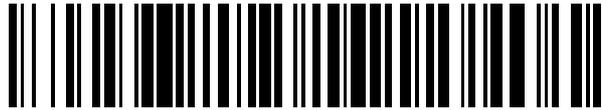


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 146**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2011 PCT/US2011/048129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2012 WO12030539**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2011 E 11822350 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2611910**

54 Título: **Diferenciación de células madre embrionarias humanas**

30 Prioridad:

31.08.2010 US 378472 P

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

08.03.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

REZANIA, ALIREZA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 658 146 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).

Diferenciación de células madre embrionarias humanas**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente divulgación proporciona métodos para promover la diferenciación de células madre pluripotentes en células productoras de insulina. En particular, la presente divulgación proporciona un método para producir una población de células, en donde más del 85% de las células en la población expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo.

ANTECEDENTES

Los avances en la terapia de reemplazo celular para la diabetes mellitus Tipo I y un escasez de islotes de Langerhans trasplantables han centrado el interés en desarrollar fuentes de células productoras de insulina, o células β apropiadas para el injerto. Un enfoque es la generación de células β funcionales a partir de células madre pluripotentes como, por ejemplo, células madre embrionarias.

En el desarrollo embrionario vertebrado, una célula pluripotente da lugar a un grupo de células que comprenden tres capas germinales (ectodermo, mesodermo, y endodermo) en un proceso conocido como gastrulación. Los tejidos como, por ejemplo, tiroides, timo, páncreas, intestino e hígado, se desarrollan a partir del endodermo, a través de una etapa intermedia. La etapa intermedia en este proceso es la formación del endodermo definitivo. Las células del endodermo definitivo expresan un número de marcadores, como HNF3 beta, GATA4, MIXL1, CXCR4 y SOX17.

La formación del páncreas surge de la diferenciación del endodermo definitivo en endodermo pancreático. Las células del endodermo pancreático expresan el gen de la caja homeótica pancreático-duodenal, PDX1. En ausencia de PDX1, el páncreas no se desarrolla más allá de la formación de las yemas ventrales y dorsales. Por lo tanto, la expresión de PDX1 marca un paso crítico en la organogénesis pancreática. El páncreas maduro contiene, entre otros tipos de células, tejido exocrino y tejido endocrino. Los tejidos exocrino y endocrino surgen de la diferenciación del endodermo pancreático.

Según se ha informado las células que llevan las características de las células de los islotes se derivan de células embrionarias del ratón. Por ejemplo, Lumelsky et al. (Science 292:1389, 2001) informan de la diferenciación de células madre embrionarias de ratón a estructuras secretoras de insulina similares a islotes pancreáticos. Soria et al. (Diabetes 49:157, 2000) informan que las células secretoras de insulina derivadas de células madre embrionarias de ratón normalizan la glucemia en ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina.

En otro ejemplo, Hori et al. (PNAS 99: 16105, 2002) divulgan que el tratamiento de células madre embrionarias de ratón con inhibidores de la fosfoinositida 3-quinasa (LY294002) produjo células que se asemejaban a células β .

En otro ejemplo, Blyszczuk et al. (PNAS 100:998, 2003) informa de la generación de células productoras de insulina a partir de células madre embrionarias de ratón que expresan constitutivamente Pax4.

Micallef *et al.* informa que el ácido retinoico puede regular el compromiso de las células madre embrionarias para formar endodermo pancreático positivo en PDX1. El ácido retinoico es lo más efectivo para inducir la expresión de Pdx1 cuando se añade a cultivos en el día 4 de la diferenciación de células madre embrionarias durante un periodo correspondiente al final de la gastrulación en el embrión (Diabetes 54:301, 2005).

Miyazaki *et al.* informa de una línea de células madre embrionarias de ratón que sobre-expresa Pdx1. Sus resultados muestran que la expresión de Pdx1 exógena mejoró claramente la expresión de genes de insulina, somatostatina, glucoquinasa, neurogenina3, p48, Pax6 y Hnf6 en las células diferenciadas resultantes (Diabetes 53: 1030, 2004).

Skoudy *et al.* informa de que la activina A (un miembro de la superfamilia TGF- β) regula por incremento la expresión de genes pancreáticos exocrinos (p48 y amilada) y genes endocrinos (Pdx1, insulina, y glucagón) en células madre embrionarias de ratón. El efecto máximo se observó usando 1nM activina A. También observaron que el nivel de expresión del ARNm de insulina y Pdx1 no se vio afectado por el ácido retinoico; sin embargo, el tratamiento con 2nM FGF7 dio lugar a un nivel aumentado del transcrito para Pdx1 (Biochem. J. 379: 749,2004).

Shiraki *et al.* estudió los efectos de los factores de crecimiento que aumentan específicamente la diferenciación de células madre embrionarias en células PDX1 positivas. Observaron que TGF- β 2 produjo reproduciblemente una mayor proporción de células PDX1 positivas (Genes Cells. 2005 Jun; 10(6): 503-16.).

Gordon *et al.* demostró la inducción de células del endodermo brachyury [positivo]/HNF3 beta [positivo] de células madre embrionarias humanas en ausencia de suero y en presencia de activina junto con un inhibidor de la señalización Wnt (US 2006/0003446A1).

5 Gordon et al. (PNAS, Vol 103, página 16806, 2006) afirma "Se requirieron simultáneamente la señalización de Wnt y TGF-beta/nodal/activina para la generación de la línea primitiva anterior".

10 Sin embargo, el modelo de ratón de desarrollo de células madre embrionarias humanas puede no imitar exactamente el programa de desarrollo en mamíferos superiores como, por ejemplo, humanos.

15 Thomson *et al.* aislaron células madre embrionarias de blastocitos humanos (Science 282:114, 1998). Concurrentemente, Gearhart y sus compañeros de trabajo derivaron líneas de células germinales embrionarias humanas (hEG) de tejido gonadal fetal (Shambloott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998). A diferencia de las células madre embrionarias de ratón, que puede evitarse que se diferencien simplemente cultivando con Factor inhibidor de la leucemia (LIF), las células madre embrionarias humanas deben mantenerse bajo condiciones muy especiales (Patente U.S. N° 6.200.806; WO 99/20741; WO 01/51616).

20 D'Amour *et al.* describe la producción de cultivos enriquecidos del endodermo definitivo derivado de células madre embrionarias humanas en presencia de una alta concentración de activina y suero bajo (Nature Biotechnology 2005). Trasplantar estas células bajo la cápsula renal de ratones dio lugar a la diferenciación en células más maduras con características de algunos órganos endodérmicos. Las células del endodermo definitivo derivadas de células madre embrionarias humanas pueden diferenciarse adicionalmente en células PDX1 positivas tras la adición de FGF-10 (US 2005/0266554A1).

25 D'Amour et al. (Nature Biotechnology - 24, 1392 - 1401 (2006)) afirma: "Hemos desarrollado un proceso de diferenciación que convierte células madre embrionarias humanas (hES) a células endocrinas capaces de sintetizar las hormonas pancreáticas insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático y grelina. Este proceso imita la organogénesis pancreática in vivo dirigiendo las células a través de etapas que se asemejan al endodermo definitivo, endodermo del tubo digestivo, el endodermo pancreático y el precursor endocrino de camino a células que expresan hormonas endocrinas".

35 En otro ejemplo, Fisk *et al.* informa de un sistema para producir células de islotes pancreáticos a partir de células madre embrionarias humanas (US2006/0040387A1). En este caso, la vía de diferenciación se dividió en tres etapas. Las células madre embrionarias humanas se diferenciaron primero al endodermo usando una combinación de butirato de sodio y activina A. Las células se cultivaron luego con antagonistas de TGF- β como Noggin en combinación con EGF o betacelulina para generar células PDX1 positivas. La diferenciación terminal se indujo por nicotinamida.

40 La WO 2007/143193 describe un método para generar células del endodermo definitivo y del endodermo pancreático a partir de células madre usando medio definido en ausencia de células alimentadoras.

45 La 2009/154606 describe métodos para generar células del tipo del linaje del endodermos derivadas de células pluripotentes humanas, como células madre embrionarias humanas, usando varios agentes incluyendo inhibidores de GDF8, GDF11 y GSK-3beta.

50 Sigue habiendo una necesidad significativa de desarrollar métodos in vitro para generar una célula que exprese insulina funcional, que se asemeje más a una célula β . La presente invención toma un enfoque alternativo para mejorar la eficiencia de diferenciar células madre embrionarias humanas hacia células que expresan insulina, generando una población de células en donde más del 85% de las células en la población expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo.

SUMARIO

55 La presente invención proporciona un cultivo celular que comprende una población aislada de células y un medio de cultivo adecuado para diferenciar células madre pluripotentes, en donde el medio de cultivo carece de suero y se suplementa con BSA, GDF-8 y 14-Prop-2-en-1-il-3,5,7,14,17,23,27-heptaazetatetracilo[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]heptacos-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11, 21,23-nonaen-16-ona y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1, en donde más del 85% de las células en la población expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, en donde dicha población de células se obtiene diferenciando células madre pluripotentes en el medio de cultivo.

60 En una realización, la presente invención proporciona una población de células, en donde más del 85% de las células en la población expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo.

65 En una realización, las poblaciones de células madre pluripotentes se diferencian en poblaciones de células

que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo cultivando las células madre pluripotentes en medio suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1. En una realización, la diferenciación de la población de células madre pluripotentes hacia una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se logra tratando las células madre pluripotentes con activina A y un ligando de Wnt.

En una realización, la diferenciación de la población de células madre pluripotentes hacia una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se logra tratando las células madre pluripotentes con GDF-8 y por lo menos otro factor se selecciona del grupo que consiste de: una anilina-piridinotriazina, una anilina-piridinotriazina cíclica, N-{{1-(Fenilmetil)azepan-4-il}metil}-2-piridin-3-ilacetamida, 4-{{4-(4-{{2-(Piridin-2-ilamino) etil}amino)-1,3,5-triazin-2-il}piridin-2-il}oxi)butan-1-ol, 3-{{3-[4-{{2-[Metil(piridin-2-il)amino]etil}amino)-1,3,5-triazin-2-il]piridin-2-il}amino)propan-1-ol, N~4~-2-(3-Fluorofenil)etil}-N~2~-3-(4-metilpiperazin-1-il)propil}pirido[2,3-d]pirimidina-2,4-diamina, 1-Metil-N-[(4-piridin-3-il-2-{{3-(trifluorometil)fenil}amino)-1,3-tiazol-5-il}metil]piperidina-4-carboxamida, 1,1-Dimetiletil {2-[4-{{5-[3-(3-hidroxi)propil}fenil]-4H-1,2,4-triazol-3-il}amino)fenil]etil}carbamato, 1,1-Dimetiletil {3-{{5-[3-(3-hidroxi)propil]-2-(metiloxi)fenil]-1,3-oxazol-2-il}amino)fenil}metil}carbamato, 1-{{5-[6-{{4-[(4-Metilpiperazin-1-il)sulfonil]fenil}amino]pirazin-2-il}tiofen-2-il}metil}piperidin-4-ol, 1-{{4-[6-{{4-[(4-Metilpiperazin-1-il)sulfonil]fenil}amino]pirazin-2-il}tiofen-2-il}metil}piperidina-4-carboxamida, y 2-{{4-(1-Metiletil)fenil}amino}-N-(2-tiofen-2-iletil)-7,8-dihidropirido[4,3-d]pirimidina-6(5H)-carboxamida.

