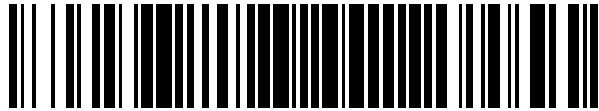


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 897**

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/US2011/048127**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2012 WO12030538**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2011 E 11822349 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2611909**

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

30 Prioridad:

**31.08.2010 US 378448 P**

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

**26.03.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FRYER, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 660 897 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 invención**

La presente divulgación proporciona métodos para estimular la diferenciación de células madre pluripotenciales en células productoras de insulina. En particular, la presente divulgación proporciona un método para producir una población de células, en el que más del 80 % de las células en la población expresa marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo.

**Antecedentes**

Los avances en la terapia de reemplazo celular para la diabetes mellitus tipo I y la escasez de islotes de Langerhans trasplantables han centrado el interés en el desarrollo de fuentes de células productoras de insulina, o células  $\beta$ , apropiadas para el injerto. Un enfoque es la generación de células  $\beta$  funcionales a partir de células madre pluripotenciales, tales como, por ejemplo, células madre embrionarias.

Durante el desarrollo embrionario de los vertebrados, una célula pluripotencial da lugar a un grupo de células que comprenden tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) en un proceso conocido como gastrulación. Los tejidos tales como, por ejemplo, el tiroides, el timo, el páncreas, el intestino y el hígado, se desarrollará a partir del endodermo, a través de una etapa intermedia. La etapa intermedia en este proceso es la formación de endodermo definitivo. Las células definitivas del endodermo expresan una serie de marcadores, tales como, beta HNF3, GATA4, MIXL1, CXCR4 y SOX 17.

La formación del páncreas surge de la diferenciación de endodermo definitivo en el endodermo pancreático. Las células del endodermo pancreático expresan el gen homeobox duodenal-pancreático, PDX1. En ausencia de PDX1, el páncreas no logra desarrollarse más allá de la formación de yemas ventrales y dorsales. Por tanto, la expresión de PDX1 marca una etapa crítica en la organogénesis pancreática. El páncreas madura contiene, entre otros tipos de células, tejido exocrino y tejido endocrino. Los tejidos exocrinos y endocrinos surgen de la diferenciación del endodermo pancreático.

Las células que soportan las propiedades de las células de los islotes se han derivado, según se ha informado, de células embrionarias de ratón. Por ejemplo, Lumelsky y col., (Science 292:13, 2001) señalan que la diferenciación de las células madre de embriones de ratón en estructuras secretoras de insulina es similar a la de los islotes pancreáticos. Soria y col., (Diabetes 49:157, 2000) señalan que las células secretoras de insulina derivadas de las células madre de embriones de ratón normalizan la glucemia en ratones con diabetes inducida por estreptozotocina.

En un ejemplo, Hori y col., (PNAS 99: 16105, 2002) divulgan que el tratamiento de las células madre de embriones de ratón con inhibidores de la fosfoinositido 3-quinasa (LY294002) produjo células que se parecían a las células  $\beta$ .

En otro ejemplo, Blyszczuk y col., (PNAS 100:998, 2003) informan que la generación de células productoras de insulina a partir de células madre de embriones de ratón expresan constitutivamente Pax4.

Micallef y col., informan que el ácido retinoico puede regular la implicación de las células madre embrionarias en la formación de endodermos pancreático positivo para PDX1. El ácido retinoico es el más efectivo en la inducción de la expresión de Pdx1 cuando se añade a cultivos el día cuatro de la diferenciación de la célula madre embrionaria, durante un período que se corresponde con el final de la gastrulación en el embrión (Diabetes 54:301, 2005).

Miyazaki y col., informan que una línea de células madre de embrión de ratón sobreexpresa Pdx1. Sus resultados muestran que la expresión exógena de Pdx1 potencia claramente la expresión de insulina, somatostatina, glucoquinasa, neurogenina 3, p48, Pax6 y Hnf6 en las células diferenciadas resultantes (Diabetes 53: 1030, 2004).

Skoudy y col., informan que la activina A (miembro de la superfamilia de TGF- $\beta$ ) regula por aumento la expresión de los genes pancreáticos exocrinos (p48 y amilasa) y de los genes endocrinos (Pdx1, insulina y glucagón) en células madre de embrión de ratón. Se observó el máximo efecto utilizando activina A 1 nM. También se observó que el nivel de expresión de ARNm de insulina y Pdx1 no se veía afectados por el ácido retinoico; sin embargo, el tratamiento con FGF7 de 3nM dio como resultado un incremento en el nivel de la transcripción de Pdx1 (Biochem. J. 379: 749.200 4).

Shiraki y col., estudiaron los efectos de los factores de crecimiento que potencian específicamente la diferenciación de las células madre embrionarias en el interior de las células positivas para Pdx1. Observaron que la reproducibilidad de TGF- $\beta$ 2 producía una mayor proporción de células positivas para PDX1 (Genes Cells. 2005 Jun; 10(6): 503-16.).

Gordon y col., demostraron la inducción de células del endodermo [positiva]/ HNF3 beta [positiva] a partir de células

madre de embriones de ratón, en ausencia de suero y en presencia de activina, junto con un Inhibidor de la señalización de Wnt (documento US 2006/0003446A1).

5 Gordon y col., (PNAS, Vol. 103, página 16806, 2006) declara "se requirió la señalización simultánea de Wnt y TGF- $\beta$ / nodal/ activina para la generación de la línea primitiva anterior."

Sin embargo, el desarrollo del modelo de células madre de embriones de ratón puede no imitar exactamente el programa de desarrollo en mamíferos superiores como, por ejemplo, los seres humanos.

10 Thomson y col., aislaron células madre embrionarias de blastocitos humanos (Science 282:114, 1998). Al mismo tiempo, Gearhart y colaboradores derivaron líneas de células germinales embrionarias humanas (hEG) a partir del tejido gonadal fetal (Shamblott y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998). A diferencia de las células madre embrionarias de ratón, a las que se puede impedir la diferenciación simplemente mediante el cultivo con el factor inhibidor de la leucemia (LIF), las células madre embrionarias humanas deben conservarse en condiciones muy especiales (patente de Estados Unidos n.º 6.200.806; documento WO 99/20741; documento WO 01/51616).

15 D'Amour y col., describen la producción de cultivos enriquecidos con endodermo definitivo derivado de células madre embrionarias de seres humanos en presencia de una elevada concentración de activina y baja de suero (Nature Biotechnology 2005). El trasplante de estas células bajo la cápsula renal de los ratones dio como resultado la diferenciación en células más maduras con las características de algunos órganos endodérmicos. Las células de endodermo definitivo derivado de células madre embrionarias pueden diferenciarse adicionalmente en células positivas para PDX1 tras la adición de FGF1 (documento US 2005/266554A1).

20 D'Amour y col., (Nature Biotechnology – 24, 1392 – 1401 (2006)) indican: "Hemos desarrollado un proceso de diferenciación que convierte las células madre embrionarias de humanos (hES) en células endocrinas capaces de sintetizar las hormonas pancreáticas: insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático y grelina. Este proceso imita la organogénesis pancreática *in vivo* conduciendo las células a través de varias etapas que se parecen al endodermo definitivo, al endodermo del tubo intestinal, al endodermo pancreático y al precursor endocrino, en ruta hacia las células que expresan hormonas endocrinas".

30 En otro ejemplo, Fisk y col., señalan un sistema para producir células de los islotes pancreáticos a partir de células madre embrionarias humanas (documento US2006/0040387A1). En este caso, la vía de diferenciación se dividió en tres etapas. Primero, las células madre embrionarias humanas se diferenciaron en endodermo utilizando una combinación de butirato de sodio y activina A. A continuación, se cultivaron las células con antagonistas de TGF- $\beta$ , tal como Noggin combinado con EGF o betacelulina para generar células positivas para PDX1. La diferenciación terminal se indujo con nicotinamida.

40 Sigue existiendo una necesidad significativa de desarrollar métodos *in vitro* para generar una célula funcional que exprese insulina que se asemeje más estrechamente a una célula  $\beta$ . La presente invención adopta un enfoque alternativo para mejorar la eficacia de la diferenciación de células madre embrionarias humanas a células que expresan insulina, a través de la generación de una población de células en la que más del 80 % de las células en la población exprese marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo.

### Sumario

45 La presente invención proporciona un cultivo celular que comprende una población aislada de células y un medio de cultivo adecuado para diferenciar células madre pluripotenciales complementadas con GDF-8 y 14-Prop-2-en-1-yl-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 y en el que la concentración de glucosa no supera 5,5 mM, en el que las células en la población expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo, en el que dicha población de células se puede obtener mediante:

- 55 a. Cultivar una población de células madre pluripotenciales,  
b. Diferenciar la población de células madre pluripotenciales en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo cultivando las células madre pluripotenciales en el medio de cultivo.

60 En una realización, la presente divulgación proporciona una población de células, en la que más del 80 % de las células en la población expresa marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo.

En una realización, la presente divulgación proporciona un método para generar una población de células, en el que más del 80 % de las células en la población expresa marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo, que comprende las etapas de:

- 65 a. Cultivar una población de células madre pluripotenciales,

b. Diferenciar la población de células madre pluripotenciales en una población de células en la que más del 80 % de las células en la población expresa marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo en un medio en el que la concentración de glucosa no supera 10,5 mM.

## 5 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el análisis de FACS de la expresión de las proteínas indicadas en las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciadas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1.

10 La figura 2 muestra el efecto de la concentración de glucosa en el medio sobre los niveles de expresión de CXCR4 (panel B) y el número y la viabilidad de las células (panel B) en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciadas de acuerdo con los métodos desvelados en el Ejemplo 2.

La figura 3 muestra el efecto de la concentración de glucosa en el medio sobre los niveles de expresión de CXCR4 y el aspecto en el cultivo (panel A) y la expresión de SOX17 en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciadas de acuerdo con los métodos desvelados en el Ejemplo 2.

15 La figura 4 muestra el análisis de PCR en tiempo real de la expresión de los genes indicados en las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciadas de acuerdo con el primer método desvelado en el Ejemplo 2.

