

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 663**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2010 PCT/US2010/059586**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2012 WO12078153**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2010 E 10860584 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2649177**

54 Título: **Agentes y métodos para inhibir el crecimiento de células madre pluripotentes humanas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2018

73 Titular/es:

**VIACYTE, INC. (100.0%)
Building 2-503 3550 General Atomics Court
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**SCHULZ, THOMAS y
ROBINS, ALLAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 690 663 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agentes y métodos para inhibir el crecimiento de células madre pluripotentes humanas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al cribado e identificación de agentes citotóxicos o inhibidores de células madre pluripotentes *in vitro*.

10 Antecedentes de la invención

Un posible obstáculo en el desarrollo de terapias de reemplazo celular que usan células madre embrionarias humanas (células hESCs o hES) es que los métodos de diferenciación pueden no especificar todas las hESC de manera homogénea. hESC indiferenciadas, células parcialmente diferenciadas o progenitoras, o células especificadas incorrectamente pueden persistir dentro de poblaciones de células diferenciadas. La presencia de dichas células puede contribuir a efectos biológicos "fuera del objetivo" tras la implantación, siendo el mayor problema percibido el crecimiento excesivo de implantes o la generación de teratomas. No está claro si los teratomas son causados únicamente por hESC persistentes, o si las células parcialmente diferenciadas o progenitoras también contribuyen a la formación del teratoma. Independientemente, será importante demostrar que las poblaciones de células trasplantables son seguras y no contienen subpoblaciones que causan teratoma.

Es posible minimizar subpoblaciones de células no deseadas o purificar poblaciones deseables antes del trasplante o administración, agotando, aislando, matando o inhibiendo células indiferenciadas usando diversos enfoques que involucran agentes dirigidos tales como compuestos orgánicos de moléculas pequeñas, marcadores de superficie celular o anticuerpos (Choo *et al.*, Stem Cells 2008 2: 1454-63). Por lo tanto, existe la necesidad de identificar agentes y métodos que puedan usarse para eliminar poblaciones potencialmente inseguras de células que de otro modo serían trasplantables.

30 Sumario de la invención

La revista de biología celular, 167(4), 723-734 (2004), muestra que la apoptosis inducida por ceramidas elimina las células pluripotentes residuales procedentes de cuerpos embrioides (EBC), evita la formación de teratomas, y enriquece los EBC para las células que experimentan diferenciación neural después del trasplante. Se descubrió que las células apoptóticas, cuando se incuban cuerpos embrioides (EB) de células madre embrionarias humanas con S18; la apoptosis por S18 enriquece a los neuroprogenitores (NP) (+) para nestina; y los NP (+) para nestina enriquecidos en EB tratados con S18 experimentan una rápida diferenciación neuronal. Stem Cells, 26(6), 1454-1463 (2008), muestra la muerte celular inducida por mAb 84 de hESC indiferenciadas, pero no diferenciadas. Stem Cells, 27(8), 1792-1801 (2009), muestra que el mecanismo de muerte celular inducida por mAb 84 de las hESC indiferenciadas es oncosis. La presente invención proporciona métodos y composiciones como se define en las reivindicaciones. También se divulga en el presente documento métodos para identificar inhibidores y agentes citotóxicos poniendo en contacto una célula madre pluripotente (tal como una célula ES o una célula iPS) con un inhibidor candidato o agente citotóxico y observando que se inhibe la proliferación o viabilidad de la célula madre pluripotente. La selectividad del inhibidor o agente citotóxico puede determinarse poniendo en contacto una célula diferenciada o en diferenciación con el agente inhibidor o citotóxico candidato y observando que la proliferación y la viabilidad de la célula diferenciada o en diferenciación no se ven afectadas por el inhibidor candidato o el agente citotóxico. Por ejemplo, la divulgación describe diversos compuestos de moléculas pequeñas capaces de eliminar ablaciones de hESC no comprometidas dentro de poblaciones de diferenciación. Los compuestos identificados son candidatos para incluir en la fabricación y producción amplificada de un producto de terapia celular, eliminando potencialmente células indiferenciadas, por ejemplo, células madre pluripotentes, proporcionando de ese modo una medida mejorada de seguridad contra la formación de teratomas.

Las células de la presente invención pueden ser cualquier especie, pero en determinadas realizaciones son células de primate, tales como células humanas.

55 La proliferación y la viabilidad se pueden determinar mediante cualquier método conocido en la técnica, pero oportunamente se puede determinar usando un ensayo de impedancia. Como alternativa, la proliferación y la viabilidad de las células de acuerdo con la presente invención se pueden determinar mediante tinción con fosfatasa alcalina o analizando las células en busca de la presencia de un marcador.

60 Las células en diferenciación o diferenciadas de la invención se obtienen normalmente de células madre pluripotentes, y pueden incluir células tales como células de endodermo definitivas, células de endodermo del tracto digestivo superior negativas para PDX1, células de endodermo del tracto digestivo superior positivas para PDX1, células de endodermo pancreáticas positivas para PDX-1, células progenitoras endocrinas y células precursoras endocrinas.

65 Las células en diferenciación o diferenciadas pueden analizarse en paralelo, o pueden estar presentes junto con

células madre pluripotentes, como en un cultivo de células, que puede ser una población de células que experimentan diferenciación de células madre pluripotentes a derivados más diferenciados de las células madre pluripotentes. Por ejemplo, la población de células puede incluir células de una etapa 1, una etapa 2, una etapa 3, una etapa 4 y una etapa 5 de diferenciación de células madre pluripotentes a células del linaje del endodermo pancreático.

En determinadas realizaciones de la invención, el cultivo de células es un cultivo adherente. En otras realizaciones, el cultivo de células es un cultivo en suspensión, que puede ser una suspensión de agregados celulares.

En un aspecto, un inhibidor selectivo de células madre o agente citotóxico descrito en el presente documento no tendrá ningún efecto sobre la diferenciación o el potencial de diferenciación de las células, y particularmente sobre la célula madre pluripotente y sus derivados diferenciadores y diferenciados. La diferenciación y el potencial de diferenciación puede determinarse analizando las células en busca de la presencia de marcadores. Dichos marcadores pueden incluir aquellos que identifican células madre pluripotentes, tales como OCT4, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, fosfatasa alcalina, NANOG y SOX2. Los marcadores también pueden identificar células en diferenciación o diferenciadas, tales como aquellas que identifican las diferenciaciones de la etapa 1 y las células de endodermo definitivas que incluyen SOX17, FOXA2/HNF313, CER, MIXL1, EOMES, GSC y CXCR4; marcadores que identifican las diferenciaciones de la etapa 2 y las células de endodermo del tracto digestivo superior negativas para PDX1, tales como SOX17, HNF113, HNF1a, HNF4a y FOXA1; marcadores que identifican las diferenciaciones de la etapa 3 o células de endodermo del tracto digestivo superior positivas para PDX1, tales como PDX1, HNF6, SOX9 y PROX1; tales como PDX1, HNF6, SOX9 y PROX1; marcadores que identifican las diferenciaciones de la etapa 4 o las células progenitoras del endodermo pancreático positivas para PDX1, tales como PDX1, NKX6.1, PTF1A, CPA y cMYC; y marcadores que identifican las diferenciaciones de la etapa 5, las células precursoras endocrinas y/o las células progenitoras endocrinas, tales como NGN3, PAX4, ARX y NKX2.2

En algunos aspectos, las células pueden controlarse para diferenciación indeseable (por ejemplo, células que no se obtienen de células de endodermo definitivas o células de tipo no pancreático), para lo cual pueden usarse los siguientes marcadores y otros conocidos en la técnica: AFP, CALCR, CMKOR1, CRIP1, FOXQ1, GATA4, GCG, CHGA, CPA, FGF17, GHRL, INS, MAFA, NFM, PAX3, PAX6, PP, PROX1, SOX1, SOX6, SOX7, SST, SYP, VWF y ZIC1.

Estos y otros marcadores pueden detectarse mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, RCP-C, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, clasificación de células, ELISA, transferencia Northern y transferencia Western, tecnología de expresión génica digital multiplex que depende de tecnologías de captura y detección basadas en hibridación.

En algunas realizaciones, puede ser ventajoso cultivar muestras de células tratadas con un inhibidor candidato o agente citotóxico en condiciones que soporten la expansión de células madre pluripotentes, antes de analizar la presencia de un marcador. De este modo, la detección de células madre pluripotentes puede potenciarse o amplificarse.

También se contempla que los métodos de cribado descritos en el presente documento pueden incluir el análisis de los efectos del inhibidor candidato o de agentes citotóxicos en diversos momentos. Por ejemplo, una célula o un cultivo de células se puede poner en contacto con un inhibidor candidato o agente citotóxico en un primer momento y se puede detectar un efecto del inhibidor o agente citotóxico en un segundo momento posterior. Cuando la célula o el cultivo celular es una población de células que experimentan diferenciación, el primer momento puede ser, por ejemplo, diferenciación de la etapa 1 y el segundo momento puede ser durante la diferenciación de la etapa 2, etapa 3, etapa 4 o etapa 5.

La presente invención también proporciona métodos para reducir el número o porcentaje de células madre pluripotentes en una población de células, tal como se define en las reivindicaciones. Normalmente, las células se pondrán en contacto en un medio de cultivo celular que contenga una cantidad efectiva del inhibidor selectivo de células madre o agente citotóxico, tal como al menos aproximadamente 1 μM de ácido cafeico, al menos aproximadamente 1 μM de Ivermectina o al menos 5 μM de cloruro de queleritina.

La invención contempla que dichos métodos serán particularmente útiles para reducir el número o porcentaje de células madre pluripotentes en poblaciones de células en diferenciación o diferenciadas, tales como aquellas poblaciones procedentes de células madre pluripotentes.

En determinadas realizaciones, las células madre pluripotentes se diferencian a células del linaje del endodermo, tales como células de linaje pancreático, y luego se tratan con un inhibidor selectivo de células madre pluripotentes o agente citotóxico de la invención para reducir las células madre pluripotentes indiferenciadas en la diferenciación final, o durante el proceso de diferenciación. Dichas células en diferenciación y diferenciadas incluyen células de endodermo definitivas, células de endodermo del tracto digestivo superior negativas para PDX1, células de endodermo del tracto digestivo superior positivas para PDX1, células progenitoras del endodermo pancreático positivas para PDX1, células progenitoras endocrinas y células precursoras endocrinas.

Ventajosamente, los métodos de la invención son igualmente aplicables tanto para cultivo a pequeña escala (*por ejemplo* hasta aproximadamente 10^5 células), tal como placas de 96 pocillos y 6 pocillos, como placas o matraces más grandes, tales como vasos de cultivo de 60 mm², 100 mm², 150mm², matraces T25, matraces T75, matraces T175, matraces triples, y fábricas de células más pequeñas, tales como 2, 5 o 10 fábricas de células apiladas, así como el cultivo a gran escala de al menos aproximadamente 1×10^9 células, tales como matraces de agitación, vasos de biorreactor y otros vasos tales como 40 fábricas de células apiladas que serán bien conocidas por el experto en la técnica. Un experto en la técnica apreciará que las expresiones "pequeña escala" y "gran escala" no son limitantes y que para cualquier estudio, el número de células y, por lo tanto, la capacidad de volumen del vaso de cultivo dependerá de la naturaleza de los estudios.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona métodos para diferenciar una población de células madre pluripotentes como se define en las reivindicaciones. De acuerdo con dichos métodos, el inhibidor selectivo de células madre pluripotentes o agente citotóxico es uno que, a una dosis efectiva citotóxica o inhibidora de células madre pluripotentes, no tiene ningún efecto sobre la diferenciación o el potencial de diferenciación de las células madre pluripotentes o sus derivados diferenciados, y al mismo tiempo no tiene ningún efecto sobre la viabilidad o la proliferación de los derivados diferenciadores o diferenciados.

Además, los métodos descritos en el presente documento se pueden usar con protocolos de diferenciación que implican el contagio secuencial de células madre pluripotentes con dos o más condiciones en diferenciación, tales como la diferenciación secuencial de células madre pluripotentes a células endocrinas pancreáticas a través de la etapa 1 (endodermo definitivo), la etapa 2 (endodermo del tracto digestivo superior negativo para PDX1), la etapa 3 (endodermo del tracto digestivo superior positivo para PDX1), la etapa 4 (progenitor del endodermo pancreático positivo para PDX1) o la etapa 5 (progenitores endocrinos y precursores endocrinos). Las condiciones de diferenciación útiles para este tipo de series de diferenciación incluyen medio de cultivo, compuestos y factores de crecimiento, tales como medios de cultivo celular diferenciadores que contienen, un miembro de la superfamilia de TGFE3; un miembro de la familia Wnt; un activador de la ruta de Wnt; un inhibidor de ROCK; un miembro de la familia FGF; un inhibidor de la ruta de hedgehog; un inhibidor de la superfamilia de TGFE3; un retinoide; un análogo de ácido retinoico; un miembro de la familia EGF; y/o un inhibidor de gamma secretasa. También se incluyen condiciones tales como reducir o eliminar el suero; reducir o eliminar la insulina y los factores de crecimiento similares a la insulina; reducir o eliminar la señalización del factor de crecimiento de la superfamilia TGFE3; reducir o eliminar la actividad gamma secretasa; reducir o eliminar la señalización de la ruta de hedgehog; activar la señalización del factor de crecimiento de la superfamilia TGFE3; activar la señalización del factor de crecimiento de la familia FGF; activar la señalización del factor de crecimiento de la familia EGF; activar una ruta Wnt; y activar un miembro de la familia del receptor de ácido retinoico. Estas condiciones se pueden lograr fácilmente con los métodos de la presente invención.

La presente invención también proporciona composiciones como se define en las reivindicaciones. Normalmente, las composiciones serán diferenciaciones en las que se requiere la inhibición o eliminación de células madre pluripotentes, tal como cuando las células se usan para la implantación en un sujeto.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** es una colección de gráficos que muestran los datos de expresión génica de RCP-C obtenidos para diversos marcadores, que demuestran que la RCP-C puede usarse como una medida de la abundancia relativa de tipos de células en poblaciones de células mixtas. La **Figura 1A** muestra la expresión del gen SOX17 en 100 % hESC (columna izquierda) y de 100 % células definitivas (DE; columna derecha) Las columnas entre el 100 % hESC y el 100 % DE muestran la expresión del gen SOX17 a partir de mezclas de dilución conocidas (o relaciones) de hESC:células DE, 99:1 hESC:células DE (2ª columna de la izquierda), 95:5 hESC:células DE (3ª columna de la izquierda) y 90:10 hESC:DE (4ª columna de la izquierda). La **Figura 1B** muestra la expresión del gen OCT4 en hESC mezcladas con células de fibroblastos embrionarios humanos (HEF) en relaciones conocidas (100: 0 HEF: hESC; 99:1 HEF:hESC; 90:10 HEF:hESC; 50:50 HEF:hESC; y 0:100 HEF:hESC. La **Figura 1C** muestra que la expresión del gen relativo de insulina (INS) es proporcional al número de células que expresan el gen marcador en la población.

La **Figura 2** es un esquema ejemplar para controlar y detectar niveles de células madre pluripotentes en cultivos diferenciados.

Las **Figuras 3A-3D** son gráficos que rastrean ensayos de impedancia en tiempo real de células hES (hESC; Las **Figuras 3A y 3B**) o células de endodermo definitivas (DE; Las **Figuras 3C y 3D**) en presencia de siete compuestos LOPAC1280™ que causaban una reducción o caída de la impedancia celular, lo que indicaba citotoxicidad en cultivos de hESC pero no diferenciaba el endodermo definitivo.

Las **Figuras 4A y 4G** son gráficos de barras que muestran los niveles relativos de expresión génica de OCT4 (**Figura 4A**), NANOG (**Figura 4B**), FOXA2 (**Figura 4C**), SOX17 (**Figura 4D**), SOX7 (**Figura 4E**), PAX6 (**Figura 4F**) y ZIC1 (**Figura 4G**) BG02 con tratamiento de agentes citotóxicos selectivos candidatos de la sub-biblioteca LOPAC1280™ (**Tabla 4**) a cultivos celulares adherentes de la etapa 1 de BG02. Los niveles de expresión se normalizaron usando la media geométrica de tres genes constitutivos, GUSB, CYCG y TBP. Los gráficos representan la regulación de plegado en comparación con la muestra de hESC. Las grandes puntas de las

flechas indican la hora del tratamiento con fármacos. D = DMSO (control); C = Cloruro de queleritrina; A = AG490; B = BTO-1; De = Defostatina; S = SU6656.

Las Figuras 5A-5M. son gráficos de barras que muestran los niveles relativos de expresión génica de marcadores expresados en células pluripotentes o en células de linaje pancreático: OCT4 (Figura 5A), MIXL (Figura 5B), EOMES (Figura 5C), CXCR4 (Figura 5D), SOX17 (Figura 5E), HNF1B (Figura 5F), HNF4A (Figura 5G), PDX1 (Figura 5H), PTF1A (Figura 5I), NKX2.2. (Figura 5J), NGN3 (Figura 5K), NKX6.1 (Figura 5L) y PAX4 (Figura 5M) a cultivos celulares de agregados en suspensión en las etapas 1-4. Los niveles de expresión se normalizan a los niveles medios de expresión de los genes constitutivos. Los gráficos representan la regulación de plegado en comparación con una muestra de hESC. Ch.Cl = cloruro de queleritrina; Def. = defostatina; AG = AG 490; SU = SU6656.

Las Figuras 6A-6F son gráficos de barras que muestran los niveles relativos de expresión génica de marcadores de células de linaje no pancreático: SOX1 (Figura 6A); por ejemplo, al menos observado en células extraembrionarias y neurales), ZIC1 (Figura 6B); por ejemplo, al menos observado en células neurales tempranas), PAX6 (Figura 6C); por ejemplo, al menos observado en células de ectodermo neuronales), SOX7 (Figura 6D); por ejemplo, al menos observado en células extraembrionarias), AFP (Figura 6E); por ejemplo, al menos observado en células del hígado y células extraembrionarias) y CDX2 (Figura 6F; por ejemplo, al menos observado en células extraembrionarias) en diferenciaciones tratadas con compuestos. El cloruro de queleritrina (Ch. Cl) y la defostatina (Def.) no promueven la diferenciación de células de linaje no pancreático, o células "fuera del objetivo", mientras que tirfostina AG 490 (AG) y SU6656 (SU) parecían producir una expresión elevada de AFP y CDX2, respectivamente, que son marcadores no característicos de las células pancreáticas y no se expresan normalmente en linajes pancreáticos.

Las Figuras 7A y 7B son fotografías de placas de 96 pocillos que contienen hESCs y progenitores neurales (NPC) procedentes de hESCs cribados con la biblioteca LOPAC1280™. Las CES humanas se tiñeron para actividad de fosfatasa alcalina (Figura 7A); y los NPC se tiñeron con cristal violeta (Figura 7B). Las columnas izquierda y derecha de las placas LOPAC están en blanco y sirvieron como controles no tratados. Los pocillos que muestran citotoxicidad o inhibición del crecimiento están rodeados por un círculo.

La Figura 8 es una fotografía del cribado secundario del LOPAC1280™ en hESC de compuestos candidatos a concentraciones variables y se tiñeron para actividad de fosfatasa alcalina.

Las Figura 9A-9H son gráficos de barras que muestran los niveles relativos de expresión génica de OCT4 (Figuras 9A y 9E), SOX17 (Figuras 9B y 9F), PAX6 (Figuras 9C y 9G) y CDX2 (Figuras 9D y 9H) con tratamiento de agentes citotóxicos selectivos candidatos de la subbiblioteca LOPAC1280™ (Tabla 4) a cultivos celulares de agregados en suspensión en la etapa 1. Los cultivos se diferenciaron al final de la etapa 2. Los niveles de expresión se normalizan a los niveles medios de expresión de una muestra del día 2 de una diferenciación de etapa 1 previamente calificada (estudios de panel izquierdos). Los gráficos representan la regulación de plegado en comparación con la muestra del día 2. Ci = línea CiT49 hESC; CA = Ácido cafeico; C = Calmidazolio; P = Pirocatecol; N = Nafticidina; H = Hidroxianilida; U = U-73343; M = MG624; P = Pentamidina; G = Guinacrina; D = Domperidona; I = Ivermectina; AP = Amm. Pirrolidinina; O = Oleoildopamina; S = SKF96365.

Las Figuras 10A-10I son gráficos de barras que muestran los niveles relativos de expresión génica de OCT4 (Figura 10 A), MIXL (Figura 10B), HNF1B (Figura 10C), HNF4A (Figura 10D), PAX4 (Figura 10E), NGN3 (Figura 10F), NKX2.2 (Figura 10G), NKX6.1 (Figura 10H) y PTF1A (Figura 10I) después del tratamiento de los cultivos celulares de agregados en suspensión en las etapas 1 con DMSO (control), ácido cafeico 0,1 μM o agentes de ivermectina 0,17 μM. Las muestras de control no tratadas se recogieron en d0 y d1 (estudio de panel izquierdo). Las muestras tratadas se recogieron en d2, d3, d5, d7, d9, d11 e d13. Las columnas para cada día de las muestras tratadas son (de izquierda a derecha): DMSO, ácido cafeico e ivermectina. Los cultivos se diferenciaron al final de la etapa 4. Los resultados de una diferenciación del endodermo pancreático sin tratar se muestran a la derecha, con muestras recogidas en los días 0, 1, 2, 5, 8, 10 y 14.

La Figura 11 es una tabla que muestra los nombres, acciones y estructuras de los tres compuestos de la biblioteca LOPAC1280™ que eran citotóxicos para hESC pero que no afectaban la viabilidad celular de las células diferenciadas.

Las Figuras 12A-12B son imágenes de agregados en suspensión posteriores a la etapa 1 sembrados en placas en cultivo adherente en medio hESC y teñidos con tinción nuclear DAPI (estudios de panel izquierdos) y OCT4 (estudios de panel intermedios). Las agrupaciones positivas para OCT4 se muestran en los estudios de panel derechos como agrupaciones oscuras rellenos, ya sea en agrupaciones primarias más pequeños o secundarias más grandes.

Las Figuras 13A-13E. son imágenes que muestran el agotamiento de células positivas para OCT4 en cultivos de agregados en suspensión de la etapa 1 tratados con cloruro de queleritrina (ChCl; Figura 13B), ivermectina (Figura 13C) y ácido cafeico (Figura 13E) en comparación con las células control tratadas con DMSO (Figuras 13A y 13D) de la etapa 1.

Las Figuras 14A-14B son imágenes que muestran el agotamiento de células positivas para OCT4 en cultivos de agregados en suspensión de la etapa 1 de la línea celular hES BG02 tratada con ácido cafeico (Figura 14B) en comparación con el control, cultivos tratados con DMSO (Figura A).