20 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra el análisis PCR en tiempo real de la expresión de los genes indicados en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciados de acuerdo con los métodos divulgados en el Ejemplo 1.

La Figura 2 muestra el análisis FACS de la expresión de las proteínas indicadas en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciados de acuerdo con los métodos divulgados en el Ejemplo 1.

La Figura 3 muestra el análisis PCR en tiempo real de la expresión de los genes indicados en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciados de acuerdo con los métodos divulgados en el Ejemplo 2.

La Figura 4 muestra la expresión de SOX17 mediante inmunofluorescencia en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciados de acuerdo con los métodos divulgados en el Ejemplo 2.

La Figura 5 muestra el análisis FACS de la expresión de las proteínas indicadas en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciados de acuerdo con los métodos divulgados en el Ejemplo 2.

La Figura 6 muestra el análisis PCR en tiempo real de la expresión de los genes indicados en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciados de acuerdo con los métodos divulgados en el Ejemplo 3.

La Figura 7 muestra la expresión de SOX17 mediante inmunofluorescencia en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciados de acuerdo con los métodos divulgados en el Ejemplo 3.

La Figura 8 muestra la expresión de SOX17 mediante inmunofluorescencia en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciados de acuerdo con los métodos divulgados en el Ejemplo 3.

La Figura 9 muestra el análisis PCR en tiempo real de la expresión de los genes indicados en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciados de acuerdo con los métodos divulgados en el Ejemplo 5.

55 DESCRIPCION DETALLADA

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

60 Definiciones

Células madre son células indiferenciadas definidas por su capacidad a nivel celular individual de tanto auto-renovarse como diferenciarse para producir células de progenie, incluyendo progenitoras auto-renovables, progenitoras no renovables, y células terminalmente diferenciadas. Las células madre también se caracterizan por

su capacidad de diferenciarse in vitro en células funcionales de varios linajes celulares a partir de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales tras el trasplante y por contribuir sustancialmente a la mayoría de, sino todos, los tejidos tras la inyección en blastocitos.

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

15 La diferenciación es el proceso mediante el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada como, por ejemplo, una célula nerviosa o una célula muscular. Una célula diferenciada o inducida por diferenciación es una que ha tomado una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término "comprometido", cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha procedido en la vía de diferenciación a un punto en el que, en circunstancias normales, continuará para diferenciarse en un tipo celular o un subconjunto celular específico, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse en un tipo celular diferente o volver a un tipo celular menos diferenciado. La desdiferenciación se refiere al proceso por el cual una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Tal como se usa en la presente, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir, las células de las que proviene y a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula coloca la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un marcador específico del linaje se refiere a una característica específicamente asociada con el fenotipo de las células de un linaje de interés y se puede usar para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida con el linaje de interés.

30 "Células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo", o "células de Etapa 1", o "Etapa 2), como se usa en la presente se refiere a células que expresan por lo menos uno de los siguientes marcadores: SOX17, GATA4, HNF-3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína de caja homeótica tipo mezcla, FGF4, CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99, o OTX2. Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo incluyen células precursoras de la línea primitiva, células de la línea primitiva, células del mesendodermo y células del endodermo definitivo.

35 "Células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático", como se usa en la presente, se refiere a células que expresan por lo menos uno de los siguientes marcadores: PDX1, NKX6.1, HNF1 beta, PTF1 alfa, HNF6, HNF4 alfa, SOX9, HB9 o PROX1. Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático incluyen células del endodermo pancreático, células primitivas del tubo digestivo y células posteriores del intestino anterior.

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

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

50 "Célula endocrina pancreática", o "célula que expresa hormonas pancreáticas", o "Células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático" como se usa en la presente, se refiere a una célula capaz de expresar por lo menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

60 **Aislamiento, Expansión y Cultivo de Células Madre Pluripotentes**

Caracterización de Células Madre Pluripotentes

65 Las células madre pluripotentes pueden expresar uno o más de los antígenos embrionarios específicos de

la etapa (SSEA) 3 y 4, y marcadores detectables usando los 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 lugar a la pérdida de la expresión de SSEA-4, Tra-1-60, y Tra-1-81 (si la hay) y a expresión aumentada de SSEA-1. Las células madre pluripotentes indiferenciadas tienen típicamente actividad de fosfatasa alcalina, que puede detectarse fijando las células con 4% de paraformaldehído, y luego desarrollando con Vector Red como sustrato, como se describe por el fabricante (Vector Laboratories, Burlingame Calif.). Las células madre pluripotentes indiferenciadas también expresan típicamente OCT4 y TERT, como se detecta por RT-PCR.

Otro fenotipo deseable de células madre pluripotentes propagadas es un potencial para diferenciarse en células de las tres capas germinales: tejidos del endodermo, mesodermo y ectodermo. La pluripotencia de las células madre pluripotentes puede confirmarse, por ejemplo, inyectando células en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID), fijando los teratomas que se forman usando un 4% de paraformaldehído, y luego examinándolos histológicamente para evidencia de tipos celulares de las tres capas 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.

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

Fuentes de Células Madre Pluripotentes

Ejemplos de células madre pluripotentes son líneas establecidas 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 son adecuadas las células tomadas de una población de células madre pluripotentes ya cultivadas en ausencia de células alimentadoras. También son adecuadas las líneas de células madre embrionarias humanas mutantes como, por ejemplo, la línea celular de referencia BG01v (BresaGen, Athens, GA).

Cultivo de Células Madre Pluripotentes

En una realización, las células madre pluripotentes se cultivan en una capa de células alimentadoras que sustentan 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 alimentadoras pero no obstante sustentan la proliferación de células madre pluripotentes sin experimentar diferenciación sustancial. El crecimiento de células madre pluripotentes en cultivo libre de alimentadoras sin diferenciación se sustenta usando un medio condicionado cultivando anteriormente con otro tipo celular. Alternativamente, el crecimiento de células madre pluripotentes en cultivo libre de alimentadoras sin diferenciación se sustenta usando un medio químicamente definido.

En una realización, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en una capa de células alimentadoras de fibroblastos embrionarias de ratón de acuerdo con los métodos divulgados en Reubinoff *et al* (Nature Biotechnology 18: 399 - 404 (2000)). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en una capa de células alimentadoras de fibroblastos embrionarias de ratón de acuerdo con los métodos divulgados en Thompson et al (Science 6 Noviembre de 1998: Vol. 282. N° 5391, pp. 1145 - 1147). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en cualquiera de las capas de células alimentadoras divulgadas en Richards et al, (Stem Cells 21: 546-556, 2003).

En una realización, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en una capa de células alimentadoras humanas de acuerdo con los métodos divulgados en Wang et al (Stem Cells 23: 1221-1227, 2005). En una realización alternativa, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en la capa de células alimentadoras humanas divulgada en Stojkovic et al (Stem Cells 2005 23: 306-314, 2005). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en la capa de células alimentadoras humanas divulgada en Miyamoto et al (Stem Cells 22: 433-440, 2004). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en la capa de células alimentadoras humanas divulgada en Amit et al (Biol. Reprod 68: 2150-2156, 2003). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en la capa de células alimentadoras humanas divulgada en Inzunza et al (Stem Cells 23: 544-549, 2005).

En una realización, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en medio de cultivo derivado de acuerdo con los métodos divulgados en la US20020072117. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en medio de cultivo derivado de acuerdo con los métodos divulgados en la US6642048. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en medio de cultivo derivado de acuerdo con los métodos divulgados en la WO2005014799. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en medio de cultivo derivado de acuerdo con los métodos divulgados en Xu et al (Stem Cells 22: 972-980, 2004). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en medio de cultivo derivado de acuerdo con los métodos divulgados en la US20070010011. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en

medio de cultivo derivado de acuerdo con los métodos divulgados en la US20050233446. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en medio de cultivo derivado de acuerdo con los métodos divulgados en la US6800480. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en medio de cultivo derivado de acuerdo con los métodos divulgados en la WO2005065354.

5 En una realización, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos divulgados en Cheon et al (BioReprod DOI: 10.1095/bioreprod. 105.046870, 19 de octubre de 2005). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos divulgados en Levenstein et al (Stem Cells 24: 568-574, 2006). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos divulgados en la US20050148070. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos divulgados en la US20050244962. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos divulgados en la WO2005086845.

10 Las células madre pluripotentes pueden colocarse en placas sobre un sustrato de cultivo adecuado. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es un componente de la matriz extracelular como, por ejemplo, los derivados de la membrana basal o los que pueden formar parte de acoplamiento receptor-ligando de moléculas de adhesión. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es MATRIGEL® (Becton Dickenson). El MATRIGEL® es una preparación soluble de células tumorales de Engelbreth-Holm-Swarm que se gelifica a temperatura ambiente para formar una membrana basal reconstituida.

15 Como alternativa son adecuados otros componentes y mezclas de componentes de la matriz extracelular. Dependiendo del tipo de células que se está proliferando, esta puede incluir laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, sulfato de heparano, y similares, solos o en varias combinaciones.

20 Las células madre pluripotentes pueden colocarse en placas sobre el sustrato en una distribución adecuada y en presencia de un medio que promueve la supervivencia, propagación y retención celulares de las características deseables. Todas estas características se benefician de la atención cuidadosa a la distribución del sembrado y pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica.

25 El medio de cultivo adecuado puede elaborarse a partir de los siguientes componentes como, por ejemplo, medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM); medio de Eagle modificado de Dulbecco Knockout (KO DMEM), Gibco #10829-018; medio basal DMEM F12/50% de Ham; 200 mM de L-glutamina, Gibco # 15039-027; solución de aminoácidos no esenciales, Gibco 11140-050; β-mercaptoetanol, Sigma # M7522; factor de crecimiento de fibroblastos básico recombinante humano (bFGF), Gibco # 13256-029.

30 **Formación de Células que Expresan Marcadores Característicos del Linaje del Endodermo Definitivo a partir de Células Madre Pluripotentes**

35 La presente divulgación proporciona métodos para la formación de poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo a partir de poblaciones de células madre pluripotentes. En una realización, la presente divulgación proporciona métodos para diferenciar adicionalmente las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en células que expresan marcadores del linaje endocrino pancreático. En una realización, esto se logra utilizando un protocolo de diferenciación por pasos, en donde las poblaciones de células madre pluripotentes se diferencian primero en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo. Luego, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se diferencian luego en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático. Luego, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se diferencian luego en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.

40 La presente invención proporciona una población de células en donde más del 85% de las células expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo. La población de células puede tratarse adicionalmente para formar una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático. La población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático puede tratarse adicionalmente para formar una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.

45 La eficiencia de la diferenciación puede determinarse exponiendo una población celular tratada a un agente (como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteínas expresado por células que expresan marcadores característicos del tipo celular deseado.

50 Los métodos para evaluar la expresión de marcadores de proteínas y ácidos nucleicos en células cultivadas o aisladas son estándar en la técnica. Estos incluyen reacción de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR), transferencias Northern, hibridación in situ (ver por ejemplo, Current

Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 2001 suplemento)), e inmunosensayos como análisis inmunohistoquímico de material seccionado, transferencia Western, y para marcadores que son accesibles en células intactas, análisis de citometría de flujo (FACS) (ver por ejemplo, Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

Las características de las células madre pluripotentes son bien conocidas por los expertos en la técnica, y características adicionales de las células madre pluripotentes continúan siendo identificadas. Los marcadores de células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, la expresión de uno o más de los siguientes: ABCG2, cripto, FOXD3, CONNEXIN43, CONNEXIN45, OCT4, SOX2, NANOG, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, Tra 1-81.