La figura 5 muestra el análisis de PCR en tiempo real de la expresión de los genes indicados en las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciadas de acuerdo con el segundo método desvelado en el Ejemplo 2.

20 La figura 6 muestra el nivel de pH de los diversos medios después de una exposición de 24 horas a las células los días 1 a 4 de los métodos desvelados en el Ejemplo 2.

La figura 7 muestra el efecto de los niveles de pH en el medio sobre la expresión de los genes indicados en las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciadas de acuerdo con el segundo método desvelado en el Ejemplo 3.

25 La figura 8 muestra el análisis de PCR en tiempo real de la expresión de los genes indicados en las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciadas de acuerdo con el método desvelado en el Ejemplo 4.

## 30 Descripción detallada

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

## 35 Definiciones

Las células madre son células indiferenciadas definidas por su capacidad a nivel de una sola célula tanto para autorrenovarse como para diferenciarse para producir células descendientes, incluidas células progenitoras autorrenovantes, progenitoras no renovantes y células terminalmente diferenciadas. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de diversos linajes celulares a partir de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a los tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, si no todos, los tejidos después de inyectarse en blastocistos.

45 Las células madre se clasifican de acuerdo con su potencial de desarrollo como: (1) *totipotenciales*, que son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias; (2) *pluripotenciales*, que significa que son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias; (3) *multipotenciales*, que significa que son capaces de dar lugar a un subconjunto de linajes celulares, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico concreto (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir una descendencia que incluye HSC (autorrenovantes), progenitoras oligopotenciales limitadas a células sanguíneas, y todos los tipos de células y elementos (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre. (4) oligopotenciales, que significa que son capaces de dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes celulares que las células madre multipotenciales; y (5) unipotenciales, que significa que son capaces de dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

La diferenciación es el proceso mediante el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, tal como, por ejemplo, una célula nerviosa o una célula muscular. Una célula diferenciada o inducida por diferenciación es la que ha adquirido una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término "comprometida", cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha avanzado en la vía de diferenciación hasta un punto en la que, en circunstancias normales, continuará diferenciándose hasta un tipo de célula o subconjunto de tipos de células específico, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse a un tipo de célula diferente o volver a un tipo de célula menos diferenciada. Desdiferenciación se refiere al proceso mediante el cual una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Tal como se utiliza en el presente documento, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células procedía y a qué células

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

5 "Células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo", o "células de Etapa 1", o "Etapa 1", como se usa en el presente documento, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox similar a Mix, FGF4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 o OTX2. Las células que  
10 expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo incluyen células precursoras de línea primitiva, células de línea primitiva, células del mesoendodermo y células de endodermo definitivo.

"Células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático", como se usa en el presente documento, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: PDX1, NKX6,1, HNF1  
15 beta, PTF1 alfa, HNF6, HNF4 alfa, SOX9, HB9 o PROX1. Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático incluyen células de endodermo pancreático, células de tubo intestinal primitivo y células de intestino anterior posterior.

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

"Marcadores", como se usa en el presente documento, son las moléculas de ácido nucleico o polipeptídicas que se  
25 expresan diferencialmente en una célula de interés. En este contexto, la expresión diferencial significa un aumento del nivel de un marcador positivo y una disminución del nivel de un marcador negativo. El nivel detectable del marcador ácido nucleico o polipéptido 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  
30 células utilizando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica.

"Célula pancreática endocrina" o "célula que expresa hormona pancreática" o "célula que expresan marcadores  
35 característicos del linaje endocrino pancreático", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula capaz de expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

### **Aislamiento, expansión y cultivo de células madre pluripotenciales**

#### *Caracterización de células madre pluripotenciales*

40 Las células madre pluripotenciales 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 y col., Science 282:1145, 1998). La diferenciación de las células madre pluripotenciales in vitro da como resultado la pérdida de expresión de SSEA-4, Tra 1-60 y Tra 1-81 (si está presente) y el aumento de expresión de SSEA- 1. Las  
45 células madre pluripotenciales no diferenciadas tienen, típicamente, actividad de fosfatasa alcalina, que puede detectarse mediante la fijación de las células con paraformaldehído al 4 % y, después, desarrollando con Vector Red como sustrato, como describe el fabricante (Vector Laboratories, Burlingame Calif.). Las células madre pluripotenciales no diferenciadas también expresan típicamente OCT4 y TERT, según lo detectado mediante RT-PCR.

50 Otro fenotipo deseable de células madre pluripotenciales propagadas es un potencial de diferenciarse en células de las tres capas germinales: tejidos de endodermo, mesodermo y ectodermo. Pluripotencia de las células madre pluripotenciales se puede confirmar, por ejemplo, mediante la inyección de células en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID), fijando los teratomas que se forman usando 4 % de paraformaldehído y, después,  
55 examinándolos histológicamente para detectar evidencia de tipos de células de las tres capas germinales. Como alternativa, la pluripotencia se puede determinar mediante la creación de cuerpos embrioides y la evaluación de los cuerpos embrioides para determinar la presencia de marcadores asociados con las tres capas germinales.

Las líneas de células madre pluripotenciales propagadas pueden cariotiparse utilizando una técnica de bandas G  
60 estándar y se comparan con los cariotipos publicados de las especies de primates correspondientes. Es deseable obtener células que tienen un "cariotipo normal", lo que significa que las células son euploides, en las que todos los cromosomas humanos están presentes y no están alterados de forma notable.

#### *Fuentes de células madre pluripotenciales*

65 Ejemplos de células madre pluripotenciales son líneas establecidas de células madre embrionarias humanas o células germinales embrionarias humanas, tales 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 pluripotenciales ya cultivadas en ausencia de células alimentadoras. También son adecuadas las líneas mutantes de células madre embrionarias humanas, tales como, por ejemplo, la línea celular de referencia BG01v (BresaGen, Athens, GA).

5 *Cultivo de células madre pluripotenciales*

10 En una realización, las células madre pluripotenciales se cultivan sobre una capa de células alimentadoras que soportan las células madre pluripotenciales de varias maneras. Como alternativa, las células madre pluripotenciales se cultivan en un sistema de cultivo que está esencialmente libre de células alimentadoras, pero, no obstante, apoya la proliferación de células madre pluripotenciales sin experimentar una diferenciación sustancial. El crecimiento de células madre pluripotenciales en cultivos libres de alimentación sin diferenciación se soporta utilizando un medio acondicionado por cultivo previo con otro tipo celular. Como alternativa, el crecimiento de células madre pluripotenciales en cultivo libre de alimento sin diferenciación se soporta utilizando un medio químicamente definido.

15 En una realización, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar sobre una capa de células de alimentación de fibroblastos embrionarios de ratón conforme a los métodos desvelados en Reubinoff y col., (Nature Biotechnology 18: 399 – 404 (2000)). Como alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar sobre una capa de células de alimentación de fibroblastos embrionarios de ratón conforme a los métodos desvelados en Thompson y col., (Science 6 de noviembre de 1998: Vol. 282. no. 5391, pág. 1145 – 1147). Como alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar sobre una cualquiera de las capas de células alimentadoras desveladas en Richards y col., (Stem Cells 21: 546–556, 2003).

20 En una realización, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar sobre una capa de células alimentadoras humanas conforme a los métodos desvelados en Wang y col., (Stem Cells 23: 1221–1227, 2005). En una realización alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar sobre la capa de células alimentadoras humanas desveladas en Stojkovic y col., (Stem Cells 2005 23: 306–314, 2005). Como alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar sobre la capa de células alimentadoras humanas desveladas en Miyamoto y col., (Stem Cells 22: 433–440, 2004). Como alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar sobre la capa de células alimentadoras humanas desveladas en Amit y col., (Biol. Reprod 68: 2150–2156, 2003). Como alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar sobre la capa de células alimentadoras humanas desveladas en Inzunza y col., (Stem Cells 23: 544–549, 2005).

25 En una realización, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar en medios de cultivo derivados conforme a los métodos desvelados en el documento US20020072117. Como alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar en medios de cultivo derivados conforme a los métodos desvelados en el documento US6642048. Como alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar en medios de cultivo derivados conforme a los métodos desvelados en el documento WO2005014799. Como alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar en medios de cultivo derivados conforme a los métodos desvelados en Xu y col., (Stem Cells 22: 972–980, 2004). Como alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar en medios de cultivo derivados conforme a los métodos desvelados en el documento US20070010011. Como alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar en medios de cultivo derivados conforme a los métodos desvelados en el documento US20050233446. Como alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar en medios de cultivo derivados conforme a los métodos desvelados en el documento US6800480. Como alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar en medios de cultivo derivados conforme a los métodos desvelados en el documento WO2005065354.

30 En una realización, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar en medios de cultivo desvelados en el documento WO2005065354. Como alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar en medios de cultivo desvelados en el documento WO2005086845.

35 En una realización, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar conforme a los métodos desvelados en Cheon y col., (BioReprod DOI: 10.1095/biolreprod.105.046870, 19 de octubre de 2005). Como alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar conforme a los métodos desvelados Levenstein y col., (Stem Cells 24: 568–574, 2006). Como alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar conforme a los métodos desvelados en el documento US20050148070. Como alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar conforme a los métodos desvelados en el documento US20050244962. Como alternativa, las células madre pluripotenciales se pueden cultivar conforme a los métodos desvelados en el documento WO2005086845.

40 Las células madre pluripotenciales pueden sembrarse sobre un sustrato de cultivo adecuado. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es un componente de la matriz extracelular, tal como, por ejemplo, los derivados de la membrana basal o que pueden formar parte de los acoplamientos ligando-receptor de la molécula de adhesión. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es MATRIGEL® (Becton Dickinson). MATRIGEL® es una preparación soluble de células tumorales Engelbreth-Holm Swarm que se gelifica a temperatura ambiente para formar una membrana basal reconstituida.

Otros componentes de la matriz extracelular y mezclas de componentes son adecuados como alternativa. Dependiendo del tipo de células que se proliferan, esto puede incluir laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, sulfato de heparano y similares, solos o en diversas combinaciones.

5 Las células madre pluripotenciales pueden sembrarse en placas sobre el sustrato en una distribución adecuada y en presencia de un medio que estimula la supervivencia, propagación y retención de las características deseables. Todas estas características se benefician de una atención cuidadosa a la distribución de la siembra y pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la técnica.