Las Figuras 15A-15B son imágenes que muestran el agotamiento de células positivas para OCT4 en cultivos de agregados en suspensión de la etapa1 usando cloruro de queleritrina desde el día 1 al 2 de la etapa 1. Los agregados se colocaron en placas en cultivo adherente en medio hESC durante 24 (arriba) o 72 horas (abajo) antes de teñir.

La **Figura 16** es una colección de imágenes que muestra el agotamiento de células positivas para OCT4 en cultivos de agregados en suspensión de la etapa 1 usando ácido cafeico desde el día 1 al 2 de la etapa 1. Los agregados se sembraron en placas en cultivo adherente en medio hESC durante 24 (arriba) o 72 horas (abajo) antes de teñir.

5 La **Figura 17** es una colección de imágenes que muestra los efectos de ivermectina o ácido cafeico (concentraciones indicadas) en cultivos de agregados en suspensión de diferenciaciones de células hES CyT49, después de la siembra en placas el día 2 en medio celular ES y cultivo durante 24 o 72 horas adicionales. Se muestra la tinción inmunocitoquímica para OCT4.

10 Descripción detallada

La presente invención se puede entender más rápidamente con referencia a la siguiente descripción detallada de la invención y los ejemplos incluidos en este documento. Sin embargo, antes de divulgar y describir las presentes composiciones y métodos, debe entenderse que la presente invención no se limita a ácidos nucleicos específicos, polipéptidos específicos, tipos celulares específicos, células huésped específicas, condiciones específicas o métodos específicos, etc., ya que, por supuesto, pueden variar, y las numerosas modificaciones y variaciones en la misma serán evidentes para los expertos en la técnica. Véase Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY; Maniatis et al., (1982) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY; Wu (Ed.) 1993 *Meth. Enzymol.* 218, Parte I; Wu (Ed.) 1979 *Meth. Enzymol.* 68; Wu et al., (Eds.) 1983 *Meth. Enzymol.* 100 y 101; Grossman y Moldave (Eds.) 1980 *Meth. Enzymol.* 65; Miller (ed.) 1972 *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; Old and Primrose, 1981 *Principles of Gene Manipulation*, Universidad de California Press, Berkeley; Schleif y Wensink, 1982 *Practical Methods in Molecular Biology*; Glover (Ed.) 1985 *DNA Cloning vol. I y II*, IRL Press, Oxford, RU; Hames & Higgins (Eds.) 1985 *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, RU; y Setlow & Hollaender 1979 *Genetic Engineering: Principles and Methods*, vols. 1-4, Plenum Press, NY. Por último, las abreviaturas y la nomenclatura, cuando se emplean, se consideran patrones en el campo y se usan comúnmente en revistas profesionales tales como las citadas en el presente documento. Se ha de entender además que la invención no abarca células hES obtenidas por destrucción de embriones y que cualquier ejemplo que se base en dichas células se incluyen solo como referencia.

30 A menos que se indique otra cosa, los términos usados en el presente documento deben entenderse de acuerdo con el uso convencional por parte de los expertos en la técnica relevante. Además de las definiciones de términos proporcionados a continuación, las definiciones de términos comunes en biología molecular también se pueden encontrar en Rieger et al., 1991 *Glosario de genética: clásico y molecular*, 5ª edición, Berlín: Springer-Verlag; y en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., Eds., *Current Protocols*, un proyecto conjunto entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley and Sons, Inc., (suplemento de 1998). Debe entenderse que tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, "un" o "una" pueden significar uno o más, dependiendo del contexto en el que se usa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula" puede significar que al menos una célula, dos células o una pluralidad de células.

40 Además, para los fines de esta memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, porcentajes o proporciones de materiales, condiciones de reacción y otros valores numéricos usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, deben entenderse que están modificados en todos los casos, por el término "**aproximadamente**". En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener mediante la presente invención. Por lo menos, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos indicados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo habituales.

50 "**aproximadamente**" o "**alrededor de**" como se usa en el presente documento significa que un número denominado "aproximadamente" o "alrededor" comprende el número enumerado más o menos 1-10 % de ese número enumerado. Por ejemplo, aproximadamente 50 nucleótidos pueden significar 45-55 nucleótidos o tan solo 49-51 nucleótidos dependiendo de la situación. Siempre que aparezca en el presente documento, un intervalo numérico, como "45-55", se refiere a cada número entero en el intervalo dado; *por ejemplo*, "45-55 %" significa que el porcentaje puede ser del 45 %, 46 %, etc., hasta el 55 % inclusive. Cuando un intervalo descrito en el presente documento incluye valores decimales, como "1,2 % a 10,5 %", el intervalo se refiere a cada valor decimal del incremento más pequeño indicado en el intervalo dado; *por ejemplo*, "1,2 % a 10,5 %" significa que el porcentaje puede ser del 1,2 %, 1,3%, 1,4%, 1,5%, etc. hasta el 10,5 % inclusive; *por ejemplo*, "1,20 % a 10,50 %" significa que el porcentaje puede ser del 1,20 %, 1,21 %, 1,22 %, 1,23 %, etc. hasta el 10,50 % inclusive.

60 Como se usa en el presente documento, "**suspensión de células individuales**" o expresiones equivalentes, se refiere a una mezcla de un fluido y una célula, o más normalmente una pluralidad de células, que están separadas entre sí (es decir, no agregadas), que pueden prepararse por cualquier medio mecánico, biológico o químico disponible. Las suspensiones de células individuales descritas en el presente documento son normalmente preparaciones de células hES viables o células derivadas de hES suspendidas en una solución fisiológica, tal como una solución salina basal, solución salina, medio de cultivo celular o similares. Existen varios métodos para disociar

conglomerados celulares para formar suspensiones de células individuales de tejidos primarios, células adherentes en cultivo y agregados celulares, que incluyen, pero sin limitación, métodos que disocian las células mediante la fuerza física (disociación mecánica tal como raspado celular, trituración a través de una pipeta de diámetro estrecho, aspiración con aguja fina, desagregación con agitador vorticial y filtración forzada a través de una malla fina de nailon o acero inoxidable), con enzimas (es decir, disociación enzimática usando tripsina, colagenasa, Accutase™ y similares), o combinaciones de los mismos. Además, los métodos y las condiciones del medio de cultivo capaces de soportar el crecimiento y la viabilidad de suspensiones de células individuales de células hES son útiles para la expansión, clasificación de células y siembra definida para ensayos de placas de múltiples pocillos y permiten la automatización de procedimientos de cultivo y expansión clonal. Por lo tanto, una realización de la invención proporciona métodos para generar una disociación enzimática estable de células individuales de células hES o un sistema de cultivo celular procedente de hES capaz de soportar el mantenimiento a largo plazo y la expansión eficiente de células hES pluripotentes indiferenciadas o células hES diferenciadas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "**poner en contacto**" (es decir, poner en contacto una célula, por ejemplo, una célula diferenciable, con un compuesto) pretende incluir la incubación del compuesto y la célula juntos *in vitro* (por ejemplo, añadir el compuesto a células en cultivo). La expresión "**poner en contacto**" no pretende incluir la exposición *in vivo* de células a un medio de cultivo celular definido que comprende componentes, compuestos, factores de crecimiento y similares (por ejemplo, un neurotransmisor, un ligando ErbB3, un miembro de la familia TGF-3, etc.), o componentes, compuestos, factores de crecimiento y similares, tal como se producen de forma natural en un sujeto (es decir, exposición que se puede producir como resultado de un proceso fisiológico natural). Por ejemplo, una etapa de poner en contacto una célula con un medio celular definido que contiene un neurotransmisor, un ligando ErbB3 y un miembro de la familia TGF-13, se puede realizar de cualquier manera adecuada, pero se entenderá que expone a la célula al contacto con los componentes anteriormente mencionados. Por ejemplo, las células pueden ponerse en contacto incubando (cultivando) las células con el(los) componente(s) en cultivo adherente o en cultivo en suspensión. Se entiende que las células contactadas con los componentes en un medio definido pueden tratarse adicionalmente con un entorno de diferenciación celular para estabilizar las células, o para diferenciar las células.

"**Soporte**" como se usa en el presente documento en el contexto de cultivo celular, se refiere a composiciones de medios, componentes específicos de los mismos y condiciones de cultivo que son suficientes para el crecimiento, viabilidad, pluripotencia y/u otras características deseadas del cultivo celular. Por lo tanto, un medio definido que soporta la expansión indiferenciada de las células hES es uno en el que las células se desarrollarán sin diferenciación cuando las células hES se cultiven en el mismo sin factores adicionales, compuestos, aditivos o similares. Un compuesto o factor que soporta la expansión de las células hES es uno que, cuando se añade a las condiciones de los medios descritos, permitirá que las células hES se desarrollen.

Como se usa en el presente documento, "**medios de cultivo celular definidos**", "**medios de cultivo definidos**" y "**medios definidos**" se usan indistintamente para referirse a composiciones acuosas que contienen proporciones, cantidades o actividades específicas de componentes inorgánicos y orgánicos (incluidos componentes biológicos y bioactivos) que pueden reproducirse fielmente con propiedades sustancialmente similares. Los medios definidos pueden contener proteínas, preferentemente proteínas recombinantes, siempre que puedan prepararse o purificarse sin una variabilidad significativa de lote a lote o de partida a partida. Los sueros animales son inherentemente indefinidos y variables, y por lo tanto los medios definidos no incluyen suero. Sin embargo, se pueden incluir en un medio definido, suero u otras proteínas, factores y similares, altamente purificados e individuales en una cantidad o proporción basada en la masa, equivalentes molares o actividad (por ejemplo, actividad biológica mensurable).

Como se usa en el presente documento, el término "**diferenciar**" se refiere a la producción de un tipo de célula que es más especializado que el tipo de célula del que se obtiene. Por lo tanto, el término abarca los tipos de células que están parcial y terminalmente diferenciadas. Las células diferenciadas procedentes de células hES generalmente se denominan "**células procedentes de hES**", "**cultivos de agregados de células procedentes de hES**", "**suspensiones de células individuales procedentes de hES**", "**cultivos adherentes de células procedentes de hES**" y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "**sustancialmente**" se refiere a en gran medida o grado. Por ejemplo, "**sustancialmente similar**" en el contexto puede usarse para describir un método que es en gran medida o grado similar a otro método. Sin embargo, como se usa en el presente documento, con el término "**sustancialmente libre**", (por ejemplo, "**sustancialmente libre**" o "**sustancialmente libre de contaminantes**" o "**sustancialmente libre de suero**" o "**sustancialmente libre de insulina o factor de crecimiento similar a la insulina**" o expresiones equivalentes), significa que la solución, medio, suplemento, excipiente o similar, es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o al menos aproximadamente 100 % libre de suero, contaminantes, insulina o factor de crecimiento similar a la insulina. La divulgación proporciona un medio de cultivo definido que no contiene suero, o está 100 % libre de suero, o está sustancialmente libre de suero. Por el contrario, una composición, proceso, método, solución, medio, suplemento, excipiente o similar, "**sustancialmente similar**" es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % similar a la composición de referencia, proceso, método, solución, medio, suplemento, excipiente previamente descrito en el presente documento o en un proceso o método descrito anteriormente.

El término "**enriquecido**" puede referirse a un cultivo celular que contiene más de aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 % de un linaje celular deseado.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "**cantidad efectiva**" o expresiones equivalentes, de un agente, tal como un compuesto, se refiere a la cantidad del agente que es suficiente en presencia de los componentes y condiciones restantes para efectuar el resultado deseado, tal como inhibición del crecimiento de células madre pluripotentes. Una cantidad efectiva de un compuesto o factor de crecimiento para estabilizar un cultivo de células madre pluripotentes es la cantidad que dará como resultado la estabilización de un cultivo de células madre pluripotentes, *por ejemplo*, más de un día, una semana, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses y/o seis o más meses en ausencia de una célula de alimentación y en ausencia de suero o reemplazo de suero. Como alternativa, una "**cantidad efectiva**" o expresiones equivalentes, de un agente, tal como un compuesto, puede referirse a la concentración del compuesto que es suficiente en presencia de los componentes restantes para efectuar la estabilización de un cultivo de células madre pluripotentes por más de 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 40 pases, en ausencia de una célula de alimentación y en ausencia de suero o reemplazo de suero. De forma similar, esta concentración la determina fácilmente un experto en la técnica.

20 Como se usa en el presente documento, el término "**agente**" se refiere a cualquier molécula, compuesto y/o sustancia que produce un efecto, tal como un efecto biológico, preferentemente un efecto deseado. En determinadas realizaciones, los agentes divulgados en el presente documento son citotóxicos o inhibidores del crecimiento de células madre pluripotentes. En un aspecto, los agentes citotóxicos o inhibidores divulgados en el presente documento son selectivamente citotóxicos o citostáticos hacia células madre pluripotentes en comparación con al menos otro tipo de células, que puede ser una célula más diferenciada que una célula madre pluripotente.

25 Los "**agentes citotóxicos o inhibidores candidatos**" o "**agentes candidatos**" divulgados en el presente documento pueden ser sintéticos o de origen natural, que incluyen, pero sin limitación, productos biológicos, bioquímicos y químicos que abarcan numerosas clases químicas, aunque con frecuencia son compuestos orgánicos. A menudo, los agentes candidatos son compuestos orgánicos de moléculas pequeñas, es decir, aquellos que tienen un peso molecular de más de aproximadamente 50 Da pero menos de aproximadamente 2500 Da, normalmente menos de aproximadamente 2000 Da, con frecuencia menos de aproximadamente 1500 Da, a menudo menos de aproximadamente 1000 Da y normalmente aproximadamente 800 Da o menos, incluyen grupos químicos funcionales necesarios para las interacciones estructurales con polipéptidos y/o ácidos nucleicos, y normalmente incluyen al menos un grupo amino, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, normalmente al menos dos de los grupos químicos funcionales y más a menudo al menos tres de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos pueden incluir estructuras cíclicas de carbono o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales identificados anteriormente. Los agentes candidatos también pueden ser biomoléculas tales como ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, peptidomiméticos, anticuerpos, ribozimas, construcciones de ARNi (incluyendo ARNsi), ARN antisentido, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, isoprenoides, purinas, pirimidinas, derivados o análogos estructurales de los anteriores, o combinaciones de los mismos y similares. Cuando el agente es un ácido nucleico, el agente normalmente es una molécula de ADN o ARN, aunque también se contemplan ácidos nucleicos modificados, variantes, análogos y similares.

45 Los agentes candidatos se obtienen a partir de una amplia diversidad de fuentes que incluyen bibliotecas o colecciones de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para la síntesis dirigida y aleatoria de una amplia diversidad de compuestos orgánicos y biomoléculas, que incluyen la expresión de oligonucleótidos aleatorizados, bibliotecas combinatorias orgánicas sintéticas, bibliotecas de presentación sobre fagos de péptidos aleatorios y similares. Como alternativa, las bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles o se producen fácilmente. Además, las bibliotecas y compuestos naturales y sintéticamente producidos pueden modificarse a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales. Además, los agentes farmacológicamente activos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, y otros métodos que serán bien conocidos en la técnica, para producir análogos estructurales de los agentes.

55 Como se usa en el presente documento, el término "**expresar**" se refiere a la transcripción de un polinucleótido y/o traducción de un polipéptido en una célula, de modo que los niveles de la molécula son mensurablemente más altos en una célula que expresa la molécula que en una célula que no expresa la molécula. Los métodos para medir la expresión de una molécula son bien conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, sin limitación, transferencia Northern, TR-RCP, hibridación *in situ*, transferencia Western e inmunotinción.

60 Como se usa en el presente documento cuando se refiere a una célula, línea celular, cultivo celular o población de células, el término "**aislado**" se refiere a estar sustancialmente separado de la fuente natural de las células de manera que la célula, línea celular, cultivo celular o población de células pueden cultivarse *in vitro*. Además, el término "**aislamiento**" se usa para referirse a la separación física de una o más células de un grupo de dos o más células, donde las células se seleccionan basándose en una característica deseada, como la morfología celular y/o la expresión de un marcador. Las células aisladas de acuerdo con la presente divulgación pueden o no estar parcial,

sustancial o completamente purificadas de contaminantes

Como se usa en el presente documento, "**ligando**" se refiere a un producto químico que se une a una molécula biológica, tal como un receptor. Como se usa en el presente documento, "**agonista**" se refiere a un ligando que se une a un receptor de una célula y desencadena una respuesta de la célula, mientras que "**antagonista**" se refiere a un ligando que se une a un receptor e inhibe una respuesta de una célula bloqueando la unión del agonista.

Como se usa en el presente documento, "**densidad celular convencional**" se refiere a un intervalo de concentración de células madre pluripotentes que se sabe que son viables y pueden expandirse en cultivo. Por ejemplo, normalmente se siembran en placas células hES a una densidad de aproximadamente 30.000 a 60.000 células/cm², dependiendo del ciclo de crecimiento de las células o línea celular, y produciendo aproximadamente 150.000 — 350.000 células/cm², por ejemplo, aproximadamente 2,5 x 10⁶ a aproximadamente 5 x 10⁷ células por placa de 60 mm o aproximadamente 19,6cm². Por el contrario, "**baja densidad celular**" se refiere, por ejemplo, a células madre pluripotentes sembradas en placas a una densidad celular que es significativamente menor que la densidad celular convencional. Es bien sabido en la técnica que las células sembradas en placas por debajo de una determinada densidad umbral pueden experimentar un retraso en la división celular o pueden dejar de sobrevivir a los pasajes. Los cultivos de células hES sembradas en placas a aproximadamente 30.000 o menos células por cm² se consideran de baja densidad celular.

En determinadas realizaciones, las células madre pluripotentes se cultivan en un medio definido descrito en el presente documento en ausencia y/o presencia de proteínas de matriz extracelular (ECM), *por ejemplo*, MATRIGEL™. Las células pluripotentes cultivadas en ausencia de ECM pueden contener aproximadamente 0,5 a 20 % de suero humano (hS) o fracciones retenidas de hS de una columna de centrifugación de corte de 300K y/o 100K MW (Microcon, Millipore, Billerica, MA). Las suspensiones de agregados de células hES pueden producirse incubando directamente células hES en los medios que contienen hasta 20 % de hS, por ejemplo, 0,2%, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % de hS o fracciones retenidas de hS durante una noche a 37 °C. La eficacia de recubrimiento para las células madre en el medio que contiene hS o la fracción retenida de hS fue comparable a la observada para células hES cultivadas en DC-HALF como se describe en el documento PCT/US2007/062755, o cultivadas en medio DC-HALF usando MATRIGEL™ como ECM, u otras matrices similares. Los métodos para cultivar células hES en un medio definido se describen en la publicación de la Patente de los EE.UU. n.º 2009/0104696, del 23 de abril de 2009, titulada MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA MEDIOS DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES LIBRES DE ALIMENTADOR QUE CONTIENEN SUERO HUMANO.

Aún en otras realizaciones, las células madre pluripotentes, como una monocapa o como una suspensión agregada, se cultivan en un medio sustancialmente libre de suero animal (*por ejemplo*, suero fetal de mamífero tal como suero bovino fetal) y además en ausencia de un factor de crecimiento para fibroblastos añadido exógenamente (FGF). Dichos métodos son distinguibles de la Patente de los EE.UU. n.º 7.005.252 de Thomson, que requiere cultivar células hES en un medio sin suero animal pero que contiene factores de crecimiento añadidos exógenamente, incluyendo FGF.

Como se usa en el presente documento, la expresión "**célula diferenciable**" se usa para describir una célula o población de células que pueden diferenciarse en una célula madura, o un progenitor o precursor de una célula madura, o que puede participar en la diferenciación de células, *por ejemplo*, fusionarse con otras células, que pueden diferenciarse en una célula madura. Las expresiones "**célula progenitora**" y "**célula progenitora restringida de linaje**" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a células multipotentes, oligopotentes y unipotentes que están comprometidas con la diferenciación a lo largo de una ruta particular. Por ejemplo, las células progenitoras del linaje del endodermo pueden ser capaces de diferenciarse en diversos tipos de células del endodermo, pero habitualmente no se desarrollan en el ectodermo, mesodermo o derivados de los mismos. En una realización, el progenitor o epitelio del endodermo pancreático como se describe en el presente documento son células progenitoras capaces de desarrollarse adicionalmente en diferentes tipos de células secretoras de hormonas pancreáticas tales como insulina, somatostatina, glucagón, grelina y células secretoras de polipéptido pancreático. Determinadas células madre adultas son tipos de células progenitoras.

La divulgación también contempla células diferenciables de cualquier fuente dentro de un animal, siempre que las células sean diferenciables como se define en el presente documento. Por ejemplo, las células diferenciables pueden extraerse de embriones, o cualquier capa germinal primordial, del tejido placentario o del corion, o de tejidos más maduros, como los que contienen células madre adultas, que incluyen, pero sin limitación, adiposo, médula ósea, tejido nervioso, tejido mamario, tejido hepático, tejidos del páncreas, epiteliales, respiratorios, gonadales y musculares. En realizaciones específicas, las células diferenciables son células madre embrionarias. En otras realizaciones específicas, las células diferenciables son células madre adultas o células desdiferenciadas. En aún otras realizaciones específicas, las células madre son células madre procedentes de placenta o coriónicas.

Por supuesto, la invención contempla usar células diferenciables de cualquier animal capaz de generar células diferenciables. Los animales de los que se recogen las células diferenciables pueden ser vertebrados o invertebrados, mamíferos o no mamíferos, humanos o no humanos. Ejemplos de fuentes animales incluyen, pero sin limitación, primates, roedores, caninos, felinos, equinos, bovinos y porcinos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "**célula precursora**" es un tipo de linaje restringido, parcialmente diferenciado, generalmente una célula unipotente, que ha perdido la mayor parte o la totalidad de la multipotencia de células madre. Las células precursoras normalmente son capaces de diferenciarse en solo uno, dos o unos pocos tipos de células finales estrechamente relacionadas). Las células precursoras endocrinas descritas en ese caso, por ejemplo, son capaces de diferenciarse en células que expresan la hormona pancreática.

Como se usa en el presente documento, "**endodermo definitivo**" y "**DE**" se usan indistintamente para referirse a una célula de linaje de endodermo multipotente que puede diferenciarse adicionalmente en células del tubo intestinal u órganos procedentes del tubo intestinal. De acuerdo con determinadas realizaciones, las células de endodermo definitivas son células de mamífero, y en una realización preferente, las células de endodermo definitivas son células humanas. En algunas realizaciones de la presente invención, las células de endodermo definitivas expresan determinados marcadores y/o no expresan significativamente otros marcadores. En algunas realizaciones, uno o más marcadores seleccionados de entre SOX17, CXCR4, MIXL1, GATA4, HNF3beta, GSC, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1, CRIP1 y CER se expresan en células de endodermo definitivas. En otras realizaciones, uno o más marcadores seleccionados de entre OCT4, alfa fetoproteína (AFP), trombomodulina (TM), SPARC, SOX7 y HNF4alfa no se expresan significativamente en células de endodermo definitivas. Las poblaciones de células de endodermo definitivas y los métodos de producción de las mismas también se describen en la solicitud de Patente de los EE.UU. n.º 11/021.618, titulada ENDODERMO DEFINITIVO, presentada el 23 de diciembre de 2004 (ahora la Patente de los EE.UU. n.º 7.510.876).