Tras tratar las células madre pluripotentes con los métodos de la presente divulgación, las células diferenciadas pueden purificarse exponiendo una población de células tratadas a un agente (como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteínas, como CXCR4, expresado por las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo.

Las células madre pluripotentes citadas por referencia son de la línea de células madre embrionarias humanas H9 (código NIH: WA09), la línea de células madre embrionarias humanas H1 (código NIH: WA01), la línea de células madre embrionarias humanas H7 (código NIH: WA07), y la línea de células madre embrionarias humanas SA002 (Cellartis, Suecia). También son adecuadas para su uso en la presente invención las células que expresan por lo menos uno de los siguientes marcadores característicos de células pluripotentes: ABCG2, cripto, CD9, FOXD3, CONNEXIN43, CONNEXIN45, OCT4, SOX2, NANOG, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, y Tra 1-81.

Los marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se seleccionan del grupo que consiste de SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína de caja homeótica tipo mezcla, FGF4, CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99, y OTX2. Adecuada para su uso en la presente invención es una célula que expresa por lo menos uno de los marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es una célula precursora de la línea primitiva. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es una célula del mesendodermo. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es una célula del endodermo definitivo.

Los marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se seleccionan del grupo que consiste de PDX1, NKX6.1, HNF1 beta, PTF1 alfa, HNF6, HNF4 alfa, SOX9, HB9 y PROX1. Adecuada para su uso en la presente invención es una célula que expresa por lo menos uno de los marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático es una célula del endodermo pancreático.

Los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo que consiste de NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4, NGN3, y PTF1 alfa. En una realización, una célula endocrina pancreática es capaz de expresar por lo 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 por lo menos uno de los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático es una célula endocrina pancreática. La célula endocrina pancreática puede ser una célula que expresa hormonas pancreáticas. Alternativamente, la célula endocrina pancreática puede ser una célula secretora de hormonas pancreáticas.

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

Formación de Células que Expresan Marcadores Característicos del Linaje del Endodermo Definitivo a partir de Células Madre Pluripotentes

En un aspecto de la presente invención, las poblaciones de células madre pluripotentes pueden diferenciarse en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo cultivando las células madre pluripotentes en medio que carece de suero y suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1. En una realización, la diferenciación de la población de células madre pluripotentes hacia una población de células que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se logra tratando las células madre pluripotentes con activina A y un ligando de Wnt.

En una realización alternativa, la diferenciación de la población de células madre pluripotentes hacia una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se logra tratando las células madre pluripotentes con GDF-8 y por lo menos un otro factor seleccionado del grupo que consiste de una anilina-piridinotriazina, una anilina-piridinotriazina cíclica, N-{{1-(Fenilmetil)azepan-4-il}metil}-2-piridin-3-ilacetamida, 4-{{4-(4-{{2-(Piridin-2-ilamino)etil}amino)-1,3,5-triazin-2-il}piridin-2-il}oxi)butan-1-ol, 3-{{3-[4-{{2-[Metil(piridin-2-il)amino]etil}amino)-1,3,5-triazin-2-il]piridin-2-il}amino}propan-1-ol, N~4~-2-(3-Fluorofenil)etil}-N~2~-3-(4-metilpiperazin-1-il)propil]pirido[2,3-d]pirimidina-2,4-diamina, 1-Metil-N-[(4-piridin-3-il-2-{{3-(trifluorometil)fenil}amino)-1,3-tiazol-5-il}metil]piperidina-4-carboxamida, 1,1-Dimetiletil {2-[4-{{5-[3-(3-hidroxi)propil]fenil}-4H-1,2,4-triazol-3-il}amino)fenil]etil}carbamato, 1,1-Dimetiletil {{3-{{5-[5-(3-hidroxi)propil]-2-(metiloxi)fenil]-1,3-oxazol-2-il}amino)fenil]etil}carbamato, 1-{{5-[6-{{4-{{4-Metilpiperazin-1-il}sulfonyl}fenil}amino)pirazin-2-il]tiofen-2-il}metil]piperidin-4-ol, 1-{{4-[6-{{4-{{4-Metilpiperazin-1-il}sulfonyl}fenil}amino)pirazin-2-il]tiofen-2-il}metil]piperidina-4-carboxamida, y 2-{{4-(1-Metiletil)fenil}amino}-N-(2-tiofen-2-iletil)-7,8-dihidropirido[4,3-d]pirimidina-6(5H)-carboxamida. Ejemplos de factores adecuados para su uso pueden encontrarse en la Solicitud de Patente US N° de Serie 12/494.789. En una realización, el por lo menos un otro factor es 14-Prop-2-en-1-il-3,5,7,14,17,23,27-heptaazatetraciclo[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]heptacosa-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-nonaen-16-ona.

La población de células madre pluripotentes puede cultivarse en el medio que carece de suero y suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1 durante de aproximadamente un día a aproximadamente siete días. Alternativamente, la población de células madre pluripotentes puede cultivarse en el medio que carece de suero y suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1 durante de aproximadamente un día a aproximadamente seis días. Alternativamente, la población de células madre pluripotentes puede cultivarse en el medio que carece de suero y suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1 durante de aproximadamente un día a aproximadamente cinco días. Alternativamente, la población de células madre pluripotentes puede cultivarse en el medio que carece de suero y suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1 durante de aproximadamente un día a aproximadamente cuatro días. Alternativamente, la población de células madre pluripotentes puede cultivarse en el medio que carece de suero y suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1 durante de aproximadamente cuatro días.

En una realización, el GDF-8 se usa a una concentración de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml. En una realización alternativa, el GDF-8 se usa a una concentración de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml. En una realización alternativa, el GDF-8 se usa a una concentración de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 25 ng/ml. En una realización alternativa, el GDF-8 se usa a una concentración de aproximadamente 25 ng/ml.

La activina-A puede usarse a una concentración de aproximadamente 1 pg/ml a aproximadamente 100 µg/ml. En una realización alternativa, la concentración puede ser de aproximadamente 1 pg/ml a aproximadamente 1 µg/ml. En otra realización alternativa, la concentración puede ser de aproximadamente 1 pg/ml a aproximadamente 100 ng/ml. En otra realización alternativa, la concentración puede ser de aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml. En otra realización alternativa, la concentración puede ser de aproximadamente 100 ng/ml.

El ligando de Wnt puede seleccionarse del grupo que consiste de Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-5a y Wnt-7a. En una realización, el ligando de Wnt es Wnt-1. En una realización alternativa, el ligando de Wnt es Wnt-3a.

El ligando de Wnt puede usarse a una concentración de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 1000 ng/ml. En una realización alternativa, el ligando de Wnt puede usarse a una concentración de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml. En una realización, la concentración del ligando de Wnt es aproximadamente 20 ng/ml.

En una realización, la insulina se usa a una concentración de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml.

En una realización, el IGF-1 se usa a una concentración de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml.

Formación de Células que Expresan Marcadores Característicos del Linaje del Endodermo Definitivo

En una realización, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo formados por los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático por cualquiera método de la técnica.

Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo

definitivo obtenidas de acuerdo con los métodos de la presente divulgación pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo de acuerdo con los métodos divulgados en D'Amour et al, Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

5 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo obtenidas de acuerdo con los métodos de la presente divulgación pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo de acuerdo con los métodos divulgados en la solicitud de patente US N° de Serie 11/736.908.

Formación de Células que Expresan Marcadores Característicos del Linaje Endocrino Pancreático

15 En una realización, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se diferencian adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático por cualquier método de la técnica.

20 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático de acuerdo con los métodos divulgados en D' Amour et al, Nature Biotechnology, 2006.

25 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático de acuerdo con los métodos divulgados en D' Amour et al, Nature Biotechnology, 2006.

30 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático de acuerdo con los métodos divulgados en la solicitud de patente US N° de Serie 11/736.908.

35 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático de acuerdo con los métodos divulgados en la solicitud de patente US N° de Serie 11/779.311.

40 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático de acuerdo con los métodos divulgados en la solicitud de patente US N° de Serie 60/953.178.

45 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático de acuerdo con los métodos divulgados en la solicitud de patente US N° de Serie 60/990.529.

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

EJEMPLOS

Ejemplo de Referencia 1

60 El Papel de la Insulina en la Diferenciación de Células Madre Pluripotentes Humanas a Células que Expresan Marcadores Característicos del Linaje del Endodermo Definitivo: Siembra de grupos

65 Estudios anteriores han demostrado que una alta concentración de FBS es perjudicial para la formación del endodermo definitivo (DE) a partir de células madre embrionarias. Ver, por ejemplo, D'Amour et al., Nature Biotechnology, 2005, donde la inducción del endodermo definitivo a partir de células madre embrionarias humanas

se aumentó significativamente cuando la concentración de FBS se redujo del 10% de FBS al 0,5-2% de FBS. Se ha informado de observaciones similares, en donde la adición de 25 ng/ml de IGF o 200 ng/ml de insulina a 2% de FBS a células ES cultivadas en MEF-CM (medio condicionado de fibroblastos embrionarios de ratón) disminuyó la expresión de SOX17 por aproximadamente el 70% tras el tratamiento con activina A. Ver McLean et al, Stem Cells 25:29-38, 2007.

El efecto inhibitor observado se debió probablemente a la presencia de insulina o IGF en el FBS, activando la vía de Fosfatidilinositol 3-Quinasa. Ver McLean et al, Stem Cells 25:29-38, 2007. El bloqueo de la vía de señalización de PI-3 quinasa aumentó el porcentaje de células Sox17 positivas en células ES humanas cultivadas en MEF-CM (medio condicionado de fibroblastos embrionarios de ratón). Ver McLean et al, Stem Cells 25:29-38, 2007.

Estos datos sugieren que se esperaría que la adición de tan poco como 25 ng/ml de IGF o 200 ng/ml de insulina al medio que contiene activina A y baja concentración de FBS (0,5-2% de FBS) bloquearía la formación del endodermo definitivo. La concentración típica de IGF e insulina en FBS es aproximadamente de 70 ng/ml (J. Clin. Invest. 76:4, 1985) y aproximadamente 60 ng/ml (In Vitro Cell Dev Biol. 32:8-12, 1996), respectivamente. Esto se traduce a aproximadamente 1,4 ng/ml de IGF y aproximadamente 1,2 ng/ml de insulina en 2% de FBS.

Las células de la línea de células madre embrionarias humana H1 (p40-p52) se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL® (dilución 1:30) (BD Biosciences; Cat # 356231) en MEF-CM (medio condicionado de fibroblastos embrionarios de ratón) suplementado con 16 ng/ml de FGF2 (Catálogo# 100-18B, PeproTech, NJ),, y se diferenciaron en células que expresaban marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo como sigue.

a. medio RPMI suplementado con 2% de BSA libre de ácidos grasos Catálogo# 68700, Proliant, IA), y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) más 20 ng/ml WNT-3a (Catálogo# 1324-WN-002, R&D Systems, MN) durante un día, luego

b. medio RPMI suplementado con 2% de BSA y 100 ng/ml de activina A durante tres días adicionales.

En algunos de los cultivos, las células se trataron con la siguiente dilución de ITS-X (Catálogo# 51500-056, Invitrogen, CA): 0, 1:10⁶, 1:5 X 10⁵, 1:10⁵, 1:10⁴. El ITS-X es un reemplazo del suero suplementado comprendido de 1 mg/ml de insulina, 0,55 ng/ml de Transferrina, 0,00067 mg/ml de Selenito Sódico y 0,2 mg/ml de etanolamina. El intervalo de dilución de ITS-X se corresponde a 0, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 10 ng/ml, y 100 ng/ml de insulina. Como un control, se usó 0,2% de FBS (Catálogo# SH30070.03, Hyclone, UT) durante 1 día de diferenciación, 0,5% de FBS en el día 2 y se usó 2% de FBS durante los días 3-4. Los cultivos tratados con FBS no se suplementaron con ITS-X.

