento reducido MATRIGEL™ y se llamaron células individuales (ci).
 50

Diferenciación de endodermo definitivo: las cultivos H9 y H1 gc y ci en aproximadamente 60 a 70% de confluencia se expusieron a un medio DMEM:F12 complementado con 0,5% SFB, 10 ng/ml Wnt3a (R&D Systems) y 100 ng/ml Activina A (AA; R&D Systems) durante dos días, seguido de tratamiento con medio DMEM/F12 complementado con 2% SFB y 100 ng/ml activina A durante tres días adicionales.
 55

Los cultivos se analizaron con CCAF para expresión de CXCR4, CD99 y CD9 y mediante PCR en tiempo real para SOX-17, SOX-7, proteína alfa-fetal (PAF), CXCR4, Braquiuria (Bry), gosecoide (GSC), HNF-3 beta y GATA4. PAF y SOX-7 son considerados marcadores de endodermo visceral, mientras que GATA4, HNF-3 beta y SOX-17 representan marcadores de endodermo definitivo y GSC, Bry y CXCR4 representan marcadores de sucesión primitiva. Las células individuales diferenciadas para DE hasta un punto similar que los grupos celulares como los observados a través del porcentaje de células positivas CXCR4 resultantes (Figura 2).
 60

Ejemplo 5

65 **Diferenciación de células individuales MEh y grupos celulares para endodermo pancreático**

Una diferenciación adicional, seguida del protocolo publicado por Novocell (D'Amour KA et al., Nature Biotechnology (2006), 24(11), 1392-1401) con modificaciones, también se probó para determinar la capacidad de diferenciación de las células individuales MEh. Las células se diferenciaron además en endodermo pancreático siguiendo el protocolo DE descrito en el Ejemplo 4.

Diferenciación de endodermo pancreático: Uno de los experimentos DE con H9 (p37), que usó tanto grupos de células como células individuales del ejemplo 4, se diferenció además para endodermo pancreático. Después de la finalización del protocolo de endodermo definitivo, las células se incubaron durante 3 días con FCF10 (50ng/ml; R&D Systems), el inhibidor de erizo sónico, ciclopamina KAAD (2,5uM; Sigma-Aldrich) y 2% SFB en medio DMEM:F12. Después, las células se incubaron tres días adicionales con FCF10 (50ng/ml), KAAD ciclopamina (2,5uM), ácido retinoico (1uM; Sigma-Aldrich) y 1% B27 (Invitrogen) en DMEM con glucosa baja. Después, las células se incubaron tres días adicionales con Exendina 4 (50ng/ml; Sigma-Aldrich), DAPT (1uM; Calbiochem), y 1% B27 en DMEM con glucosa baja. Se tomaron muestras de ARN de un pocillo de una placa con 6 pocillos para cada tipo de célula y después se analizó mediante PCR a tiempo real en esta etapa para marcadores pancreáticos Pdx1, Nkx6.1, Nkx2.2, Pax4, NeuroD, HNF3b Ptf1a, Insulina y AFP. La diferenciación continuó durante tres días con medio CMRL (Invitrogen) que contenía 50ng/ml, HGF, IGF (R&D Systems) y Exendina 4 (50ng/ml) y 1% B27. La evaluación de los mismos marcadores de endodermo pancreático se repitió en esta fase. Las muestras de ARN para células MEh no tratadas de la misma línea se sometieron a PCR a tiempo real en paralelo con las muestras tratadas. Las muestras tratadas se normalizaron para los controles no tratados fijados para un cambio de pliegue de uno. La expresión Pdx1 se controló y comparó entre células individuales y grupos celulares. La inducción de expresión de marcador de endodermo pancreático fue equivalente entre las células individuales y los grupos celulares (Figura 3). Por lo tanto, las células individuales MEh tienen una capacidad inherente para diferenciarse similar a los grupos de células MEh.

Ejemplo 6

Paso de células MEh como células individuales

El paso de células MEh como células individuales ayudará a la habilidad para aumentar cultivos y facilitar el proceso de fabricación.

Descripción de generación y paso de célula individual: las células H9 crecieron como grupos en MATRIGEL™ como se ha descrito anteriormente. En el paso 38, una placa de 6 cm de células H9 se incubó con 2ml TrypLE™ Express durante 5 minutos a 37 °C. Las células se volvieron a suspender en DMEM:F12 y centrifugaron durante 4 minutos a 900 rpm. Las células se volvieron a sembrar en una proporción de 1:4 en placas cubiertas con factor de crecimiento reducido MATRIGEL™ 1:30. Después de aproximadamente cinco pasos, las células se contaron antes de volver a sembrarlas y se colocaron en placas en una densidad de 14.000 células/cm². El paso y la siembra de nuevo en esta densidad continuaron en intervalos de cada cuatro días. Las células mantuvieron una estructura compacta y crecieron de células individuales pero nunca formaron grupos ajustados (comparar la Figura 1 y la Figura 4).

Ejemplo 7

Análisis de pluripotencia célula individual MEh

El mantenimiento de la pluripotencia de célula MEh es necesario con cualquier técnica de paso. Por lo tanto, las células individuales se evaluaron para pluripotencia después de múltiples pasos con TrypLE™ Express.

Análisis de pluripotencia CCAF: las células individuales H9 se cultivaron 38 pasos como grupos seguido de 16 pasos como células individuales incluyendo una criopreservación con congelación-descongelación. Las células se analizaron después con CCAF para la expresión de marcadores de pluripotencia. Las células adherentes se retiraron de las placas de cultivo usando una incubación de cinco minutos con solución TrypLE™ Express. Las células liberadas se volvieron a suspender en medio DMEM:F12 y se recuperaron mediante centrifugación, seguido de lavado y suspensión de nuevo en un búfer colorante que consistía en 2% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 0,05% azida de sodio en PBS. Cuando fue apropiado, las células se boquearon con receptor Fc durante 15 minutos usando una solución 0,1% de gamma globulina (Sigma). Las alícuotas (aproximadamente 10⁵ células) se incubaron con anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina (FE) o alofocianina (AFC) (5 µl anticuerpo por 10⁶ células), como se indica en la Tabla IIIA, con un anticuerpo primario no conjugado. Los controles incluyeron anticuerpos con la combinación apropiada de isotipo, células no manchadas y células manchadas solamente con anticuerpo conjugado secundario. Todas las incubaciones con anticuerpos se realizaron durante 30 minutos a 4 °C y después se lavaron con el búfer colorante. Las muestras que se mancharon con anticuerpos primarios no conjugados se incubaron durante 30 minutos adicionales a 4 °C con anticuerpos etiquetados conjugados secundarios PE o APC. Véase la Tabla IIIB para una lista de anticuerpos secundarios usados. Las células lavadas se transformaron en pellets y se volvieron a suspender en el búfer colorante, y las moléculas de la superficie celular se identificaron usando un instrumento CCAF Array (BD Biosciences), recogiendo al menos 10.000 resultados.

H1p40 y H9scp16 de CMEh con paso de colagenasa tienen perfiles equivalentes de expresión de proteína de pluripotencia (Figura 5).

Ejemplo 8

5

Análisis de células madre embrionarias humanas – Estabilidad de cariotipo de célula individual

El cariotipo de células individuales MEh debería permanecer estable durante múltiples pasos. Las células individuales H9 se cultivaron 38 pasos como grupos seguido de múltiples pasos como células individuales. El cariotipo de células H9 se determinó mediante el análisis estándar de cariotipo de G-bandeo (Cell Line Genetics, Madison, WI). Un total de 20 células con G-bandeo se evaluaron y se analizaron 200 núcleos de interfase mediante FISH (hibridización de fluorescencia in situ). No se encontraron aberraciones de cromosomas en las células analizadas. El análisis citogenético mostró que las células tenían un número normal de autosomas y un número de cromosoma modal de 46. El cariotipo de células individuales H9 se realizó en el paso 13 y el paso 20. Las células del paso 20 habían sido sometidas a una criopreservación de congelación-descongelación. Las células del paso 13 y 20 tuvieron un cariotipo normal (Figura 6).