Aún otras realizaciones de la presente invención se refieren a cultivos celulares y agregados celulares denominados "**células de endodermo del tracto digestivo superior negativas para PDX-1**" "**células de endodermo del tracto digestivo superior**" o equivalentes de los mismos. Las células de endodermo del tracto digestivo superior negativas para PDX1 son multipotentes y pueden dar lugar a diversas células y tejidos que incluyen pero sin limitación, timo, tiroides, paratiroides, pulmones/bronquios, hígado, faringe, bolsas faríngeas, partes del duodeno y trompa de Eustaquio. En algunas realizaciones, las células de endodermo del tracto digestivo superior expresan niveles aumentados de SOX17, HNF1beta, HNF1alfa, FOXA1 en comparación con las células de endodermo no del tracto digestivo superior, *por ejemplo*, endodermo definitivo o endodermo positivo para PDX que no expresan de forma apreciable estos marcadores. Las células de endodermo del tracto digestivo superior negativas para PDX1 también expresan niveles bajos a indetectables de PDX1, AFP, SOX7 e SOX1. Las poblaciones de células de endodermo del tracto digestivo superior negativas para PDX1 y los métodos de producción de las mismas también se describen en la solicitud de Patente de los EE.UU. n.º 11/588.693, titulada ENDODERMO DEL TRACTO DIGESTIVO SUPERIOR DORSAL Y VENTRAL QUE EXPRESA PDX-1, presentada el 27 de octubre de 2006.

Otras realizaciones de la presente invención se refieren a cultivos celulares de "células de endodermo del tracto digestivo superior pancreático positivas para PDX1" o "endodermo prepancreático positivo para PDX1", o "progenitores de endodermo prepancreático positivos para PDX1" o equivalentes de los mismos. Las células de endodermo pre-pancreáticas positivas para PDX1 son multipotentes y pueden dar lugar a diversas células y/o tejidos que incluyen, pero sin limitación, estómago, intestino y páncreas. En algunas realizaciones, las células de endodermo pre-pancreáticas positivas para PDX1 expresan niveles aumentados de PDX1, HNF6, SOX9 y PROX1 en comparación con células de endodermo no pre-pancreáticas que no expresan de forma apreciable estos marcadores. Las células de endodermo pre-pancreáticas positivas para PDX1 también expresan niveles bajos a indetectables de NKX6.1, PTF1A, CPA y cMYC.

Otras realizaciones de la presente invención se refieren a cultivos celulares de "células de endodermo pancreáticas positivas para PDX1", o "células progenitoras del endodermo pancreático positivas para PDX1", o "progenitores de páncreas" o "epitelio pancreático" o "PE" o equivalentes de los mismos. Las células progenitoras del endodermo pancreático positivas para PDX1 son multipotentes y pueden dar lugar a diversas células en el páncreas, que incluyen, pero sin limitación, células acinares, ductales y endocrinas. En algunas realizaciones, las células progenitoras pancreáticas positivas para PDX1 expresan niveles aumentados de PDX1 y NKX6.1 en comparación con las células de endodermo no pre-pancreáticas que no expresan de forma apreciable estos marcadores. Las células progenitoras pancreáticas positivas para PDX1 también expresan niveles bajos a indetectables de PTF1A, CPA, cMYC, NGN3, PAX4, ARX, NKX2.2, INS, GCG, GHRL, SST y PP.

Como alternativa, otras realizaciones de la presente invención se refieren a cultivos celulares de "**células de la punta del endodermo pancreático positivas para PDX-1**" o equivalentes de las mismas. En algunas realizaciones, las células de la punta del endodermo pancreático positivas para PDX1 expresan niveles aumentados de PDX1 y NKX6.1 similares a las células progenitoras pancreáticas positivas para PDX1, pero a diferencia de las células progenitoras pancreáticas positivas para PDX1, las células de la punta del endodermo pancreático positivas para PDX-1 expresan adicionalmente niveles aumentados. de PTF1A, CPA y cMYC. Las células de la punta del endodermo pancreático positivas para PDX1 también expresan niveles bajos a indetectables de NGN3, PAX4, ARX, NKX2.2, INS, GCG, GHRL, SST y PP.

Sin embargo, otras realizaciones de la presente invención se refieren a cultivos de "**células precursoras endocrinas pancreáticas**", "**células progenitoras endocrinas pancreáticas**" o equivalentes de las mismas. Las células progenitoras endocrinas pancreáticas son multipotentes o unipotentes y dan lugar a células endocrinas

maduras que incluyen células alfa, beta, delta y polipéptido pancreático (PP). En algunas realizaciones, las células progenitoras endocrinas pancreáticas expresan niveles aumentados de NGN3, PAX4, ARX y NKX2.2 en comparación con otros tipos de células progenitoras no endocrinas. Las células progenitoras pancreáticas también expresan niveles bajos a indetectables de INS, GCG, GHRL, SST y PP.

5 Aún otras realizaciones de la presente invención se refieren a cultivos de "**células endocrinas pancreáticas**", "**células secretoras de hormonas pancreáticas**", "**célula que expresa la hormona del islote pancreático**", o equivalentes de las mismas, que se refieren a células procedentes de una célula madre pluripotente *in vitro*, *por ejemplo*, células alfa, beta, delta y/o PP o combinaciones de las mismas. Estas células endocrinas pueden ser multihormonales o unihormonales, *por ejemplo*, que expresan insulina, glucagón, grelina, somatostatina y polipéptido pancreático o combinaciones de los mismos. Estas células endocrinas pueden, por lo tanto, expresar una o más hormonas pancreáticas, y tener al menos una o algunas de las funciones de una célula de islote pancreático humano. Las células que expresan la hormona del islote pancreático pueden ser maduras o inmaduras. Las células que expresan la hormona del islote pancreático inmaduro pueden distinguirse de las células que expresan la hormona del islote pancreático maduro basándose en la expresión diferencial de determinados marcadores, o basándose en sus capacidades funcionales, *por ejemplo*, la capacidad de respuesta a la glucosa *in vitro* o *in vivo*. Las células endocrinas pancreáticas también expresan niveles bajos a indetectables de NGN3, PAX 4, ARX y NKX2.2

20 Tipos de células

En algunas realizaciones, se usa una "**célula (madre) pluripotente**" como el material de partida para la diferenciación al linaje del endodermo, o más particularmente, a las células del tipo del endodermo pancreático. Como se usa en el presente documento, "**pluripotente**", "**pluripotencia**", "**células pluripotentes**" y expresiones equivalentes se refieren a células que son capaces tanto de la proliferación como de la autorrenovación en cultivo celular, y la diferenciación hacia diversas poblaciones celulares que incluyen aquellas que muestran propiedades multipotentes. Por ejemplo, las células ES pluripotentes pueden dar lugar a cada uno de los tres linajes de células embrionarias y, en general, se consideran capaces de generar todos los tipos de células de un embrión. Las células pluripotentes, sin embargo, generalmente no pueden dar lugar a tejidos extraembrionarios, como el amnios, el corion y otros componentes de la placenta, y pueden no ser capaces de producir un organismo completo, es decir, las células pluripotentes se distinguen de las células "**totipotentes**". La pluripotencia se puede demostrar proporcionando pruebas de posibilidad de desarrollo estable, para formar derivados de las tres capas germinales embrionarias de la progenie de una sola célula y para generar un teratoma después de la inyección en un ratón inmunosuprimido. Otras indicaciones de la pluripotencia incluyen la expresión de genes que se sabe que se expresan en células pluripotentes y la morfología característica, que es fácilmente identificable por el experto en la técnica. Las células pluripotentes de la presente invención pueden obtenerse usando cualquier método conocido por los expertos en la técnica.

En determinadas realizaciones, las células madre pluripotentes de la presente invención usadas como materiales de partida para los métodos descritos en el presente documento, son células madre, que incluyen células hES, células de germen embrionario humano (EG), células madre pluripotentes inducidas por el ser humano (iPS) o incluso células partenogénicas y similares.

En determinada realización, cuando se utilizan células pluripotentes, las células pluripotentes tienen un cariotipo normal, *por ejemplo*, más del 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o más del 95 % del cultivo celular pluripotente de metafases examinadas mostrará un cariotipo normal. Como se usa en el presente documento, "**cariotipo normal**" se refiere al número de cromosomas de tipo normal o silvestre, y/o a la morfología macroscópica.

50 "**Totipotente**", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de una célula para desarrollar todos los tipos de células, no solo los tres linajes embrionarios, incluidos los tejidos extraembrionarios (*por ejemplo*, placenta) y para dar lugar a un organismo completo (*por ejemplo*, un ratón o ser humano).

La "**autorrenovación**" se refiere a la capacidad de una célula madre para dividirse y formar más células madre con propiedades idénticas a la célula madre original, lo que permite que la población de células madre se abastezca indefinidamente.

60 Como se usa en el presente documento, "**embrionario**" se refiere a un intervalo de etapas de desarrollo de un organismo que comienza con un solo cigoto y que termina con una estructura multicelular que ya no incluye células pluripotentes o totipotentes distintas de las células gaméticas desarrolladas.

Las células madre pluripotentes de la invención no se obtienen de embriones, *por ejemplo*, las células iPS se obtienen de una célula no pluripotente, *por ejemplo*, una célula multipotente o célula terminalmente diferenciada, a través de un proceso conocido como "**desdiferenciación**" o "**reprogramación**". Como se usa en el presente documento, "**desdiferenciación**" o "**reprogramación**" se refiere al proceso por el cual una célula diferenciada revierte a un estado precursor, progenitor o célula madre menos especializado.

Las células madre pluripotentes humanas también pueden definirse o caracterizarse por la presencia de varios factores de transcripción y proteínas de superficie celular que incluyen factores de transcripción Oct4, Nanog y Sox-2, que forman el complejo regulador central que asegura la supresión de genes que conducen a la diferenciación y la

5 mantenimiento de la pluripotencia; y antígenos de superficie celular, tales como los glicolípidos SSEA3, SSEA4 y los antígenos de sulfato de queratina, Tra-1-60 y Tra-1-81.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "**células madre pluripotentes inducidas**" "**células iPS**", "**iPSCs**", "**células reprogramadas**", o equivalentes de las mismas, se refieren a un tipo de célula madre pluripotente preparada artificialmente a partir de una célula no pluripotente, normalmente un célula somática adulta, o célula diferenciada, tal como un fibroblasto, una célula hematopoyética, un miocito, una neurona, una célula epidérmica o similares. Las células iPS se pueden generar a partir de células somáticas mediante la expresión de determinados genes o productos genéticos, denominados factores de reprogramación, en las células. Véase Takahashi *et al.* (2007) Cell 131: 861-872; Wernig *et al.*, (2007) Nature 448: 318-324; Park *et al.*, (2008) Nature 15 451:141-146; La pub. de Patente de los EE.UU. n.º 2009/0047263, Más recientemente, las células iPS se han generado sin la adición de ácidos nucleicos exógenos. Véase, *por ejemplo*, Zhou *et al.*, (2009) Cell Stem Cell. 4: 381-4. Las células madre pluripotentes inducidas son sustancialmente similares a las células madre naturales pluripotentes humanas, tales como células hES, en muchos aspectos, incluyendo la expresión de determinados genes y proteínas de células madre, patrones de metilación de la cromatina, tiempo de duplicación, formación de cuerpos embrioides, formación de teratomas, formación viable de quimeras, y potencia y diferenciabilidad. Las células iPS humanas proporcionan una fuente de células madre pluripotentes sin el uso asociado de embriones.

Como se usa en el presente documento, "**multipotencia**" o "**célula multipotente**" o equivalentes de las mismas se refiere a un tipo de célula que puede dar lugar a un número limitado de otros tipos de células particulares. Es decir, las células multipotentes están comprometidas con uno o más destinos de células embrionarias y, por lo tanto, a diferencia de las células pluripotentes, no pueden dar lugar a cada uno de los tres linajes de células embrionarias ni a las células extraembrionarias. Las células somáticas multipotentes son más diferenciadas en relación con las células pluripotentes, pero no están diferenciadas terminalmente. Por lo tanto, las células pluripotentes tienen una potencia más alta que las células multipotentes. Por ejemplo, los factores determinantes de la potencia que pueden reprogramar células somáticas o usarse para generar células iPS incluyen, pero sin limitación, Oct-4, Sox2, FoxD3, 20 UTF1, Stella, Rex 1, ZNF206, Sox15, Myb12, Lin28, Nanog, DPPA2, ESG1, Otx2 y/o combinaciones de los mismos.

Un aspecto de la presente invención incluye poblaciones de células pluripotentes, progenitoras o precursoras que son capaces de desarrollar de manera selectiva, y en algunos aspectos selectivamente reversible, diferentes linajes celulares cuando se cultivan en condiciones adecuadas. Como se usa en el presente documento, el término "**población**" se refiere a la recolección de más de una célula, normalmente un cultivo celular.

La expresión "**linaje celular**" se refiere a todas las etapas del desarrollo de un tipo de célula particular, desde la primera división de escisión de un embrión hasta una célula completamente madura (es decir, una célula especializada). Sin embargo, el linaje celular no se limita a células que se desarrollan directamente a partir de un embrión, sino que también puede incluir aquellas que se diferencian, por ejemplo, de células madre pluripotentes a lo largo de una línea particular, como una línea endodérmica pancreática. Las células de las etapas 1-5 descritas en el presente documento están incluidas en el linaje pancreático.

Como se usa en el presente documento, los términos "**desarrollar**" "**diferenciar**", "**maduro**" o "**producido a partir de células pluripotentes**", "**procedentes de células pluripotentes**", "**diferenciadas de células pluripotentes**" y expresiones equivalentes, se refieren a la producción de una célula diferenciada o tipo celular más especializado, por ejemplo, de células pluripotentes *in vitro* o *in vivo*, o en el caso de células endocrinas maduradas a partir de células de endodermo pancreáticas PDX1 trasplantadas *in vivo* como se describe en la publicación de Patente Internacional PCT n.º WO 2008/013664, titulada MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE HORMONAS PANCREÁTICAS. Todos se refieren a la progresión de una célula desde la etapa en la que tiene la posibilidad de diferenciarse en al menos dos linajes celulares diferentes, a través de la especialización. y con el tiempo diferenciación terminal. Dichos términos pueden usarse indistintamente para los fines de la presente solicitud. La invención contempla condiciones de cultivo que permiten que dicha diferenciación sea reversible, de modo que se puede recuperar selectivamente la pluripotencia o al menos la capacidad de diferenciarse en más de un linaje celular.

Agentes citotóxicos e inhibidores de células pluripotentes

Como se usa en el presente documento, las expresiones "**agente citotóxico**", "**agente inhibidor**", "**agente citotóxico y/o inhibidor**" y expresiones equivalentes, se refieren a un agente que mata, inhibe, suprime, evita o reduce el crecimiento, proliferación y/o expansión de una célula. En una realización, el agente citotóxico inhibe o evita el crecimiento, proliferación y/o expansión de células madre pluripotentes indiferenciadas en un cultivo celular heterogéneo mixto o en un cultivo celular sustancialmente homogéneo que consiste en un porcentaje relativamente pequeño de células pluripotentes en el cultivo. Las expresiones agente citotóxico y/o inhibidor no se limitan a un mecanismo particular por el cual el agente funciona fisiológicamente, si reprime o evita que otra molécula se involucre en una reacción, por ejemplo, o evita o disminuye la velocidad de una reacción, o disminuye, limita, o

bloquea la acción o función de otro agente o moléculas, *por ejemplo*, una enzima u órgano. Los agentes citotóxicos o inhibidores contemplados en el presente documento son aquellos que dan como resultado la destrucción, prevención, bloqueo, detención, reducción o ralentización del crecimiento, proliferación y/o expansión de células madre pluripotentes. La invención contempla que los agentes que provocan deterioro y/o muerte de las células, así como los que son "**citostáticos**" o evitan que las células se dividan, y además, aquellos agentes que reducen el crecimiento y/o la división celular sin bloquearlos completamente, son todos lo que abarca la expresión agentes citostáticos y/o inhibidores. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, la presente invención contempla que la distinción entre citotóxico, citostático e inhibidor puede ser inherente y/o irreversible, o puede ser proporcional a la dosis y puede ser reversible. Los agentes citotóxicos o inhibidores representativos incluyen potencialmente los descritos en la biblioteca LOPAC1280™, preferentemente los descritos en la **Tabla 4**, e incluso más preferentemente aquellos agentes descritos en la **Tabla 5**.

Por ejemplo, entre los candidatos para dicho agente de acuerdo con la invención está el ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico) o el éster fenilico de ácido cafeico (CAPE), un pariente estructural de los flavonoides. Se ha demostrado que estos tienen propiedades antivirales, antiinflamatorias e inmunomoduladoras y se ha demostrado que inhiben el crecimiento de diversos tipos de células transformadas. Véase Grunberger et al. (1988) *Experientia* 44: 230-32; Burke *et al.*, (1995) *J. Med. Chem.* 38: 4171-78; Su *et al.*, (1994) *Cancer Res.* 54: 1865-70; Su *et al.*, (1991) *Moi, Carcinog.* 4: 231-42; Hlandon et al. (1980) *Arzneim. Forsch.* 30: 1847-48; y Guarini *et al.*, (1992) *Cell. Mol. Biol.* 38: 513-27. Aunque la base molecular de las muchas actividades atribuidas al ácido cafeico no está bien definida, la mayoría de las actividades inhibidas por el ácido cafeico activan el factor nuclear kappa B (NF-KB). Véase Natarajan *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93: 9090-95.

Otro agente inhibidor selectivo es la ivermectina (22, 23-dihidroavermectina B1a + 22,23-dihidroavermectina B1b), que es un agente antihelmíntico de lactona procedente de las avermectinas, que se aíslan de los productos de fermentación de *Streptomyces avermitilis*. Es un antiparasitario de amplio espectro que se comercializa con las marcas Stromectol® (EE. UU.), Mectizan® (Canadá) e Ivexterm (México). Los informes han indicado que la ivermectina se une a los canales de cloruro activados por glutamato existentes en las células nerviosas o musculares con una afinidad específica y alta, causando la hiperpolarización de las células nerviosas o musculares al aumentar la permeabilidad de los iones cloruro a través de la membrana celular.

Aún otro agente inhibidor selectivo es el cloruro de queleritrina, un inhibidor selectivo de las isoformas de la proteína quinasa C (PKC) del grupo A y B. Se ha indicado que la apoptosis es el mecanismo predominante de la muerte celular inducida por queleritrina *in vitro*. Véase Chmura *et al.*, (2000) *Clin. Cancer Res.* Febrero de 2000 6:737. Los hallazgos preclínicos de Chmura et al. (2000), sugieren que la queleritrina u otros compuestos similares pueden ser efectivos contra determinados tumores humanos que son resistentes de otra manera a los regímenes terapéuticos convencionales. Chmura et al. (2000) demuestran que el tratamiento con queleritrina da como resultado una toxicidad mínima.

Como se usa en el presente documento, el término "**variante**" incluye homólogos, análogos, ortólogos y parálogos, así como especies sintéticas y de origen natural, tales como polipéptidos quiméricos y de fusión. Las variantes de agentes citotóxicos o inhibidores, particularmente análogos estructurales, están dentro del alcance de la presente invención. Además, una variante de una proteína o polipéptido de referencia es una proteína o polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es al menos aproximadamente el 80 % idéntica a la proteína o polipéptido de referencia que se abarca en el término variante. En realizaciones específicas, la variante es al menos aproximadamente 85 %, 90 %, 95 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso 100 % idéntica a la proteína o polipéptido de referencia.

Como se usa en el presente documento en el contexto de compuestos de molécula pequeña, tales como neurotransmisores de origen natural y ligandos sintéticos de receptores de neurotransmisores, el término "**análogo**" se refiere a compuestos que comparten similitud estructural y/o funcional. Los análogos incluyen "**análogos estructurales**", que poseen similitudes estructurales; y "**análogos funcionales**" que son compuestos químicamente diferentes que presentan propiedades farmacológicas similares. Por ejemplo, se contempla que los análogos estructurales y funcionales de los compuestos LOPAC1280™, o los 176 candidatos preferentes en la **Tabla 4**, o los 10 candidatos incluso más preferentes en la **Tabla 5**, o los candidatos más preferentes en la **Figura 11F**, son adecuados para su uso en los métodos de la presente invención.

Medios de cultivo

Las composiciones y métodos de la invención incluyen soluciones nutritivas de sal basal. Como se usa en el presente documento, "**solución nutritiva de sal basal**", se refiere a una solución acuosa de sales que proporciona a las células agua y determinados iones inorgánicos a granel esenciales para el metabolismo celular normal y mantienen el equilibrio osmótico intracelular y extracelular; carbohidrato como fuente de energía; y un sistema de amortiguación para mantener el medio dentro del intervalo de pH fisiológico. Ejemplos de soluciones nutritivas de sales basales incluyen, pero sin limitación, medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio mínimo esencial (MEM), medio basal de Eagle (BME), RPM1 1640, F-10 de Ham, F-12 de Ham, medio mínimo esencial a (MEM), medio mínimo esencial de Glasgow (G-MEM), medio de Dulbecco modificado de Iscove, o un medio de uso general modificado para su uso con células pluripotentes, tales como medios de base hematopoyética X-VIVO™ (Lonza) y

mezclas de los mismos. En una realización particular, la solución nutritiva de sal basal es una mezcla de aproximadamente 50:50 (vol: vol) de DMEM y F12 de Ham.

Aunque una solución nutritiva de sal basal como se describe en el presente documento se emplea para mantener el crecimiento celular y la viabilidad de células pluripotentes, en otras realizaciones de la invención, se pueden usar medios de cultivo de células madre pluripotentes alternativas para mantener la pluripotencia o para la diferenciación de las células pluripotentes, incluyendo, pero sin limitación, medios de cultivo basados en KSR (Invitrogen), KSR sin xeno (Invitrogen), StemPro® hESC SFM (Life Technologies), mTeSR™ 1 (StemCell Technologies) y HES cellGRO (Millipore), DMEM y X Vivo™ (Lonza) y similares.