En el día 4, se recolectaron las muestras para FACS y análisis de expresión génica usando PCR en tiempo real. Sorprendentemente, como se muestra en la Figura 1, la adición de 1-100 ng/ml de insulina al medio usado para diferenciar las células, no afectó significativamente a la expresión de los marcadores asociados con el endodermo definitivo (FOXA2, SOX17, y CXCR4), los marcadores asociados con la mesénquima (T, también conocido como Brach), o marcadores extraembrionarios (SOX7, AFP). Además, los cultivos tratados con medio suplementado con 2% de BSA mostraron expresión significativamente más alta de marcadores asociados con el endodermo definitivo, que los cultivos tratados con medio suplementado con 0,5-2% de FBS.

Estas observaciones se apoyaron adicionalmente por la expresión de CXCR4 y CD9, como se determina por FACS, para los varios tratamientos. Ver Figura 2. El receptor de superficie celular CXCR4 ha demostrado anteriormente ser un marcador del endodermo definitivo. El CD9 es un marcador para células ES indiferenciadas. Consecuentemente, un aumento en la expresión de CXCR4, y una disminución en la expresión de CD9 en una población de células es indicativa para la formación del endodermo definitivo. Como se resume en la Tabla I, no se observó cambio significativo en la expresión de CXCR4, o CD9 en células tratadas con medio suplementado con BSA, a cualquier concentración de insulina probada. Estos datos sugieren que la insulina no es inhibitora a las concentraciones probadas en el medio de cultivo empleado en estos estudios.

Tabla I.

Tratamiento	% CXCR4+CD9-	% CXCR4-CD9+	% CXCR4-CD9-
FBS	56	27	9
BSA	69	13	13
BSA + 1 ng/ml insulina	70	13	10
BSA + 5 ng/ml insulina	67	15	12
BSA + 10 ng/ml insulina	69	13	13
BSA + 100 ng/ml insulina	73	12	9

Ejemplo de Referencia 2**El Papel de la Insulina en la Diferenciación de Células Madre Pluripotentes Humanas a Células que Expresan Marcadores Característicos del Linaje del Endodermo Definitivo: Siembra de Células Individuales**

Se sembraron células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (p40-p52) como células individuales a una densidad de 100000 células/cm² en placas recubiertas con MATRIGEL® (dilución 1:30) (BD Biosciences; Cat # 356231) en MEF-CM (medio condicionado de fibroblastos embrionarios de ratón) suplementado con 16 ng/ml de FGF2 (Catálogo# 100-18B, PeproTech, NJ) y 10 µM de Y27632 (Rock inhibitor, Catálogo# Y0503, Sigma, MO). 72 horas tras la siembra, los cultivos se diferenciaron en el endodermo definitivo (DE) como sigue:

a. Medio MCDB-131 (Catálogo# 10372-019, Invitrogen, CA) suplementado con 2% de BSA libre de ácidos grasos (Catálogo # 68700, Proliant, IA), 0,0025 g/ml de bicarbonato sódico (Catálogo # S3187, Sigma, MO), 1X de GlutaMax™ (Catálogo # 35050-079, Invitrogen, Ca) y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) más 20 ng/ml de WNT-3a (Catálogo# 1324-WN-002, R&D Systems, MN) durante un día, luego

b. Medio MCDB-131 suplementado con 2% de BSA, bicarbonato sódico, Glutamax, y 100 ng/ml de activina A durante tres días adicionales.

En algunos de los cultivos las células se trataron con las siguientes concentraciones de insulina (Catálogo# I9278, Sigma, MO): 0, 1, 10, 100, 1000, ó 10000 ng/ml. En el día 4, se recolectaron las muestras para FACS y análisis de expresión génica usando PCR en tiempo real.

La adición de 1-100 ng/ml de insulina al medio usado para diferenciar las células, no afectó significativamente a la expresión de los marcadores asociados con el endodermo definitivo (FOXA2, SOX17, CER1, y CXCR4). De manera similar, la expresión de marcadores embrionarios (NANOG), o marcadores extraembrionarios (SOX7, AFP) no se vio afectada. Ver Figura 3. La adición de 1-10 µg/ml de insulina, sin embargo, aumentó la expresión de NANOG. Estos datos se apoyaron adicionalmente por tinción por inmunofluorescencia (IF) para el marcador del endodermo definitivo SOX17 (Catálogo #AF1924, R & D systems, MN) (Figura 4).

La Figura 5 representa el perfil de expresión de CXCR4 y CD9 de los varios tratamientos como se midió por análisis FACS. Como se resume en la Tabla II, sólo a concentraciones superfisiológicas de insulina (1-10 µg/ml) hubo una disminución en el porcentaje de células CXCR4+CD9- y un aumento en la expresión de la fracción CXCR4-CD9+. Estos datos sugieren que en las condiciones en este estudio, sólo concentraciones superfisiológicas de insulina inhiben la formación del endodermo definitivo.

Tabla II

Tratamiento	% CXCR4+CD9-	% CXCR4-CD9+	% CXCR4-CD9-
BSA	96	1.3	0.9
BSA+ 1 ng/ml insulina	96	1.5	0.7
BSA + 10 ng/ml insulina	95	1.4	0.7
BSA + 100 ng/ml insulina	90	4.1	2
BSA + 1 µg/ml insulina	90	3.6	2.2
BSA + 10 µg/ml insulina	84	6.6	4.7

Ejemplo de Referencia 3**El Papel de IGF en la Diferenciación de Células Madre Pluripotentes Humanas a Células que Expresan Marcadores Característicos del Linaje del Endodermo Definitivo: Siembra de Células Individuales**

Se sembraron células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (p40-p52) como células individuales a una densidad de 100000 células/cm² en placas recubiertas con MATRIGEL® (dilución 1:30) (BD Biosciences; Cat # 356231) en MEF-CM (medio condicionado de fibroblastos embrionarios de ratón) suplementado con 16 ng/ml de FGF2 (Catálogo# 100-18B, PeproTech, NJ) y 10 µM de Y27632 (Rock inhibitor, Catálogo# Y0503, Sigma, MO). 72 horas tras la siembra, los cultivos se diferenciaron en el endodermo definitivo (DE) como sigue:

a. Medio MCDB-131 (Catálogo# 10372-019, Invitrogen, CA) suplementado con 2% de BSA libre de ácidos grasos (Catálogo # 68700, Proliant, IA), 0,0025 g/ml de bicarbonato sódico (Catálogo # S3187, Sigma, MO), 1X de GlutaMax™ (Catálogo # 35050-079, Invitrogen, Ca) y 100 ng/ml de GDF8 (Catálogo # 120-00, PeproTech, NJ) más 2.5 µM de inhibidor de GDK3B 14-Prop-2-en-1-il-3,5,7,14,17,23,27-

heptaazatetracilo[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]heptacosa-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-nonaen-16-ona durante un día, luego

5 b. Medio MCDB-131 suplementado con 2% de BSA, bicarbonato sódico, Glutamax, y 100 ng/ml de GDF-8 durante tres días adicionales.

10 En algunos de los cultivos las células se trataron con las siguientes concentraciones de IGF (Catálogo# AF100, PeproTech, NJ): 0, 1, 10, 50, o 200 ng/ml. Como un control, en lugar de BSA, se usó 0,2% de FBS (Catálogo# SH30070.03, Hyclone, UT) durante 1 día de diferenciación, y se usó 2% de FBS durante los días 2-4. Algunos de los cultivos tratados con FBS se trataron también con varias concentraciones de IGF.

En el día 4, se recolectaron las muestras para FACS y análisis de expresión génica usando PCR en tiempo real.

15 Sorprendentemente, la adición de 1-200 ng/ml de IGF a cultivos tratados con BSA no afectó significativamente la expresión de la expresión de marcadores asociados con el endodermo definitivo (FOXA2, SOX17, CER1, y CXCR4), cuando se comparó con las muestras de control no tratadas con IGF (Figura 6). Se observaron resultados similares con marcadores extraembrionarios (SOX, AFP). La adición de 50-200 ng/ml de IGF no aumentó la expresión del marcador embrionario NANOG.

20 Los cultivos tratados con medio suplementado con FBS fueron mucho más sensibles al efecto inhibitor de IGF. En estos cultivos, la expresión de SOX 17, HNF3B y CXCR4 disminuyó con concentración creciente de IGF. Estas observaciones se apoyaron adicionalmente con tinción por inmunofluorescencia (IF) para el marcador del DE SOX17 (Catálogo #AF1924, R & D systems, MN) (Figura 4).

25 Como se resume en la Tabla III, sólo a concentraciones superfisiológicas de IGF (50-200 ng/ml) en cultivos tratados con BSA hubo una caída en la expresión de células CXCR4+CD9- y un aumento en la expresión de la fracción CXCR4-CD9+. Sin embargo, con dosis crecientes de IGF, los cultivos tratados con FBS mostraron una caída más significativa en la expresión de la fracción CXCR4+CD9- en comparación con los cultivos tratados con BSA. Los ejemplos anteriores muestran colectivamente que en ausencia de FBS, las concentraciones fisiológicas de IGF o insulina no son inhibitoras para la inducción de marcadores de DE.

Tabla III

Tratamiento	% CXCR4+CD9-	% CXCR4-CD9+	% CXCR4-CD9-
BSA	92	0.9	2.6
FBS	93	2.7	5.9
BSA + 1 ng/ml IGF	92	0.8	3
FBS + 1 ng/ml IGF	89	3	3.6
BSA + 10 ng/ml IGF	90	1.3	5.3
FBS + 10 ng/ml IGF	87	6.4	3.3
BSA + 50 ng/ml IGF	87	6	3.5
FBS + 50 ng/ml IGF	78	6.8	13.2
BSA + 200 ng/ml IGF	79	10	8
FBS + 200 ng/ml IGF	70	13.4	12.9

55 **Ejemplo 4**

Concentraciones de IGF en Varios Lotes de FBS

60 Se adquirió un kit de IGF-1 de Diagnostic Systems Laboratories (DSL) (Cat. DSL-10-2800) y se usó para la detección se pre-trataron veinte microlitros (20 µl) de suero (duplicados) y luego se usaron 20 µl de la muestra diluida para el ensayo. Para muestras medias, se usaron directamente 20 µl de muestras para el ensayo. El ensayo se siguió siguiendo las instrucciones proporcionadas en el kit. Este kit puede detectar tanto IGF-1 humana como bovina ya que los 2 anticuerpo monoclonales usados para el kit lo son contra las secuencias del péptido homólogas.

65 *Muestras de prueba:* Se usaron las siguientes muestras de prueba:

4A/5A: Suero de ternero recién nacido Newborn; Lote AKM12868
 4B/5B: NIH-FBS (de alícuota@ -20 C)
 4C/5C: Hyclone FBS, Lote: ATK33398
 4D/5D: Hyclone FBS, Lote: AUK 54924
 4E/5E: Suero humano, Lote: A70184, de Valley Biomedical Inc
 4F/5F: Suero Knockout; Invitrogen, Lot: 557914
 4F/5F: F12 DMEM, Invitrogen, Lot: 692281
 4H/5H: Medio de condicionado MEF, Lote: 011410 (Día 5)

Muestras de control: Se usaron las siguientes muestras de control:

Fondo: "0" IGF-1 (control negativo, del kit); la muestra F12 enumerada anteriormente también sirve como un control negativo

2 controles positivos (127 ng/ml y 241 ng/ml; del kit).