Ejemplo 9

20

Diferenciación de células individuales MEh y grupos de células MEh para endodermo definitivo

Para última utilidad, las células MEh que pasaron como células individuales deben mantener su potencial de diferenciación. Las células individuales se sometieron al protocolo de endodermo definitivo de la siguiente manera. Las células H9 después de múltiples pasos con TrypLE™ Express (sc-p), se liberaron con TrypLE™ Express (sc) de células con paso individual (paso 6 y 21) en MATRIGEL™ (dilución 1:10) para diferenciación. H9 sc, en aproximadamente monocapas 60 a 70% confluentes, se expusieron a un medio DMEM:F12 complementado con 0,5% SFB, 10 ng/ml Wnt3a y 100 ng/ml Activina A durante dos días, seguido de tratamiento con medio DMEM/F12 complementado con 2% SFB y 100 ng/ml activina A durante tres días adicionales.

El día 5, las células se analizaron con CCAF para expresión de CXCR4, CD99 y CD9 y mediante PCR en tiempo real para SOX-17, SOX-7, proteína alfa-fetal (PAF), CXCR4, Braquiuria (Bry), gosecoide (GSC), HNF-3 beta y GATA4. PAF y SOX-7 son considerados marcadores de endodermo visceral, mientras que GATA4, HNF-3 beta y SOX-17 representan marcadores de endodermo definitivo y GSC, Bry y CXCR4 representan marcadores de sucesión primitiva. Las células individuales que pasaron múltiples veces (paso 6 y 21) mantienen su habilidad para diferenciarse en DE, similar a los grupos celulares (paso 36-55) (Figura 7).

Ejemplo 10

40

Diferenciación de células individuales MEh para endodermo pancreático

Las células se diferenciaron además en endodermo pancreático adhiriéndose a las siguientes etapas; tres días de incubación con FCF10 (50ng/ml), el inhibidor de erizo sónico, ciclopamina KAAD (2,5uM) y 2% SFB en medio DMEM:F12, seguido de tres días con FCF10 (509ng/ml), ciclopamina KAAD (2,5uM), ácido retinoico (1uM) y 1% B27 en DMEM con baja glucosa. La evaluación de las células se realizó el día 11. Algunos cultivos continuaron el tratamiento durante tres días en Exendina 4 (50ng/ml), DAPT (1uM) y 1% B27 en DMEM con baja glucosa. El día 14, las muestras se analizaron para marcadores pancreáticos Pdx1, Nkx6.1, Nkx2.2, Pax4, NeuroD, HNF3b, Ptf1a, Insulina y AFP mediante PCR en tiempo real. Algunos cultivos continuaron la diferenciación durante tres días adicionales con medio CMRL que contenía 50ng/ml, HGF, IGF y Exendina 4 y 1% B27. La evaluación de los mismos marcadores de endodermo pancreático se repitió al final del día 17. Los marcadores del endodermo pancreático, Nkx2.2, NeuroD, HNF6, HNF3b se expresaron predominantemente al final de los días 14 y 17. La expresión Pdx1 aumentó de manera escalonada en cada etapa de tratamiento (Figura 8).

Ejemplo 11

55

Diferenciar células individuales MEh en alimentadores MEF

Para conseguir una diferenciación óptima de células MEh para endodermo pancreático, la población de endodermo definitivo deber ser máximo. En la actualidad, el crecimiento de MEh en alimentadores MEF da como resultado los niveles conseguibles más altos de endodermo definitivo y endodermo pancreático. Para determinar si las células individuales MEh son capaces de conseguir este fin, se sembraron H2scp4 en alimentadores MEF en 14.000/cm2. Las células crecieron en medio de célula ME que contenía 20% sustitución de suero Knock-out (Invitrogen), 1x aminoácidos no esenciales (Invitrogen), 8ng/ml FCFb, 1mM L-glutamina y 1mM solución 2-mercaptoetanol en DMEM-F12. Después de 7 días las células fueron 60-70% confluentes, y se aplicó el protocolo de endodermo definitivo a las células. Específicamente, se añadieron dos días de 100ng/ml Activina A, 10ng/ml Wnt3a y 0,5% SFB en medio DMEM:F12, 100ul por pocillo seguido de tres días de tratamiento con 100ng/ml Activina A y 2% SFB en medio DMEM:F12. Las células después se retiraron con TrypLE™ Express y analizaron mediante CCAF

para expresión de CXCR4, CD99 y CD9 (Figura 9). Más del 90% de las células expresaron CXCR4 y CD99. Menos del 8% de las células expresaron CD9, como se esperaba. La siembra de células individuales H1 en alimentadores MEF mejora la diferenciación de endodermo definitivo como lo determinan los números de células positivas CXCR4.

5 Ejemplo 12

Diferenciar células individuales MEh en placas con 96 pocillos

10 Una dificultad común con el paso de células MEh como grupos es que son difíciles de cuantificar y no crecen a velocidades regulares. Las células individuales tiene la ventaja de que pueden crecer a una monocapa confluyente y pueden contarse antes del paso para asegurar la siembra igual para fines experimentales. Estos atributos son un prerrequisito para la validación exitosa del cribado.

15 CMh H9scp18 se sembraron en placas con 96 pocillos de Packard View (Perkin-Elmer) cubiertas con 1:30 de factor de crecimiento reducido MATRIGEL™ en una densidad de 14.000 células/cm². Las células crecieron durante tres a cuatro días en medio acondicionado MEF y después se trataron usando un protocolo de diferenciación DE. Un subconjunto de 40 pocillos se trató con protocolo estándar (10ng/Wnt3a Activina A y 0,5% SFB en DME:F12 durante dos días). Un segundo subconjunto de 40 pocillos se trató con el inhibidor GSK3b IX (100nM; EMD Chemicals, La Jolla, CA) en lugar de Wnt3a. Esto fue seguido de tratamiento para ambos subconjuntos durante tres días con 100ng/ml Activina A y 2% SFB en DMEM:F12. Al final del cultivo, las células se fijaron con 4% paraformaldehído a temperatura ambiente durante 20 minutos, se lavaron tres veces con PBS y se almacenaron en 100ul PBS durante la noche. Las células se permeabilizaron con 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), a temperatura ambiente durante 20 minutos o a 4 °C durante cinco minutos, después se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con 4% suero de pollo (Invitrogen-Gibco, Carlebad, CA) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios (cabra-anti-hSox17 (R&D Systems) se diluyeron y añadieron en 4% suero de pollo en una dilución 1:1000 durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario, Alexa Fluor 488 suero de pollo anti-cabra IgG (Invitrogen-Molecular Probes, Carlesbad, CA) se diluyó 1:200 en PBS y añadió a las células después de lavarlo tres veces con PBS. Para poner colorante de contraste a los núcleos, se añadieron 5 µM Draq5 (Alexis Palatform, Läufelfingen, Suiza) a las células durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con PBS y se dejaron en 100 µl/pocillo de PBS para tomar la imagen y determinar el número de células DE diferenciadas. La placa se leyó en un Analizador IN Cell 1000 (GE Healthcare; Piscataway, NJ) para una cuantificación pocillo-a-pocillo de número de células y manchado Sox17. El tratamiento con Wnt3a dio como resultado el número más alto de núcleos de células por pocillo con poca variabilidad entre células (Figura 10). El tratamiento con el inhibidor Gsk3β mostró poca viabilidad celular. Claramente, el tratamiento con Wnt3a permite que las células ME formen DE en una manera robusta y reproducible en un formato de 96 pocillos.

Ejemplo 13

Ensayo de cribado con células individuales MEh

40 Después de demostrar que las células individuales son susceptibles de siembra y diferenciación en un formato de 96 pocillos, se determinó la sensibilidad al tratamiento con compuestos nuevos. CMh H9scp19 se sembraron en placas con 96 pocillos cubiertas con 1:30 factor de crecimiento reducido MATRIGEL™ en una densidad de 14.000 células/cm². Las células crecieron durante 3-4 días en medio acondicionado MEF y después se procesaron para experimento de diferenciación DE. Un total de 13 compuestos nuevos se probaron por triplicado en una concentración de 1 a 3 µM, sustituyendo el inhibidor pequeño de molécula por Wnt3a en el protocolo de diferenciación. Los pocillos que contenían Wnt3a (10ng/ml) o inhibidor Gsk3b IX (100 nM) se usaron como controles positivos. Todos los pocillos de diferenciación se trataron con un compuesto individual más 100ng/ml Activina A y 0,5% SFB en DMEM:F12 durante dos días seguido de dos días en ausencia del compuesto con 100ng/ml Activina A y 2% SFB en DMEM:F12. Al final del protocolo, las células se fijaron, permeabilizaron, bloquearon y tiñeron como se ha descrito en el Ejemplo 11 anteriormente para determinar la expresión de Sox 17 y los núcleos. La placa después se leyó en un analizador IN Cell 1000. Esta criba indicó que H9scp21 respondió a 3 de 13 compuestos de una manera similar a Wnt3a en el protocolo de diferenciación (Figura 11). El compuesto A fue efectivo en la dosis inferior 1µM mientras que los compuestos B y C fueron efectivos en 1 y 3 µM. en el rango de tratamiento efectivo (más del 60% de células positivas Sox17), la desviación estándar entre pocillos fue pequeña. Así, las células individuales son consistentes en su habilidad para identificar compuestos nuevos a través de técnicas de cribado.