Se contempla que los medios definidos de la invención pueden comprender además oligoelementos. Los oligoelementos se pueden comprar comercialmente, por ejemplo, en Mediatech. Ejemplos no limitantes de oligoelementos incluyen, pero sin limitación, sales y compuestos que comprenden, aluminio, cloro, sulfato, hierro, cadmio, cobalto, cromo, germanio, sodio, potasio, calcio, fosfato y magnesio. Un ejemplo específico de sales y compuestos que contienen oligoelementos, incluyen, pero sin limitación, $AlCl_3$, $AgNO_3$, $Ba(C_2H_3O_2)_2$, $CdCl_2$, $CdSO_4$, $CoCl_2$, $CrCl_3$, $Cr_2(SO_4)_3$, $CuSO_4$, citrato férrico, GeO_2 , KI, KBr, LiI, ácido molíbdico, $MnSO_4$, $MnCl_2$, NaF, Na_2SiO_3 , $NaVO_3$, NH_4VO_3 , $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, $NiSO_4$, $RbCl$, selenio, Na_2SeO_3 , H_2SeO_3 , selenito•2Na, selenometionona, $SnCl_2$, $ZnSO_4$, $ZrOCl_2$, y mezclas y sales adicionales de los mismos. Si se encuentra selenio, selenito o seleniometionona, está en una concentración de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 0,02 mg/l. Además, también pueden estar presente hidroxilapatita.

Se contempla que los aminoácidos se pueden añadir a medios definidos adecuados para su uso en composiciones y métodos de la presente invención. Ejemplos no limitantes de dichos aminoácidos son glicina, L-alanina, L-alanil-L-glutamina, L-glutamina/glutamax, clorhidrato de L-arginina, L-asparagina- H_2O , ácido L-aspartico, clorhidrato de L-cisteína- H_2O , L-Cistina 2HC1, ácido L-glutámico, clorhidrato de L-histidina- H_2O , L-isoleucina, L-leucina, clorhidrato de L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, sal disódica de L-tirosina dihidratada, y L-valina. En determinadas realizaciones, el aminoácido es L-isoleucina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-valina, y mezclas de los mismos.

También se contempla que los medios definidos pueden incluir ácido ascórbico. Cuando está presente, el ácido ascórbico está presente normalmente en una concentración inicial de aproximadamente 1 mg/l a aproximadamente 1000 mg/l, o de aproximadamente 2 mg/l a aproximadamente 500 mg/l, o de aproximadamente 5 mg/l a aproximadamente 100 mg/l, o de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 100 mg/l o aproximadamente a 50 mg/l.

Además, las composiciones y métodos de la invención también pueden incluir otros componentes tales como albúmina sérica, transferrina, L-glutamina, lípidos, antibióticos, 13-mercaptoetanol, vitaminas, minerales, ATP y componentes similares. Ejemplos de vitaminas que pueden estar presentes incluyen pero sin limitación, vitaminas A, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, C, D₁, D₂, D₃, D₄, D₅, E, tocotrienoles, K₁ y K₂. Un experto en la técnica puede determinar la concentración óptima de minerales, vitaminas, ATP, lípidos, ácidos grasos esenciales, etc., para usar con un cultivo celular dado. La concentración de suplementos puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 μM a aproximadamente 1 mM o más. Ejemplos específicos de concentraciones a las que se pueden proporcionar los suplementos incluyen, pero sin limitación, aproximadamente 0,005 μM , 0,01 μM , 0,05 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 1,0 μM , 2,0 μM , 2,5 μM , 3,0 μM , 4,0 μM , 5,0 μM , 10 μM , 20 μM , 100 μM , etc. En una realización específica, las composiciones y métodos comprenden vitamina B₆ y glutamina. En otra realización específica, las composiciones y métodos comprenden vitamina C y un suplemento de hierro. En otra realización específica, las composiciones y métodos comprenden vitamina K₁ y vitamina A. En otra realización específica, las composiciones y métodos comprenden vitamina D₃ y ATP. En otra realización específica, las composiciones y métodos comprenden vitamina B₁₂ y transferrina. En otra realización específica, las composiciones y métodos comprenden tocotrienoles y 13-mercaptoetanol. En otra realización específica, las composiciones y métodos comprenden glutamina y ATP. En otra realización específica, las composiciones y métodos comprenden un ácido graso omega-3 y glutamina. En otra realización específica, las composiciones y métodos comprenden ácido graso omega 6 y vitamina B₁. En otra realización específica, las composiciones y métodos comprenden ácido α -linolénico y B₂.

Determinadas composiciones de la presente invención son esencialmente animales sin suero. Como se usa en el presente documento, "**esencialmente**" se refiere a composiciones, formulaciones, métodos y similares que son fundamentalmente o en efecto iguales a la cantidad o calidad indicada, lo que permite contaminantes menores y/o cambios insignificantes. En general, esencialmente se refiere a al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 99,5 % o 100 % igual. Por lo tanto, "**esencialmente libre de suero**", se refiere a la ausencia de suero animal, *por ejemplo*, suero fetal, o fundamentalmente o en efecto la ausencia de suero animal en las soluciones de la presente invención. En determinadas realizaciones, el suero animal no es un ingrediente esencial de las composiciones y métodos de la presente invención. Por lo tanto, la presencia de suero animal no humano en composiciones esencialmente libres de suero animal solo debe ser atribuible a impurezas, *por ejemplo*, a partir de los materiales de partida o suero animal residual del cultivo celular primario. Por ejemplo, el medio o ambiente esencialmente libre de suero animal puede contener menos de 5, 4, 3, 2,

1 o 0,5 % de suero animal. En una realización específica de la presente invención, la composición esencialmente libre de suero animal no contiene suero animal o reemplazo de suero, o solo contiene trazas de suero animal o reemplazo de suero del aislamiento de componentes del suero animal o reemplazo del suero que son añadidos a los medios definidos.

5 Un medio definido libre de suero se describe adicionalmente en detalle en la solicitud de EE.UU. n.º 11/838.054, titulada, COMPOSICIONES Y MÉTODOS ÚTILES PARA CULTIVAR CÉLULAS DIFERENCIABLES, y presentada el 13 de agosto de 2007; y en la solicitud de EE.UU. n.º. 12/264.760, titulada, COMPOSICIONES DE SUSPENSIÓN AGREGADA DE CÉLULAS MADRE Y MÉTODOS DE DIFERENCIACIÓN DE LAS MISMAS, y presentada el 4 de octubre de 2008. **Insulina y moléculas relacionadas**

15 En una realización de la presente invención, las composiciones y métodos están libres de insulina exógena y sustitutos de insulina. La expresión "**insulina exógena o sustitutos de insulina**" se usa en el presente documento para indicar insulina o sustitutos de insulina que se añade/n intencionalmente a las composiciones o métodos de la presente invención. Por lo tanto, en determinadas realizaciones de la presente invención, los métodos y composiciones están libres de insulina o sustitutos de insulina que se suministran intencionalmente. Sin embargo, las composiciones o métodos pueden no estar necesariamente libres de insulina endógena. Como se usa en el presente documento, "**insulina endógena**" indica que las células cultivadas pueden producir insulina por sí mismas cuando se cultivan de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. La insulina endógena también puede usarse para indicar impurezas residuales del cultivo celular primario o impurezas de los materiales de partida. En ejemplos específicos, las composiciones y métodos del presente contienen menos de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 µg/ml de insulina.

25 Como se usa en el presente documento, el término "insulina" se refiere a una proteína, o variante o fragmento de la misma, que se une al receptor de insulina a concentraciones fisiológicas normales y puede inducir la señalización a través del receptor de insulina. El término "insulina" abarca una proteína que tiene la secuencia polipeptídica de insulina humana nativa, o de otra insulina de mamífero, o de cualquier homólogo o variantes de estas secuencias. Además, el término insulina abarca fragmentos polipeptídicos (es decir, fragmentos funcionales) que son capaces de unirse al receptor de insulina para inducir la señalización a través del receptor de insulina. La expresión "sustituto de insulina" se refiere a cualquier compuesto que contiene cinc que puede usarse en lugar de insulina para producir efectos biológicos sustancialmente similares a los de la insulina. Ejemplos de sustitutos de insulina incluyen, pero sin limitación, cloruro de cinc, nitrato de cinc, bromuro de cinc sulfato de cinc.

35 Para ser claros, los factores de crecimiento similares a la insulina no son sustitutos de la insulina u homólogos de la insulina, como se contempla en la presente invención. En consecuencia, en otra realización específica, las composiciones y métodos de la presente invención incluyen el uso de al menos un factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) o una variante o un fragmento funcional del mismo. En otras realizaciones, las composiciones y métodos de la presente invención están libres o sustancialmente libres de cualquier factor de crecimiento exógeno similar a la insulina (IGF). En realizaciones específicas, las composiciones y métodos de la presente invención contienen menos de 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 ng/ml de IGF-1.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "**activador de IGF-1R**" se refiere a mitógenos que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Los efectos de un activador de IGF-1R normalmente están mediados por IGF-1R, aunque pueden ser mediados a través de otros receptores. El IGF-1R también está implicado en la transformación celular inducida por proteínas de virus tumorales y productos de oncogenes, y la interacción entre ellos está regulada por un grupo de proteínas de unión específica (IGFBP). Además, un gran grupo de proteasas IGFBP hidrolizan IGFBP, lo que resulta en la liberación de IGF unidos que luego recuperan la capacidad de interactuar con IGF-1R. Para el fin de la presente invención, los ligandos, los receptores, las proteínas de unión y las proteasas se consideran todos activadores de IGF-1R. En una realización, el activador de IGF-1R es IGF-1 o IGF-2. En una realización adicional, el activador de IGF-1R es un análogo de IGF-1. Ejemplos no limitantes de análogos de IGF-1, incluyen LongR3-IGF1, Des(1-3)IGF-1, [Arg³]IGF-1, [Ala³¹]IGF-1, Des(2,3)[Ala³¹]IGF-1, [Leu²⁴] IGF1, Des(2,3) [Leu²⁴] IGF-1, [Leu⁶⁰]IGF-1, [Ala³¹][Leu⁶⁰]IGF-1, [Leu][Ala³¹]IGF-1, y combinaciones de los mismos. En una realización adicional, el análogo de IGF-1 es LongR3-IGF1, que es un análogo recombinante del factor-1 de crecimiento de insulina humana. Se contempla que LongR3-IGF1 está presente inicialmente a una concentración de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 1000 ng/ml, normalmente de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, frecuentemente de aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, a menudo aproximadamente 100 ng/ml a aproximadamente 300 ng/ml, o más a menudo a una concentración de aproximadamente 100 ng/ml.

60 Factores de crecimiento

65 En determinadas realizaciones, las composiciones y métodos de la presente invención incluyen el factor de crecimiento transformante beta (TGF-13) o un miembro de la familia TGF-13 o variantes o fragmentos funcionales de los mismos o agentes que son activadores de un receptor de TGF. Como se usa en el presente documento, la expresión "**miembro de la familia TGF-0**" o similar se refiere a factores de crecimiento que generalmente se caracterizan por un experto en la técnica que pertenece a la familia TGF-13, debido a la homología con miembros

conocidos de la familia TGF- β 3, o debido a la similitud en la función con miembros conocidos de la familia TGF- β 3. En realizaciones particulares de la invención, si el miembro de la familia TGF- β 3 está presente, el miembro de la familia TGF- β 3 o variante funcional o fragmento del mismo activa SMAD 2 o 3. En determinadas realizaciones, el miembro de la familia TGF- β 3 se selecciona de entre el grupo que consiste en Nodal, activina AB, activina B, TGF- β 13, proteína morfogénica ósea-2 (BMP2), GDF-8, GDF-11 y proteína morfogénica ósea-4 (BMP4) por nombrar algunos. En una realización, el miembro de la familia TGF- β 3 se selecciona de entre activina A, activina B, nodal, GDF-8 y GDF-11. El uso de la familia TGF- β 3 de factores de crecimiento para diferenciar células pluripotentes se describe en detalle en la solicitud de EE.UU. n.º 12/132.437, titulada FACTORES DE CRECIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE ENDODERMO DEFINITIVO, y presentada el 3 de junio de 2008.

En realizaciones adicionales de la presente invención, las composiciones y métodos de la presente invención están libres de activadores de receptores de FGF. Como se usa en el presente documento, la expresión "**activador de un receptor de FGF**" se refiere a factores de crecimiento que generalmente son reconocidos por un experto en la técnica como pertenecientes a la familia FGF, debido a la homología con miembros conocidos de la familia FGF, o debido a similitud en la función con miembros conocidos de la familia FGF. En determinadas realizaciones, el activador de un receptor de FGF es un FGF, tales como, pero sin limitación, a-FGF y FGF2. En realizaciones particulares, las composiciones y métodos están libres de FGF2 exógeno. La expresión "**FGF2 exógeno**" se usa en el presente documento para indicar el factor de crecimiento 2 de fibroblastos, es decir, FGF básico que se añade intencionalmente a las composiciones o métodos de la presente invención. Por lo tanto, en determinadas realizaciones de la presente invención, los métodos y composiciones están libres de FGF2 suministrado intencionalmente. Sin embargo, las composiciones o métodos pueden no estar necesariamente libres de FGF2 endógeno. Como se usa en el presente documento, "**FGF2 endógeno**" indica que las células cultivadas pueden producir FGF2 por sí mismas cuando se cultivan de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento. El "**FGF2 endógeno**" también se puede usar para indicar impurezas residuales del cultivo celular primario o impurezas de los materiales de partida. En ejemplos específicos, las composiciones y métodos de la presente contienen menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 ng/ml de FGF2.

Sin embargo, se contempla, que las composiciones y métodos de la invención puedan incluir al menos un activador de un receptor de FGF, que incluye cualquiera de los polipéptidos de FGF, fragmentos funcionales de los mismos o variantes de los mismos. Se contempla que si está presente FGF2, inicialmente está presente a una concentración de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml, normalmente de aproximadamente 0,5 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml, frecuentemente de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 25 ng/ml, a menudo aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 12 ng/ml, o más a menudo a una concentración de aproximadamente 8 ng/ml. En otra realización específica, las composiciones y métodos de la invención pueden incluir al menos un activador de un receptor de FGF, distinto de FGF2. Por ejemplo, las composiciones y métodos de la presente invención pueden comprender al menos uno de FGF-7, FGF-10 o FGF-22 o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. En realizaciones específicas, está presente una combinación de al menos dos de FGF-7, FGF-10 y FGF-22, o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. En otra realización, están presentes los tres de FGF-7, FGF-10 y FGF-22, o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. Se contempla que si están presentes cualquiera de FGF-7, FGF-10 o FGF-22 o variantes o fragmentos funcionales, cada uno está presente inicialmente a una concentración de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml, más específicamente de aproximadamente 0,5 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml, más específicamente de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 25 ng/ml, más específicamente de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 12 ng/ml, o lo más específicamente de aproximadamente a una concentración de aproximadamente 8 ng/ml.

En determinadas realizaciones adicionales, las composiciones y métodos de la presente invención incluyen albúmina sérica (SA). En realizaciones específicas, la AS es AS bovina (ASB) o preferentemente AS humana (ASH). En realizaciones aún más específicas, la concentración de la AS es más de aproximadamente 0,2 %, peso a volumen (p/vol), pero menos de aproximadamente 10 % p/vol. En realizaciones incluso más específicas, la concentración de AS es más de aproximadamente 0,3 %, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 1,2%, 1,4%, 1,6%, 1,8%, 2,0%, 2,2%, 2,4%, 2,6%, 2,8%, 3,0%, 3,2%, 3,4%, 3,6%, 3,8%, 4,0%, 4,2%, 4,4%, 4,6%, 4,8%, 5,0%, 5,2%, 5,4%, 5,6%, 5,8%, 6,0%, 6,2%, 6,4%, 6,6%, 6,8%, 7,0%, 7,2%, 7,4%, 7,6%, 7,8%, 8,0%, 8,2%, 8,4%, 8,6%, 8,8%, 9,0%, 9,2%, 9,4%, 9,6 % y 9,8 % (pt/v).

Rho quinasa

La regulación celular se puede efectuar a través de la transducción de señales extracelulares a través de la membrana que, a su vez, modulan las rutas bioquímicas dentro de la célula. Las Rho quinasas, son una clase de enzimas que, si se inhiben, pueden ser relevantes para el tratamiento de enfermedades humanas, incluidas la diabetes, el cáncer y diversos trastornos inflamatorios cardiovasculares y del SIDA.

La familia Rho quinasas de proteínas de unión a GTP pequeñas contiene al menos 10 miembros, incluidos Rho A-E y G, Rac 1 y 2, Cdc42 y TC10. El inhibidor a menudo se denomina inhibidores de ROK o ROCK, y estos nombres se usan indistintamente en el presente documento. Los dominios efectores de RhoA, RhoB y RhoC tienen la misma secuencia de aminoácidos y parecen tener objetivos intracelulares similares. La quinasa Rho funciona como un mediador primario corriente abajo de Rho y existe como dos isoformas: α (ROCK2) y β (ROCK1). La proteína de la

familia Rho quinasa típica tiene un dominio catalítico (quinasa) en su dominio N-terminal, un dominio de bucles superenrollados en su parte media, y un supuesto dominio de homología pleckstrina (PH) en su dominio C-terminal. El dominio de unión a Rho de ROCK está localizado en la parte C-terminal del dominio de bucles superenrollados y la unión de la forma de Rho unida a GTP da como resultado una potenciación de la actividad de quinasa. La ruta
 5 mediada por Rho/Rho-quinasa juega un papel importante en la transducción de señales iniciada por muchos agonistas, incluyendo angiotensina II, serotonina, trombina, endotelina-1, norepinefrina, factor de crecimiento procedente de plaquetas, ATP/ADP y nucleótidos extracelulares, y urotensina II. Mediante la modulación de sus efectores/sustratos objetivo, Rho quinasa juega un papel importante en diversas funciones celulares, incluida la
 10 contracción del músculo liso, la organización del citoesqueleto de actina, la adhesión celular y/o la motilidad y la expresión génica.

Por lo tanto, en otras realizaciones de la invención, se añaden agentes que promueven y/o soportan la supervivencia celular a diversos medios de cultivo celular, que incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, inhibidores de Rho-quinasa Y-27632, Fasudil y H-1152P e ITS. (insulina/transferrina/selenio; Gibco). Estos agentes de supervivencia
 15 celular funcionan, en parte, promoviendo la reasociación de células hES disociadas o cultivos procedentes de hES, *por ejemplo*, endodermo del tracto digestivo superior, endodermo pancreático, epitelio pancreático, poblaciones de progenitores de endodermo pancreático y similares, particularmente endodermo pancreático disociado y poblaciones de progenitores pancreáticos. Se ha logrado un aumento en la supervivencia de hES o células procedentes de hES independientemente de si las células se produjeron a partir de agregados celulares en suspensión o de cultivos de
 20 placas adherentes (con o sin matriz extracelular, con o sin suero animal, con o sin células alimentadoras de fibroblastos). El aumento de la supervivencia de estas poblaciones celulares facilita y mejora la purificación (*por ejemplo*, usando un clasificador de células) y, por lo tanto, permite una recuperación mejorada de las células. El uso de inhibidores de Rho quinasa como Y27632 también puede permitir la expansión de tipos de células procedentes de hES, promoviendo la supervivencia durante los pases en serie de células individuales disociadas o durante la
 25 recuperación de la conservación criogénica. Aunque los inhibidores de Rho quinasa tales como Y27632 se han probado en hES y cultivos celulares procedentes de hES, los inhibidores de Rho quinasa pueden aplicarse a otros tipos de células, por ejemplo, en general, células de tipo epitelial que incluyen, pero sin limitación, intestino, pulmón, timo, riñones y tipos de células neurales como epitelio de retina pigmentado.

30 Métodos de cultivo celular

Los entornos de cultivo celular y los métodos divulgados en el presente documento incluye la siembra en placas de las células en un cultivo adherente. Como se usa en el presente documento, los términos "**placa**" "**sembrado en placa**" y "**siembra en placa**" se refieren a cualquier proceso que permita que una célula se desarrolle en un cultivo
 35 adherente. Como se usa en el presente documento, la expresión "**cultivo adherente**" se refiere a un sistema de cultivo celular mediante el cual las células se cultivan en una superficie sólida, tal como un vaso de cultivo, que a su vez puede recubrirse con un sustrato insoluble que a su vez puede recubrirse con otro recubrimiento superficial de un sustrato, como los que se enumeran a continuación, o cualquier otro material químico o biológico que permita que las células se adhieran, proliferen y/o se establezcan en cultivo. Las células pueden o no adherirse firmemente a la
 40 superficie sólida o al sustrato.

Sustratos celulares, capas alimentadoras y medios condicionados

El sustrato para el cultivo adherente puede incluir uno o una combinación de poliornitina, laminina, poli-lisina, colágeno purificado, gelatina, fibronectina, tenascina, vitronectina, entactina, proteoglicanos sulfato de heparina, MATRIGEL™, ácido poliglicólico (PGA), poli ácido láctico (PLA) y ácido poli láctico-glicólico (PLGA). Además, el sustrato para el cultivo adherente puede comprender una matriz dispuesta por una capa de alimentación o dispuesta por células (*por ejemplo*, células humanas pluripotentes) o un cultivo celular de las mismas. Como se usa en el presente documento, la expresión "**matriz extracelular**" abarca sustratos sólidos tales como, pero sin limitación, los descritos anteriormente, así como la matriz dispuesta por una capa de células de alimentación o por una célula (*por ejemplo*, una célula humana pluripotente) o cultivo celular o que está hecho de células alimentadoras de fibroblastos lisadas. En una realización, las células se siembran en placas recubiertas con MATRIGEL™. En otra realización, las células se siembran en placas recubiertas de fibronectina. En otra realización, el suero humano puede colocarse en el medio durante hasta 24 horas antes de que el medio de crecimiento entre en contacto con las células, aproximadamente simultáneamente cuando los medios de crecimiento contactan las células, o en algún momento después de que los medios de crecimiento entren en contacto con las células. Véase, *por ejemplo*, la publicación de Patente de los EE.UU. n.º 2009-0104696, presentada el 19 de octubre de 2007, titulada MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA MEDIOS DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES LIBRES DE ALIMENTADOR QUE CONTIENEN SUERO HUMANO.

Las composiciones y métodos de la presente invención contemplan que las células pluripotentes y diferenciables se pueden cultivar en condiciones que están esencialmente libres de una célula alimentadora o una capa de
 60 alimentación. Como se usa en el presente documento, una "**célula alimentadora**" o "**célula alimentadora de fibroblastos**" o expresiones equivalentes de las mismas, es una célula que se desarrolla *in vitro*, que se cultiva conjuntamente con una célula objetivo o célula de interés. Como se usa en el presente documento, una "**capa de células alimentadoras**" se usa indistintamente con la expresión "**célula alimentadora**" o "**célula alimentadora de**

fibroblastos" o "**capa alimentadora de fibroblastos**" o "**alimentadores**" o expresiones equivalentes de los mismos. Como se usa en el presente documento, la expresión "**esencialmente libre de célula alimentadora**" se refiere a condiciones de cultivo tisular, en particular condiciones de cultivo de células madre pluripotentes (por ejemplo, células hES o iPS), tales como las descritas en el presente documento, que no contienen células alimentadoras, o que contienen un número mínimo de células alimentadoras, o matrices fabricadas de células alimentadoras o matrices extracelulares, naturales o sintéticas, usadas para recubrir un vaso de cultivo. "De *minimus*", en el contexto de células alimentadoras, se refiere a la cantidad mínima de células alimentadoras que pueden transferirse inadvertidamente y en algunos casos inevitablemente a las condiciones de cultivo instantáneas de las condiciones de cultivo anteriores en las que las células pueden haberse cultivado en células alimentadoras.