10 Pueden prepararse medios de cultivo adecuados a partir de los siguientes componentes, tales como, por ejemplo, el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Gibco n.º 11965-092; medio de Eagle modificado por Dulbecco Knockout (KO DMEM), Gibco n.º 10829-018; medio basal de Ham F12/50 % DMEM; L-glutamina ; 200 mM, Gibco n.º 15039-027; solución de aminoácidos no esenciales, Gibco 11140-050;  $\beta$ -mercaptoetanol, Sigma n.º M7522; factor de crecimiento de fibroblastos básicos recombinantes humanos(bFGF), Gibco n.º 13256-029.

### 15 **Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de células madre pluripotenciales**

20 La presente divulgación proporciona métodos para la formación de poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de poblaciones de células madre pluripotenciales. En una realización, la presente divulgación proporciona métodos para diferenciar adicionalmente las células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo en células que expresan marcadores del linaje endocrino pancreático. En una realización, esto se logra utilizando un protocolo de diferenciación escalonada, en el que las poblaciones de células madre pluripotenciales se diferencian primero en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo. A continuación, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo se diferencian aún más en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático. A continuación, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian aún más en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.

30 La presente divulgación proporciona una población de células, en la que más del 80 % de las células expresa marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo. La población de células puede tratarse adicionalmente para formar una población de células que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático. La población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se pueden tratar adicionalmente para formar una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.

35 La eficacia de la diferenciación puede determinarse exponiendo una población de células tratadas a un agente (tal como un anticuerpo) que reconozca específicamente un marcador de proteína expresado por células que expresan marcadores característicos del tipo de célula deseado.

45 Los métodos para evaluar la expresión de marcadores de proteínas y ácidos nucleicos en células cultivadas o aisladas son convencionales en la técnica. Estos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR), transferencias de tipo Northern, hibridación *in situ* (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col., eds. 2001 suplemento)), e inmunoensayos, tales como análisis inmunohistoquímico del material seccionado, transferencia de de tipo Western, para marcadores que son accesibles en células intactas, análisis por citometría de flujo (FACS) (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

50 Las características de las células madre pluripotenciales son bien conocidas por los expertos en la técnica y siguen identificándose características adicionales de las células madre pluripotenciales. Los marcadores de las células madre pluripotenciales incluyen, por ejemplo, la expresión de uno o más de los siguientes: ABCG2, cripto, FOXD3, CONNEXINA43, Connexina45, OCT4, SOX2, Nanog, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, Tra 1-81.

55 Después de tratar las células madre pluripotenciales con los métodos de la presente invención, las células diferenciadas pueden purificarse exponiendo una población de células tratadas a un agente (tal como un anticuerpo) que reconozca específicamente un marcador de proteína, tal como CXCR4, expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo.

60 Las células madre pluripotenciales citadas por referencia son 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 al menos uno de los siguientes marcadores característicos de células pluripotenciales: ABCG2, cripto, CD9, FOXD3, CONNEXINA43, CONNEXINA45, OCT4, SOX2, Nanog, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60 y Tra 1-81.

Los marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo se seleccionan del grupo que consiste en SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox similar a Mix, FGF4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 y OTX2. Es adecuada para su uso en la presente invención una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo es una célula precursora líneas primitivas. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo es una célula del mesoendodermo. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo es una célula del endodermo definitiva.

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

Los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo que consiste en NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, NKX6,1, PAX4 y PTF-1 alfa. En una realización, una célula endocrina pancreática es capaz de expresar al menos una de las hormonas siguientes: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático. Es adecuada para su uso en la presente invención 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 la hormona pancreática. Como alternativa, la célula endocrina pancreática puede ser una célula que secreta hormona pancreática.

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

#### *Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de células madre pluripotenciales*

En un aspecto de la presente divulgación, las poblaciones de células madre pluripotenciales se pueden diferenciar en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo cultivando las células madre pluripotenciales en un medio en el que la concentración de glucosa no supera 10,5 mM. En una realización, la diferenciación de la población de células madre pluripotenciales hacia una población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo se consigue tratando las células madre pluripotenciales con activina A y un ligando Wnt.

En una realización alternativa, la diferenciación de la población de células madre pluripotenciales hacia una población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo se consigue tratando las células madre pluripotenciales con GDF-8 y al menos otro factor se selecciona del grupo que consiste en: una anilina-piridinotriazina, una anilina-piridinotriazina, 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]pirimidin-2,4-diamina, 1-metil-N-[[4-piridin-3-il-2-[[3-(trifluorometil)fenil]amino]-1,3-tiazol-5-il]metil]piperidin-4-carboxamida, {2-[4-{{5-[3-(3-hidroxi)propil]fenil]-4H-1,2,4-triazol-3-il]amino}fenil]etil}carbamato de 1,1-dimetiletilo, {{3-{{5-[5-(3-hidroxi)propil]-2-(metiloxi)fenil]-1,3-oxazol-2-il]amino}fenil]metil}carbamato de 1,1-dimetiletilo, 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]piperidin-4-carboxamida y 2-[[4-(1-metiletil)fenil]amino]-N-(2-tiofen-2-iletil)-7,8-dihidropirido[4,3-d]pirimidin-6(5H)-carboxamida. Se pueden encontrar ejemplos de los factores adecuados para su uso en la solicitud de patente de Estados Unidos número 12/494.789. En una realización, el al menos 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□]heptacos-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-nonaen-16-ona.

La población de células madre pluripotenciales se puede cultivar en el medio, en el que la concentración de glucosa no supera 10,5 mM durante aproximadamente un día a aproximadamente siete días. Como alternativa, la población de células madre pluripotenciales se puede cultivar en el medio, en el que la concentración de glucosa no supera 10,5 mM durante aproximadamente un día a aproximadamente seis días. Como alternativa, la población de células madre pluripotenciales se puede cultivar en el medio, en el que la concentración de glucosa no supera 10,5 mM durante aproximadamente un día a aproximadamente cinco días. Como alternativa, la población de células madre pluripotenciales se puede cultivar en el medio, en el que la concentración de glucosa no supera 10,5 mM durante



aproximadamente un día a aproximadamente cuatro días. Como alternativa, la población de células madre pluripotenciales se puede cultivar en el medio, en el que la concentración de glucosa no supera 10,5 mM durante aproximadamente un día a aproximadamente cuatro días.

5 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.

10 La activina-A se puede usar a una concentración de aproximadamente 1 pg/ml a aproximadamente 100 pg/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.

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

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

*Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático*

25 En una realización, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definido formado por los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático mediante cualquier método en la materia.

30 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se pueden diferenciar adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo según los métodos desvelados en D'Amour y col., Nature Biotechnology 24, 1392 – 1401 (2006).

35 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo obtenidas de acuerdo con los métodos de la presente invención se pueden diferenciar adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje definitivo de endodermo según los métodos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 11/736.908.

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

45 En una realización, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian aún más en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático mediante cualquier método en la materia.

50 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se pueden diferenciar aún más en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático conforme a los métodos desvelados en D' Amour y col., Nature Biotechnology, 2006.

55 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se pueden diferenciar aún más en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático conforme a los métodos desvelados en D' Amour y col., Nature Biotechnology, 2006.

60 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se pueden diferenciar aún más en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático conforme a los métodos desvelados en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 11/736.908.

65 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se pueden diferenciar aún más en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje

endocrino pancreático, tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático conforme a los métodos desvelados en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 11/779.311.

5 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se pueden diferenciar aún más en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático conforme a los métodos desvelados en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 60/953.178.

10 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se pueden diferenciar aún más en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático conforme a los métodos desvelados en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 60/990.529.

La presente invención se ilustra adicionalmente, aunque sin limitaciones, mediante los siguientes ejemplos.

## 20 Ejemplos

### Ejemplo de referencia 1

#### El papel de los medios y el protocolo de siembra en la diferenciación de las células madre pluripotenciales humanas en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo

25 Se elevaron células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en el pase 41 (p41) mediante TrypLE (n.º de catálogo 12604-013, Invitrogen, CA) y se sembraron como células individuales a una densidad de 100.000 células/cm.<sup>2</sup> en placas revestidas MATRIGEL® (dilución de 1:30) en MEF-CM (medios acondicionados de fibroblastos embrionarios de ratón) suplementado con 20 ng/ml de FGF2 (n.º de catálogo 100-18B, PeproTech, NJ) y 10 µM de Y-27632 (un Inhibidor de la Rho quinasa, n.º de catálogo Y0503, Sigma, MO).

30 Paralelamente, se sembraron células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en el pase 41 como colonias de células en placas revestidas con MATRIGEL® (dilución de 1:30) en una proporción de pases de 1 a 3 recogiendo las células con Dispasa (n.º de catálogo 17105-041, Invitrogen, CA) y sembrando las células en placas en MEF-CM con 20 ng/ml de FGF2. Para los cultivos en formato de células individuales y de colonias, los medios se cambiaron 24 y 48 horas después de la siembra con MEF-CM recién preparado con 20 ng/ml de FGF2.

A las 72 horas después de la siembra, los cultivos se diferenciaron en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de la siguiente manera:

- 40
- a. MCDB-131 (n.º de catálogo 10372-019, Invitrogen, CA) que contiene 0,0025 g/ml adicionales de bicarbonato sódico (n.º de catálogo S3187, Sigma, MO), se suplementó con 2 % de BSA sin ácidos grasos (n.º de catálogo 68700, Proliant, IA), 1X GlutaMax™ (n.º de catálogo 35050-079, Invitrogen, Ca) y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) más 20 ng/ml de WNT-3a (n.º de catálogo 1324-WN-002, R&D Systems, MN) durante un día, después MCDB-131 con 0,0025 g/ml adicionales de bicarbonato sódico, 2 % de BSA, glutamax y 100 ng/ml de activina A durante tres días (condición 1); o,
  - 45 b. RPMI-1640 (n.º de catálogo 22400-105, Invitrogen, CA), se suplementó con 2 % de BSA sin ácidos grasos (n.º de catálogo 68700, Proliant, IA) y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) más 20 ng/ml de WNT-3a (n.º de catálogo 1324-WN-002, R&D Systems, MN), durante un día, después con medio RPMI-1640 suplementado con 2 % de BSA y 100 ng/ml de activina A todos los días durante tres días adicionales (Condición 2).
- 50

El día 4, se recogieron muestras para el análisis FACS. En la Figura 1, los resultados de la citometría de flujo para la expresión de CXCR4 y CD9 se muestran en formato de diagrama de dispersión con la expresión de CXCR4 representada en el eje Y frente a la expresión de CD9 representada en el eje X. El porcentaje de células que expresan CXCR4, CD9 y CD99 (un marcador adicional de diferenciación) se resumen en la Tabla 1. La diferenciación, medida mediante la expresión aumentada de los marcadores de superficie celular CXCR4 y CD99, se mejoró mediante el uso de medio MCDB-131 y la expresión de CXCR4 y CD99 se incrementó aún más cambiando de un cultivo de estilo de colonias a un cultivo de células individuales. Además, estos datos se correlacionaron con la expresión disminuida de CD9, un marcador celular para células indiferenciadas, medida mediante citometría de flujo.