Ejemplo 14

60 Expansión e células MEh individuales en botellas con rodillo

Para facilitar el aumento para fines de fabricación, las células MEh necesitan expandirse fácilmente en grandes cantidades. Actualmente, el tratamiento con collagenasa para el paso de células MEh no es susceptible de aumentar en botellas con rodillo o matraces agitadores. Las células MEh se expandieron y que crecieron repetidamente como células individuales tiene la habilidad para adherirse uniformemente a diferentes superficies. En este ejemplo, las botellas con rodillo se probaron como recipientes potenciales para el aumento. H9scp19 se

sembraron en 14.000 células/cm² en una botella con rodillo de 480 cm² (6,7 x 10⁶ células; Corning, Acton, MA) cubiertas con 1:30 factor de crecimiento reducido MATRIGEL™. Los volúmenes de 100ml de medio acondicionado MEF por botella se usaron para mantener las células, y se cambió cada dos días. Las botellas se fijaron a 20 rev/hora durante 24 horas y se aumentó a 60 rev/hora durante el resto del tiempo. Las células se adherieron uniformemente a la botella con rodillo y se expandieron visiblemente sobre el cuarto día del periodo de evaluación. Las células se retiraron usando TrypLE™ Express y se contaron. Los resultados de la recuperación indicaron que se obtuvieron 13x10⁶ células por botella, lo que indica que ocurrió una duplicación mínima de las células en comparación con la siembra original. Se estima que menos de la mitad de las células inicialmente sembradas se unieron a la botella con rodillo, lo que sugiere que una expansión celular real más grande ocurrió en las botellas con rodillo. Esto demuestra que las células MEh que pasan como células individuales pueden expandirse en un sistema automatizado de botella con rodillo. Se realizarán más experimentos para determinar la velocidad de expansión junto con el mantenimiento de pluripotencia.

Ejemplo 15

Transfección de células MEh individuales

La introducción de ADN en células para hacer tipos transgénicos de células es una característica útil. El ADN puede contener un vector de expresión o un gen reportero para facilitar la diferenciación o para permitir la selección de las células. Las células MEh han demostrado ser difíciles de transfectar en grupos. Sin embargo, las células MEh individuales pueden ser más susceptibles de técnicas de transfección.

Las células H9p33 pasaron con TrypLE™ Express y se sembraron en 20.000 células/cm² en una placa cubierta con 1:30 factor de crecimiento reducido MATRIGEL™. Las células H9p33 pasaron con colagenasa y se sembraron de una placa de 6 cm a un pocillo de una placa con 6 pocillos cubierta con 1:30 factor de crecimiento reducido MATRIGEL™. Después de 3 días, las células se transfectaron con CMV-GFP, donde GFP se expresa en cada célula bajo el promotor viral CMV. Específicamente, 2 o 4 µg de ADN se diluyeron en 250 µl de medio Opti-MEM y 8 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 250 µl de Opti-MEM. Las mezclas se combinan después de cinco minutos a temperatura ambiente. Los reactivos combinados se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de añadirse a las células cultivadas en dos ml de medio acondicionado MEF. El medio se sustituyó por medio acondicionado MEF cada 24 horas a partir de entonces. Después de tres días, las células se fijaron con 4% paraformaldehído a temperatura ambiente durante 20 minutos, y después se lavaron dos veces con PBS y se dejaron en PBS a 4 °C durante la noche. Para poner colorante de contraste a los núcleos, se añadieron 5 µM Draq5 (Alexis Palatform) a las células durante cinco minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con PBS y se dejaron en 1 ml / pocillo de PBS para tomar la imagen en un Analizador IN Cell 1000 para determinar la eficiencia de transfección (Figura 12). Las células MEh individuales muestran una mejora del doble en eficiencia de transfección sobre grupos de MEh. Por lo tanto, las células MEh individuales tienen una capacidad mejorada de transfección y son más fáciles de modificar genéticamente. Con la optimización, quizás puede ser posible usar otros métodos o reactivos de transfección para conseguir una mejora más dramática de transfección de célula ME individual.

Ejemplo 16

Conversión de grupos de células MEh cultivados en una capa de célula alimentadora a células MEh individuales cultivadas en una matriz extracelular requiere retirada de células alimentadoras

El paso de células de mamífero con enzimas tal como tripsina, tripsina recombinantes (TrypLE™), o Accutase™ (enzima de tipo tripsina derivada de invertebrado) es el estándar actual para cultivo celular de líneas celulares primarias e inmortalizadas en escenarios de investigación y fabricación. Estas enzimas producen una suspensión celular individual homogénea de células que pueden contarse, analizarse, manipularse y pasar de una manera reproducible y susceptible de colocarse en placas en escenarios tan diversos como en un formato de placa de 385 pocillos de alto rendimiento o en un recipiente de cultivo expansible con múltiples litros.

Dadas las ventajas obvias del paso de célula individual, hay un considerable interés en el desarrollo de un método para pasar células madre embrionarias humanas como células individuales. Sin embargo, las mejores prácticas actuales con células madre embrionarias humanas requieren que las células pasen en grupos mediante interrupción manual o pasen con una enzima (colagenasa o proteasa neutral) que mantenga grupos de células embrionarias. La investigación en el pasado de esta área ha dado como resultado la derivación de células que pueden pasar como células individuales en alimentadores (línea Cellartis SCEDTM461), o la derivación de células individuales de grupos que pasaron con colagenasa a células individuales en MATRIGEL™ con Accutase™ (R. Bajpai et al., 2008).

Aquí hay un intento de desarrollar un método de paso de célula individual para tomar células MEh directamente de alimentadores a matrigel en un método de paso al por mayor usando TrypLE™ o Accutase™. Los resultados indican que tomar el paso basado de alimentadores de estilo grupo de células MEh directamente a MATRIGEL™ usando paso a granel bien con TrypLE™ o Accutase™ sin una etapa intermedia de paso de grupo

basado en colagenasa en MATRIGEL™ es ineficiente debido a la aparición de una población celular diferenciada y es por lo tanto menos probable que dé como resultado un cultivo robusto y homogéneo de células MEh.

Resultados

5

En un esfuerzo por mover a un cultivo libre de alimentador de células MEh de un cultivo con base alimentadora, se pasaron células MEh H1 con paso 37 que habían sido soportadas por una capa alimentadora MEF en medio de CMEh y crecieron durante 5 días en pocillos de 10 cm² de placas con 67 pocillos. Las células pasaron con TrypLE™, Accutase™ o 1 mg/ml de colagenasa.

10

Antes de añadir enzima a las células, el medio gastado se aspiró, se añadió 1 ml de PBS (no Ca²⁺ o Mg²⁺) a cada pocillo, se aspiró y después se añadió 1 ml de enzima a temperatura ambiente (colagenasa, Accutase™ o TrypLE™). Accutase™ o TrypLE™ se usaron en una concentración de reserva después de alcanzar la temperatura ambiente. La colagenasa se retiró de congelación a -80 °C, se descongeló y mezcló con 9 ml DMEM/F12, se filtró de manera estéril y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente antes de su uso.

15

Las células se incubaron en enzima a 37 °C durante 10 minutos. Accutase™ o TrypLE™ provocaron que las células se elevaron completamente del plato después de un tratamiento de 10 minutos. La colagenasa no elevó las células después de 10 minutos de incubación, de manera que las células se descartaron con una pipeta de cristal de 10 ml después de la incubación de 10 minutos. Un ml de 2x Probumin en DMEM-F12 se añadió a cada pocillo y el volumen total combinado en el pocillo se transfirió a un tubo cónico estéril de 50 ml, asegurándose la elevación y suspensión del mayor número de células posibles.