En determinados aspectos, las células pluripotentes de la presente invención pueden cultivarse sin necesidad de ningún tipo de célula alimentadora o capa alimentadora, ya sea creada por células o proteínas lisadas a partir de esas células, o el uso de otros tipos de recubrimientos superficiales tales como un recubrimiento de suero humano.

En una realización de la presente invención, las células se desarrollan en medio acondicionado obtenido a partir de una célula alimentadora, que estabiliza la célula en su estado actual de diferenciación. En otra realización, el medio definido usado en el presente documento es un medio no acondicionado, que es un medio que no se obtiene de una célula alimentadora.

Como se usa en el presente documento, el término "**estabilizar**" cuando se usa en referencia al estado de diferenciación de una célula o cultivo de células, indica que las células continuarán proliferando en múltiples pases en cultivo, y preferentemente de manera indefinida en cultivo, donde la mayoría, si no todas, las células en el cultivo tienen el mismo estado de diferenciación. Además, cuando las células estabilizadas se dividen, la división normalmente produce células del mismo tipo de célula o produce células del mismo estado de diferenciación. Una población de célula o célula estabilizada en general, no diferencia más ni se desdiferencia si las condiciones del cultivo celular no se alteran y las células continúan siendo pasadas sin permitir que crezcan demasiado. En una realización, la célula que se estabiliza es capaz de proliferar en estado estable indefinidamente, o durante al menos más de 2 pases. En realizaciones más específicas, las células son estables durante más de 3 pases, 4 pases, 5 pases, 6 pases, 7 pases, 8 pases, 9 pases, más de 10 pases, más de 15 pases, más de 20 pases, más de 25 pases o más de 30 pases. En determinadas realizaciones, la célula es estable durante más de aproximadamente 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses u 11 meses de pases continuos. En otra realización, la célula es estable durante más de aproximadamente 1 año de pases continuos. En una realización, las células madre pluripotentes se mantienen en cultivo en un estado pluripotente por pase habitual en un medio definido hasta que se desee que se diferencien. Como se usa en el presente documento, el término "**proliferar**" se refiere a un aumento del número de células en un cultivo celular.

En una realización, las células diferenciables se ponen en contacto con al menos una de las composiciones de la invención en ausencia de suero fetal animal o reemplazo de suero, y en ausencia de una capa o matrices de células alimentadoras, naturales o sintéticas, tales que las células se mantienen en un estado indiferenciado durante al menos un mes. La pluripotencia se puede determinar a través de la caracterización de las células con respecto a la morfología, los marcadores de superficie, los marcadores de transcripción, el cariotipo y la capacidad de diferenciarse a las células de las tres capas germinales. Estas características son bien conocidas por los expertos en la técnica.

Cultivo en suspensión

Como se usa en el presente documento, la expresión "**cuerpos embrioides**" o "EBs" o "**cuerpos agregados**" o expresiones equivalentes, se refieren a tipos celulares diferenciados en cultivos en suspensión en medios no definidos o se diferencian a través de protocolos no dirigidos hacia múltiples tejidos de la capa germinal. Los cuerpos embrioides se distinguen de los agregados de células madre pluripotentes en suspensión, por ejemplo, por criterios morfológicos. La determinación de cuándo existen cuerpos embrioides en un cultivo de células madre embrionarias se realiza habitualmente por personas expertas en la técnica. Por ejemplo, las masas flotantes de aproximadamente 20 células o más dependiendo de las condiciones de cultivo se consideran EB. Véase, por ejemplo, Schmitt *et al.*, (1991) *Genes Dev.* 5: 728-740; Doetschman *et al.*, (1985) *J. Embryol. Exp. Morph.* 87: 27-45. La expresión también se refiere a estructuras equivalentes procedentes de células germinales primordiales, que son células primitivas extraídas de regiones gonadales embrionarias; véase, por ejemplo, Shambloott, *et al.*, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 95: 13726. Las células germinales primordiales, a veces también denominadas en la técnica células EG o células germinales embrionarias, cuando se tratan con factores adecuados, forman células ES pluripotentes a partir de las cuales pueden obtenerse cuerpos embrioides; véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n.º 5.670.372; y Shambloott, *et al.*, anteriormente mencionado.

Existen diversos métodos para fabricar cuerpos embrioides, por ejemplo cuerpos embrioides por hilado como se describe por Ng *et al.*, (2008) (*Nature Protocols* 3: 468-776), y cuerpos embrioides fabricados a partir de suspensiones de células individuales colocadas en placas en islas de matriz extracelular con micro-patrones como se describe en Bauwens *et al.*, (2008), anteriormente mencionado. Sin embargo, estos métodos son prohibitivos en costos y menos eficientes para la producción a gran escala (fabricación) de células hES y células procedentes de

hES porque requieren demasiadas etapas antes de que la producción de escalamiento pueda realmente comenzar. Por ejemplo, el protocolo de Bauwens et al., requiere que las células hES se siembren en MATRIGEL™ con factor de crecimiento reducido antes de que las células puedan seleccionarse para iniciar un cultivo en suspensión. El tiempo y el costo de este método lo hacen engorroso porque se requieren placas de cultivo de tejidos con micro-
 5 patrones personalizados. Además, el método empleado por Ng *et al.*, no se puede escalar de forma rentable para la fabricación de células hES y células procedentes de hES porque requiere el uso de centrifugadoras para crear cuerpos embrioides uniformes. Por último, en todas estas metodologías, los agregados celulares no están fabricados a partir de suspensiones de células individuales de células madre pluripotentes, como lo son los cultivos en suspensión de agregados de células individuales descritos en el presente documento.

10 Los cuerpos embrioides también se pueden crear exponiendo agregados de células ES indiferenciadas a señales de diferenciación no dirigidas, tales como 20 % de suero bovino fetal. El resultado de esta metodología no dirigida es una mezcla de tipos de células que pretende imitar el desarrollo embrionario normal *in vitro*. Aunque este enfoque es útil en el nivel básico de investigación para examinar el desarrollo embrionario, no es responsable de ningún proceso de fabricación a gran escala adecuado para producir material para terapia celular, donde el rendimiento celular, la identidad de la población, la pureza de la población, la consistencia del lote, la seguridad, la función celular y el costo de los bienes son las principales preocupaciones. Además, independientemente de cualquier estrategia de enriquecimiento empleada para purificar un tipo de célula dado de un cuerpo embriode, el protocolo de diferenciación no proporciona un enfoque dirigido que generará una gran población homogénea de un solo tipo de
 15 célula. Posteriormente, las poblaciones contaminantes siempre estarán presentes y pueden predominar, lo que obstaculizará cualquier intento de purificar una población específica.

20 Todo el trabajo anteriormente indicado sobre la creación y diferenciación de agregados de células madre pluripotentes tiene uno o más de los siguientes componentes en su metodología: 1) uso de células ES de ratón en lugar de humanas; 2) protocolos de agregación forzada que dependen de la centrifugación para agregar células en lugar de los procesos normales de adhesión celular; 3) agregación de fragmentos de células en condiciones estáticas; 4) disociación no única de células o raspado de las células de las superficies para crear agregados; y 5) diferenciación no directa de los agregados celulares usando 15-20 % de suero de ternera fetal (STF), dando como resultado la formación de cuerpos embrioides y tipos de células de todas las capas germinales. Para conocimiento de los solicitantes, el único estudio indicado en el que 15-20 % de FCS no se usa para diferenciar cuerpos embrioides implica un protocolo donde los agregados celulares se formaron por agregación forzada y luego los agregados formados se diferenciaron inmediatamente usando medios adecuados para mesodermo (Ng *et al.*, Blood (2005) 106: 1601). Sin embargo, en este informe, los investigadores transfirieron los cuerpos embrioides al cultivo adherente no agregado después de 10-12 días en cultivo agregado estático, por lo que las comparaciones con la
 25 aplicación actual son irrelevantes.

30 Por el contrario, los agregados de células individuales descritos en el presente documento se producen mediante un enfoque que 1) disocia células madre humanas pluripotentes (por ejemplo, células ES humanas o células IPS humanas) a células individuales y luego crea agregados por cultivo rotacional a velocidades de cizalladura optimizadas para un mejor control de diámetro agregado y supervivencia celular; y 2) permite la diferenciación directa de los agregados de células madre pluripotentes, por ejemplo, al endodermo definitivo y, posteriormente, a otros tipos de células de linaje endodermo. Véase la publicación de las Patentes de los EE.UU. n.º 2008/0268534 (presentada el 23 de febrero de 2007, titulada "COMPOSICIONES Y MÉTODOS ÚTILES PARA CULTIVAR CÉLULAS DIFERENCIABLES"); 2008/0113433 (presentada el 13 de agosto de 2007, titulada "COMPOSICIONES Y MÉTODOS ÚTILES PARA CULTIVAR CÉLULAS DIFERENCIABLES"); 2010/0112691 (presentada el 4 de noviembre de 2008, titulada "COMPOSICIONES DE SUSPENSIÓN DE AGREGADOS DE CÉLULAS MADRE Y MÉTODOS DE DIFERENCIACIÓN DE LOS MISMOS"). Este protocolo de diferenciación genera poblaciones definitivas de linaje endodermo y pancreático con alta eficiencia y poblaciones contaminantes mínimas. Además, este enfoque para la agregación y diferenciación de células madre pluripotentes no crea cuerpos embrioides, en contraste directo con todas las otras investigaciones publicadas.
 35

40 En una realización particular, las células indiferenciadas así como las diferenciables se expanden en un cultivo en suspensión, usando los medios de cultivo celular de la presente invención. En otra realización particular, las células diferenciables pueden mantenerse y expandirse en suspensión, *es decir*, permanecen indiferenciadas o se evita que sigan diferenciándose. Los términos "**expandir**" "**expandido**" y "**expansión**" en el contexto del cultivo celular se usan tal como están en la técnica, y se refieren a la proliferación celular y aumento en el número de células, preferentemente aumento en el número de células viables. En una realización específica, las células se expanden en suspensión por cultivo durante más de aproximadamente un día, *es decir*, aproximadamente 24 horas. En una realización más específica, las células se expanden en suspensión por cultivo durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
 45 50 días o más, o al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 semanas o más.

Cultivo en suspensión de agregados

55 Se conocen en la técnica diversos métodos para fabricar agregados celulares tales como, por ejemplo, el método de "gota colgante" en el que las células en una gota invertida de medio de cultivo tisular se hunden hasta el fondo de la gota donde se agregan; agitación de suspensiones celulares en un matraz de laboratorio; y diversas modificaciones
 60

de estas técnicas. Véase, por ejemplo, Timmins, *et al.*, (2004) *Angiogenesis* 7: 97-103; Dai *et al.*, (1996) *Biotechnol. Bioengineering* 50: 349-356; Foty *et al.*, (1996) *Development* 122: 1611-20; Forgacs *et al.*, (2001) *J. Biophys.* 74: 2227-34 (1998); Furukawa *et al.*, (2001) *Cell Transplant.* 10: 441-445; Glicklis *et al.*, (2004) *Biotechnol. Bioengineering* 86: 672-80; Carpenedo *et al.*, (2007) *Stem Cells* 25: 2224-34; y Korff *et al.*, (2001) *FASEB J.* 15: 447-57. Más recientemente, los agregados celulares se han formado raspando colonias microestructuradas en suspensión, centrifugando colonias de placas de microtitulación y en suspensión o usando pipetas para desalojar y suspender colonias desarrolladas en micropocillos modelados (Ungrin *et al.*, (2008) *PLoS ONE* 3 (2), 1-12; Bauwens *et al.*, (2008) *Stem Cells*, publicado en línea el 26 de junio de 2008). Aunque dichos métodos se pueden usar para producir agregados celulares descritos en el presente documento, los agregados celulares producidos en el presente documento se optimizan para la diferenciación dirigida sincrónica como se describe en d'Amour *et al.*, 2006, *anteriormente mencionado*. Además, a diferencia de estos otros métodos, los métodos para producir los agregados celulares en suspensión descritos en el presente documento son responsables de la fabricación a gran escala.

El término "**suspensión**" como se usa en el contexto del cultivo celular, se usa tal como está en la técnica. Concretamente, las suspensiones de cultivo celular son entornos de cultivo celular en los que las células o agregados celulares no se adhieren a una superficie, tal como un vaso de cultivo. Un experto en la técnica estará familiarizado con las técnicas de cultivo en suspensión, que incluyen, pero sin limitación, el uso de equipos tales como campanas de flujo, incubadoras y/u otros equipos usados para mantener las células en constante movimiento, *por ejemplo*, plataformas rotatorias, agitadores, *etc.*, si es necesario. Como se usa en el presente documento, las células están "**en movimiento**" si se están moviendo, o si su entorno inmediato se está moviendo en relación con las células. Si las células se mantienen "en movimiento", el movimiento, en una realización, será un "**movimiento suave**" o "**agitación suave**" que está diseñado para prevenir o evitar la exposición de las células a la tensión por cizalladura.

En general, las composiciones de medio celular de la presente invención se actualizan al menos una vez al día, pero el medio puede cambiarse más a menudo o con menos frecuencia, dependiendo de las necesidades y circunstancias específicas del cultivo y el tipo de vaso de cultivo, *por ejemplo*, un sistema de biorreactor de bucle cerrado. *In vitro*, las células generalmente se desarrollan en medios de cultivo en modo discontinuo y se exponen a diversas condiciones de medios. En algunas realizaciones de la invención, las células en un cultivo pueden mantenerse como cultivos adherentes o como agregados celulares en suspensión, que se mantienen en contacto con un medio de cultivo circundante; y los medios de desecho son reemplazados periódicamente. En general, el medio de cultivo puede actualizarse cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas, o cualquier fracción de los mismos. En ejemplos adicionales, el medio puede actualizarse con menos frecuencia tal como, pero sin limitación, cada 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o cada 2 o más días, o cualquier momento intermedio.

En otra realización de la invención, se emplean procesos de fabricación a gran escala aumentada, que puede incluir el crecimiento, el cultivo y diferenciación de las células en grandes biorreactores usando métodos de perfusión para actualizar el medio para evitar la degradación de factores de crecimiento y otros agentes que tienen que ser reemplazados con frecuencia. La perfusión también se puede usar como un medio para agotar los productos de desecho de los medios de cultivo durante un período de tiempo. Por ejemplo, la Patente de los EE. n.º 5.320.963 describe un biorreactor para cultivo de perfusión de células en suspensión. La Patente de los EE.UU n.º 5.605.822 describe un sistema de biorreactor, que emplea células estromales para proporcionar factores de crecimiento, para el crecimiento de células en cultivo mediante perfusión. La Patente de los EE.UU. n.º 5.646.043 describe el crecimiento de células mediante perfusión continua y periódica que incluye composiciones de medios para el crecimiento de células. La Patente de los EE.UU n.º 5.155.035 describe un biorreactor para el cultivo en suspensión de células mediante rotación de medios fluidos.

En general, las células que se cultivan en las composiciones de medios de la presente invención se "**dividen**" o "**pasan**" cada semana más o menos, pero las células se pueden dividir más a menudo o con menos frecuencia, dependiendo de las necesidades y circunstancias específicas del cultivo en suspensión. Por ejemplo, las células se pueden dividir cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días, o cualquier momento intermedio. Como se usa en el presente documento, el término "**dividir**" o "**pasar**" en el contexto del cultivo celular se usa tal como está en la técnica. Concretamente, la división del cultivo celular, o pase, es la colección de células de un cultivo anterior y la posterior transferencia ("**siembra**") de un número menor de células recolectadas (cosechadas) en un nuevo vaso de cultivo celular del mismo tamaño. El experto en la técnica reconocerá que "**dividir**" o "**pasar**" también abarca transferir la totalidad o una parte de las células cosechadas a un vaso más grande, o dividir las en varios vasos de cultivo. En general, el pase de células permite que las células continúen creciendo en un entorno de cultivo celular saludable. Un experto en la técnica estará familiarizado con el proceso y los métodos de pases de cultivo celular, que pueden implicar, aunque no necesariamente, el uso de métodos enzimáticos o no enzimáticos que pueden usarse para desagregar las células que se han agrupado durante su expansión del crecimiento.

Las realizaciones descritas en el presente documento proporcionan métodos para la fabricación a gran escala de células madre pluripotentes proliferantes y/o en diferenciación (por ejemplo, células hES e iPS) manteniendo un entorno de baja cizalladura, que mantiene de este modo la densidad de células operativas en el sistema y minimiza tensiones de cizalladura fluidas. En particular, la presente invención abarca métodos para mantener un entorno de

baja cizalladura en un sistema de escalamiento de fabricación de células eucarióticas cultivando una suspensión celular en una placa de 60 mm, placa de 6 pocillos, un frasco giratorio, un biorreactor (*por ejemplo*, matraces grandes y de agitación), un vaso, sistemas de bucle cerrado y similares. Como alternativa, los sistemas de perfusión continua para cultivar células requieren agitación o movimiento en el biorreactor o vaso para proporcionar la suspensión de las células, la oxigenación y un suministro de nutrientes frescos, *por ejemplo*, para crecimiento y/o diferenciación. Para mantener las células en suspensión, los vasos del biorreactor normalmente usan uno o más dispositivos móviles de agitación mecánica que también son una fuente potencial de tensión por cizalladura.

Establecer y mantener una velocidad de cizalladura de agitación constante y optimizada es importante para mantener el crecimiento y la viabilidad celular. Por ejemplo, la velocidad de cizalladura aumentada es perjudicial en los siguientes aspectos: (1) la cizalladura excesiva aumenta el consumo de energía, (2) la cizalladura excesiva interfiere con la difusión en la superficie de la membrana, (3) la cizalladura excesiva puede privar a determinados compuestos de sus bioactividades y (4) la cizalladura excesiva puede deformar las membranas celulares más allá del umbral de ruptura de tensión que conduce a la lisis celular. Por lo tanto, es deseable mantener la cizalladura dentro de un intervalo óptimo de 5 a 500 segundos⁻¹, dependiendo del diámetro del agregado celular y la sensibilidad de la línea celular particular a la disociación y cizalladura de células individuales. Ejemplos de velocidades de cizalladura producidas por configuraciones útiles en los métodos de la invención se muestran en el Ejemplo 17 de la solicitud de Patente de los EE.UU. n.º 12/264.760 para diámetros de agregado entre 100-200 µm y velocidades de rotación entre 60-140 rpm para una placa de 6 pocillos. Estos valores estiman el tiempo de tensión de cizalladura promedio que se produce en el fluido a granel durante la rotación. Sin embargo, se espera que la tensión de cizalladura en la pared del vaso sea más alta debido a los efectos límite.

Aun así, existen otros ejemplos de medios o dispositivos para generar una suspensión de células suavemente agitada y son bien conocidos por un experto en la técnica que incluyen impulsores, tales como hélices, u otros medios mecánicos, vejigas, medios basados en fluidos o fluidos de gas, soportes ultrasónicos generadores de ondas, plataformas oscilantes o giratorias o combinaciones de las mismas que producen una suspensión celular. En los métodos de la invención, una plataforma giratoria es un medio ejemplar para suspender las células en el medio cuando las células están en placas de 6 pocillos, generando una velocidad de cizalladura de menos de 400 s⁻¹. Independientemente del tipo de rotor o mecanismo para generar suspensiones de fluido mixto agitadas, la velocidad de cizalladura promediada en el tiempo y la tensión de cizalladura en el fluido a granel proporcionan un factor de normalización por el cual todos los dispositivos de mezcla de fluidos pueden relacionarse. Si bien los regímenes de flujo entre los dispositivos pueden variar en su perfil y grado de flujo laminar o turbulento, los cálculos de cizalladura proporcionan una base para igualar el flujo en dispositivos que producen mezcla mediante diferentes mecanismos. Por ejemplo, para un matraz de agitación de 125 ml con un diámetro de impulsión de 4 cm, un ancho de vaso de 6,4 cm, un ángulo de impulsión de 90 grados y un ancho de impulsión de 0,1 cm, una velocidad de rotación de impulsión de 135 rpm generará la misma velocidad de cizalladura promedio en el tiempo y tensión de cizalladura en el fluido a granel que una placa de 6 pocillos con medio de 5 ml que gira a 100 rpm para agregados de 100 µm de diámetro.

Se contempla que las células diferenciables puedan pasarse usando métodos de disociación enzimáticos, no enzimáticos o manuales, antes y/o después del contacto con el medio definido de la invención. Las técnicas de pases manuales se han descrito bien en la técnica, tal como en Schulz *et al.*, (2004) Stem Cells, 22: 1218-38. Aunque los pases mecánicos no implican ninguna sustancia adicional, no es eficiente para la fabricación a gran escala de células madre pluripotentes o de muchas células procedentes de las mismas. Por ejemplo, en biorreactores o matraces grandes, se contempla el uso de enzimas, usando, por ejemplo, GMP-colagenasa. Ejemplos no limitantes de métodos de disociación enzimática incluyen el uso de proteasas tales como tripsina, colagenasa, dispasa y ACCUTASE™ (Life Technologies, Carlsbad, CA). En una realización, ACCUTASE™ se usa para pasar las células contactadas. Cuando se usan métodos de pases enzimáticos, el cultivo resultante puede comprender una mezcla de singletes, dobletes, tripletes y grupos de células que varían en tamaño dependiendo de la enzima usada. Un ejemplo no limitante de un método de disociación no enzimático es un tampón de dispersión celular. La elección del método de pase está influenciada por la elección de la matriz extracelular, si hay una presente, y la determina fácilmente un experto en la técnica.

La solución de desagregación usada en los métodos de la presente invención puede ser cualquier solución de desagregación capaz de romper o desagregar las células en células individuales, sin causar toxicidad extensa a las células. Ejemplos de soluciones de desagregación incluyen, pero sin limitación, tripsina, ACCUTASE™, 0,25 % de tsin/EDTA, TrypLE o VERSENE™ (EDTA) y tripsina. Los métodos de la presente invención no necesitan dar como resultado que cada célula de una capa o suspensión confluyente se desagreguen en células individuales, siempre que al menos unas pocas células individuales (o más preferentemente la mayoría de las células) se desagreguen y sean capaces de volver a cultivarse.