Resultados: La sensibilidad del ensayo para el suero era mayor de 10 ng/ml; y para el medio era mayor de 0,1 ng/ml.

Positivos conocidos (ng/ml)	Concentración determinada por el Ensayo (ng/ml)	SE
127 ng/ml	126.8	8.2
241 ng/ml	233.8	4.2

Duplicados	Muestras	IGF-1 (ng/ml)	SE
4A/5A	Suero de ternero recién nacido Newborn; Lote AKM12868	29.78	0.41
4B/5B	NIH-FBS (de alícuota@ -20 C)	49.16	2.68
4C/5C	Hyclone FBS, Lote: ATK33398	80.29	5.39
4D/5D	Hyclone FBS, Lote: AUK 54924	76.45	1.99
4E/5E	Suero Humano, Lote: A70184, de Valley Biomedical Inc.	55.65	2.28
4F/5F	Suero Knockout; Invitrogen, Lote: 557914	12.07	0.15
4G/5G	F12 DMEM, Invitrogen, Lote: 692281	ND*	ND
4H/5H	Medio condicionado MEF, Lote: 011410 (Día 5)	1.33**	0.07

Ejemplo de Referencia 5

Papel de Insulina/IGF y FBS en la Diferenciación de Células Madre Pluripotentes Humanas a Células que Expresan Marcadores Característicos del Linaje del Endodermo Definitivo: Siembra de Células Individuales

Se sembraron células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (p40-p52) como células individuales a una densidad de 100000 células/cm² en placas recubiertas con MATRIGEL® (dilución 1:30) (BD Biosciences; Cat # 356231) en MEF-CM (medio condicionado de fibroblastos embrionarios de ratón) suplementado con 16 ng/ml de FGF2 (Catálogo# 100-18B, PeproTech, NJ) y 10 µM de Y27632 (Rock inhibitor, Catálogo# Y0503, Sigma, MO). 72 horas tras la siembra, los cultivos se diferenciaron en el endodermo definitivo (DE) como sigue:

a. Medio MCDB-131 (Catálogo# 10372-019, Invitrogen, CA) suplementado con 0,22% de FBS (Catálogo# SH30070.03, Hyclone, UT), 0,0025 g/ml de bicarbonato sódico (Catálogo # S3187, Sigma, MO), 1X de GlutaMax™ (Catálogo # 35050-079, Invitrogen, Ca) y 100 ng/ml de GDF8 (Catálogo # 120-00, PeproTech, NJ) más 2.5 µM de inhibidor de GDK3B 14-Prop-2-en-1-il-3,5,7,14,17,23,27-heptaazatetraciclo[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]heptacos-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-nonaen-16-ona durante un día, luego

b. Medio MCDB-131 suplementado con FBS, bicarbonato sódico, Glutamax, y 100 ng/ml de GDF8 durante tres días adicionales.

ES 2 658 146 T3

Se usó 0,5% de FBS para el día 2 y se usó 2% de FBS para los días 3-4. Además del FBS regular, se probaron también FBS tratado con calor (Catálogo# F4135, Sigma, MO) y FBS tratado con carbón vegetal (Catálogo# F6765, Sigma, MO). algunos de los cultivos tratados con FBS también se trataron con varias concentraciones de IGF (10-100 ng/ml) o insulina (10-100 ng/ml).

5

En el día 4, se recolectaron las muestras para análisis por FACS y PCR en tiempo real. Al contrario que los cultivos tratados con BSA (ver Ejemplos anteriores) en presencia de FBS, la adición de insulina o IGF reguló por disminución dependientemente de la dosis los marcadores asociados con el endodermo definitivo como SOX17 y CXCR4. Ver Figura 9. La expresión del marcador de pluripotencia NANOG también se reguló por incremento.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un cultivo celular que comprende una población aislada de células y un medio de cultivo adecuado para diferenciar células madre pluripotentes, en donde el medio de cultivo carece de suero y se suplementa con BSA, GDF-8 y 14-Prop-2-en-1-il-3,5,7,14,17,23,27-heptaazatetracilo[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]heptacos-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11, 21,23-nonaen-16-ona y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1, en donde más del 85% de las células en la población expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, en donde dicha población de células se obtiene diferenciando células madre pluripotentes en el medio de cultivo.
- 10 **2.** El cultivo celular de la reivindicación 1, en donde la población de células madre pluripotentes se diferencia en el medio que carece de suero y suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1 durante un periodo de por lo menos 6 días.
- 15 **3.** El cultivo celular de la reivindicación 1 ó 2, en donde la población de células madre pluripotentes se diferencia en el medio que carece de suero y suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1 durante un periodo de por lo menos 7 días.
- 20 **4.** El cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se seleccionan del grupo que consiste de SOX17, GATA4, HNF-3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína de caja homeótica tipo mezcla, FGF4, CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99, y OTX2.
- 25 **5.** El cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el GDF-8 se usa a una concentración de 5 ng/ml a 500 ng/ml; de 5 ng/ml a 50 ng/ml; de 5 ng/ml a 25 ng/ml; o de 25 ng/ml.
- 30 **6.** El cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la insulina se usa a una concentración de 1 ng/ml a 100 ng/ml.
- 35 **7.** El cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el IGF-1 se usa a una concentración de 1 ng/ml a 200 ng/ml.
- 40 **8.** El cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la población de células en donde más del 85% de las células en la población expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo puede diferenciarse adicionalmente en una población de células que expresan marcador característicos del linaje del endodermo pancreático.

40

45

50

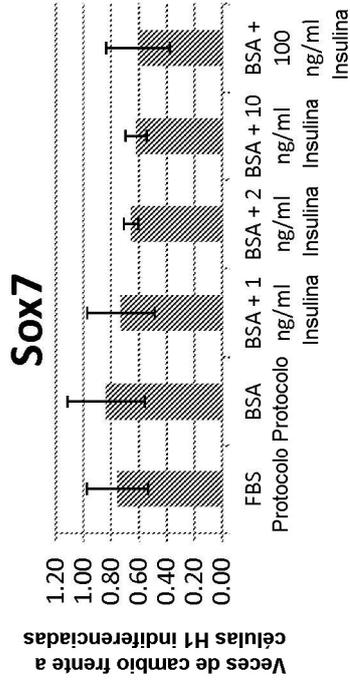
55

60

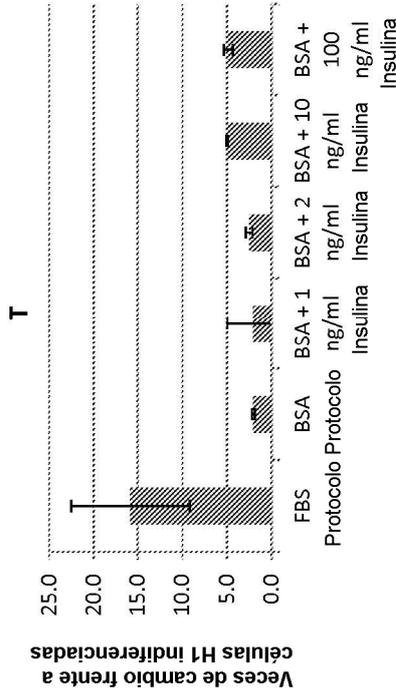
65

Figura 1

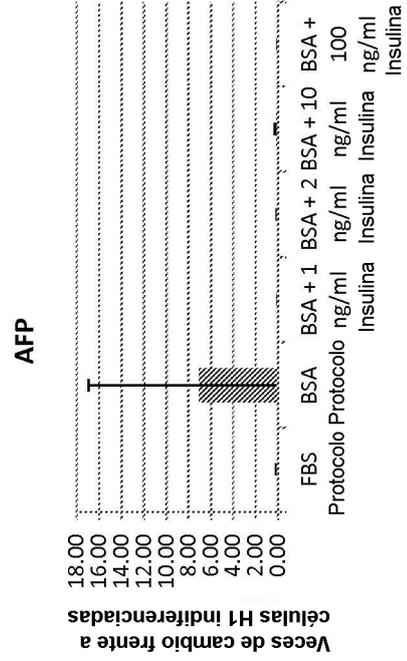
a)



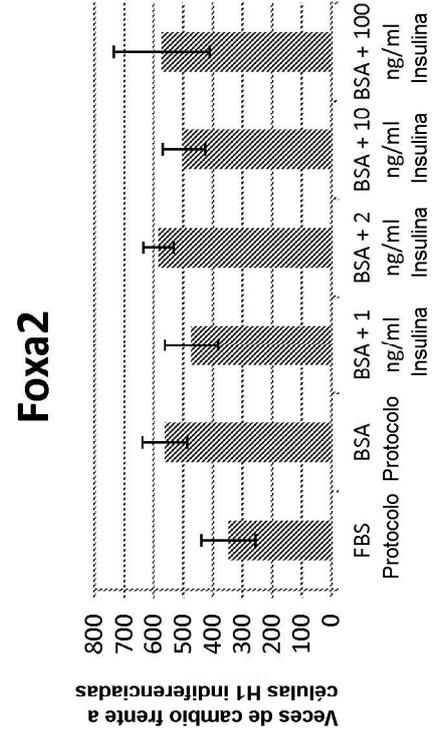
b)



c)

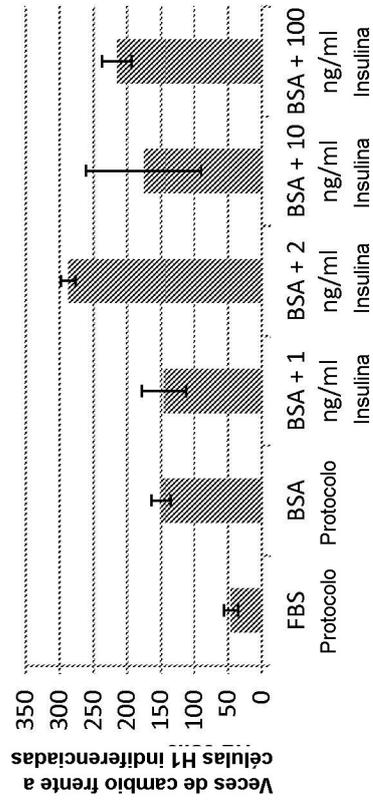


d)



e)

CXCR4



f)