60 Es interesante el hecho de que con el uso de MCDB-131 en formato de clúster o de colonias, hay menos células co-negativas (CXCR4/ CD9) en la figura 1, lo que indica menos diferenciación no específica, o menos células que no expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo en cultivos de medio MCDB-131 tratado. En conjunto, estos datos indican que las células madre embrionarias humanas H1 se diferencian más eficientemente en presencia de medio MCDB-131 que el medio RPMI-1640 y que la diferenciación en MCDB-131 puede mejorarse aún más sembrando y cultivando las células como células individuales frente a la siembra y cultivo en colonias.

65

Tabla 1

	CXCR4	CD9	CD99
MCDB (clúster)	88,6	10,1	21,7
RPMI (clúster)	81,8	8,8	30,5
MCDB (célula individual)	92,3	6,7	62,2
RPMI (célula individual)	72,4	12,7	43,1

## Ejemplo de referencia 2

5

### El papel de la glucosa en la diferenciación de las células madre pluripotenciales humanas en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo

10 La glucosa es un azúcar de tipo hexosa soluble que se añade a casi todos los medios de cultivo celular, incluidos el medio de Ames; el medio basal de Eagle (BME); el medio BGJb con modificación de Fitton-Jackson; el medio de Click; el medio CMRL-1066; el medio Eagle modificado de Dulbecco(DMEM); la mezcla de DMEM/nutriente de Ham F-12 (50:50); modificación F-12 de Coon; el medio de Fischer; el medio H-Y (Hybri-Max®); el medio Iscove modificado de Dulbecco (IMDM); medio 5A modificado de McCoy; medio MCDB; medio 199; medio mínimo esencial de Eagle (EMEM); medio NCTC; mezcla de nutrientes, medio F-10 de Ham; mezcla de nutrientes, medio F-12 de Ham; mezcla de nutrientes F-12 de Ham modificación de Kaighn (F12K); medio RPMI-1640; medio para hibridomas sin suero/sin proteínas; medio MB de Waymouth; medio E de Williams y varios medios patentados. Véase <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-expert/glucose.html>.

20 La cantidad de glucosa en las formulaciones de cultivo celular varía. Aunque la serie de medios MCDB contiene glucosa en el intervalo de 3,9 a 10 mM, la mayoría de los medios contienen de 1 g/l (5.5 mM) hasta incluso 10 g/l (55 mM) de glucosa, con RPMI-1640 establecido a 11 mM glucosa. Las concentraciones de glucosa por encima de 10 mM son análogas a una afección diabética dentro del sistema de cultivo celular. Esto es importante porque los mismos procesos que pueden afectar a las células y las moléculas *in vivo* pueden producirse *in vitro*. La consecuencia del crecimiento de las células en condiciones que son esencialmente diabéticas es que las células y los productos celulares son modificados por los procesos de glucosilación y glioxidación y pueden sufrir daños por el estrés oxidativo y carbonílico mediado por la glucosa. Véase <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-expert/glucose.html>.

30 ] Un medio que se utiliza actualmente para generar endodermo definitivo es el medio modificado de Dulbecco de Iscove (IMDM) que contiene glucosa 25 mM (Kubo y col.; April 1, 2004, Development 131, 1651-1662), RPMI con glucosa 11 mM (D'Amour y col., Nat Biotechnol. 2005 Dec; 23(12):1534-41), o DMEM-F12 con glucosa 17,5 mM. Cada uno de estos medios está por encima de la concentración de glucosa 10 mM análoga a una afección diabética. En consecuencia, para reducir el estrés sobre las células que podría inducirse por niveles altos de glucosa en el medio de cultivo, se intentó encontrar una concentración de glucosa inferior a 10 mM para la diferenciación de las células madre embrionarias humanas en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo. Uno de tales medios con una concentración de glucosa por debajo de 10 mM es MCDB-131, que contiene una concentración de glucosa base de 5,5 mM.

40 Se elevaron células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en el pase 41 (p41) mediante TrypLE (n.º de catálogo 12604-013, Invitrogen, CA) y se sembraron como células individuales a una densidad de 100.000 células/cm.<sup>2</sup> en placas revestidas MATRIGEL® (dilución de 1:30) en MEF-CM (medios acondicionados de fibroblastos embrionarios de ratón) suplementado con 20 ng/ml de FGF2 (n.º de catálogo 100-18B, PeproTech, NJ) y 10 µM de Y-27632 (un Inhibidor de la Rho quinasa, n.º de catálogo Y0503, Sigma, MO). El medio se cambió 24 y 48 horas después de la siembra con MEF-CM recién preparado con 20 ng/ml de FGF2. Los cultivos se diferenciaron en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo 72 horas después del siguiente modo:

- 50 a. MCDB-131 (n.º de catálogo 10372-019, Invitrogen, CA) medio suplementado con 2 % de BSA sin ácidos grasos (n.º de catálogo 68700, Proliant, IA), 0,0025 g/ml de bicarbonato sódico (n.º de catálogo S3187, Sigma, MO), 1X de GlutaMax™ (n.º de catálogo 35050-079, Invitrogen, Ca) 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN), 20 ng/ml de WNT-3a (n.º de catálogo 1324-WN-02, R&D Systems, MN), y 0, 5, 10, 15, 20, o 25 mM de glucosa (n.º de catálogo G8769, Sigma, MO) durante un día, después
- 55 b. MCDB-131 medio suplementado con 2 % de BSA, bicarbonato sódico, Glutamax, 100 ng/ml de activina A y 0, 5, 10, 15, 20, o 25 mM de glucosa durante tres días adicionales.

El día 4, se recogieron muestras para FACS y análisis de expresión génica usando PCR en tiempo real, y se contaron mediante ViaCount® (Guava®, Millipore, Billerica, MA). De acuerdo con los resultados del Ejemplo 1, la diferenciación de células madre pluripotenciales en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo dio como resultado la expresión sólida de marcadores asociados con el linaje de endodermo definitivo (Figura 2A). Cuando la concentración de glucosa en el medio se suplementó con 0, 5, 10, 15, 20 o 25 mM

60

de glucosa (concentración final: Glucosa 5,5, 10,5, 15,5, 20,5, 25,5, o 30,5 mM, respectivamente), se observó un aumento modesto en el número de células en muestras tratadas con glucosa 10 mM adicional (concentración final de glucosa 15,5 mM) como se muestra en la Figura 2B. También se observó un aumento modesto en la expresión de CXCR4 para células suplementadas con glucosa 5 mM adicional (concentración final de glucosa 10,5 mM), como se muestra en la Figura 2A. Sin embargo, estos aumentos en el número de células y CXCR4 se vieron compensados por una reducción en la viabilidad celular total (Figura 2B).

A nivel basal de glucosa (5,5 mM), casi todas las células en el cultivo eran positivas para SOX17 y las células se dispersaron en la placa de cultivo en un patrón uniforme (Figura 3 A y B). A medida que aumentaba la concentración de glucosa, las células mantenían una alta expresión de SOX17, sin embargo, se observó que las células se agrupaban. Estas células agrupadas se dispersaron menos uniformemente en la superficie de cultivo que las poblaciones de células cultivadas al nivel basal de glucosa. Este efecto se correlacionó con un ligero aumento en la expresión de los marcadores celulares CD9 y OCT4 para células indiferenciadas y un marcador celular SOX7-a para ectodermo extraembrionario, y una disminución en la expresión génica del homeobox 1 de páncreas pancreático (MNX1) también conocido como Homeobox HB9 (HLXB9) en las células agrupadas (Figura 4).

También se observaron efectos similares relacionados con la glucosa en cultivos diferenciados con DMEM que contenían una concentración de glucosa de 5,5 mM (baja) o 25 mM (alta) (n.º de catálogo 10567-014 y 21063-029, Invitrogen, CA). Como se ha descrito anteriormente, para los controles, las células se sembraron como células individuales, se cultivaron 3 días en medio acondicionado MEF y se diferenciaron en MCDB-131 con medio suplementado con glucosa 5,5 mM o 25 mM, o en medio DMEM con niveles altos o bajos de glucosa suplementado con 2 % de BSA sin ácido graso, 100 ng/ml de activina A, y 20 ng/ml de WNT-3a en el primer día, y 2 % de BSA sin ácidos grasos y 100 ng/ml de activina A durante los siguientes tres días con un cambio diario de los medios.

De manera similar a los resultados con el medio MCDB-131, en el que los niveles elevados de glucosa inhiben la formación de endodermo definitivo en comparación con las células tratadas con medio con niveles bajos de glucosa, se observó que una concentración elevada de glucosa en DMEM reducía la diferenciación de células hES. Por citometría de flujo, después de la diferenciación al endodermo definitivo, el 88,6 % de las células fueron positivas para CXCR4 en un medio que contenía glucosa 5,5 mM frente al 80 % de células positivas para CXCR4 en medios que contenían glucosa 25 mM. Además, los marcadores de diferenciación en endodermo definitivo medidos mediante qRT-PCR (SOX17) disminuyeron, mientras que los marcadores de células indiferenciadas (OCT4) o destinos de diferenciación alternativos (CDX2) aumentaron (Figura 5) en las células alimentadas con medios que contenían niveles altos de glucosa frente a las alimentadas con medios con niveles bajos de glucosa. Este efecto se debió, al menos en parte, al pH de los medios, ya que a lo largo de la diferenciación de cuatro días, el pH del medio disminuyó después de 48 horas del día de diferenciación. Además, cuanto mayor sea el pH inicial y final de los medios de cultivo (8,1 > pH > 7,6) (Figura 6) durante la formación de endodermo definitivo, más completa será la conversión a endodermo definitivo.