Ya sea al comienzo del cultivo o después de los pases, las células diferenciables se pueden sembrar a cualquier densidad, incluida una sola célula en una cámara de cultivo. La densidad celular de las células sembradas se puede ajustar dependiendo de diversos factores, que incluyen pero no se limitan al uso de cultivos adherentes o en suspensión, la receta específica de los medios de cultivo celular usados, las condiciones de crecimiento y el uso contemplado de las células cultivadas. Ejemplos de densidades de cultivos celulares que pueden ser adecuados para su uso en los métodos de la invención incluyen, pero sin limitación, 0,01 x 10⁵ células/ml, 0,05 x 10⁵ células/ml,

0,1 x 10⁵ células/ml, 0,5 x 10⁵ células/ml, 1,0 x 10⁵ células/ml, 1,2 x 10⁵ células/ml, 1,4 x 10⁵ células/ml, 1,6 x 10⁵ células/ml, 1,8 x 10⁵ células/ml, 2,0 x 10⁵ células/ml, 3,0 x 10⁵ células/ml, 4,0 x 10⁵ células/ml, 5,0 x 10⁵ células/ml, 6,0 x 10⁵ células/ml, 7,0 x 10⁵ células/ml, 8,0 x 10⁵ células/ml, 9,0 x 10⁵ células/ml, o 10,0 x 10⁵ células/ml, o más, han sido cultivadas en suspensión con buena supervivencia celular, o cualquier valor intermedio.

5 Además de lo anterior, como se usa en el presente documento, la expresión "**densidad de célula operativa**" o "**densidad de célula operacional**" o expresiones equivalentes se refiere a la densidad celular a la que se operará un protocolo de cultivo celular o sistema o proceso de fabricación para obtener la producción de una proliferación o diferenciación de cultivo de células hES. Dichas densidades celulares son aquellas en las que los nutrientes tales como vitaminas, minerales, aminoácidos o metabolitos, así como las condiciones ambientales tales como la tensión de oxígeno, que se suministran al sistema son suficientes para mantener la viabilidad celular. Como alternativa, dichas densidades celulares son aquellas en las que los productos de desecho pueden eliminarse del sistema a una velocidad suficiente para mantener la viabilidad celular. Dichas densidades celulares pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la técnica.

15 Además, las células madre pluripotentes también se pueden desarrollar en dispositivos de cultivo de 96 pocillos que proporcionan mediciones de impedancia en tiempo real, que pueden usarse para medir la proliferación y la viabilidad celular usando los métodos RT-CEST™ de ACEA Biosciences, Inc. (web mundial en aceabio.com) u otras herramientas similares de investigación de ensayos celulares. Dicho enfoque permite una identificación y cuantificación sin etiqueta de los efectos sutiles o inmediatos sobre las células diferenciables, así como las mediciones de proliferación, apoptosis y cambios en la morfología, en tiempo real.

Diferenciación de células madre pluripotentes a lo largo de las líneas de linaje endodermo y linaje endodermo pancreático: Resumen de la producción de células de etapas 1 a 4

25 Los métodos para la producción de determinadas células del linaje del endodermo y del endodermo pancreático se proporcionan en el presente documento, y se analizan en otra parte en aplicaciones relacionadas tales como la solicitud de Patente de los EE.UU. n.º 11/773.944, titulada MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE HORMONAS PANCREÁTICAS, presentada el 5 de julio de 2007, que es una continuación en parte de la solicitud de Patente de los EE.UU. n.º 11/681.687, titulada CÉLULAS PRECURSORAS ENDOCRINAS, CÉLULAS QUE EXPRESAN LA HORMONA PANCREÁTICA Y MÉTODOS DE PRODUCCIÓN, presentada el 2 de marzo de 2007;

30 En pocas palabras, los métodos de diferenciación dirigida descritos en el presente documento para células madre pluripotentes, por ejemplo, células hES e iPS, se pueden dividir en al menos cuatro o cinco etapas. **La etapa 1** es la producción de endodermo definitivo a partir de células madre pluripotentes y toma de 2 a 5 días, normalmente 2 o 3 días. Las células madre pluripotentes se suspenden primero en medios que comprenden RPMI (sin suero animal o con niveles muy bajos de suero animal, *por ejemplo*, 0,2 %); un factor de crecimiento de un miembro de la superfamilia TGFE3, tal como activina A, activina B, GDF-8 o GDF-11 (al menos 100 ng/ml); un miembro de la familia Wnt o un activador de la ruta Wnt, tal como Wnt3a (al menos 25 ng/ml); y opcionalmente, una rho-quinasa o inhibidor de ROCK, tal como Y-27632 (aproximadamente 10 µM) para potenciar el crecimiento, la supervivencia y la proliferación, así como promover la adhesión célula-célula durante aproximadamente 24 horas. Como alternativa, también se pueden usar pequeñas cantidades de ITS (Invitrogen, Carlsbad, CA) a aproximadamente 1:5000, mientras se mantiene bajo el contenido de insulina y suero en los medios de cultivo celular. Véase *también*, la solicitud de Patente de los EE. UU. n.º 12/132.437, titulada FACTORES DE CRECIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE ENDODERMO DEFINITIVO, presentada el 3 de junio de 2008. Después de aproximadamente 24 horas, el medio se intercambia por medio que comprende RPMI con una pequeña cantidad de suero animal, tal como suero fetal bovino al 0,2 % (FBS); un factor de crecimiento de un miembro de la superfamilia TGFE3, tal como activina A, activina B, GDF-8 o GDF-11 (aproximadamente 100 ng/ml); opcionalmente, una rho-quinasa o inhibidor de ROCK, durante otras 24 (día 2) a 48 horas (día 3); y opcionalmente 1:5000 de ITS. Es importante destacar que, la producción de endodermo definitivo requiere condiciones de cultivo celular sin suero animal o con concentraciones muy pequeñas de suero animal, y sin insulina o factor de crecimiento similar a la insulina o concentraciones muy bajas de insulina o factor de crecimiento similar a la insulina, *por ejemplo*, menos de 0,2 µg/ml de insulina o factor de crecimiento similar a la insulina. Véase McLean *et al.*, (2007) Stem Cells 25: 29-38. McLean *et al.*, también mostró que el contacto de células hES con insulina a concentraciones tan bajas como 0,2 µg/ml en la etapa 1 puede ser perjudicial para la producción de endodermo definitivo. Aun otros expertos en la técnica han modificado la diferenciación de la etapa 1 de células madre pluripotentes a endodermo definitivo sustancialmente como se describe en el presente documento y en D'Amour *et al.* (2005). Véase, *por ejemplo*, Agarwal *et al.*, (2008) 26: 1117-1127; Amen *et al.*, (2010) Stem Cells 28: 45-56; Bingham *et al.*, (2009) Stem Cells & Development 18 (7): 1-10; Borowiak *et al.*, (2009) Cell Stem Cell 4: 348-358; Brolen *et al.*, (2010) J. Biotechnology 145 (2010) 284-294; Brunner *et al.*, (2009) Genome Res. 19: 1044-56; Chen *et al.*, (2008) Nature Chemical Biology 5 (4): 258-265; Duan *et al.*, (2010) Stem Cells, 28(4): 674-86. Hinton *et al.*, (2009) Stem Cells & Development, 19 (6): 797-807; Gibson *et al.*, (2009) Integr. Biol. 1, 540-551; Johannesson *et al.*, (2009) Plos ONE 4 (3): e4794; King, C., "Culture and Preparation of Human Embryonic Stem Cells for Proteomics-Based Applications", capítulo 19 de Human Embryonic Stem Cell Protocols, Methods in Molecular Biology, Turksen (ed.) Humana Press; King *et al.*, (2008) Regenerative Medicine, 3 (2): 175-180; Maehr *et al.*, (2009) Proc Nat'l Aca Sci 106 (37): 15768-15773; Synnergren *et al.*, (2009) Stems Cells & Development 19 (7): 961-78; y Zhou *et al.*, (2008) Stem Cells & Development 17: 737-750. La diferenciación,

especificación, caracterización e identificación adecuadas del endodermo definitivo son necesarias con el fin de obtener otras células del linaje de endodermo. Las células de endodermo definitivas en esta etapa expresan conjuntamente SOX17 y HNF313 (FOXA2) y no expresan de forma apreciable al menos HNF4alfa, HNF6, PDX1, SOX6, PROX1, PTF1A, CPA, cMYC, NKX6.1, NGN3, PAX3, ARX, NKX2.2, INS, GHRL, SST o PP.

5 En realizaciones preferentes, las células de endodermo definitivas se enriquecen, se aíslan y/o se purifican usando uno o más de los métodos descritos en la solicitud de Patente de los EE.UU. n.º 11/021.618, titulada ENDODERMO DEFINITIVO, presentada el 23 de diciembre de 2004, (ahora la Patente de los EE.UU. n.º 7.510.876); solicitud de Pat. provisional de los EE. UU. n.º 60/736.598, titulada MARCADORES DEL ENDODERMO DEFINITIVO, presentada el 14 de noviembre de 2005; La solicitud de Patente de los EE. UU. n.º 11/317.387 titulada EXPANSIÓN DE CÉLULAS DE ENDODERMO DEFINITIVAS, presentada el 22 de diciembre de 2005 (ahora la Patente de los EE.UU n.º 7.625.753); la solicitud de Patente de los EE. UU. n.º 12/093.590, titulada MARCADORES DEL ENDODERMO DEFINITIVO, presentada el 21 de julio de 2008; y la solicitud de Patente de los EE. UU. n.º 12/582.600, titulada EXPANSIÓN DE CÉLULAS DE ENDODERMO DEFINITIVAS, PRESENTADA el 20 de octubre de 2009.

La **etapa 2** toma el cultivo de células de endodermo definitivas especificado y caracterizado adecuadamente de la etapa 1 y produce endodermo del tracto digestivo superior o endodermo del tracto digestivo superior específicamente negativo para PDX1 incubando sus cultivos en suspensión con RPMI con opcionalmente una mayor cantidad de suero animal no humano, (*por ejemplo*, FBS al 0,2 a 2 %); dilución 1:1000 de ITS; 25 ng/ml de KGF (o FGF7); opcionalmente, un inhibidor ROCK o Rho quinasa para potenciar el crecimiento, la supervivencia, la proliferación y promover la adhesión célula-célula, durante 24 horas (día 3 o día 4); y opcionalmente, un inhibidor de la quinasa del receptor de TGF13 tal como SB-431542 o inhibidor IV. Después de aproximadamente 24 horas, el medio se intercambia por medio con la misma formulación pero opcionalmente sin un inhibidor de la quinasa del receptor de TGFE3 y/o un inhibidor de ROCK, durante al menos otras 24 a 48 horas. Una etapa crítica para la especificación adecuada del endodermo del tracto digestivo superior es la eliminación de los factores de crecimiento de la familia TGFE3. Por lo tanto, se puede añadir opcionalmente un inhibidor de la quinasa del receptor de TGFE3 a cultivos de células de la etapa 2 durante aproximadamente 24 horas después de la inducción de endodermo definitiva o después de la etapa 1, tal como el inhibidor de TGFE3 n.º IV, o SB431542, un inhibidor específico de la quinasa de tipo receptor de activina (ALK), que es un receptor de tipo I de TGFE3. Las células de endodermo del tracto digestivo superior o de endodermo del tracto digestivo superior negativas para PDX1 producidas durante la etapa 2 expresan conjuntamente SOX17, HNF113 y HNF4alfa y no expresan conjuntamente de manera apreciable al menos PDX1, ni HNF6, PDX1, SOX6, PROX1, PTF1A, CPA, cMYC, NKX6.1, NGN3, PAX3, ARX, NKX2.2, INS, GSC, GHRL, SST o PP, que son característicos del endodermo definitivo, el endodermo del tracto digestivo superior positivo para PDX1, las células progenitoras del endodermo del tracto digestivo superior pancreático positivas para PDX1 o los precursores endocrinos así como células de tipo uni o multihormonal.

Aún en otra realización, el factor de crecimiento de la familia de FGF proporcionado al cultivo de células de endodermo definitivo o población celular es FGF10 y/o FGF7. Sin embargo, se apreciará que pueden proporcionarse otros factores de crecimiento de la familia FGF o análogos o miméticos del factor de crecimiento de la familia FGF en lugar de o además de FGF10 y/o FGF7. Por ejemplo, se puede proporcionar un factor de crecimiento de la familia de FGF seleccionado de entre el grupo que consiste en FGF1, FGF2, FGF3, etc., hasta e incluyendo FGF23.

En otras realizaciones, el inhibidor de hedgehog es KAAD-ciclopamina. Sin embargo, se apreciará que pueden usarse otros inhibidores de hedgehog. Dichos inhibidores incluyen, pero sin limitación, análogos de KAAD-ciclopamina, jervina, análogos de jervina, anticuerpos bloqueadores de la ruta de hedgehog y cualquier otro inhibidor de la función de la ruta de hedgehog conocido por los expertos en la técnica. Cuando se usa solo o junto con el factor de crecimiento de la familia FGF, el inhibidor de hedgehog se puede proporcionar a una concentración de al menos aproximadamente 0,01 µM a aproximadamente 50 µM.

La **etapa 3** toma el cultivo de células de endodermo del tracto digestivo superior negativo para PDX1 adecuadamente especificado a partir de la etapa 2 y produce células de endodermo del tracto digestivo superior positivas para PDX1 cultivando en DMEM o RPMI con B27 al 1 % vol/vol; 25 µM de KAAD ciclopamina; un retinoide, tal como aproximadamente 0,2 µM de ácido retinoico (AR), o un análogo de ácido retinoico tal como aproximadamente 3 nM de ácido arotinoide, ácido 4-[(E)-2-(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naphtalenil)-1-propenil]benzoico o TTNPB; y aproximadamente 50 ng/ml de Noggin, durante aproximadamente 24 a 72 horas. De nuevo, se puede usar un inhibidor de ROCK tal como Y-27632 para potenciar el crecimiento, la supervivencia, la proliferación y promover la adhesión célula-célula. Las células del tracto digestivo superior positivas para PDX1 producidas durante la etapa 3 expresan conjuntamente PDX1 y HNF6, así como SOX9 y PROX1, y no expresan conjuntamente de forma apreciable marcadores característicos de endodermo definitivo o de las células de endodermo del tracto digestivo superior negativas para PDX1 como se describió anteriormente en las etapas 1 y 2. Las etapas 2 y 3 se describen con más detalle en la solicitud de Patente de los EE.UU. n.º 11/588.693, titulada ENDODERMO DEL TRACTO DIGESTIVO SUPERIOR DORSAL Y VENTRAL QUE EXPRESA PDX-1, presentada el 27 de octubre de 2006.

La **etapa 4** toma células que se han especificado adecuadamente de la etapa 3 e intercambia el medio de cultivo por medio que contiene DMEM con suplemento B27 de aproximadamente 1 % vol/vol, aproximadamente 50 ng/ml de

5 KGF y 50 ng/ml EGF y aproximadamente 50 ng/ml de noggin durante aproximadamente 24 a 96 horas (aproximadamente 1-4 días) o más. De nuevo, se puede usar un inhibidor de ROCK tal como Y-27632 para potenciar el crecimiento, la supervivencia, la proliferación y promover la adhesión célula-célula. Las células progenitoras del endodermo pancreático positivo para PDX1 producidas durante la etapa 4 expresan conjuntamente al menos PDX1 y Nkx6.1 así como PTF1A, y no expresan de manera apreciable otros marcadores o todos los marcadores característicos del endodermo definitivo o de las células de endodermo del tracto digestivo superior negativas para PDX1 y positivas para PDX1 como se describió anteriormente en las etapas 1, 2 y 3, o células precursoras endocrinas o endocrinas.

10 En otra realización de la invención, las etapas 1-4 producen cultivos celulares diferenciados que consisten en una población mixta de células, *por ejemplo*, la diferenciación de la etapa 4 produce progenitores de endodermo pancreáticos positivos para PDX1 que tienen la posibilidad de desarrollarse y madurar *in vivo* en células que secretan insulina en funcionamiento, fisiológicamente similares en función a los de las células beta humanas naturales, pero también puede producir otras poblaciones celulares. Por ejemplo, los cultivos de células de la etapa 15 4 también producen poblaciones significativas de precursor endocrino, o células positivas para CHGA. Estas poblaciones de células diferentes después de la diferenciación de la etapa 4 se describen con más detalle en la solicitud de los EE.UU.n.º 12/132.437, titulada MÉTODOS PARA PURIFICAR EL ENDODERMO Y CÉLULAS DE ENDODERMO PANCREÁTICAS PROCEDENTES DE CÉLULAS HES, presentada el 3 de junio de 2008.

20 Con respecto a algunos de los procesos para la diferenciación de células pluripotentes a células de endodermo definitivas, los factores de crecimiento mencionados anteriormente se proporcionan a las células para que los factores de crecimiento estén presentes en los cultivos a concentraciones suficientes para promover la diferenciación de al menos una parte de las células pluripotentes a células de endodermo definitivas. En algunos procesos, los factores de crecimiento mencionados anteriormente están presentes en el cultivo celular a una concentración de al 25 menos 5 ng/ml, al menos 10 ng/ml, al menos 25 ng/ml, al menos 50 ng/ml, al menos 75 ng/ml, al menos 100 ng/ml, al menos 200 ng/ml, al menos 300 ng/ml, al menos 400 ng/ml, al menos 500 ng/ml, al menos 1000 ng/ml, al menos 2000 ng/ml, al menos 3000 ng/ml, al menos 4000 ng/ml, al menos 5000 ng/ml o más de 5000 ng/ml; o en el caso con ácido retinoico (AR), al menos 0,05 µM, al menos 1 µM, al menos 1,5 µM, o al menos 2 µM de AR se proporcionan a cultivos de etapa 2 (o cultivos de células de endodermo del tracto digestivo superior negativas para PDX-1) o 30 concentraciones equivalentes efectivas si se usan análogos de AR tales como TTNPB. En determinados procesos para la diferenciación de células pluripotentes a células de linaje endodermo definitivas diferenciadas y células de linaje endodermo, los factores de crecimiento mencionados anteriormente se eliminan del cultivo celular después de su adición. Por ejemplo, los factores de crecimiento pueden eliminarse en aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco 35 días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días o aproximadamente diez días o más después de su adición. En un proceso típico, los factores de crecimiento se eliminan aproximadamente uno, dos o tres días después de su adición.

40 En otras realizaciones, el inhibidor de la gamma secretasa (los investigadores describen esto anteriormente en alguna parte) se proporciona al comienzo del proceso de diferenciación, por ejemplo, en la etapa pluripotente, y permanece en el cultivo celular a lo largo de la diferenciación a las células que expresan la hormona del islote pancreático. En aún otras realizaciones, el inhibidor de la gamma secretasa se añade después del inicio de la diferenciación, pero antes de la diferenciación a la etapa de endodermo del tracto digestivo superior positivo para PDX1. En realizaciones preferentes, el inhibidor de la gamma secretasa se proporciona al cultivo celular o población 45 de células aproximadamente al mismo tiempo que proporciona los factores de diferenciación que promueven la conversión de endodermo definitivo a endodermo positivo para PDX1. En otras realizaciones preferentes, el inhibidor de la gamma secretasa se proporciona al cultivo celular o población de células después de que una parte sustancial de las células en el cultivo celular o población de células se haya diferenciado a células de endodermo del tracto digestivo superior positivas para PDX-1.

50 **Encapsulación de progenitores de endodermo pancreáticos positivos para PDX1**

Los cultivos que contienen células progenitoras del endodermo pancreático positivo para PDX1 producidas a partir de la etapa 4 se cargan y se contienen completamente en un dispositivo de macroencapsulación y se transplantan 55 en un paciente, y las células progenitoras del endodermo pancreático positivo a PDX1 maduran en células que secretan hormonas pancreáticas fisiológicamente activas *in vivo*, *por ejemplo*, células secretoras de insulina. La encapsulación de las células progenitoras del endodermo pancreático positivas para PDX1 y la producción de insulina *in vivo* se describen en detalle en la solicitud de patente de los EE.UU. N.º 12/618.659, titulada ENCAPSULACIÓN DE CÉLULAS DE LÍNEAS PANCREÁTICAS DERIVADAS DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES HUMANAS, presentada el 13 de noviembre de 2009, que reivindica el beneficio de prioridad para la solicitud de Pat. provisional n.º 61/114.857, titulada ENCAPSULACIÓN DE PROGENITORES PANCREÁTICOS DERIVADOS DE CÉLULAS HES, presentada el 14 de noviembre de 2008; y la solicitud de Pat. provisional de los EE. UU. n.º 61/121.084, titulada ENCAPSULACIÓN DE CÉLULAS DE ENDODERMO PANCREÁTICAS, presentada el 9 de diciembre de 2008.

65 Los métodos, composiciones y dispositivos descritos en el presente documento son actualmente representativos de

las realizaciones preferentes y son ilustrativos y no pretenden ser limitaciones del alcance de la invención.

Por ejemplo, activina AB, un miembro de la superfamilia TGFE3 de factores de crecimiento o proteínas de señalización, se usa para producir endodermo definitivo a partir de células madre pluripotentes, *por ejemplo*, células hES y células iPS, sin embargo, se pueden usar otros miembros de la superfamilia TGFE3, *por ejemplo*, GDF-8 y GDF-11, para producir endodermo definitivo como se describe en la public. de Patente internacional PCT n.º WO 2009/154606, titulada FACTORES DE CRECIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE ENDODERMO DEFINITIVO, presentada el 3 de junio de 2008.

El ácido retinoico (AR) se usa para diferenciar las células de endodermo del tracto digestivo superior negativas para PDX1 en la etapa 2 a las células del tracto digestivo superior positivas para PDX1 en la etapa 3. Sin embargo, se pueden usar otros retinoides o análogos del ácido retinoico como ácido 4-[(E)-2-(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalenil)-1-propenil] benzoico (TTNPB) y análogos similares (*por ejemplo*, 4-HBTTNPB).

Noggin, *por ejemplo*, es una proteína que inactiva los miembros de la superfamilia TGFE3 de las proteínas de señalización, como la proteína morfogenética ósea-4 (BMP4). Sin embargo, otros inhibidores de BMP4 tales como cordina y gastrulación torcida (Tsg) o anticuerpos neutralizantes anti-BMP pueden evitar la unión de BMP a sus receptores de superficie celular, inhibiendo así de manera efectiva la señalización de BMP. Aún pequeñas moléculas como la dorsomorfina (6-[4-(2-piperidin-1-il-etoxi)fenil]-3-piridin-4-il-pirazolo[1,5-a]pirimidina), también conocida como compuesto C, y sus derivados también se pueden usar para inactivar o inhibir BMP, *por ejemplo*. Como alternativa, las sustituciones para Noggin pueden provenir del gen para Noggin humano, que ha sido clonado y secuenciado. Véase la Patente de los EE.UU. n.º 6.075.007. El análisis de la secuencia de Noggin muestra una región carboxi terminal que tiene homología con un inhibidor de proteasa de tipo Kunitz, lo que indica que otros inhibidores de proteasa de tipo Kunitz pueden tener potencialmente un efecto similar de inhibición de BMP. Los dispositivos de macroencapsulación descritos en el presente documento y en la solicitud de Patente de los EE.UU. n.º 12/618.659, son de nuevo solo a modo de ejemplo y no pretenden ser limitaciones del alcance de la invención. En particular, los cambios en el diseño del dispositivo tales como el tamaño del dispositivo, la pluralidad de cámaras o subcompartimentos en el dispositivo, la pluralidad de puertos, o incluso los mecanismos para cargar y extraer el dispositivo, están todos abarcados. Por lo tanto, será evidente para un experto en la técnica que se pueden realizar diversas sustituciones y modificaciones a la invención divulgada en el presente documento, no solo para los métodos de diferenciación descritos en el presente documento, sino también para el dispositivo de encapsulación.