SOX17

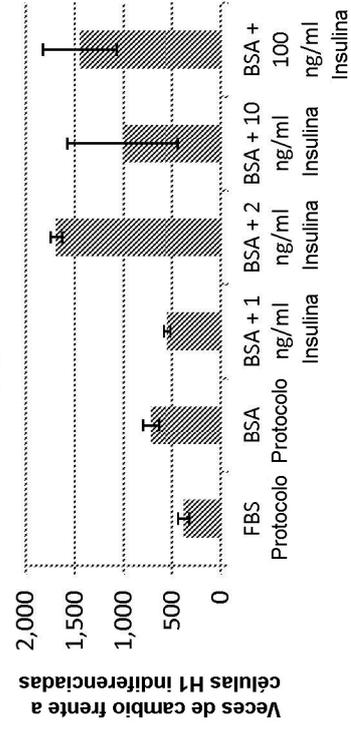


Figura 2

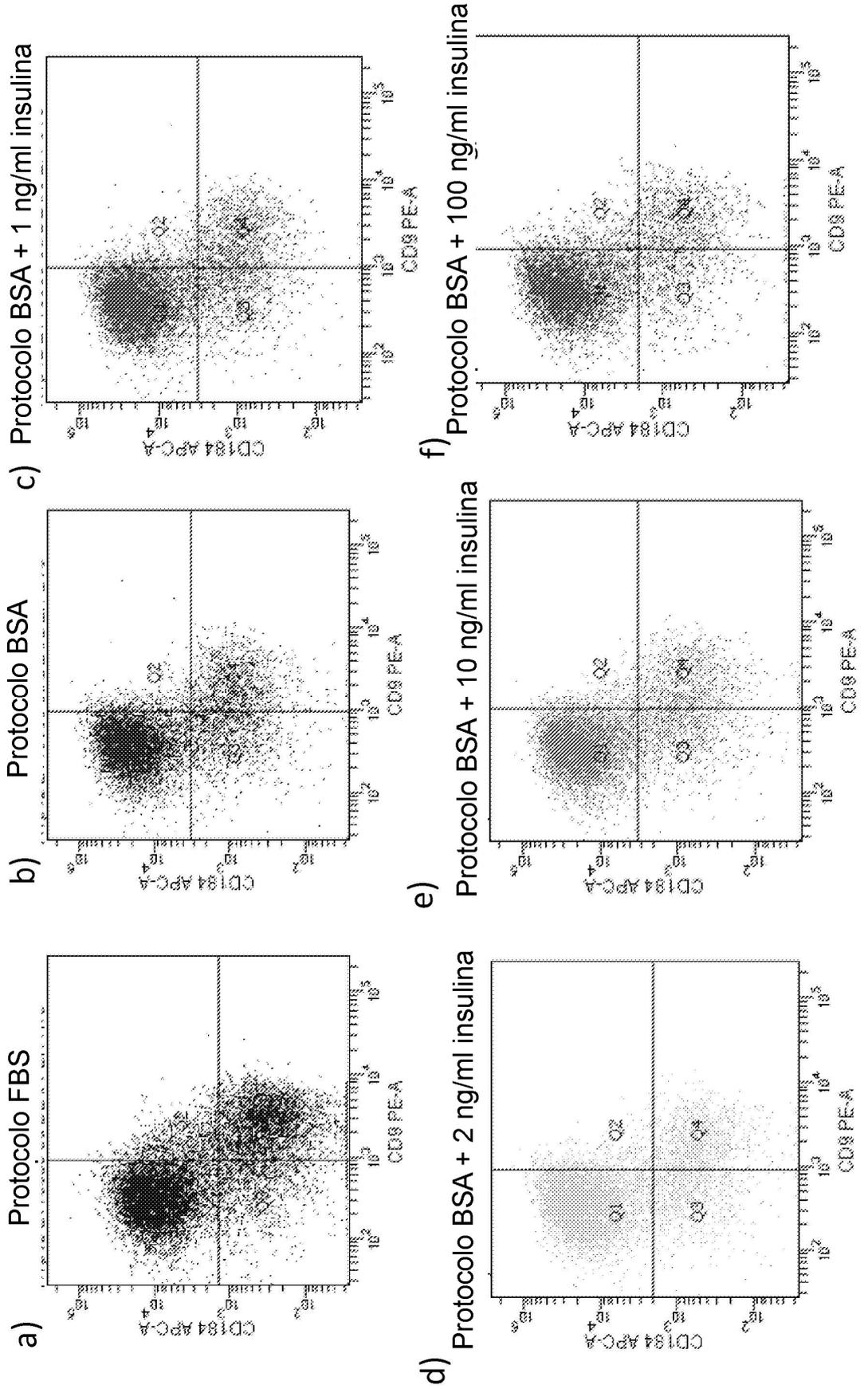
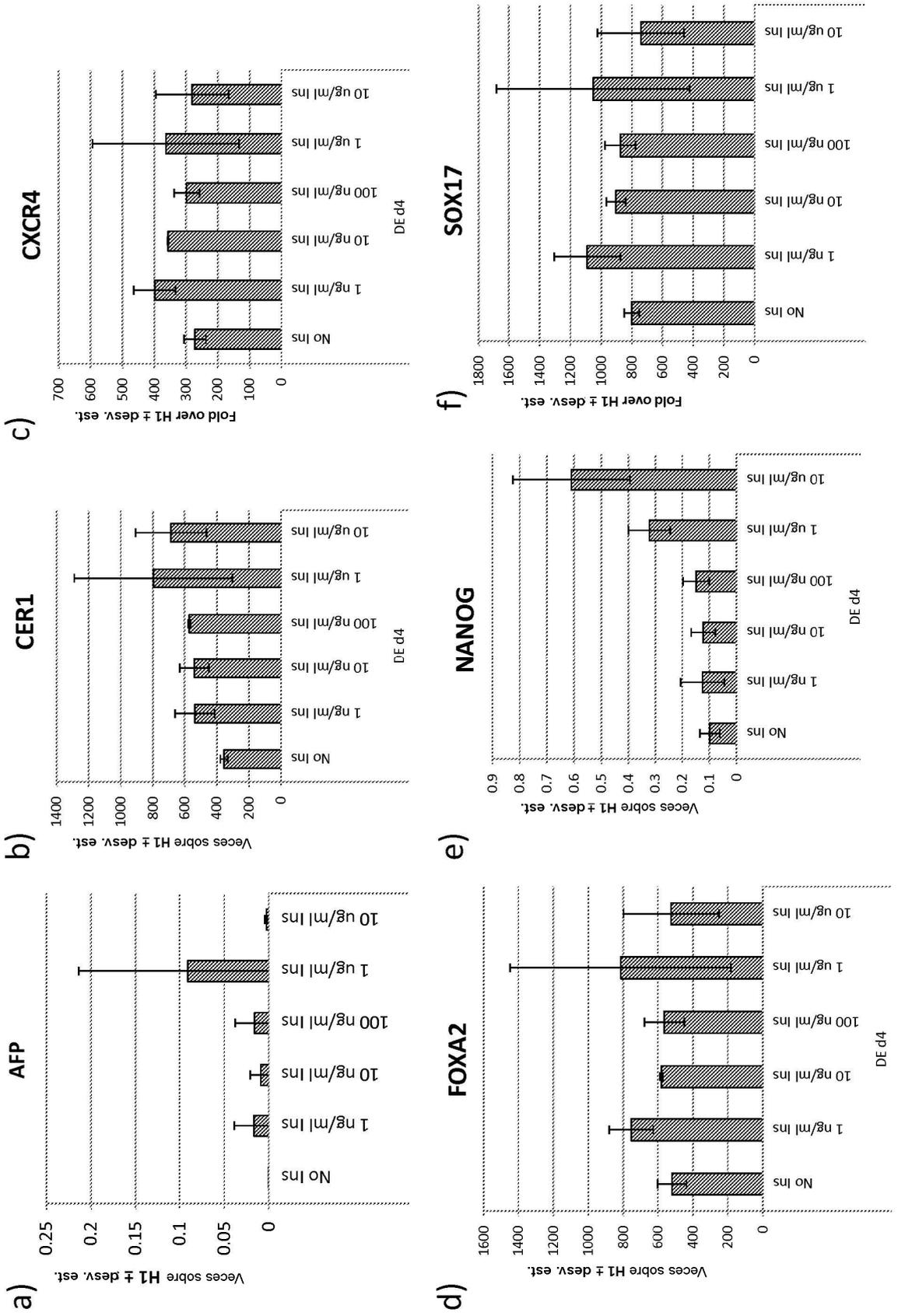


Figura 3



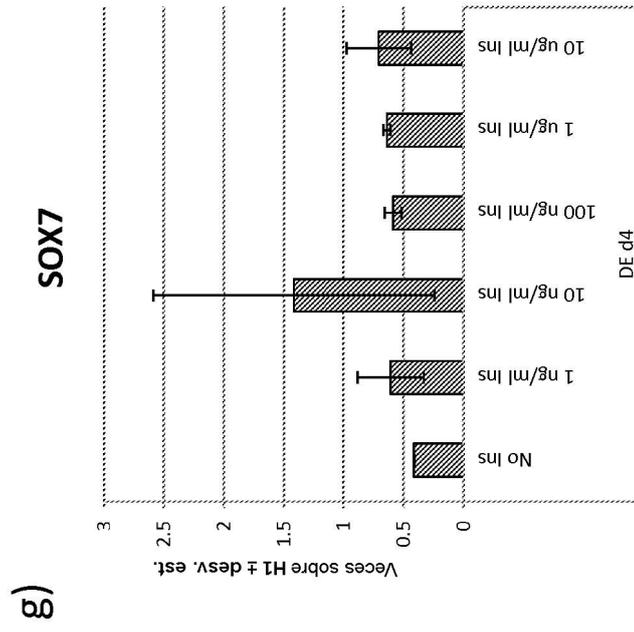
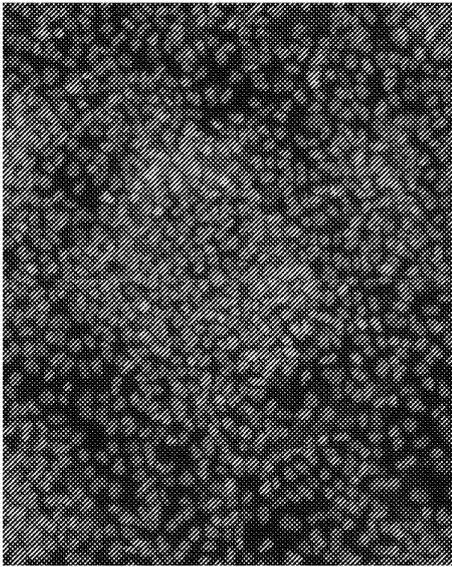
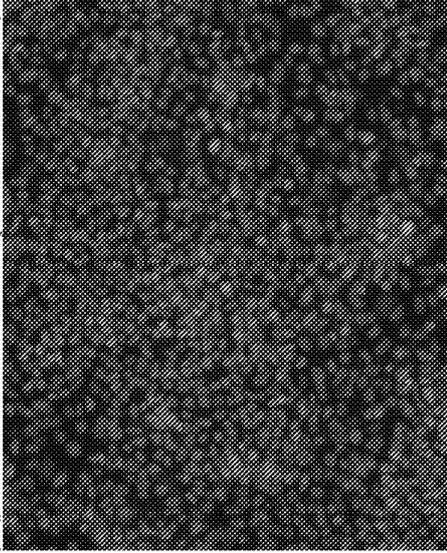