En resumen, los resultados de los inventores indican que los niveles basales de glucosa (5,5 mM) en los medios de diferenciación son suficientes para generar una población de células en la que más del 80 % de las células expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo. El aumento de las concentraciones de glucosa en el medio de diferenciación a 10,5 mM es suficiente para generar una población similar, sin embargo, el aumento de las concentraciones de glucosa por encima de 10,5 mM puede dar como resultado una mayor expresión de marcadores de pluripotencia/diferenciación reducida, tales como CD9 o OCT4, o aumento en la expresión de marcadores asociados con diferenciación del destino alternativo/ectodermo extraembrionario, tales como SOX7 o CDX2.

### Ejemplo de referencia 3

#### El papel del control del pH en la diferenciación de las células madre pluripotenciales humanas en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (hES) en el pase 46 (p46) como colonias de células en placas revestidas con MATRIGEL® (dilución de 1:30) en una proporción de pases de 1 a 3 recogiendo las células con Dispasa (n.º de catálogo 17105-041, Invitrogen, CA) y sembrando las células en placas en MEF-CM con 20 ng/ml de FGF2. Los medios se cambiaron diariamente con MEF-CM recién preparado con 20 ng/ml de FGF2, hasta el inicio de la diferenciación en endodermo definitivo (DE) de la siguiente manera:

a. medio MCDB-131 (n.º de catálogo 10372-019, Invitrogen, CA) suplementado con 2 % de BSA sin ácidos grasos (n.º de catálogo 68700, Proliant, IA), 1X GlutaMax™ (n.º de catálogo 35050-079, Invitrogen, Ca) y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) más 20 ng/ml de WNT-3a (n.º de catálogo 1324-WN-002, R&D Systems, MN) durante un día, seguido de tratamiento con MCDB-131 suplementado con 2 % de BSA, glutamax y 100 ng/ml de activina A todos los días durante tres días adicionales; o

b. MCDB131 que contiene 0,0025 g/ml adicionales de bicarbonato sódico (n.º de catálogo S3187, Sigma, MO) medio suplementado con 2 % de BSA sin ácidos grasos (n.º de catálogo 68700, Proliant, IA), 1X GlutaMax™ (n.º de catálogo 35050-079, Invitrogen, Ca) y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) más 20 ng/ml de WNT-3a (n.º de catálogo 1324-WN-002, R&D Systems, MN) durante un día, seguido de tratamiento con MCDB-131 con

0,0025 g/ml de bicarbonato sódico suplementado con 2 % de BSA, glutamax y 100 ng/ml de activina A todos los días durante tres días adicionales.

5 El día 4, se recogieron muestras para FACS y análisis de expresión génica usando PCR en tiempo real, y se contaron mediante ViaCount® (Guava®, Millipore, Billerica, MA). Como se muestra en el Ejemplo 2, un pH relativamente más ácido de los medios de diferenciación (pH <7,6) puede reducir la expresión de CXCR4 debido a una diferenciación menos dirigida y una diferenciación alternativa incrementada.

10 Para comprobar si este efecto se debía al pH, las células se diferenciaron en MCDB-131 basal que contiene la concentración publicada de 1 gramo/litro de bicarbonato de sodio y los autores diferenciaron las células en medios suplementados con la concentración de bicarbonato de DMEM, que es 3,7 gramos/litro. Se observó que la diferenciación, medida por la expresión incrementada de los marcadores de superficie celular CXCR4 y la expresión disminuida de CD9, se mejoró mediante el uso de un agente tampón. El medio MCDB-131 con 3.7 g/l de bicarbonato sódico para un tampón tenía una expresión de CXCR4 significativamente mayor y niveles de expresión de CD9 más bajos frente a células diferenciadas en MCDB-131 que contenía solo el nivel base de bicarbonato (1g/l) (Figura 7A y B). Esto se debe en parte al hecho de que el medio MCDB-131 tiene un nivel de pH de 7,5 y la adición de 2,7 g/l de bicarbonato sódico eleva el pH a 7,6.

20 Además, al final de la diferenciación, los medios (que contienen el sensor de color de pH rojo fenol) de cultivos cultivados en medios no diferenciados fueron significativamente más amarillos y ácidos que los cultivos suplementarios con medios tamponados con bicarbonato sódico que permanecieron de color rojo. Estos resultados indican que aumentar el pH de los medios a 7,6 o más promueve una diferenciación endodérmica definitiva más eficaz de las células madre pluripotenciales y el aumento y estabilización del pH de los medios se pudo lograr mediante alternativas al tamponamiento con bicarbonato, incluyendo, pero sin limitaciones, aumentar los niveles de CO<sub>2</sub> en el incubador y otros sistemas de tampones solubles como HEPES o fosfato.

#### Ejemplo de referencia 4

30 **El papel del medio RPMI-1640 o MCDB-131 y los miembros de la superfamilia del TGF-Beta Activina A y GDF-8 en la diferenciación de células madre pluripotenciales humanas en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo**

35 Se elevaron células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en el pase 47 (p47) mediante TrypLE (n.º de catálogo 12604-013, Invitrogen, CA) y se sembraron como células individuales a una densidad de 100.000 células/cm.<sup>2</sup> en placas revestidas MATRIGEL® (dilución de 1:30) en MEF-CM (medios acondicionados de fibroblastos embrionarios de ratón) suplementado con 20 ng/ml de FGF2 (n.º de catálogo 100-18B, PeproTech, NJ) y 3 µM de H-1152, glicilo (un Inhibidor de la Rho quinasa, n.º de catálogo 555554, EMD chemicals, Gibbstown, NJ).

40 A las 72 horas después de la siembra, los cultivos se diferenciaron en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de la siguiente manera:

45 a. MCDB-131 (n.º de catálogo 10372-019, Invitrogen, CA) que contiene 0,0025 g/ml adicionales de bicarbonato sódico (n.º de catálogo S3187, Sigma, MO), se suplementó con 2 % de BSA sin ácidos grasos (n.º de catálogo 68700, Proliant, IA), 1X GlutaMax™ (n.º de catálogo 35050-079, Invitrogen, Ca) y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) más 20 ng/ml de WNT-3a (n.º de catálogo 1324-WN-002, R&n Systems, MN) durante un día, después MCDB-131 con 0,0025 g/ml adicionales de bicarbonato sódico, 2 % de BSA, glutamax y 100 ng/ml de activina A durante tres días o

50 b. MCDB-131 (N.º de catálogo 10372-019, Invitrogen, CA) que contiene 0,0025 g/ml adicionales de bicarbonato sódico (N.º de catálogo S3187, Sigma, MO), se suplementó con 2 % de BSA sin ácidos grasos (N.º de catálogo 68700, Proliant, IA), 1X GlutaMax™ (N.º de catálogo 35050-079, Invitrogen, Ca) y 100 ng/ml de GDF-8 (R&D Systems, MN) más 2,5 µM del inhibidor GSK3B 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 durante un día, después MCDB-131 con 0,0025 g/ml 0,0025 g/ml adicionales de bicarbonato sódico, 2 % de BSA, Glutamax y 100 ng/ml GDF-8 durante tres días, o

55 c. MCDB-131 (N.º de catálogo 10372-019, Invitrogen, CA) que contiene 0,0025 g/ml adicionales de bicarbonato sódico (N.º de catálogo S3187, Sigma, MO), se suplementó con 2 % de BSA sin ácidos grasos (N.º de catálogo 68700, Proliant, IA), 1X GlutaMax™ (N.º de catálogo 35050-079, Invitrogen, Ca) y 100 ng/ml de GDF-8 (R&D Systems, MN) durante cuatro días, o

60 d. RPMI-1640 (n.º de catálogo 22400-105, Invitrogen, CA), se suplementó con 2 % de BSA sin ácidos grasos (n.º de catálogo 68700, Proliant, IA) y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) más 20 ng/ml de WNT-3a (n.º de catálogo 1324-WN-002, R&D Systems, MN), durante un día, después con medio RPMI-1640 suplementado con 2 % de BSA y 100 ng/ml de activina A todos los días durante tres días adicionales.

65 e. RPMI-1640 (N.º de catálogo 22400-105, Invitrogen, CA) se suplementó con 2 % de BSA sin ácidos grasos (N.º de catálogo 68700, Proliant, IA) y 100 ng/ml de GDF-8 (R&D Systems, MN) más 2,5 µM del inhibidor GSK3B 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 durante un día, después medio RPMI-1640 suplementado con 2 % de BSA, Glutamax y 100 ng/ml de GDF-8 todos los días durante tres días adicionales.

El día 4, se recogieron muestras para el análisis FACS y qRT-PCR. En la Tabla 2, el porcentaje de células que expresan CXCR4, CD9 y CD99 (un marcador adicional de diferenciación) se resumen en la Tabla 2. La diferenciación, medida por la expresión aumentada del marcador de superficie celular CXCR4 se mejoró mediante el uso del medio MCDB-131 en comparación con RPMI-1640 y la expresión de CXCR4 se incrementó aún más mediante el uso de GDF-8 en combinación con el inhibidor de GSK3B, en comparación con las células tratadas con activina A y Wnt3a. Mediante qRT–PCR se observaron resultados similares, que muestran una mejor diferenciación con el uso del medio MCDB-131 en comparación con RPMI-1640, y mediante el uso de GDF-8 en combinación con un inhibidor GSK3B en comparación con células tratadas con activina A y Wnt3a para el gen MNX-1 (Figura 8). Además, estos datos se correlacionaron con una expresión disminuida de CD9, un marcador celular para células indiferenciadas, medido por citometría de flujo (Tabla 2) u OCT4 y CD9, según se midió mediante qRT-PCR (Figura 8). Estos datos indican que las células madre embrionarias humanas H1 se diferencian más eficientemente en presencia de medio MCDB-131 que en medio RPMI-1640, y que la diferenciación en MCDB-131 puede mejorarse aún más al diferenciar las células en presencia de GDF-8 y un inhibidor de GSK3B frente a la diferenciación con activina A y Wnt3.