20

Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 200 x seguido de un lavado con 2% Probumin y centrifugación durante 5 minutos a 200 x. Las células después se volvieron a suspender en medio acondicionado MEF y se colocaron en placas en una proporción de 1 a 3,5 en matraces T25 cubiertos con MATRIGEL™ (dilución 1:30 en DMEM) y se colocaron en una incubadora humidificada con 5% CO₂ a 37 °C.

25

El número de células se calculó contando con un hemocitómetro Improved Neubauer. Las células que se elevaron con Accutase™ tuvieron una densidad de 3,8 millones de células / 10 cm² pocillo. Las células que se elevaron con TrypLE™ tuvieron una densidad de 3,7 millones de células / 10 cm² pocillo. La colagenasa no fue contable por el hemocitómetro debido al estilo de colonia. Dada una proporción de partición de 1 a 3,5, colocamos en placas las células tratadas con Accutase en una densidad de siembra de 2,71 millones/matraz T25 o 108.000 células/cm², las células tratadas con TrypLE™ en una densidad de siembra de 2,71 millones/matraz T25 o 105.000 células/cm². Asumimos que los pocillos tratados con colagenasa se sembraron en una densidad similar (de 105.000 a 108.000 células/cm²), ya que no hubo una diferencia apreciable en la densidad de MEh de pocillo a pocillo antes del tratamiento con enzima. Un matraz adicional colocado en una placa con colagenasa elevó células para fines de conteo en el siguiente paso.

30

35

Las células se mantuvieron durante 4 días con cambios diarios de medio acondicionado MEF complementado con 16 µg/ml de FCFb. Después de 4 días en cultivo los cultivos fueron confluentes, y las células MEh tratadas como células individuales formaron monocapas de células MEh con bolsillos ocasionales de fibroblastos, mientras que las células MEh con paso de grupos formaron grupos grandes de estilo colonia de células MEh (Figura 139). Estas células volvieron a pasar después.

40

45

Como se ha descrito previamente, las células se incubaron en enzima a 37 °C durante 10 minutos. Accutase™ y TrypLE™ provocaron que las células se elevaran del plástico y MATRIGEL™ después de un tratamiento de 10 minutos. La colagenasa no elevó células, de manera que las células se volvieron a incubar durante 45 minutos en total a 37 °C. El matraz adicional de colagenasa se elevó con Accutase™. Las células individuales estuvieron después con un hemocitómetro Improved Neubauer.

50

Dos ml de 2% Probumin en DMEM-F12 se añadieron después a cada matraz después de la incubación con enzima, el volumen total (≈4ml) del matraz se pasó a una pipeta arriba y abajo 5-10 veces con el fin de suspender el mayor número de células posibles. La suspensión después se transfirió a un tubo cónico de 50 ml y se centrifugó durante 5 minutos a 200 xg. Las células después se volvieron a suspender en medio acondicionado MEF complementado con 16 µg/ml de FCFb, y después se colocaron en placas en matraces T25 pre-cubiertos con 1:30 MATRIGEL™ en una proporción de 1:4.

55

Las células que pasaron con Accutase™, después de cuatro días en cultivo, tuvieron una densidad de 5,6 millones de células totales (223.000 célula/cm²), las células que pasaron con TrypLE™, después de cuatro días en cultivo, tuvieron una densidad de 5,05 millones de células totales (202.000 células/cm²) y las células que pasaron con colagenasa, después de cuatro días en cultivo, tuvieron una densidad de 3,45 millones de células totales (138.000 células/cm²). Dado que las células pasaron en una proporción de 1:4, las células se colocaron en una densidad de 58.000 células/cm² para paso de Accutase™, 51.000 células/cm² para paso de TrypLE™ y 35.000 células/cm².

60

65

Las células crecieron después durante 6 días adicionales, con cambio diario de medio de medio acondicionado MEF complementado con 16ng/ml de FCFb. Mientras las células que pasaron con colagenasa forman colonias grandes de células densas y homogéneas y las células de tipo diferenciado/fibroblasto son raras, las célula que pasaron con Accutase™ o TrypLE™ crecieron muy despacio y con el tiempo dejaron de crecer o sobrecrecieron con células de tipo fibroblasto que probablemente se formaron de células MEh diferenciadas (Figura 14).

Estos resultados sugieren que una fase intermedia de transición de alimentadores a cultivo libre de alimentador (MATRIGEL™) usando un paso manual o enzima que soporte el paso de estilo grupo (colagenasa o proteasa neutral) es lo mejor para aclimatar las células para el cultivo libre de alimentador en MATRIGEL™ antes de iniciar el paso individual.

Aunque varios aspectos de la invención se han ilustrado anteriormente por referencia a ejemplos y realizaciones preferentes, se apreciará que el alcance de la invención está definida por la descripción anterior sino por las siguientes reivindicaciones apropiadamente interpretadas bajo los principios de la ley de patentes.

TABLA 1: PANEL DE ENZIMA QUE LIBERA CÉLULAS

ENZIMA	NÚMERO DE CÉLULAS (10 ⁵)
Colagenasa	3,5
TRYPLE SELECT	3,15
TRYPLE EXPRESS	2,6
TRIPSINA/EDTA	0,7
TRIPSINA	0,1

TABLA II: Curso de tiempo para paso enzimático de CMEh

ENZIMA	2 MINUTOS ((10 ⁵))	10 MINUTOS (10 ⁵)
TRYPLE EXPRESS	2,1	1,3
TRYPLE SELECT	0,75	1,7

TABLA IIIA: LISTA DE ANTICUERPOS PRIMARIOS USADOS PARA CCAF Y ANÁLISIS DE INMUNOTINCIÓN

Anticuerpo	Proveedor	Isotipo	Clon
SSEA-1	Chemicon (CA)	Ratón IgM	MC-480
SSEA-4	Chemicon (CA)	Rata IgM	MC-813-70
TRA 1-60	Chemicon (CA)	Ratón IgM	TRA 1-60
TRA 1-81	Chemicon (CA)	Ratón IgM	TRA 1-81
TRA 1-85	Chemicon (CA)	Ratón IgM	TRA 1-85
PDGFr-B			
PDX1	Santa Cruz Biotechnology, INC	Cabra IgG	A-17
Sox 17	R&D Systems	Cabra IgG	
CD 9	BD	Ratón IgM	M-L13
CD47			
CD56			
CD99			
CD117			
CD184			
E-Cadherin			

TABLA IIIA: LISTA DE ANTICUERPOS SECUNDARIOS CONJUGADOS USADOS PARA CCAF Y ANÁLISIS DE INMUNOTINCIÓN

Anticuerpos secundario conjugado	Proveedor	Dilución
APC conjugado de cabra anti-ratón IgG	Jackson ImmunoResearch (PA)	1:200
PE conjugado de cabra anti-ratón IgG	Jackson ImmunoResearch (PA)	1:200
PE o APC conjugado de burro anti-conejo	Jackson ImmunoResearch (PA)	1:200
PE o APC conjugado de burro anti-cabra	Jackson ImmunoResearch (PA)	1:200
PE de cabra anti-ratón IgM	SouthernBiotech (AL)	1:200
PE de cabra anti-rata IgM	SouthernBiotech (AL)	1:200
PE de cabra anti-ratón IgG3	SouthernBiotech (AL)	1:200