Figura 4

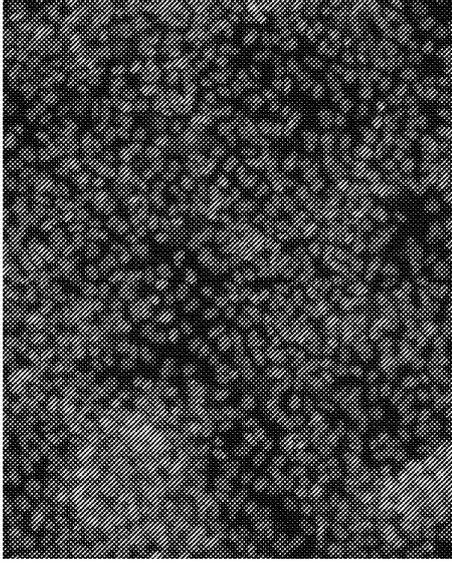
Sox17-Verde//DAPI-Azul



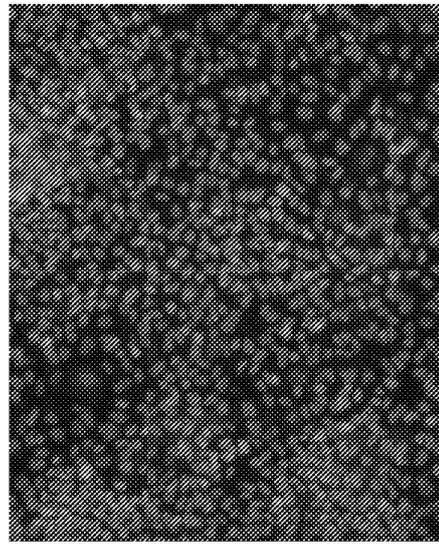
Sin insulina



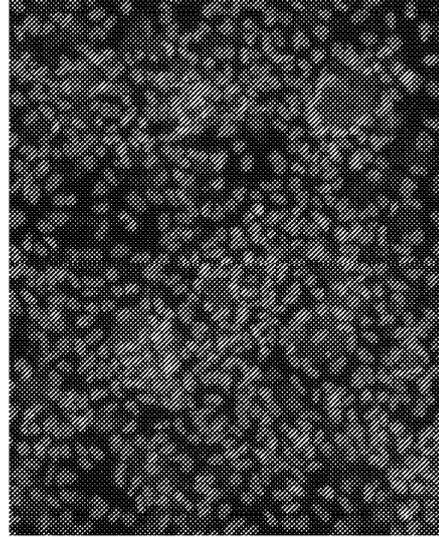
1 ng/ml de insulina



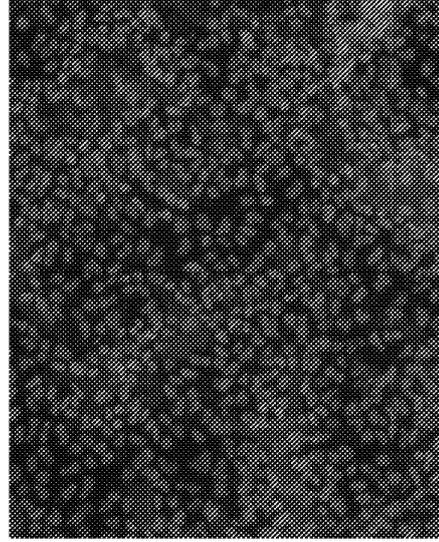
10 ng/ml de insulina



100 ng/ml de insulina



1 ug/ml de insulina



10 ug/ml de insulina

Figura 5

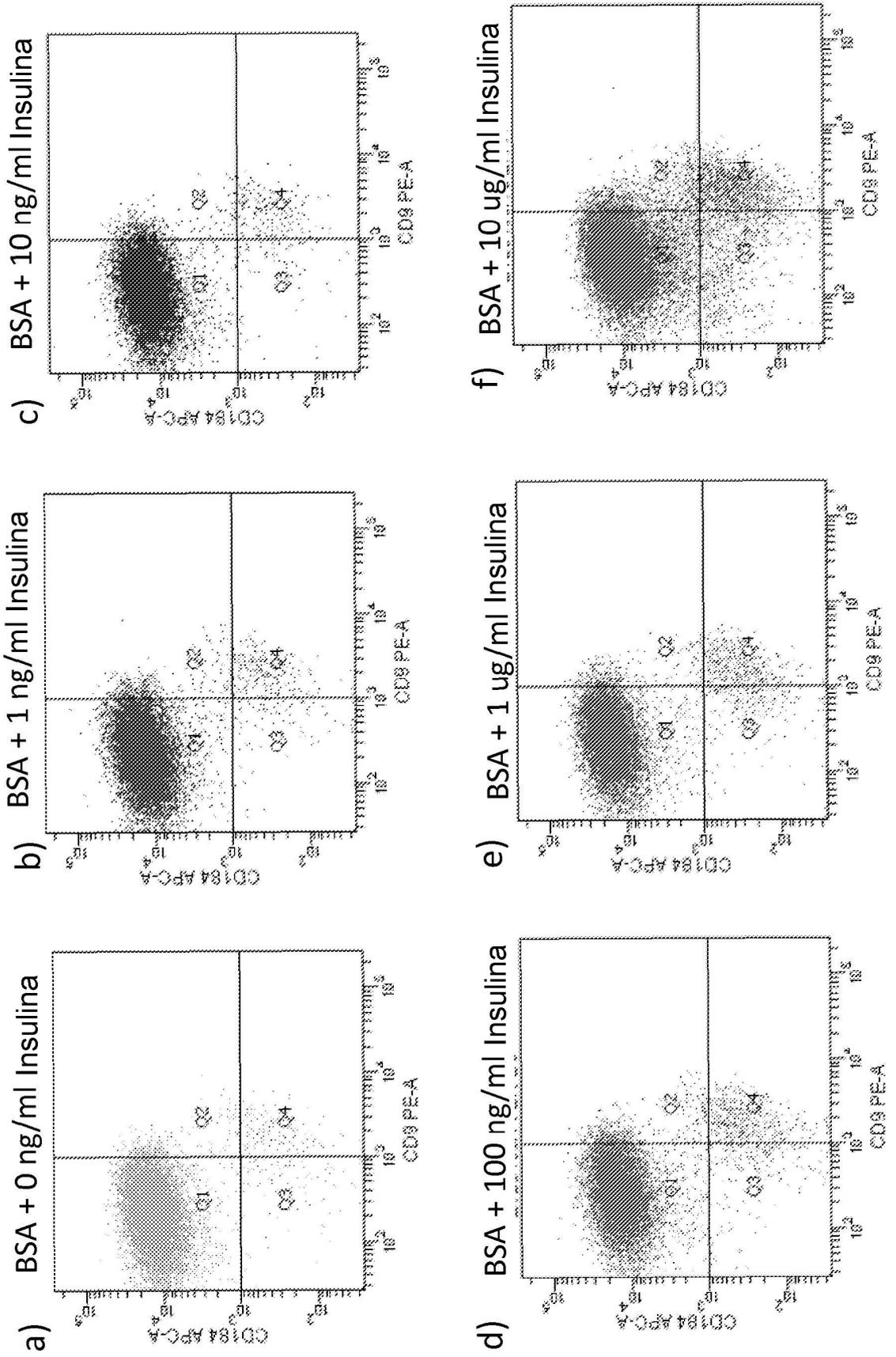


Figura 6

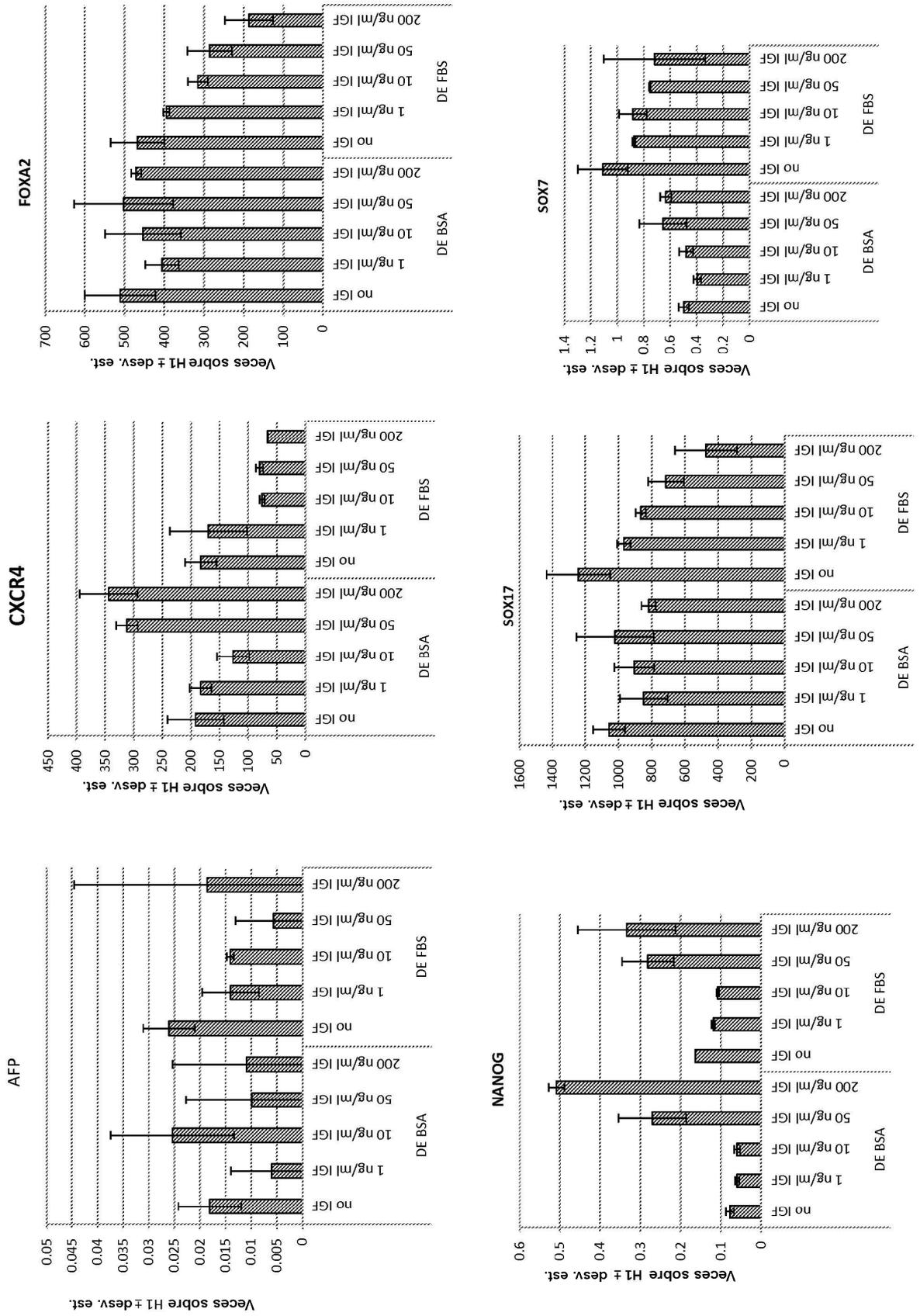
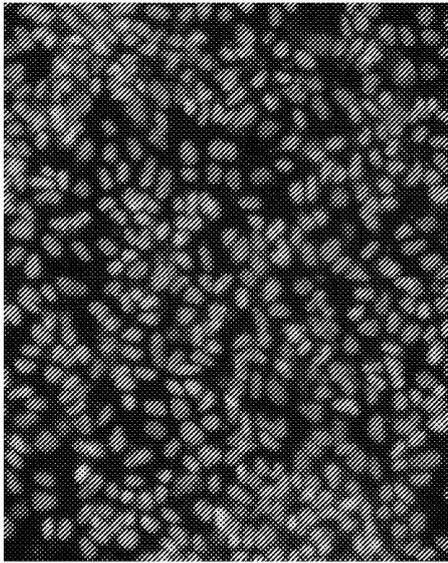