Control de la producción de células multipotentes o diferenciadas

Se puede utilizar un medio o entorno diferenciador de células para diferenciar de forma parcial, terminal o de manera reversible las células diferenciables de la presente invención. De acuerdo con la invención, el medio o entorno diferenciador celular puede contener diversos componentes que incluyen, *por ejemplo*, medio KODMEM (Medio de Eagle modificado de Knockout Dulbecco), DMEM, medio F12 de Ham, SFB (suero fetal bovino), FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2), KSR o hLIF (factor inhibidor de la leucemia humana). El medio o entorno diferenciador de células también puede contener suplementos tales como L-glutamina, NEAA (aminoácidos no esenciales), P/S (penicilina/estreptomina), N2, B27 y 13-mercaptoetanol (3-ME). Se contempla que se pueden añadir factores adicionales al medio o entorno diferenciador de células, que incluyen, pero sin limitación, fibronectina, laminina, heparina, sulfato de heparina, ácido retinoico, miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (FCE), miembros de la familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) incluyendo FGF2, FGF7, FGF8 y/o FGF10, miembros de la familia del factor de crecimiento (PDGF) procedente de plaquetas, factor de crecimiento transformante (TGF)/proteína morfogenética ósea (BMP)/factor de diferenciación y del crecimiento (GDF) antagonistas de la familia del factor que incluyen, pero sin limitación, noggin, folistatina, cordina, gremLin, proteínas de la familia cerberus/DAN, ventropina, dosis alta de activina, y sin amnio o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. Los antagonistas de TGF/BMP/GDF también pueden añadirse en forma de Fc quimeras de receptor TGF/BMP/GDF. Otros factores que se pueden añadir incluyen moléculas que pueden activar o desactivar la señalización a través de la familia de receptores Notch, que incluyen, pero sin limitación, proteínas de las familias tipo Delta y Jagged, así como inhibidores del procesamiento o escisión de Notch, o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. Otros factores de crecimiento pueden incluir miembros de la familia del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), insulina, la familia de factores relacionados sin alas (WNT) y la familia del factor hedgehog o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. Se pueden añadir factores adicionales para promover el tallo/progenitor del mesendodermo, el tallo/progenitor del endodermo, el tallo/progenitor del mesodermo o la proliferación y supervivencia del tallo/progenitor del endodermo definitivo, así como la supervivencia y diferenciación de los derivados de estos progenitores.

Las composiciones descritas en el presente documento son útiles para el cribado de compuestos de prueba para determinar si un compuesto de prueba modula la pluripotencia, la proliferación y/o la diferenciación de células diferenciables. La pluripotencia, proliferación y/o diferenciación de las células diferenciables puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica. Los métodos no limitantes incluyen el examen de la morfología celular, la expresión de diversos marcadores, la formación de teratomas, loss recuentos celulares y las mediciones de la impedancia.

La progresión de células pluripotentes a células multipotentes a células multipotentes o células diferenciadas

adicionales se puede controlar midiendo y cuantificando la expresión del nivel de determinados marcadores genéticos, como la detección de la presencia o ausencia de un marcador genético específico en diferentes momentos antes y después de la adición de un agente exógeno, por ejemplo, un agente de señalización de TGF- β . Como alternativa, la expresión de determinados marcadores se puede determinar midiendo el nivel en el que el marcador está presente en las células del cultivo celular o población celular. Por ejemplo, en determinados procesos, se determina la expresión de marcadores característicos de células pluripotentes así como la falta de expresión significativa de marcadores característicos de células multipotentes o diferenciadas.

En otra realización, el control de la producción de otros tipos de células menos diferenciadas del linaje endodérmico definitivo, técnicas cualitativas o semicuantitativas, tales como métodos de transferencia de transferencia e inmunocitoquímica (ICC) o inmunohistoquímica (IHC), puede usarse para medir la expresión del marcador. Como alternativa, la expresión del marcador puede cuantificarse con precisión con técnicas tales como RCP-C. Además, se apreciará que a nivel del polipéptido, muchos de los marcadores de las células que expresan la hormona del islote pancreático son proteínas secretadas. Como tal, pueden utilizarse técnicas para medir el contenido del marcador extracelular, tales como ELISA. Esta y otras metodologías de control y cribado se describen en detalle en la solicitud de los EE.UU. n.º 11/165.305, titulada MÉTODOS PARA IDENTIFICAR FACTORES PARA ENDODERMO DEFINITIVO, presentada el 23 de junio, 2005, ahora la patente de los EE. UU. N.º 7.541.185.

La progresión del desarrollo de las células pluripotentes descritas en el presente documento (*por ejemplo*, células producidas como resultado de las etapas 1-4 o las etapas 1-5 como se describe en D'Amour *et al.*, 2006, *anteriormente mencionado*) se puede controlar determinando la expresión de marcadores característicos de cada tipo de célula procedente de pluripotente a lo largo de la ruta de desarrollo. Por ejemplo, en algunos procesos, la identificación y caracterización de un tipo de célula procedente de pluripotencia es por expresión de un determinado marcador o por diferentes niveles de expresión y patrones de más de un marcador. Es decir, la presencia o ausencia, la expresión alta o baja, de uno o más marcadores tipifica e identifica un tipo de célula. Además, determinados marcadores pueden tener expresión transitoria, por lo que el marcador se expresa en gran medida durante una etapa de desarrollo y se expresa mal en otra etapa de desarrollo. La expresión de determinados marcadores puede determinarse midiendo el nivel al que está presente el marcador en las células del cultivo celular o población celular en comparación con un marcador de control normalizado o estandarizado. En dichos procesos, la medición de la expresión del marcador puede ser cualitativa o cuantitativa. Un método para cuantificar la expresión de marcadores que se producen mediante genes marcadores es a través del uso de RCP cuantitativa (RCP-C). Los métodos para realizar RCP-C son bien conocidos en la técnica.

En aún otras realizaciones, la RCP-C puede usarse junto con técnicas inmunohistoquímicas o técnicas de citometría de flujo para caracterizar e identificar de forma eficaz y precisa los tipos de células y determinar tanto la cantidad como las proporciones relativas de dichos marcadores en un tipo de célula sujeto. En una realización, la RCP-C puede cuantificar los niveles de expresión de ARN en un cultivo celular que contiene una población mixta de células. Sin embargo, la RCP-C no puede proporcionar ni calificar si los marcadores o las proteínas sujeto en cuestión se expresan conjuntamente en la misma célula. En otra realización, la RCP-C se usa junto con métodos de citometría de flujo para caracterizar e identificar tipos de células. Por lo tanto, mediante el uso de una combinación de los métodos descritos en el presente documento, y tales como los descritos anteriormente, la caracterización completa y la identificación de diversos tipos de células, incluidas las células de tipo de linaje endodermo, puede llevarse a cabo y demostrarse.

Se ha demostrado que la medición de la expresión de un gen particular mediante RCP-C puede usarse para estimar con precisión la cantidad relativa de células en poblaciones celulares mixtas que expresan de manera diferencial ese gen particular. Por lo tanto, usando la medición basada en RCP-C de la expresión génica, la cantidad de células pluripotentes, diferenciadas multipotentes, diferenciadas unipotentes y/o diferenciadas terminalmente puede determinarse en determinadas poblaciones de células mixtas en diversas condiciones de cultivo celular. Por ejemplo, las poblaciones de células pluripotentes y células diferenciadas tales como las células de la etapa 1 (endodermo definitivo) se mezclaron juntas en proporciones conocidas y se determinaron para la expresión génica de marcadores de endodermo definitivos. El ARN total se aisló de 10.000 células totales y se realizó por triplicado para cada condición (muestra). Un tercio (1/3) del ARN aislado se usó luego para la síntesis de ADNc y un cuarto (1/40) de la reacción de ADNc se usó en cada amplificación RCP-C. Por lo tanto, cada punto de datos de RCP se obtiene aproximadamente de 1/120 de la entrada original de 10.000 células (o ARN equivalente de aproximadamente 83 células totales). La RCP-C se realizó usando metodologías bien establecidas en la técnica. Véase D'Amour *et al.*, (2006), *anteriormente mencionado*.

La Figura 1A proporciona una representación gráfica de los datos de expresión del gen por RCP-C obtenidos para el marcador SOX17, que se expresa en las células de la etapa 1 (endodermo definitivo, DE), pero no en las células pluripotentes, por ejemplo, hESC. La primera columna de la Figura 1A (extremo izquierdo) muestra la señal producida por RCP-C a partir de 100 % de hESC, mientras que el extremo de la columna de la derecha muestra la señal producida por RCP a partir del 100 % de células DE. Las columnas entre el 100 % hESC y las células 100 % DE muestran la señal producida por RCP-C a partir de mezclas de dilución conocidas (o relaciones) de hESC: células DE. Por ejemplo, la columna 2 muestra la señal producida por RCP-C a partir de una mezcla de 99: 1 hESC: células DE, la columna 3 muestra la señal producida por RCP-C a partir de una mezcla de 95: 5 hESC: células DE,

la columna 4 muestra la señal producida por RCP-C a partir de una mezcla de 90: 10 hESC: células DE, y así sucesivamente hasta la penúltima columna, que muestra la señal producida por RCP-C a partir de una mezcla de 1:99 hESC: células DE.

5 Los datos presentados en la Figura 1A demuestran que a medida que aumenta el número de células endodérmicas humanas definitivas en la población mixta, también aumenta el nivel de expresión génica para los genes específicos del endodermo definitivo. Además, este ensayo de RCP-C es altamente sensible, lo que detecta la expresión de genes marcadores de endodermo definitivos cuando el endodermo definitivo constituye solo el 1 % de la población celular, *por ejemplo*, la columna 2 del estudio de panel A tiene una relación hESC:DE de 99:1. Esto indica que este método de RCP-C puede detectar incluso un único equivalente definitivo de células de endodermo en un cultivo celular mixto. Además, la respuesta de la señal PCR-C es razonablemente lineal en la mayor parte del intervalo de concentraciones de células (del 1 % al 90 % del endodermo definitivo).

15 La relación entre las cantidades de células endodérmicas humanas definitivas para la expresión de un marcador de endodermo definitivo también se observó cuando el tamaño de muestra fue de 50.000 células/muestra. Además, se analizaron otros marcadores genéticos presentes en células de endodermo definitivas y los resultados fueron uniformes con los observados para SOX17.

20 En otra realización, las cantidades relativas de células pluripotentes presentes en poblaciones de células mixtas se pueden medir determinando el valor de expresión génica relativa para los genes marcadores de células madre pluripotentes. Por ejemplo, hESCs indiferenciadas se mezclaron con células de fibroblastos embrionarios humanos (HEF) en proporciones conocidas, *es decir*, 100:0 HEF:hESC; 99:1 HEF:hESC; 90:10 HEF:hESC; 50:50 HEF:hESC; y 0:100 HEF:hESC. Cada muestra que contenía las mezclas descritas de células no agrupadas se colocó en cultivo rotacional para formar un cultivo de agregados en suspensión esencialmente como se describe en el presente documento. Se tomaron muestras de RCP-C a las 48 horas de cultivo y se determinaron para la expresión de genes marcadores pluripotentes que incluyen los enumerados en la **Tabla 1**, tales como OCT4. Similar a los resultados descritos anteriormente en la Figura 1A, la expresión relativa del gen marcador celular pluripotente, OCT4, es proporcional al porcentaje (relación) de las células pluripotentes que se colocaron en el cultivo. Véase la Figura 1B. Por lo tanto, el método descrito para determinar la abundancia relativa de células determinando los niveles de expresión del marcador génico para un tipo de célula específico no depende de ningún tipo de célula particular; más bien, el método es igualmente reproducible para células pluripotentes (*por ejemplo*, hESC) y para células procedentes pluripotentes, tales como células de las etapas 1 (endodermo definitivo o SOX17 y HNF3 (3 endodermo definitivo, 2 (tracto digestivo superior o endodermo del tracto digestivo superior negativo para PDX1 o SOX17), HNF3 (3 y endodermo del tracto intestinal superior de HNF4a), 3 (endodermo del tracto intestinal superior posterior o endodermo del tracto intestinal superior positivo para PDX1), 4 (progenitores pancreáticos o endodermo o epitelio pancreático, o endodermo pancreático co-positivo para PDX1/NKX6.1) y 5 (células precursoras endocrinas o endocrinas o células precursoras endocrinas co-positivas para NGN3/NKX2.2. Aún otros marcadores celulares pluripotentes tales como los descritos en la **Tabla 1**, en particular SOX2, pueden analizarse de forma similar.

40 **Tabla 1: Marcadores celulares pluripotentes**

Nombre del marcador	Células EC/ES/EG de ratón	Células EC/ES/EG de mono	Células ES/iPS pluripotentes humanas	Células EG humanas
SSEA-1	+	-	-	-
SSEA-3	-	+	+	+
SSEA-4	-	+	+	+
TRA-1-60	-	+	+	+
TRA-1-81	-	+	+	+
Fosfatasa alcalina	+	+	+	+
Oct4 (POU5F1)	+	+	+	Desconocido
Nanog	+	+	+	+
SOX2	+	+	+	+
Formación de teratoma <i>in vivo</i>	+	+	+	-

CLAVES

Célula ES = célula madre embrionaria	TRA = antígeno de rechazo tumoral 1
Célula EG = célula germinal embrionaria	SSEA = antígeno embrionario específico de fase
Célula EC= célula de carcinoma embrionario	SOX2 = SRY (región determinante del sexo Y) casilla 2

45 Los resultados de RCP-C pueden confirmarse usando citometría de flujo. Las ESC humanas se diferenciaron en la etapa 5 (células endocrinas pancreáticas). Véase D'Amour *et al.*, (2006), *anteriormente mencionado*. La proporción de la población celular que se había diferenciado a las células endocrinas pancreáticas se determinó mediante citometría de flujo usando un anticuerpo contra la insulina. Se obtuvieron poblaciones de aproximadamente 1 %, 10 % o 20 % de células endocrinas que expresan insulina. A continuación, se tomaron muestras de ARN mensajero de estas tres poblaciones y se realizó RCP-C. Los resultados que se muestran en la Figura 1C demostraron que la

expresión relativa del gen de insulina es de hecho proporcional al número de células que expresan el gen marcador en la población. Este método fue altamente reproducible, y además demuestra la correlación entre la cantidad de expresión del gen marcador y el porcentaje de células en una población celular que expresa el gen marcador. Además, se analizaron otros marcadores genéticos de células endocrinas pancreáticas y los resultados fueron uniformes con los observados para la insulina.

Aún otros métodos, que se conocen en la técnica, también pueden usarse para cuantificar la expresión del gen marcador. Por ejemplo, la expresión de un producto de gen marcador puede detectarse usando anticuerpos específicos para el producto de gen marcador de interés (por ejemplo, mediante transferencia de Western, análisis de citometría de flujo, ELISA, inmunohistoquímica o inmunofluorescencia, y similares). En determinados procesos, puede determinarse la expresión de genes marcadores característicos de células procedentes de pluripotentes así como la falta de expresión significativa de genes marcadores característicos de células procedentes de pluripotentes. Aún otros métodos para caracterizar e identificar tipos de células procedentes de pluripotentes se describen en aplicaciones relacionadas como se indicó anteriormente.

Las combinaciones de sonda de amplificación/cebador adecuadas para su uso en ensayos de amplificación incluyen las siguientes: Insulina (INS) (GenBank NM_000207): cebadores AAGAGGCCATCAAGCAGATCA (SEQ ID NO: 1); CAGGAGGCGCATCCACA (SEQ ID NO: 2); Nkx6.1 (NM_006168): cebadores CTGGCCTGTACCCCTCATCA (SEQ ID NO: 3); CTTCCCGTCTTTGTCCAACAA (SEQ ID NO: 4); P dx 1 (NM_000209): cebadores AAGTCTACCAAAGCTCACGCG (SEQ ID NO: 5); GTAGGCGCCGCTGC (SEQ ID NO: 6); Ngn3 (NM_020999): cebadores GCTCATGCTCTCTATTCTTTTGC (SEQ ID NO: 7); GGTTGAGGCGTCATCCTTTCT (SEQ ID NO: 8); FOXA2 (HNF3B) (NM_021784): cebadores GGGAGCGGTGAAGATGGA (SEQ ID NO: 9); TCATGTTGCTCACGGAGGAGTA (SEQ ID NO: 10); Glucagón (GCG) (NM_002054): cebadores AAGCATTTACTTTGTGGCTGGATT (SEQ ID NO: 11); TGATCTGGATTTCCTCTGTGTCT (SEQ ID NO: 12); HNF6 (NM_030712): cebadores CGCTCCGCTTAGCAGCAT (SEQ ID NO: 13); GTGTTGCTCTATCCTTCCCAT (SEQ ID NO: 14); HNF4Alpha (NM_000457): cebadores GAAGAAGGAAGCCGTCAGTA (SEQ ID NO: 15); GACCTTCGAGTGCTGATCCG (SEQ ID NO: 16); Sox17 (NM_022454): cebadores GGCGCAGCAGAATCCAGA (SEQ ID NO: 17); CCACGACTTGCCAGCAT (SEQ ID NO: 18); HLxB9 (NM_005515): cebadores CACCGCGGGCATGATC (SEQ ID NO: 19); ACTTCCCCAGGAGGTTTCGA (SEQ ID NO: 20); Nkx2.2 (NM_002509): cebadores GGCCTTCAGTACTCCCTGCA (SEQ ID NO: 21); GGGACTTGAGGCTTGAGTCT (SEQ ID NO: 22); PTF1a (NM178161): cebadores GAAGGTCATCATCTGCCATCG (SEQ ID NO: 23) GGCCATAATCAGGGTTCGCT (SEQ ID NO: 24); SST (NM_001048): cebadores CCCAGACTCCGTCAGTTTC (SEQ ID NO: 25); TCCGTCTGGTTGGGTTTCAG (SEQ ID NO: 26); PAX6 (NM_000280): cebadores CCAGAAGGATGCCTCATAAAGG (SEQ ID NO: 27); TCTGCGCGCCCTAGTTA (SEQ ID NO: 28); cebadores de Oct4: TGGCTCGAGAAGGATGTG (SEQ ID NO: 29) GCATAGTCGCTGCTTGATCG (SEQ ID NO: 30); cebadores MIXL1 CCGAGTCCAGGATCCAGGTA (SEQ ID NO: 31) CTCTGACGCCGAGACTTGG (SEQ ID NO: 32); cebadores GATA4 CCTCTTGCAATGCGAAAG (SEQ ID NO: 33) CGGGAGGAAGGCTCTCACT (SEQ ID NO: 34); cebadores de GSC GAGGAGAAAGTGGAGGTCTGGTT (SEQ ID NO: 35) CTCTGATGAGGACCGCTTCTG (SEQ ID NO: 36); cebadores de CER ACAGTGCCCTCAGCCAGACT (SEQ ID NO: 37) ACAACTACTTTTTTCACAGCCTTCGT (SEQ ID NO: 38); cebadores de AFP GAGAAACCCACTGGAGATGAACA (SEQ ID NO: 39) CTCATGGCAAAGTTCTTCCAGAA (SEQ ID NO: 40); cebadores de SOX1 ATGCACCGCTACGACATGG (SEQ ID NO: 41) CTCATGTAGCCCTGCGAGTTG (SEQ ID NO: 42); cebadores de ZIC1 CTGGCTGTGGCAAGGTCTTC (SEQ ID NO: 43) CAGCCCTCAAACCTCGCACTT (SEQ ID NO: 44); cebadores NFM ATCGAGGAGCGCCACAAC (SEQ ID NO: 45) TGCTGGATGGTGTCTGGT (SEQ ID NO: 46). Otros cebadores están disponibles a través de ABI Taqman, incluidos FGF17 (Hs00182599_ml), VWF (Hs00169795_ml), CMKOR1 (Hs00604567_ml), CRIP1 (Hs00832816_g1), FOXQ1 (Hs00536425_sl), CALCR (Hs00156229_ml) y CHGA (Hs00154441_ml).

Control de células pluripotentes

Además de los métodos para controlar y determinar las estimaciones de la cantidad relativa de células pluripotentes o procedentes de pluripotentes en poblaciones de células mixtas que expresan un gen particular descrito anteriormente, otro método para controlar y determinar los niveles de células al menos pluripotentes es recolocar los cultivos de células diferenciadas como se describe en la **Figura 2** en condiciones de cultivo celular pluripotentes. Esto puede realizarse con cultivos de células adherentes o cultivos de agregados en suspensión como se describe en la solicitud de Patente de los EE.UU. n.º 12/264.760, titulada COMPUESTOS EN SUSPENSIÓN DE AGREGADOS DE CÉLULAS MADRE Y MÉTODOS DE DIFERENCIACIÓN DE LOS MISMOS, presentada el 4 de noviembre de 2008. Las condiciones de cultivo celular pluripotentes son aquellas que promueven el crecimiento y la proliferación pluripotentes, incluyendo el crecimiento en capas alimentadoras o en condiciones sin alimentador en una matriz extracelular procedente de alimentadores de fibroblastos lisados o en matrices superficiales sintéticas (Corning) o en medios de cultivo celular pluripotentes sin alimentador como se describe en la solicitud de patente de los EE.UU. relacionada n.º 11/875.057, titulada MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA MEDIOS DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES LIBRES DE ALIMENTADOR QUE CONTIENEN SUERO HUMANO, presentada el 20 de octubre de 2008. Este enfoque amplifica pequeñas cantidades de células pluripotentes en cualquier cultivo porque cuando se transfieren o se vuelven a sembrar y cultivar en condiciones de cultivo celular pluripotentes, incluso la(s) pequeña(s) cantidad(es) de célula(s) pluripotente(s) proliferará más rápido y adquirirá tiempos de duplicación similares a los de otras células pluripotentes en condiciones de cultivo pluripotentes (*por ejemplo*, hESCs se duplica

durante una noche o en aproximadamente 18-24 horas). La tinción positiva con Ki67 ha confirmado que las células de los cultivos recolocados proliferaban.