Tabla 2

Tratamiento con medio	CD184	CD9	CD99
RPMI+AA+Wnt	77,8	20,9	77,8
RPMI+GDF8+inhibidor GSK3B	81,6	13,8	83,4
MCDB131+AA+Wnt	81,2	21,1	60,0
MCDB131+GDF8+ inhibidor GSK3B	87,1	14,3	50,9
MCDB 131+GDF8	43,2	31,2	23,7

Aunque los diversos aspectos de la invención se han ilustrado anteriormente haciendo referencia a ejemplos y realizaciones preferentes, se apreciará que el alcance de la invención está definido no por la descripción anterior sino por las siguientes reivindicaciones correctamente interpretadas bajo la ley de patentes.

**REIVINDICACIONES**

1. Un cultivo celular que comprende una población aislada de células y un medio de cultivo adecuado para diferenciar células madre pluripotenciales complementadas con GDF-8 y 14-Prop-2-en-1-yl-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, 0,21-nonaen-16-ona y en el que la concentración de glucosa no supera 5,5 mM, en el que las células en la población expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo, en el que dicha población de células se puede obtener mediante:
- 5
- a. Cultivar una población de células madre pluripotenciales,
- 10 b. Diferenciar la población de células madre pluripotenciales en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo cultivando las células madre pluripotenciales en el medio de cultivo.
- 15 2. El cultivo celular de la reivindicación 1, en el que los marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo se seleccionan del grupo que consiste en SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox similar a Mix, FGF4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 y OTX2.
- 20 3. El cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la población de células madre pluripotenciales se cultiva en el medio en el que la concentración de glucosa no excede de 5,5 mM durante de un día a siete días; de un día a seis días; de un día a cinco días; de un día a cuatro días; o durante cuatro días.
- 25 4. El cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el GDF-8 se usa a una concentración de 5 ng/ml a 500 ng/ml; 5 ng/ml a 50 ng/ml; 5 ng/ml a 25 ng/ml; o 25 ng/ml.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