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para diferenciar células madre pluripotentes como células individuales en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático, que comprende las etapas de:
- a) Cultivar las células madre pluripotentes como grupos,
 b) Liberar las células madre pluripotentes como células individuales,
 c) Colocar en placas las células madre pluripotentes inividuales en un sustrato de cultivo de tejido, y
 d) Diferenciar las células madre pluripotentes individuales.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, donde las células madre pluripotentes se liberan como células individuales mediante tratamiento con una enzima seleccionada del grupo consistente en tripsina, tripsina recombinantes y tripsina/EDTA.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, donde las células madre pluripotentes se liberan como células individuales mediante tratamiento con una enzima en una concentración de desde aproximadamente 0,5 g/L a aproximadamente 2,5 g/l.
- 20 4. El método de la reivindicación 2, donde las células madre pluripotentes se liberan como células individuales mediante tratamiento con una enzima en una concentración de aproximadamente 2,5 g/l.
5. El método de la reivindicación 2, donde las células madre pluripotentes se liberan como células individuales mediante tratamiento con una enzima durante aproximadamente de dos a cinco minutos.
- 25 6. El método de la reivindicación 2, donde las células madre pluripotentes se liberan como células individuales mediante tratamiento con una enzima durante aproximadamente cinco minutos.
7. El método de la reivindicación 2, donde las células madre pluripotentes se liberan como células individuales mediante tratamiento con tripsina recombinante en una concentración de desde aproximadamente 1X a aproximadamente 0,001X.
- 30 8. El método de la reivindicación 2, donde las células madre pluripotentes se liberan como células individuales mediante tratamiento con tripsina recombinante en una concentración de 1X.
- 35 9. El método de la reivindicación 2, donde las células madre pluripotentes se liberan como células individuales mediante tratamiento con tripsina recombinante durante aproximadamente de dos a cinco minutos.
10. El método de la reivindicación 2, donde las células madre pluripotentes se liberan como células individuales mediante tratamiento con tripsina recombinante durante aproximadamente cinco minutos.
- 40 11. El método de la reivindicación 1, donde el sustrato de cultivo de tejido se selecciona del grupo consistente en una preparación soluble de células de tumor Engelbreth-Holm-Swarm que gelifican a temperatura ambiente para formar una membrana con base reconstituida, fibronectina, laminina, suero humano y colágeno.
- 45 12. El método de la reivindicación 11, donde la preparación soluble de células de tumor Engelbreth-Holm-Swarm que gelifican a temperatura ambiente para formar una membrana con base reconstituida se usa en una dilución de desde aproximadamente 1:30 a aproximadamente 1:10.
- 50 13. El método de la reivindicación 12, donde la preparación soluble de células de tumor Engelbreth-Holm-Swarm que gelifican a temperatura ambiente para formar una membrana con base reconstituida se usa en una dilución de 1:10.
14. El método de la reivindicación 1, donde el sustrato de cultivo de tejido es una preparación soluble reducida con factor de crecimiento de células de tumor Engelbreth-Holm-Swarm que gelifican a temperatura ambiente para formar una membrana con base reconstituida.
- 55 15. El método de la reivindicación 13, donde la preparación soluble reducida con factor de crecimiento de células de tumor Engelbreth-Holm-Swarm que gelifican a temperatura ambiente para formar una membrana con base reconstituida se usa en una dilución de desde aproximadamente 1:30 a aproximadamente 1:10.
- 60 16. El método de la reivindicación 14, donde la preparación soluble reducida con factor de crecimiento de células de tumor Engelbreth-Holm-Swarm que gelifican a temperatura ambiente para formar una membrana con base reconstituida se usa en una dilución de 1:30.
- 65 17. El método de la reivindicación 1, donde las células madre pluripotentes son células madre embrionarias.
18. El método de la reivindicación 17, donde las células madre embrionarias son humanas.