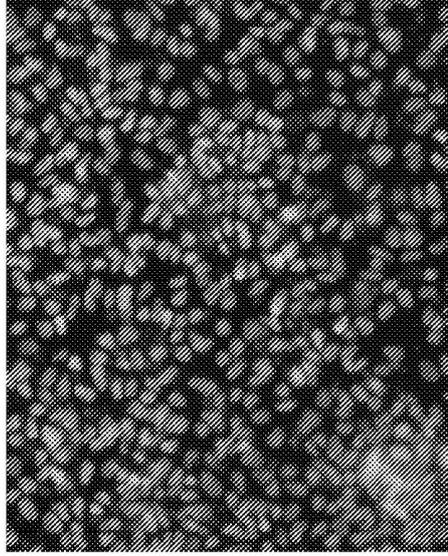
Figura 7

2% BSA

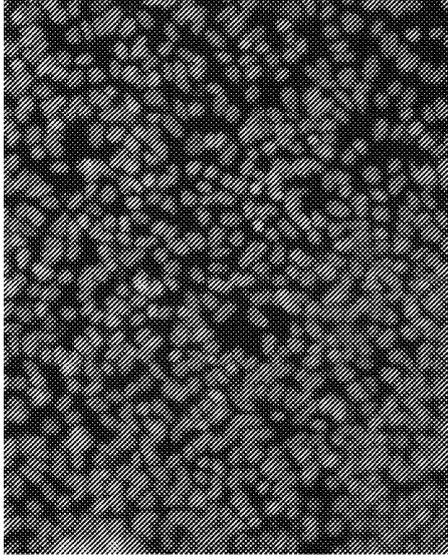
Sox 17-Verde/DAPI-Azul



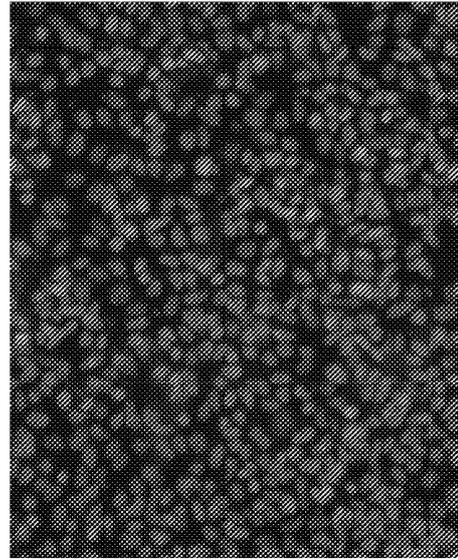
No IGF



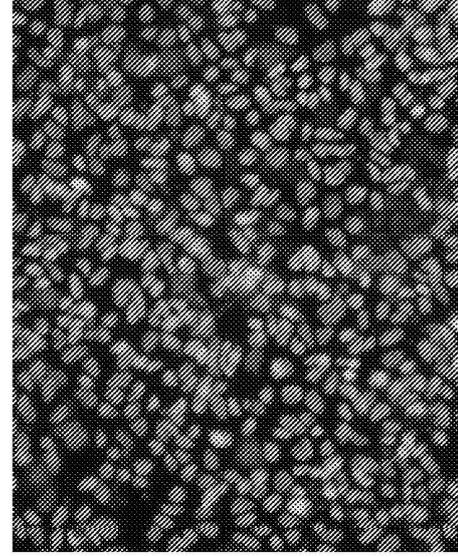
1 ng/ml IGF



10 ng/ml IGF



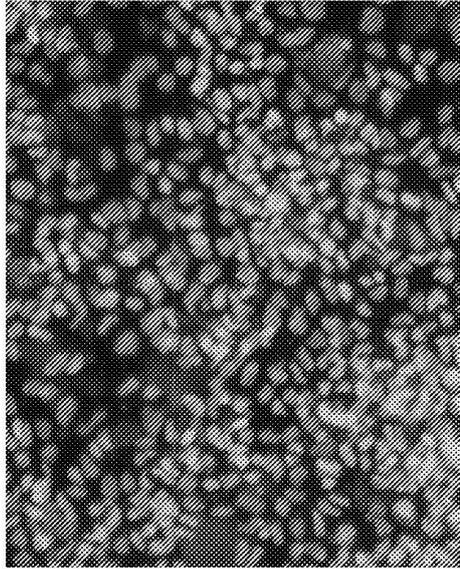
50 ng/ml IGF



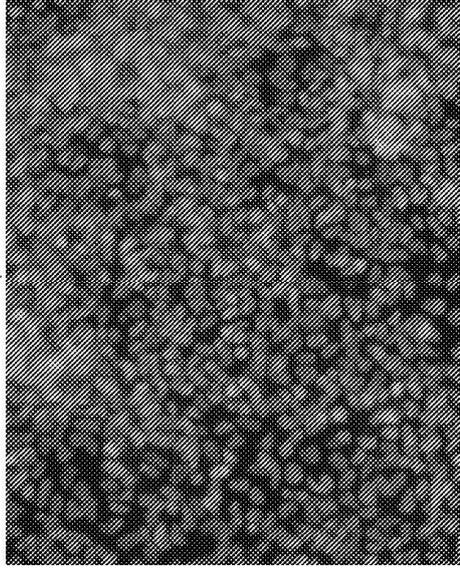
200 ng/ml IGF

Figura 8

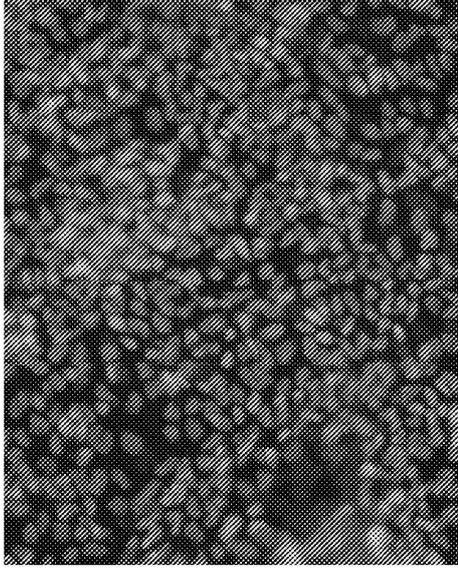
2% FBS
Sox 17: Verde / DAPI-Azul



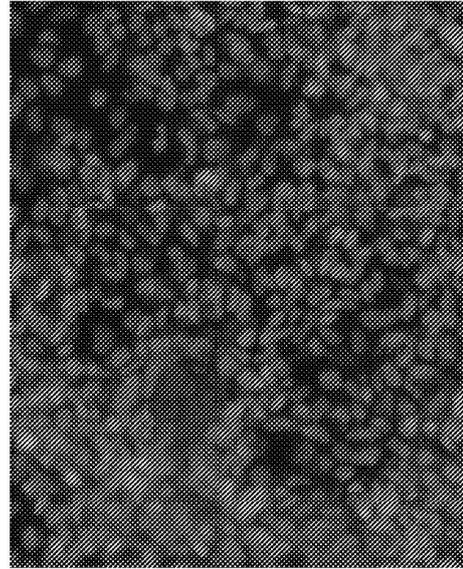
No IGF



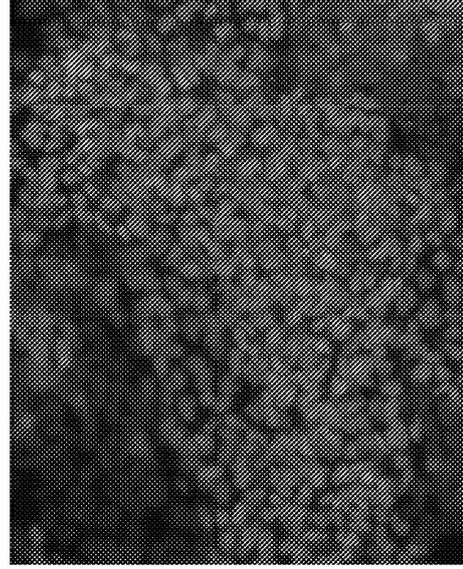
1 ng/ml IGF



10 ng/ml IGF



50 ng/ml IGF



200 ng/ml IGF

Figura 9

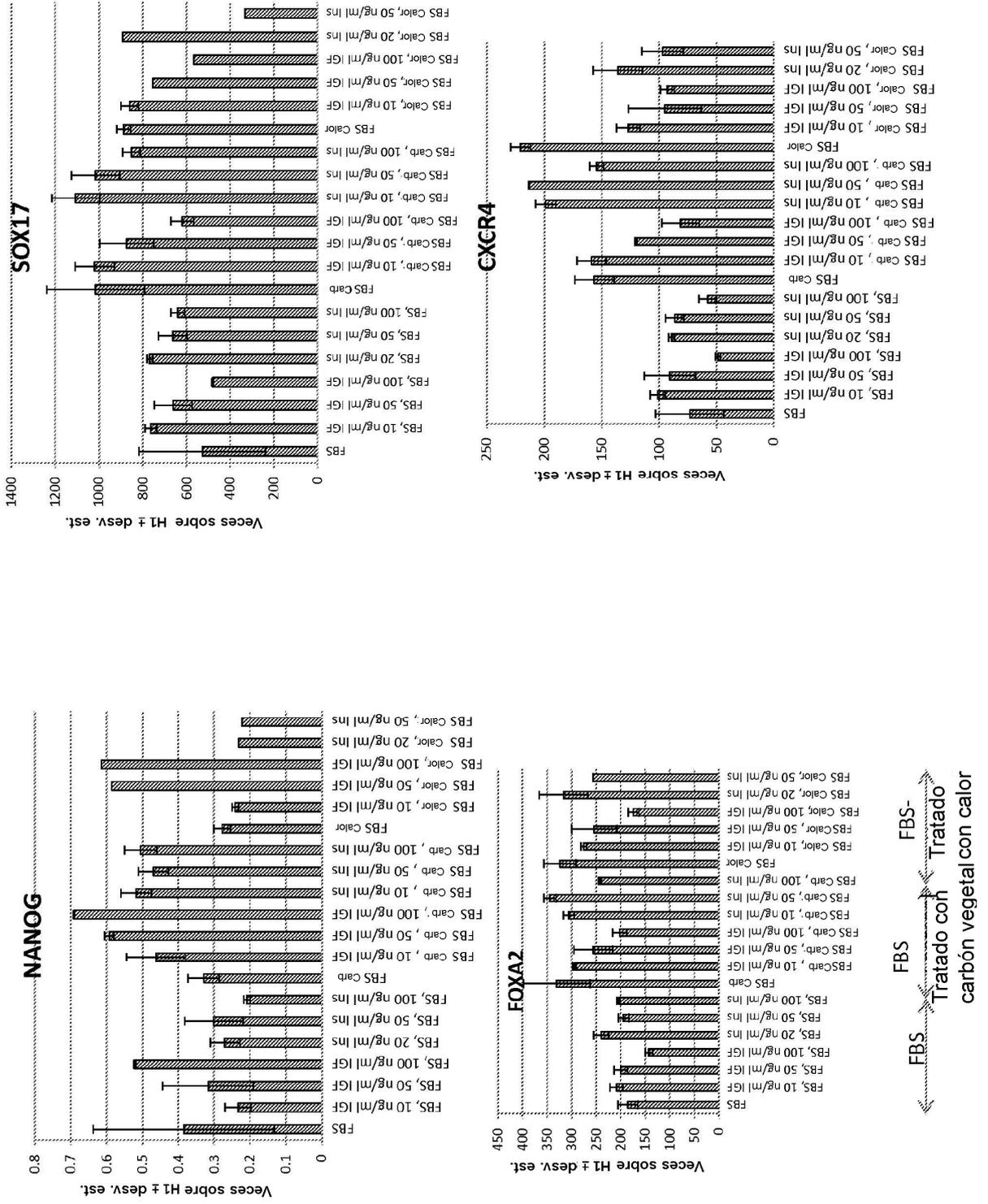


Figura 9