FIG. 1

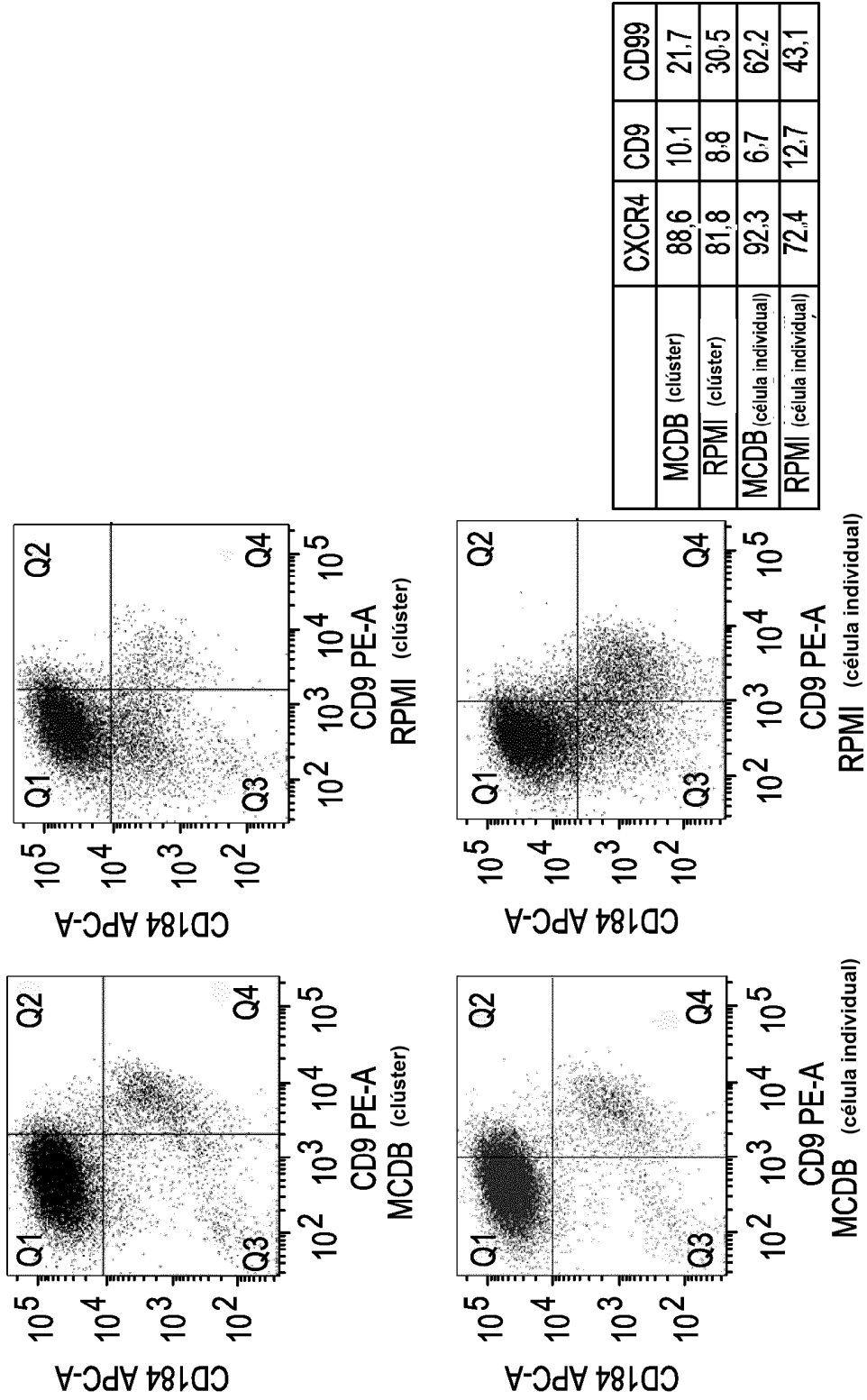




FIG. 2A  
CXCR4

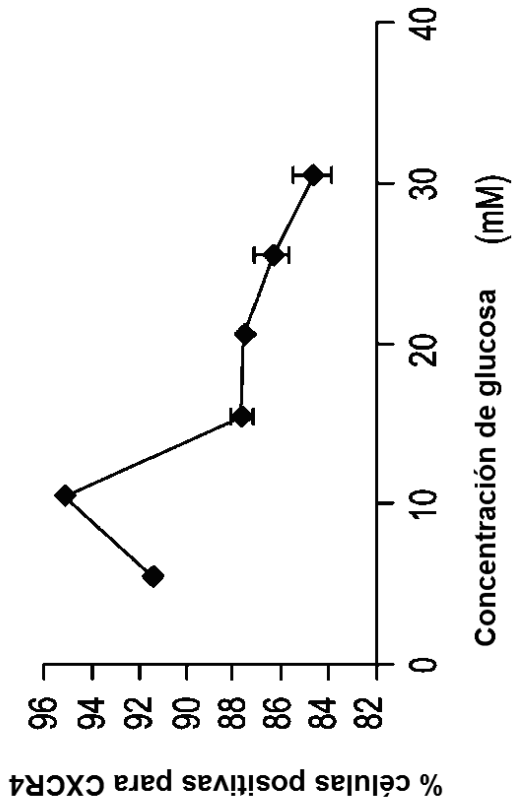


FIG. 2B

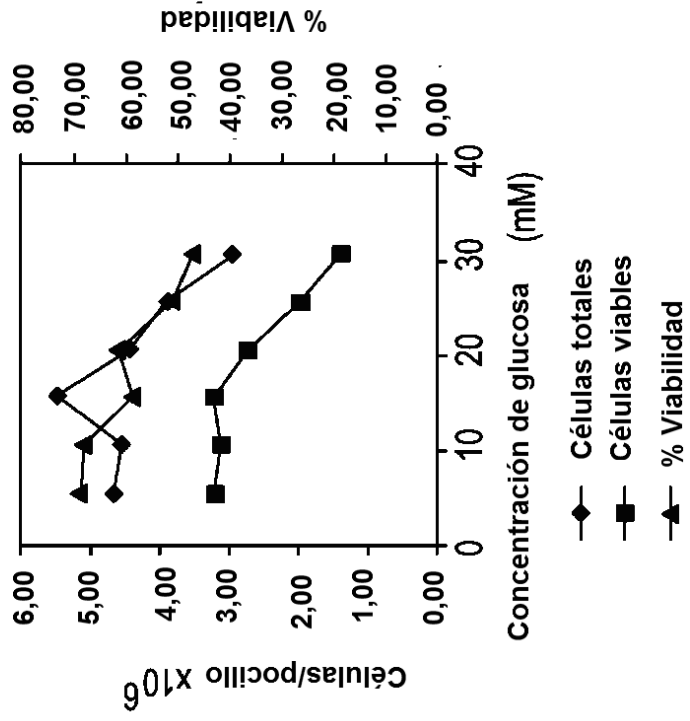


FIG. 3A

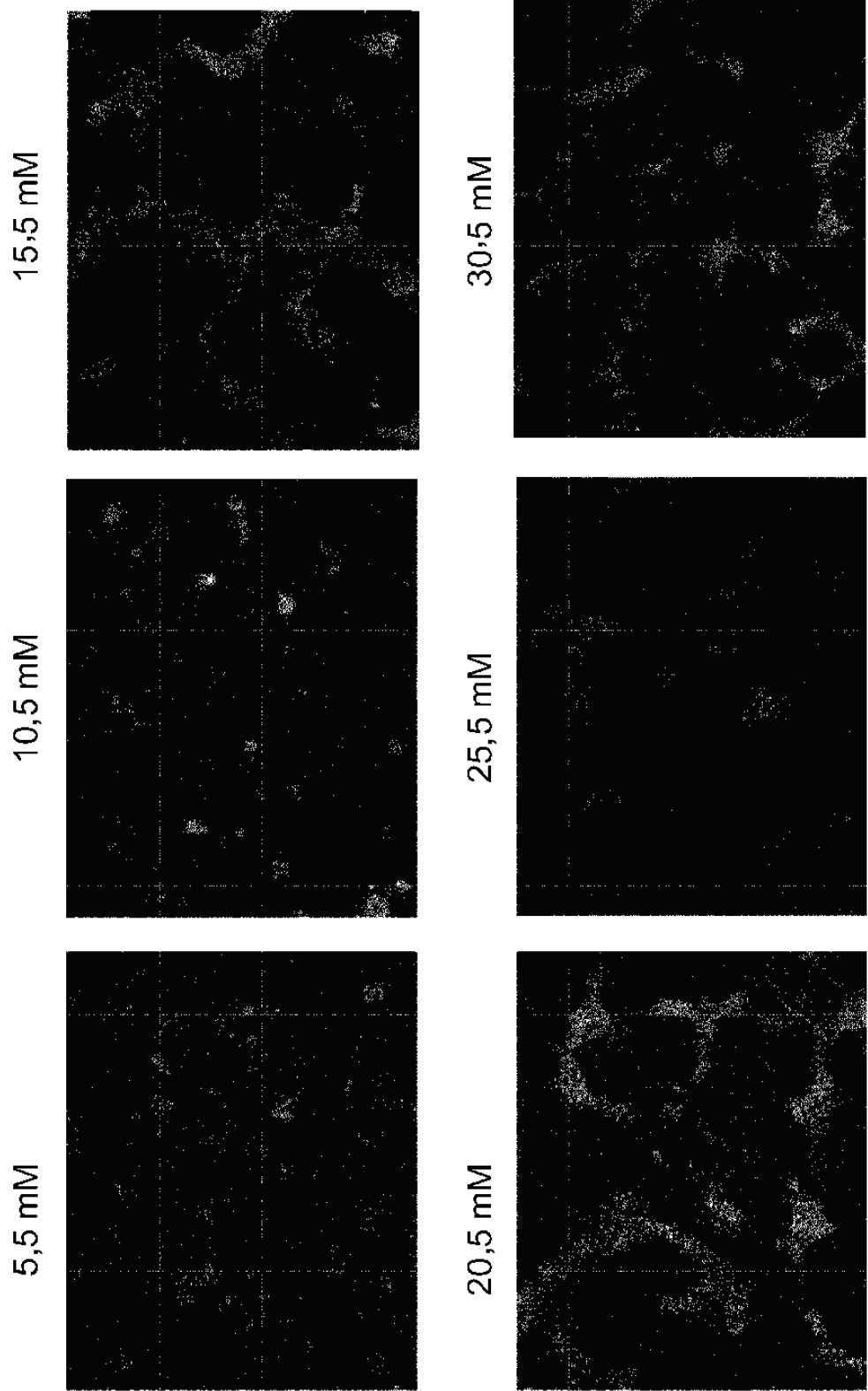


FIG. 3B

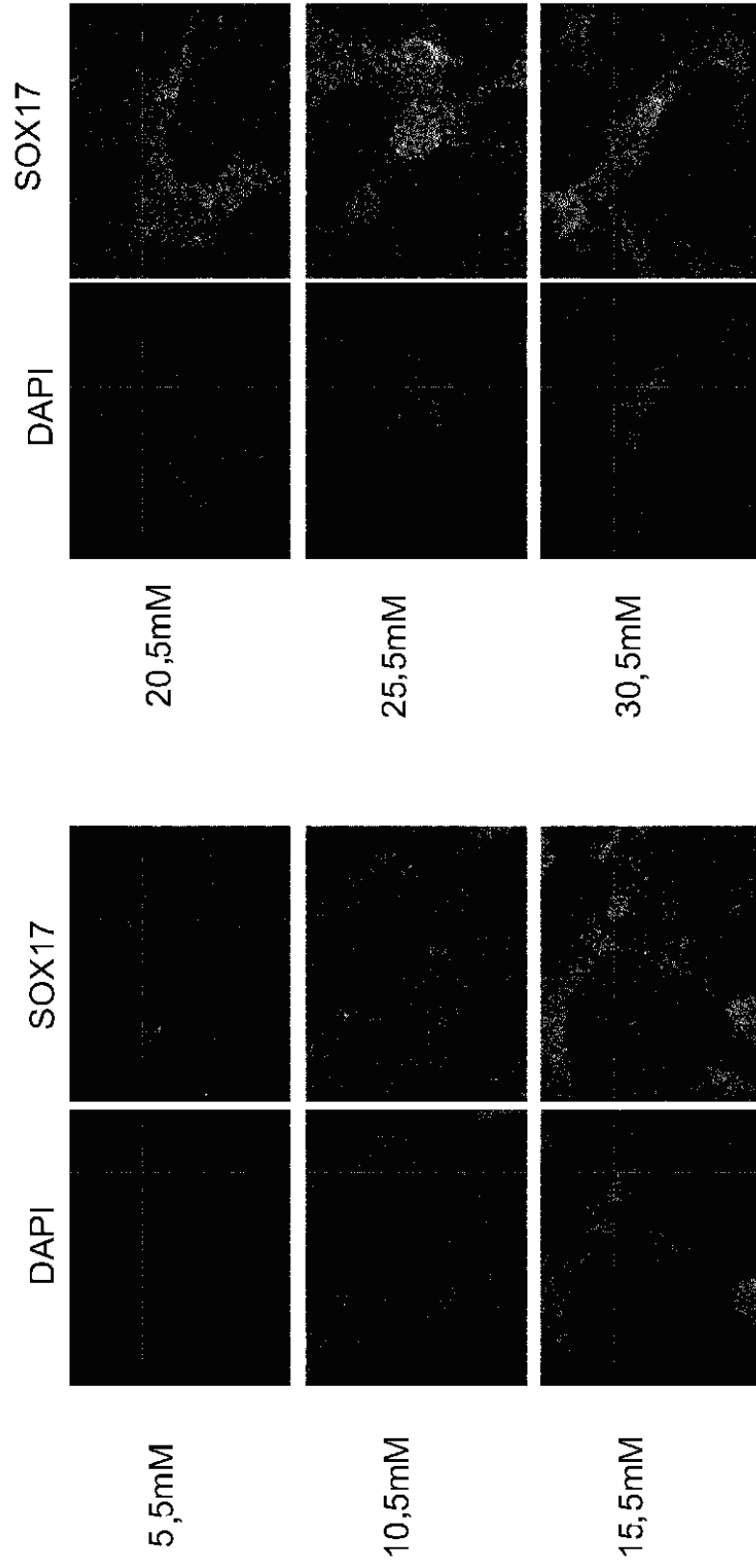


FIG. 4