FIGURA 1

Grupos de células MEh

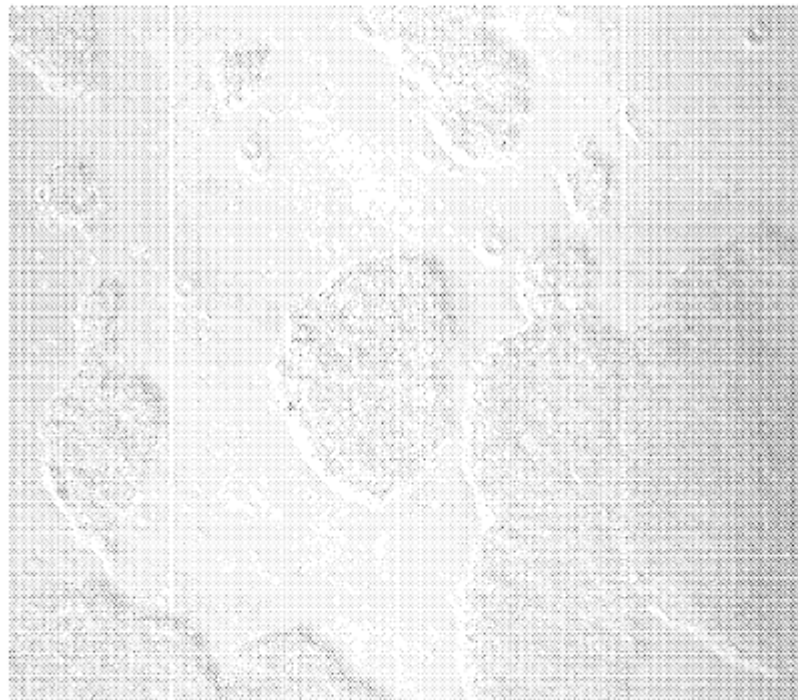


Figura 2

Diferenciación a DE

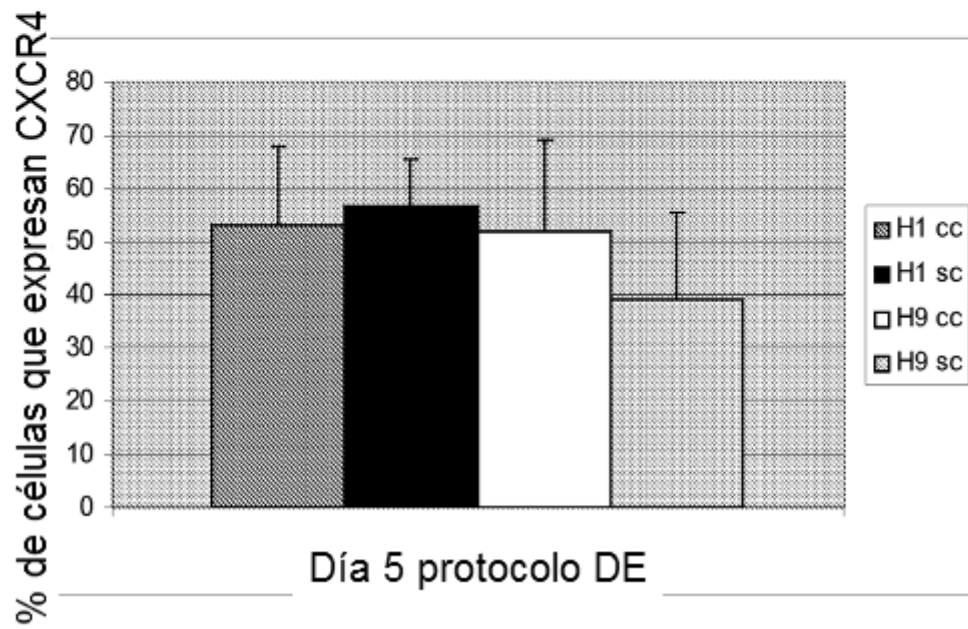


Figura 3

Diferenciación para PE

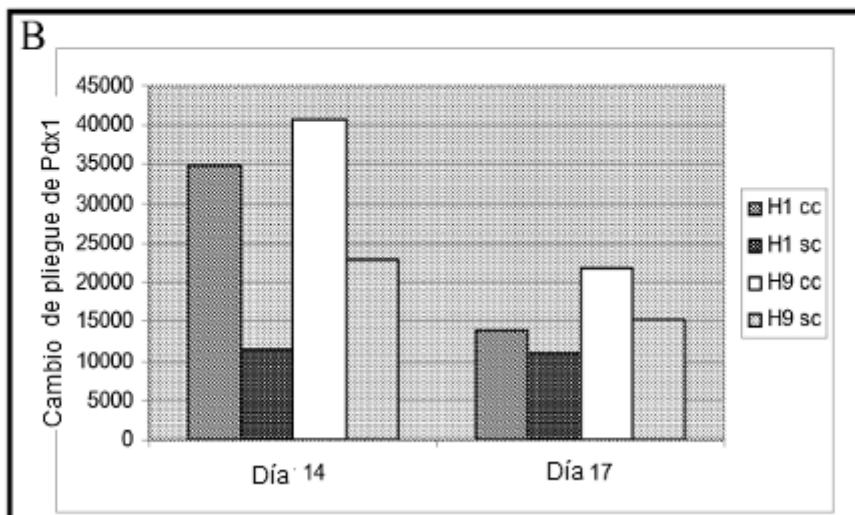
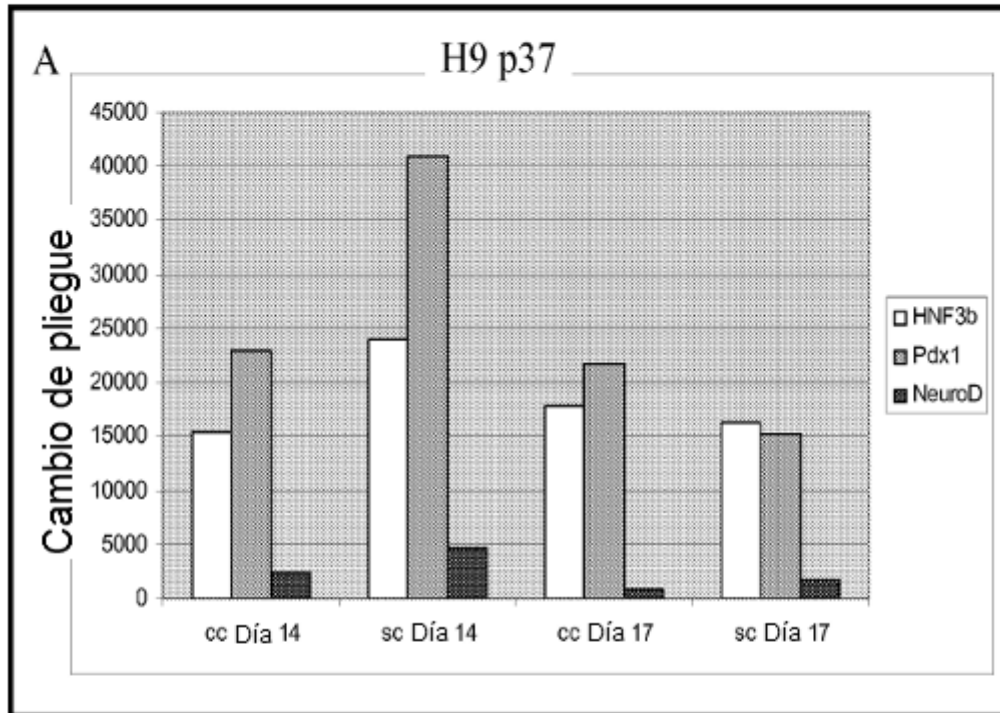


Figura 4

células individuales MEH, H9scp22

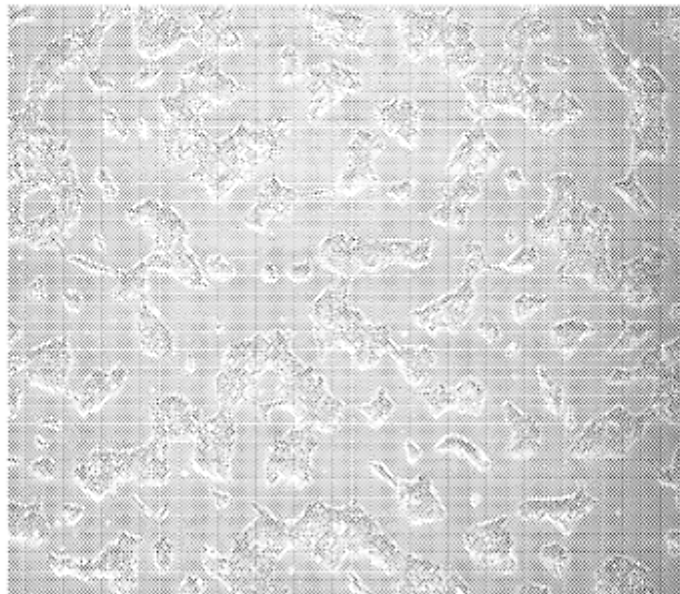


Figura 5

Análisis de pluripotencia

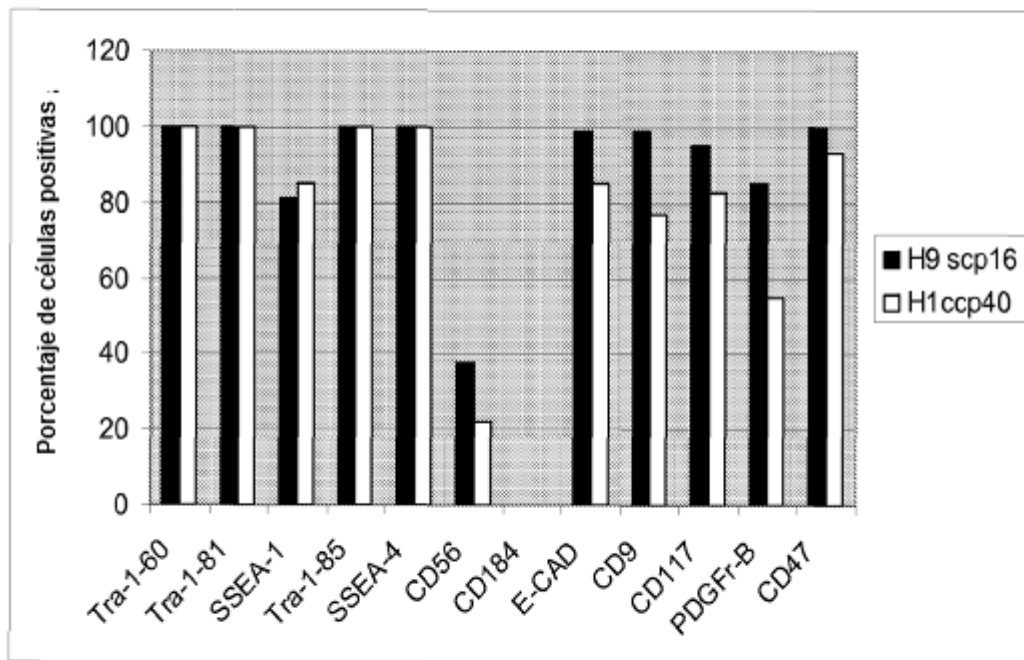


Figura 6:

Expansión de cromosoma H9scp20

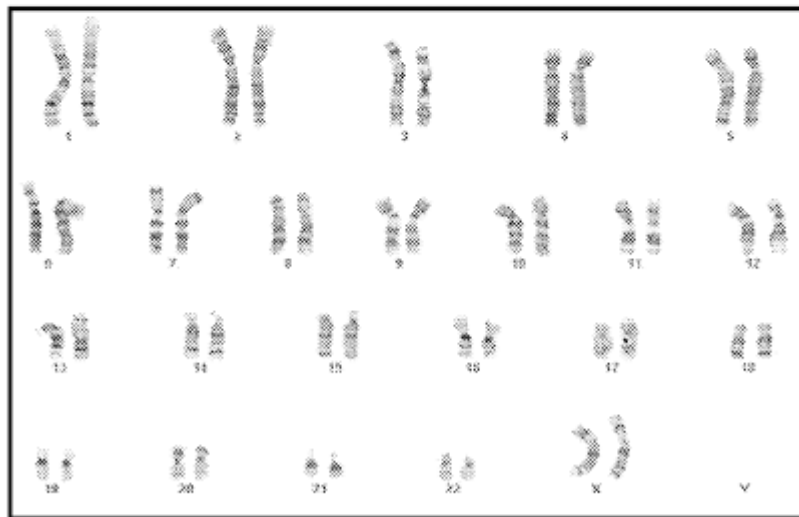


Figura 7:
Evaluación de expresión de
marcador de endodermo definitivo

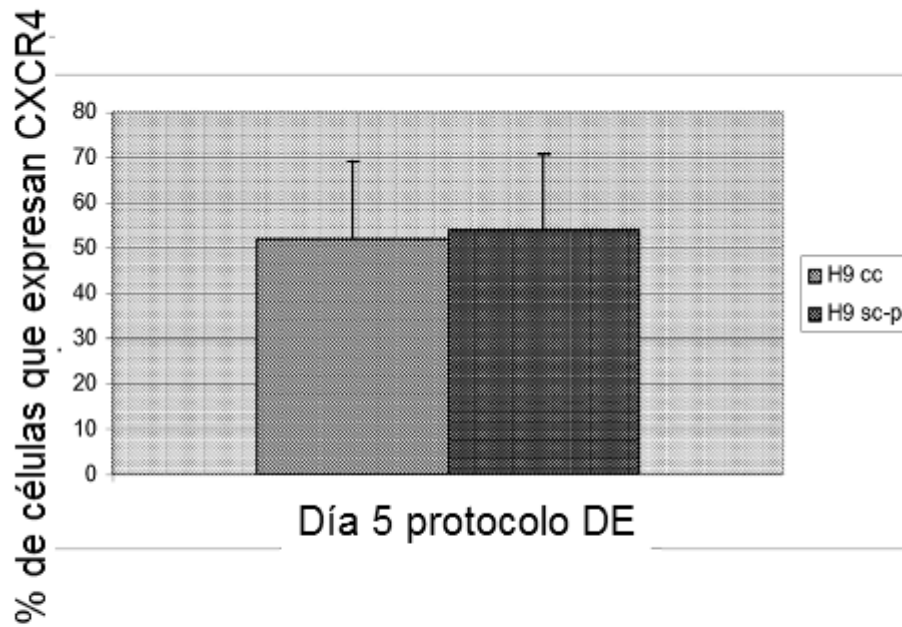


Figura 8

Expresión de marcadores pancreáticos

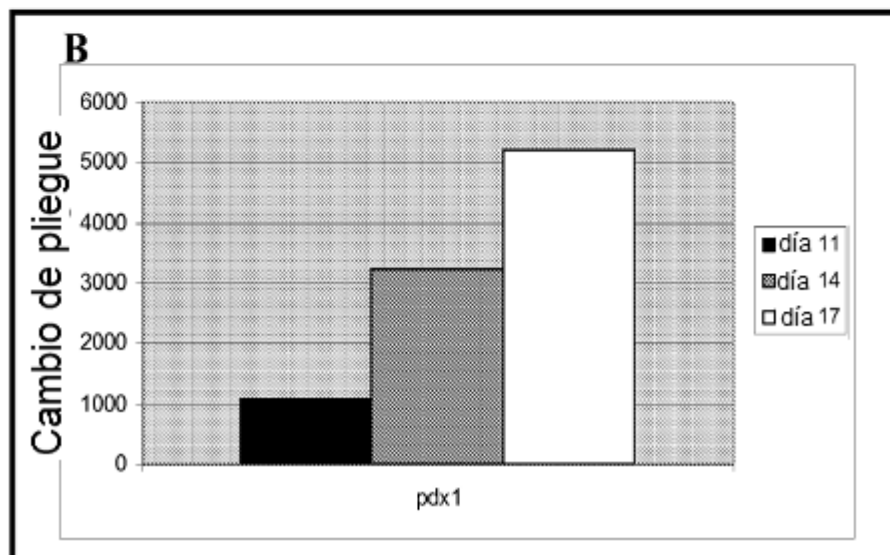
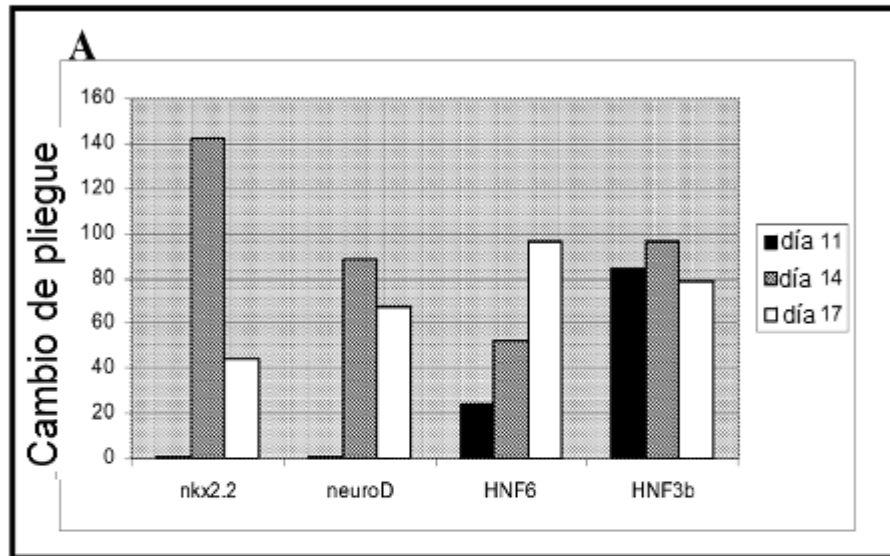


Figura 9
Diferenciación DE de célula
MEh individual en MEFs

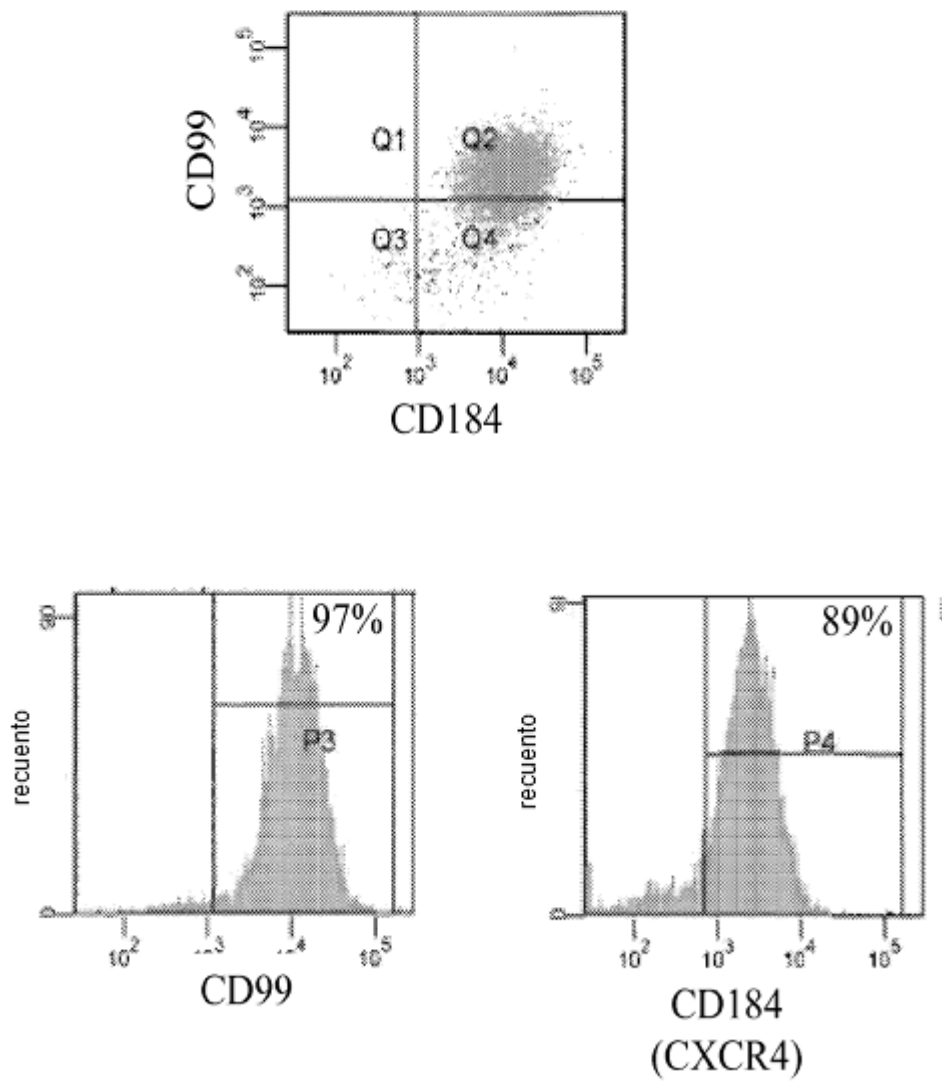


Figura 10

Diferenciación de células MEh individuales en placa con 96 pocillos

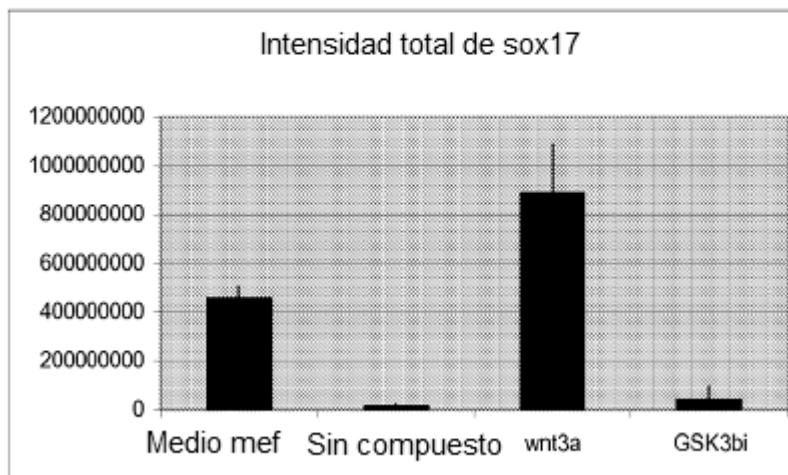
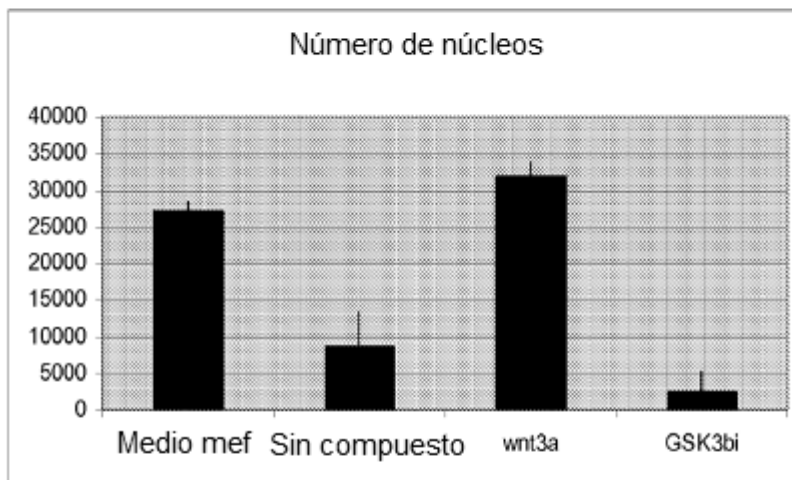


Figura 11
Células MEh individuales
identifican nuevos compuestos

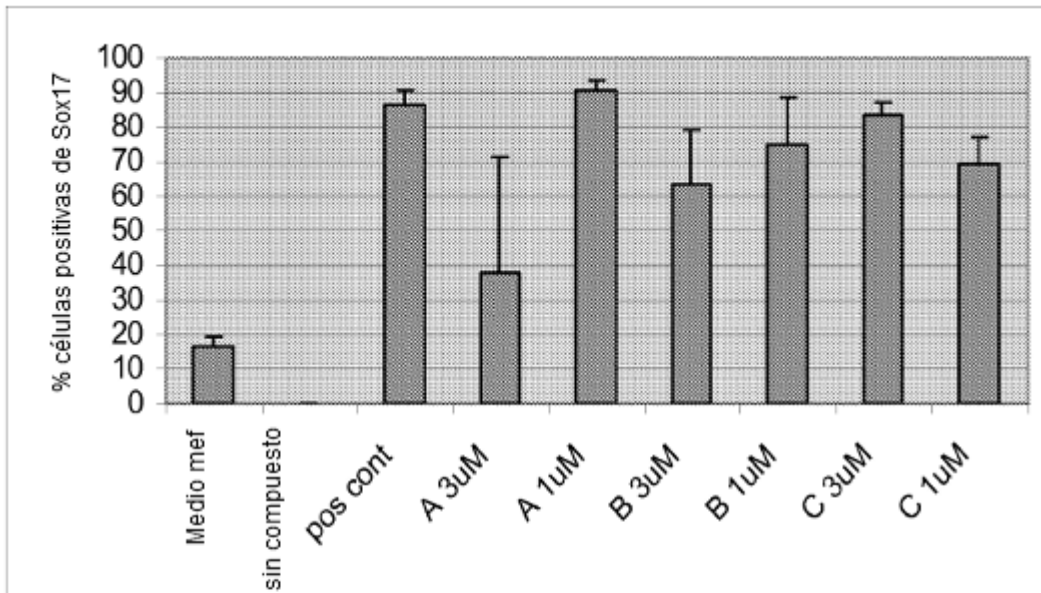


Figura 12 Eficiencia de transfección

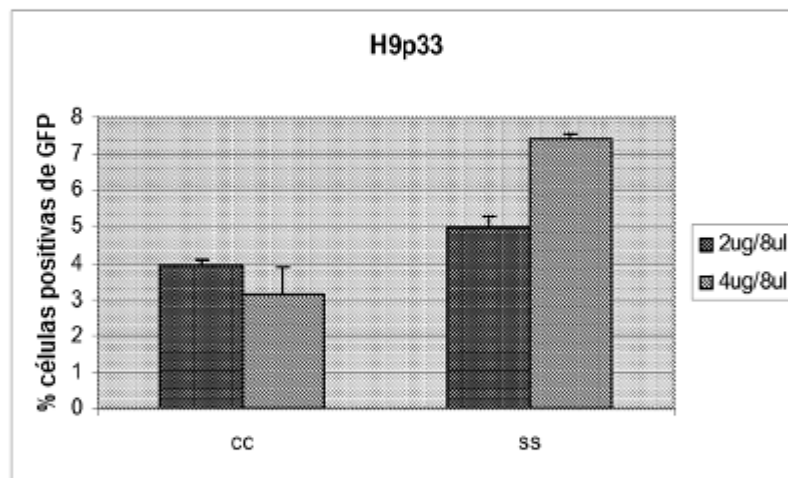


Figura 13

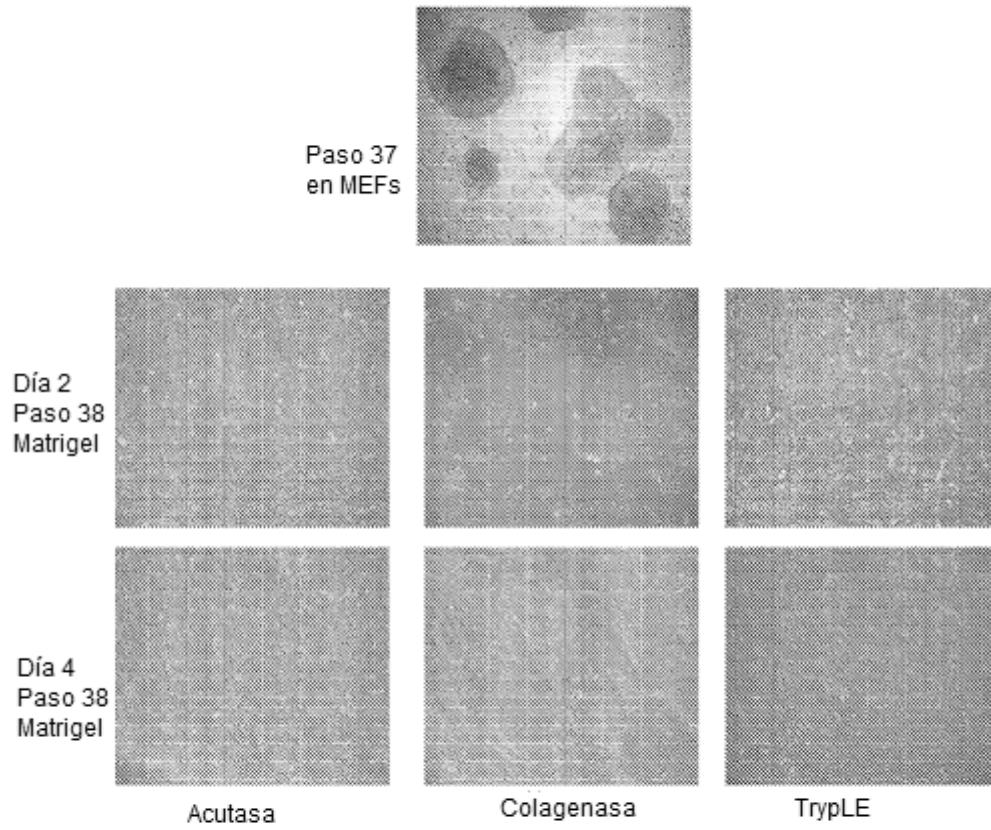


Figura 14