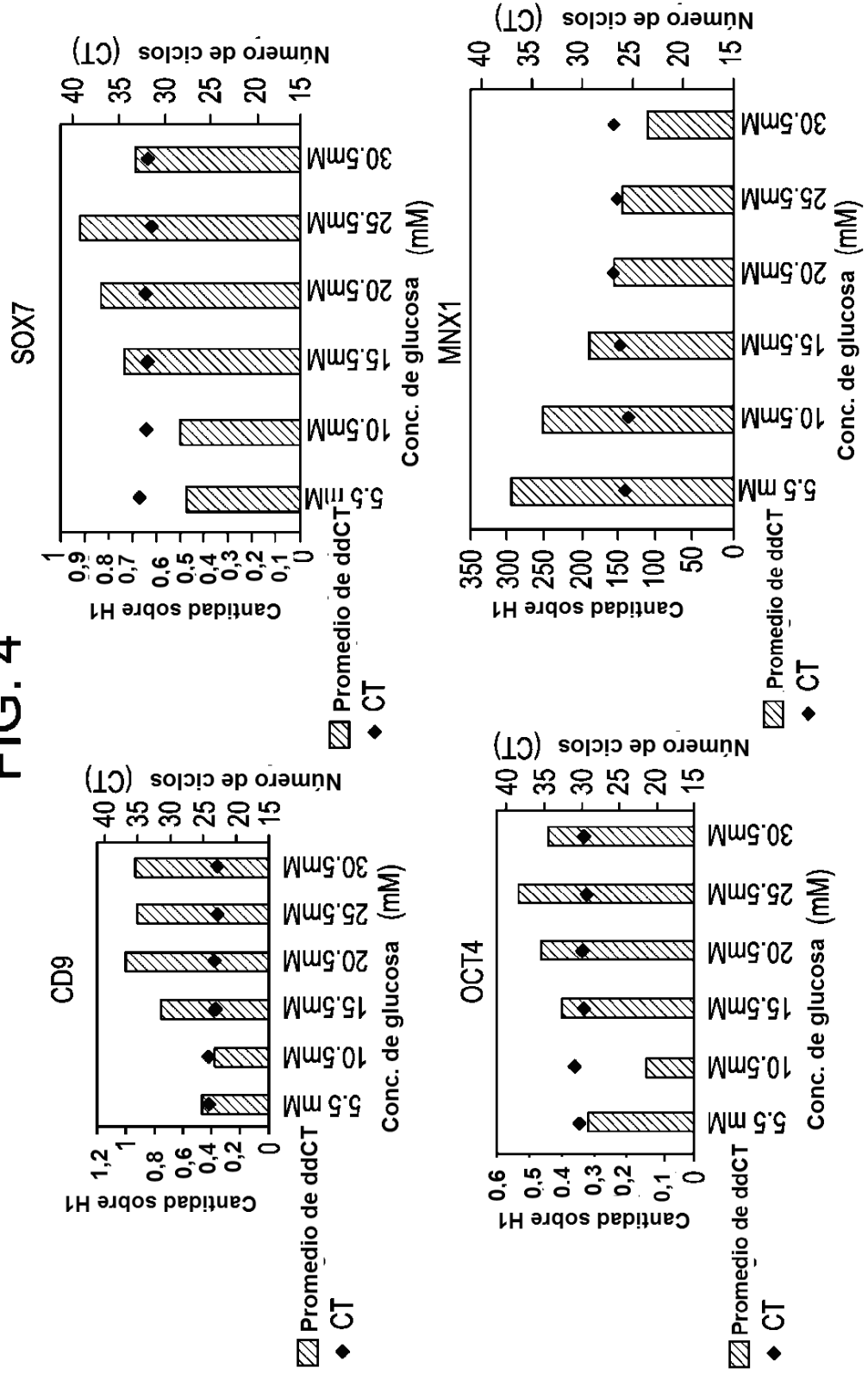


FIG. 5

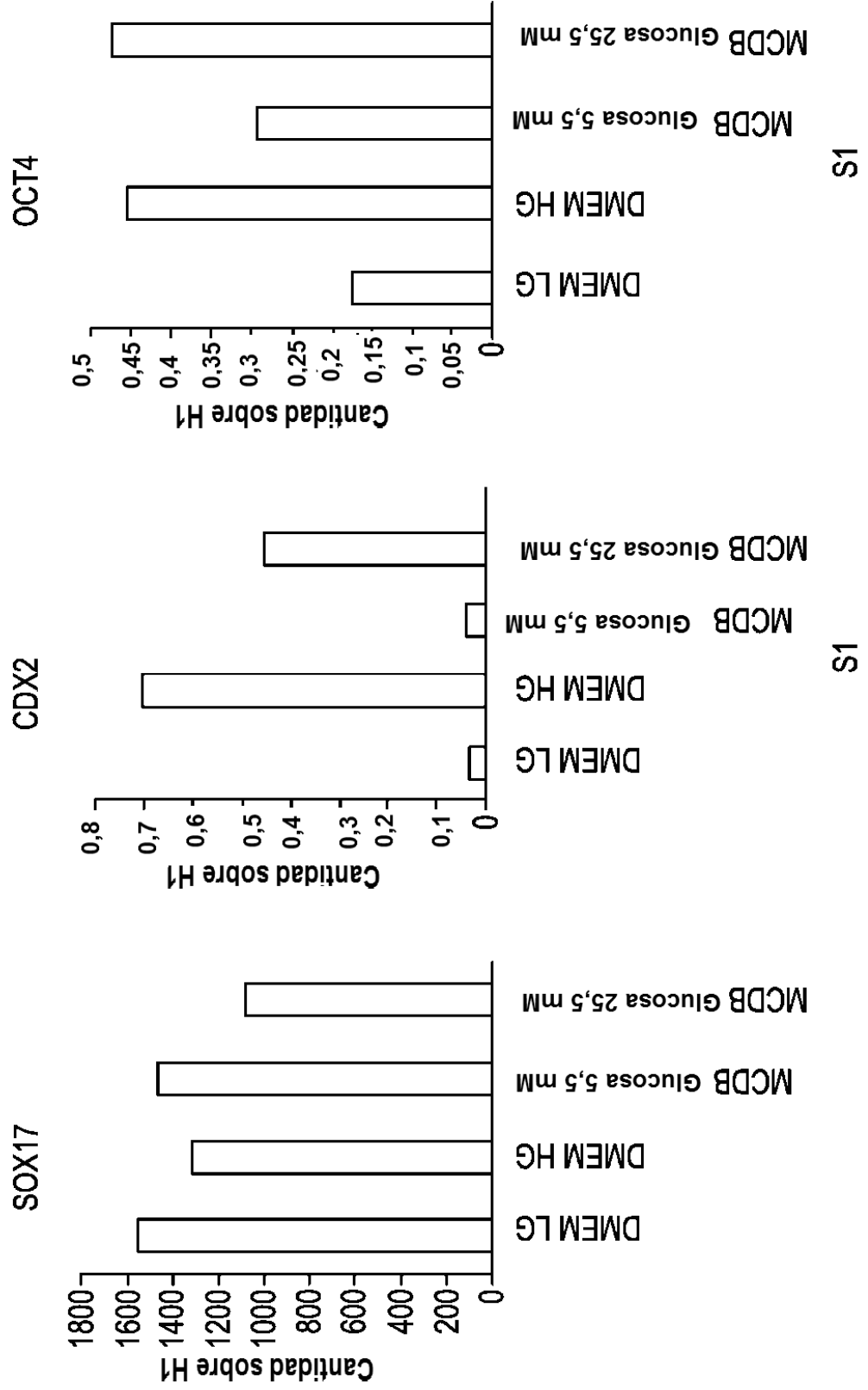


FIG. 6

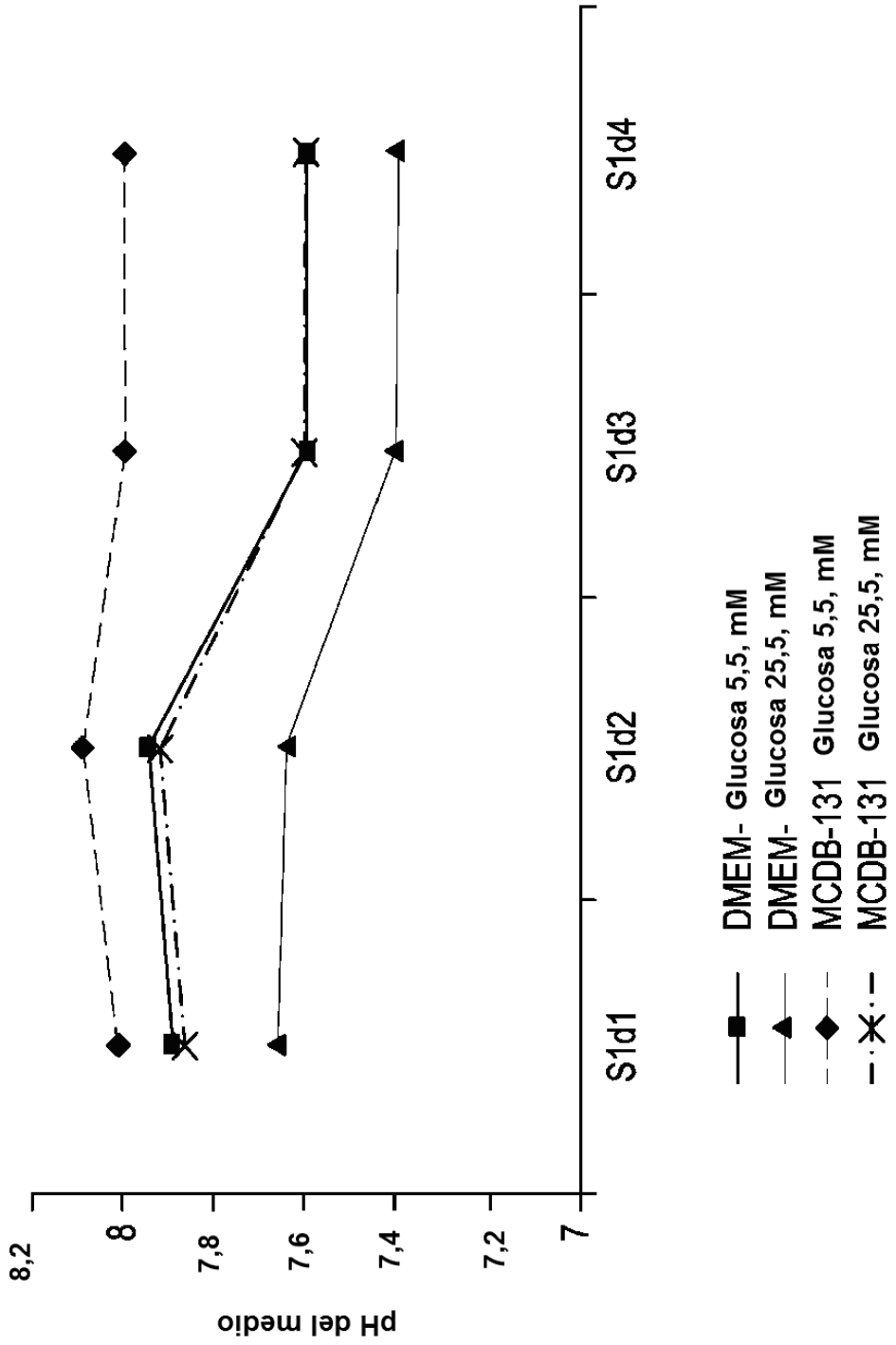


FIG. 7A

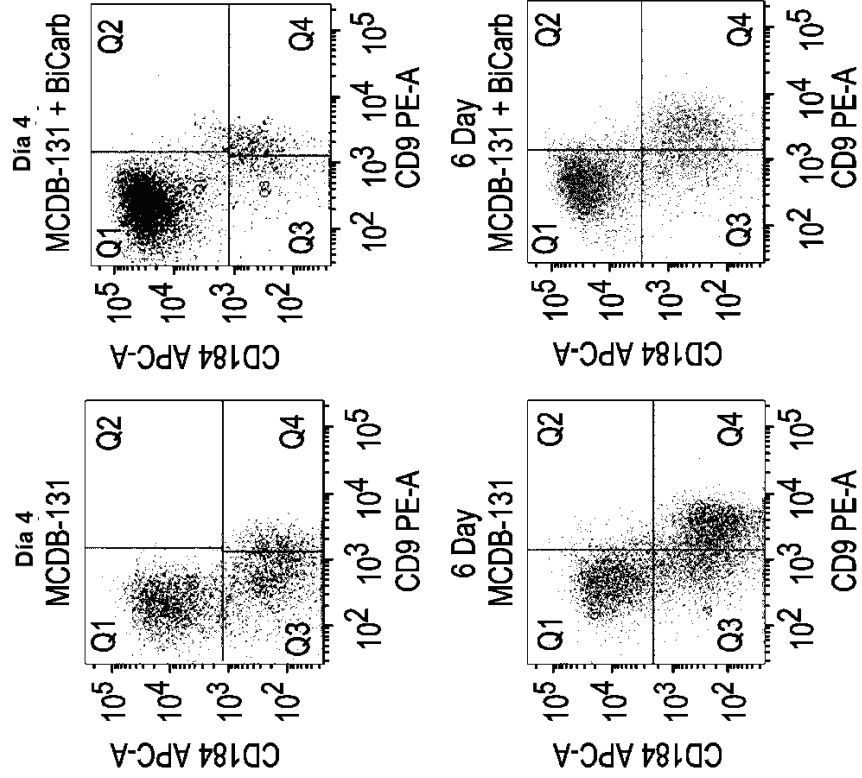


FIG. 7B

% CXCR4/CD9 Pos	MCDB-131	MCDB-131 + BiCarb
Day 4	46.2/21.9	86.8/11.7
Day 6	35.6/43.8	62/26.2

FIG. 8