Métodos de cribado que emplean cultivos de agregación en suspensión pluripotentes

5 En algunas realizaciones, los métodos de cribado se emplean para obtener determinadas poblaciones de células que comprenden células pluripotentes, multipotentes y/o diferenciadas. La población celular se proporciona con un factor de diferenciación candidato. En un primer momento, que es anterior o aproximadamente al mismo tiempo que proporciona el factor de diferenciación candidato, se determina la expresión de un marcador. Como alternativa, la expresión del marcador puede determinarse después de proporcionar el factor de diferenciación candidato. En un
10 segundo momento, que es posterior al primer momento y posterior a la etapa de proporcionar el factor de diferenciación candidato a la población de células, la expresión del mismo marcador se determina nuevamente. Si el factor de diferenciación candidato es capaz de promover la diferenciación de las células precursoras pancreáticas se determina comparando la expresión del marcador en el primer momento con la expresión del marcador en el
15 segundo momento. Si la expresión del marcador en el segundo momento aumenta o disminuye en comparación con la expresión del marcador en el primer momento, entonces el factor de diferenciación candidato es capaz de promover la diferenciación de las células progenitoras pancreáticas.

20 En las realizaciones de los métodos de cribado descritos en el presente documento, la población celular se pone en contacto o se proporciona de otro modo con un factor de diferenciación (prueba) candidato o factor citotóxico o inhibidor. El factor de diferenciación candidato o factor citotóxico o inhibidor puede comprender cualquier molécula que pueda tener el potencial de promover la diferenciación de cualquiera de las células mencionadas anteriormente o evitar el crecimiento o reducir la proliferación de células madre pluripotentes o matar las células madre pluripotentes. En realizaciones alternativas, el factor de diferenciación candidato o el factor citotóxico o inhibidor
25 comprende una molécula que no se sabe que promueve la diferenciación celular. En realizaciones preferentes, el factor de diferenciación candidato o el factor citotóxico o inhibidor comprende una molécula que no se sabe que promueve la diferenciación de células progenitoras pancreáticas humanas.

30 En algunas realizaciones de los métodos de cribado descritos en el presente documento, el factor de diferenciación candidato o factor citotóxico o inhibidor comprende una molécula pequeña. La expresión "**molécula pequeña**" se usa en el presente documento como en la técnica para referirse a compuestos orgánicos de bajo peso molecular, que por definición no son polímeros. Las moléculas pequeñas pueden ser de origen natural (como los neurotransmisores endógenos) o pueden prepararse por métodos químicos orgánicos de síntesis conocidos en la técnica. En determinadas realizaciones, una molécula pequeña es una molécula que tiene una masa molecular de
35 aproximadamente 800 Dalton o menos.

40 En otras realizaciones descritas en el presente documento, el factor de diferenciación candidato o agente citotóxico o inhibidor comprende una molécula grande, *por ejemplo*, un polipéptido. El polipéptido puede ser cualquier polipéptido que incluye, pero sin limitación, una glucoproteína, una lipoproteína, una proteína de matriz extracelular, una citoquina, una quimiocina, una hormona peptídica, una interleuquina o un factor de crecimiento. Los polipéptidos preferentes incluyen factores de crecimiento.

45 En algunas realizaciones de los métodos de cribado descritos en el presente documento, el factor de diferenciación candidato o agente citotóxico o inhibidor candidato se proporciona a la población celular en una o más concentraciones. En algunas realizaciones, el factor de diferenciación candidato o agente citotóxico o inhibidor candidato se proporciona a la población celular de modo que la concentración del factor de diferenciación candidato en el medio que rodea las células varía de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 10 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración del factor de diferenciación candidato o agente citotóxico o inhibidor candidato en el medio que rodea las células varía de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 1 mg/ml. En otras realizaciones,
50 la concentración del factor de diferenciación candidato o agente citotóxico o inhibidor candidato en el medio que rodea las células varía de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 100 mg/ml. En aún otras realizaciones, la concentración del factor de diferenciación candidato o agente citotóxico o inhibidor candidato en el medio que rodea las células varía de aproximadamente 100 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml. En realizaciones preferentes, la concentración del factor de diferenciación candidato o agente citotóxico o inhibidor candidato en el medio que rodea
55 las células es de aproximadamente 5 ng/ml a 1000 µg/ml.

60 En algunas realizaciones, las etapas de los métodos de cribado descritos en el presente documento comprenden determinar la expresión de al menos un marcador en un primer momento y un segundo momento. En algunas de estas realizaciones, el primer momento puede ser anterior o aproximadamente al mismo tiempo que proporciona a la población celular el factor de diferenciación candidato o agente candidato citotóxico o inhibidor. Como alternativa, en algunas realizaciones, el primer momento es posterior a proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato o agente candidato citotóxico o inhibidor. En algunas realizaciones, la expresión de una pluralidad de marcadores se determina en un primer momento.

65 Los métodos mencionados anteriormente son igualmente aplicables al cribado de moléculas pequeñas y otros compuestos que son citotóxicos o inhiben el crecimiento, expansión y/o proliferación de células madre pluripotentes;

o en el caso de un factor de diferenciación candidato, mejorar la viabilidad, estabilizar el estado de diferenciación, aumentar el crecimiento y mantener la pluripotencia de las células hES. Estará dentro del nivel de habilidad en la técnica adaptar las enseñanzas descritas en el presente documento a dichos métodos de cribado.

5 Además de determinar la expresión de al menos un marcador en un primer momento, algunas realizaciones de los métodos de cribado descritos en el presente documento contemplan determinar la expresión de al menos un
 10 marcador en un segundo momento, que es posterior al primer momento y que es posterior a proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato o agente citotóxico o inhibidor candidato. En dichas realizaciones, la expresión del mismo marcador se determina tanto en el primer como en el segundo momento. En
 15 algunas realizaciones, la expresión de una pluralidad de marcadores se determina tanto en el primer como en el segundo momento. En dichas realizaciones, la expresión de la misma pluralidad de marcadores se determina tanto en el primer como en el segundo momento. En algunas realizaciones, la expresión del marcador se determina en una pluralidad de momentos, cada uno de los cuales es posterior al primer momento, y cada uno de los cuales es posterior a proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato o el agente citotóxico o inhibidor candidato. En determinadas realizaciones, la expresión del marcador se determina mediante RCP-C. En otras realizaciones, la expresión del marcador se determina mediante inmunocitoquímica.

20 En algunas realizaciones de los métodos de cribado descritos en el presente documento, se deja pasar suficiente tiempo entre proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato o agente citotóxico o inhibidor candidato y determinar la expresión del marcador en el segundo momento. El tiempo suficiente entre proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato o agente citotóxico o inhibidor candidato y determinar la expresión del marcador en el segundo momento puede ser tan poco como desde aproximadamente 1 hora hasta tanto como aproximadamente 10 días. En algunas realizaciones, la expresión de al menos un marcador se determina múltiples veces después de proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato o agente candidato citotóxico o inhibidor. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente es al menos aproximadamente 1 hora, al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 12 horas a varios días a la semana.

30 En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, se determina además si la expresión del marcador en el segundo momento ha aumentado o disminuido en comparación con la expresión de este marcador en el primer momento. Un aumento o disminución en la expresión del al menos un marcador indica que el factor de diferenciación candidato o agente citotóxico o inhibidor candidato es capaz de promover la diferenciación de la célula o bloquear o inhibir la célula. De forma similar, si se determina la expresión de una pluralidad de marcadores, se determina además si la expresión de la pluralidad de marcadores en el segundo momento ha aumentado o disminuido en comparación con la expresión de esta pluralidad de marcadores en el primer momento.
 35 Un aumento o disminución en la expresión del marcador se puede determinar midiendo o evaluando de otro modo la cantidad, nivel o actividad del marcador en la población celular en el primer y segundo momento. Dicha determinación puede ser relativa a otros marcadores, por ejemplo, expresión génica constitutiva, o absoluta. En determinadas realizaciones, en las que la expresión del marcador aumenta en el segundo momento en comparación con el primer momento, la cantidad de aumento es de al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces o más que al menos aproximadamente 100 veces. En algunas realizaciones, la cantidad de aumento es menor que 2 veces. En realizaciones en las que el
 45 marcador disminuye en el segundo momento en comparación con el primer momento, la cantidad de disminución es al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces o más que al menos aproximadamente 100 veces. En algunas realizaciones, la cantidad de disminución es menor que 2 veces.

Ejemplos

55 El medio definido simple (DC) empleado en los siguientes ejemplos se denomina DC-HAIF, y consiste esencialmente en DMEM/F12; glutamax 2 mM; 1 x aminoácidos no esenciales; 0,5 U/ml de penicilina; 0,5 U/ml de estreptomina; 10 µg/ml de transferrina (todo de Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.); 13-mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma); 0,2 % de fracción de Cohn libre de ácidos grasos V BSA (Serologicals); 1 x mezclas de oligoelementos A, B y C (Cellgro); 50 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma); 10 ng/ml de HRG-13 (H); 10 ng/ml de activina A (A); 200 ng/ml de LR-IGF1 (I) y 8 ng/ml de FGF2 (F). DC-HAIF soportó el mantenimiento a largo plazo de las células hES pluripotentes, así como los pases de células individuales y la expansión escalada de la célula hES usando Accutase™. Véase Wang, L. *et al.*, (2007) Blood, 110 (12): 4111-4119. Una formulación comercial probada por lotes de DC-HAIF está disponible en Invitrogen, con el nombre comercial StemPro® hESC SFM.

65 A lo largo de los estudios de antecedentes quedó claro que FGF2 no era un componente requerido del medio definido. Solo se observó una fosforilación pobre o moderada de los receptores de FGF después de la estimulación

del factor de crecimiento, incluso a altas concentraciones, y FGF2 podría omitirse del medio definido sin ningún impacto mensurable en el cultivo, en términos de proliferación, diferenciación espontánea o mantenimiento de la pluripotencia. Véase Wang, L. *et al.*, 2007, *anteriormente mencionado*. Por lo tanto, se llevaron a cabo determinados estudios a continuación en ausencia de FGF2 añadido, y como se indica en las leyendas de texto y figuras. Además, debido a que algunos ensayos requerían combinaciones variables de factores de crecimiento, un lote libre de factores de crecimiento de StemPro® hESC SFM se ordenó y se compró de forma personalizada en Life Technologies para proporcionar dicha flexibilidad.

Con el fin de resaltar rutas de señalización adicionales con funciones críticas en el cultivo de células hES, se empleó una biblioteca LOPAC que consistía esencialmente en una biblioteca de compuestos de moléculas pequeñas con bioactividades conocidas para cribar cultivos de células hES. El objetivo era identificar aquellas moléculas pequeñas que afectaban negativamente la expansión del cultivo y/o la pluripotencia. Se esperaba que la inhibición de las rutas clave resultara en una proliferación, citotoxicidad, apoptosis o diferenciación ralentizadas. Es importante destacar que, estos cribados primario y secundario se realizaron sobre el fondo del medio definido simple descrito anteriormente y en el presente documento, reduciendo la variabilidad normalmente introducida por componentes indefinidos tales como suero o albúmina semifracionada. Para determinar la actividad de los compuestos, se realizó un ensayo de tinción con fosfatasa alcalina. La fosfatasa alcalina es un marcador de células madre asociado con células madre pluripotentes indiferenciadas. Usando este ensayo, aproximadamente 50 compuestos de moléculas pequeñas demostraron cierta cantidad medible de actividad con respecto a su capacidad para impactar negativamente las células hES, incluyendo la reducción del crecimiento y la supervivencia de células hES. De estos compuestos, se identificaron numerosos inhibidores de los receptores de neurotransmisores de la superficie celular, lo que sugiere al menos un papel de señalización para estos receptores en la autorrenovación. Usando ligandos de origen natural o derivados relacionados farmacológicamente, se identificaron varias clases de neurotransmisores de moléculas pequeñas, que también pueden actuar como hormonas, y se demostró soporte y/o expansión del crecimiento y supervivencia de células hES a baja densidad. Dichas actividades podrían ser cruciales para desarrollar tecnologías avanzadas para la aplicación comercial y clínica de células hES, como la clonación de células individuales confiable, derivación eficiente de nuevas líneas celulares hES en condiciones completamente definidas y compatibles con GMP, crecimiento de células hES en suspensión y viabilidad potenciada tras el pase. El objetivo de los siguientes estudios fue identificar de forma similar a los agentes que tienen el efecto opuesto sobre las células madre pluripotentes. Más específicamente, los métodos de cribado de la invención se usaron para identificar agentes citotóxicos e inhibidores de células madre pluripotentes que pueden usarse para reducir poblaciones de células indiferenciadas durante la diferenciación dirigida *in vitro*.

Se debe entender que lo anterior se refiere a realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención y que se pueden realizar numerosos cambios en la misma sin apartarse del alcance de la invención. La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse de ninguna manera como que imponen limitaciones sobre el alcance de los mismos. Por el contrario, debe entenderse claramente que puede recurrirse a varias otras realizaciones, modificaciones y expresiones equivalentes, que, después de leer la descripción en el presente documento, pueden sugerir a los expertos en la técnica.

Los métodos, las composiciones y los dispositivos descritos en el presente documento son actualmente representativos de las realizaciones preferentes y son ilustrativos y no pretenden ser limitaciones del alcance de la invención. Con fines de referencia solo, se divulgan línea de células hES e iPS tales como las de las **Tabla 1 y 2** siguientes, respectivamente, que fueron adaptadas del registro de células madre del instituto nacional de salud en la web mundial en stemcells.nih.gov/research/registry, así como en el registro de células madre embrionarias humanas y el registro internacional de células madre ubicado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Massachusetts, Worcester, Massachusetts, EE.UU. Estas bases de datos se actualizan periódicamente a medida que las líneas celulares se vuelven disponibles y se obtiene el registro. Algunas de las líneas celulares no están disponibles para su envío al registro de células madre NSCB. Independientemente, al menos las siguientes líneas celulares hES se pueden comercializar a partir de la fecha de la presente invención.

Tabla 2: Líneas celulares ES humanas para referencia solo

Institución (país)	Nombre
BresaGen, Inc., Atenas, Georgia (EE.UU.)	BG01, BG02, BG03; BG04; BGO1v
Invitrogen (EE.UU.)	BGO1v/hOG
CyThera, Inc., San Diego, California (EE.UU.)	CyT49, CyT203, CyT25
Geron Corporation, Menlo park, California (EE.UU.)	GE01, GE07, GE09, GE13, GE14, GE91, GE92 (H1, H7, H9, H13, H14, H9.1, H9.2)
Universidad de California, San Francisco, California (EE.UU.)	UC01, UC06 (HSF-1, HSF-6); UCSFB1, UCSFB2, UCSFB3, UCSFB4, UCSFB5, UCSFB6, UCSFB7, UCSFB8, UCSFB9 y UCSFB10
Fundación de investigación de alumnos de Wisconsin Madison, Wisconsin (EE.UU.)	WA01, WA07, WA09, WA13, WA14 (H1, H7, H9, H13, H14)
Corporación del hospital de niños	CHB-1, CHB-2 CHB-3 CHB-4, CHB-5, CHB-6, CHB-8, CHB-9, CHB-10, CHB-11

ES 2 690 663 T3

<p>(EE.UU.) La universidad Rockefeller (EE.UU.) Universidad de Harvard (EE.UU.)</p>	<p>y CHB-12 RUES1, RUES2 y RUES3 HUES1, HUES2, HUES3, HUES4, HUES5, HUES6, HUES7, HUES8, HUES9, HUES10, HUES11, HUES12, HUES13, HUES14, HUES15, HUES16, HUES17, HUES18, HUES19, HUES20, HUES21, HUES22, HUES23, HUES24, HUES25, HUES26, HUES27; HUES28; HUES48; HUES49; HUES53; HUES55 y HUES 56</p>
<p>Instituto de investigación Samuel Lunenfeld del hospital Mt Sinai (EE.UU.) Hospital memorial de niños (EE.UU.) La universidad del centro de ciencias de la salud de Texas en Houston (EE.UU.) California Stem Cell, Inc., (EE. UU.) Universidad de la escuela de medicina/odontología de Connecticut (EE.UU.) El tercer hospital afiliado del colegio médico de Guangzhou (EE.UU.) Advanced Research Technology, Inc., (EE. UU.) Universidad de Stanford (EE.UU.) Universidad de la escuela de medicina de Nueva York (EE.UU.) Reprogenetics, LLC (EE.UU.) Universidad de California, Los Angeles (EE.UU.) Escuela de medicina del este de Virginia (EE.UU.) Instituto de genética reproductiva (EE.UU.)</p>	<p>CA1 y CA2 CM-1, CM-2, CM-5, CM-6, CM-7, CM-8, CM-11, CM-12, CM-13, CM-14, CM-16 CR1 y CR2 CSC14 CSC14, CT1, CT2, CT3, y CT4 FY-3PN; FY-hES-1; FY-hES-3; FY-hES-5; FY-hES-7 y FY-hES-8 MA 01; MA 09; MA 42; MA 50; MA135; NED 1; NED 2; NED 3 y NED 4 MFS5 NYUE S1; NYUE S2; NYUE S3; NYUE S4; NYUE S5; NYUE S6 y NYUES7 RNJ7 UCLA1; UCLA2 y UCLA3 ES-76; ES-78-1; ES-78-2 RG-222; RG-230; RG-249; RG-308; RG-313; RG-148; DISTROFIA MIOTÓNICA 1 (DM1), afectado, 46, XY; RG-153; DISTROFIA MIOTÓNICA 1 (DM1), afectado, 46, XX; RG-170; DISTROFIA MUSCULAR, TIPO BECKER (BMD), afectado, 46, XY; RG-186; ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (EH), afectado, 46, XX; RG-194; ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (EH), afectado, 46, XY; RG-233; LOCUS DE LA BETA HEMOGLOBINA (HBB), afectado (HbS/HbS- anemia de células falciformes), 46, XX; RG-245; DISTROFIA MUSCULAR EMERY-DREIFUSS, LIGADA A X (EDMD), portador, 47,XXY; RG-246; DISTROFIA MUSCULAR EMERY-DREIFUSS, LIGADA A X (EDMD), afectado, 46, XY; RG-271; DISTONÍA DE TORSIÓN 1 (DYT1), AUTOSÓMICA DOMINANTE, afectado (N/GAG del), 46, XY; RG-283; DISTROFIA MUSCULAR, TIPO DE DUCHENNE (DMD), afectado, 46, XY; RG-288; FIBROSIS QUÍSTICA (FQ), afectada (deltaF508/deltaF508), 46, XY; RG-289; FIBROSIS QUÍSTICA (FQ), afectada (deltaF508/deltaF508), 46, XX; RG-301; DISTROFIA MUSCULAR, TIPO DUCHENNE (DMD) afectado, 46, XY; RG-302; DISTROFIA MUSCULAR, TIPO DE DUCHENNE (DMD), portador, 46, XX; RG-315; NEUROFIBROMATOSIS TIPO I (NF1), afectado (R19 47X/N), 46, XY; RG-316; ESCLEROSIS TUBEROSA, TIPO 1 (TSC1), afectado (N/IVS7+1 G-A); RG-316; ESCLEROSIS TUBEROSA, TIPO 1 (TSC1), afectado (N/IVS7+1 G-A); RG-320; ESCLEROSIS TUBEROSA, TIPO 1 (TSC1), afectado (N/IVS7+1 G-A); RG-326; SÍNDROME PTERIGIUM POPLÍTEO (PPS),afectado (R84H/N), 46, XY; RG-328; DISTROFIA MUSCULAR FACIOESCAPULOHUMERAL 1A (FSHD), afectado, 46, XY; RG-330; DISTROFIA MUSCULAR FACIOESCAPULOHUMERAL 1A (FSHD), afectado, 46, XY; RG-333; DISTROFIA MUSCULAR FACIOESCAPULOHUMERAL 1A (FSHD), afectado, 46, XX; RG-356; LOCUS DE LA ALFA HEMOGLOBINA (HBA), afectado (-alpha /-), 46,</p>

XX;
 RG-357; DISTROFIA MUSCULAR EMERY-DREIFUSS, LIGADA A X (EDMD), afectado, 46, XY;
 RG-358; DISTROFIA MUSCULAR EMERY-DREIFUSS, LIGADA A X (EDMD), afectado, 46, XY;
 RG-399; DISTROFIA MUSCULAR FACIOESCAPULOHUMERAL 1A (FSHD), afectado, 46, XX;
 RG-401; DISTROFIA MUSCULAR FACIOESCAPULOHUMERAL 1A (FSHD), afectado, 46, XX;
 RG-402; DISTROFIA MUSCULAR FACIOESCAPULOHUMERAL 1A (FSHD), afectado, 46, XX;
 RG-403; DISTROFIA MUSCULAR FACIOESCAPULOHUMERAL 1A (FSHD), afectado;
 RG-404; ATROFIA MUSCULAR ESPINAL, TIPO 1 (SMA 1) afectado, 46, XY;
 RG-406; DISTONÍA DE TORSIÓN 1 AUTOSÓMICA DOMINANTE (DYT1) afectado (N/GAG del);
 RG-413; CÁNCER DE MAMA, FAMILIAR (BRCA2), afectado (N/IVS7 GT del) y NEOPLASIA ENDOCRINA MÚLTIPLE, TIPO I (HOMBRES1), afectado (N/3036 4bp del);
 RG-414; NEOPLASIA ENDOCRINA MÚLTIPLE, TIPO I (HOMBRES1), afectado (N/3036 4bp del);
 RG-415; ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (EH), afectado;
 RG-416; FIBROSIS QUÍSTICA (FQ), afectado (deltaF508/1717-I G-A);
 RG-417; FIBROSIS QUÍSTICA (FQ), afectado (deltaF508/1717-I G-A);
 RG-418; LOCUS DE LA BETA HEMOGLOBINA (HBB), afectado (cd8+G /619del);
 RG-420; LOCUS DE LA BETA HEMOGLOBINA (HBB), afectado (cd8+G/619del);
 RG-422; FIBROSIS QUÍSTICA (FQ), afectado (N1303K/deltaF508);
 RG-423; FIBROSIS QUÍSTICA (FQ), portador (N/deltaF508);
 RG-424; NEOPLASIA ENDOCRINA MÚLTIPLE, TYPE 2 (MACHOS2B), afectado (M918T/N);
 RG-426; ENFERMEDAD DE PELIZAEUS-MERZBACHER (PMLD), afectado;
 RG-428; ESCLEROSIS TUBEROSA, TIPO 1 (TSC1), afectado (N/IVS7+1 G-A);

Instituto de biociencias

sudamericano Sao Paulo (Brazil)

BR-1

Instituto de tecnología

Technion-Israel del medio oriente, Haifa (Israel)

TE03, TE04, TE06 (I 3, I 4, I 6)

Hospital universitario de Hadassah (Israel)

HAD 1; HAD 2; HAD 3; HAD 4; HAD 5; HAD 6;

Universidad Hebrea de Jerusalén

HEFX1

Instituto de tecnología Technion-Israel

13; 13,2; 13,3; 14; 16; 16,2; J3; J3.2

ARMD.1.H.iPSC.2; BOM.1.H.iPSC.1; CNS.1.H.iPSC.10; CNS.2.H.iPSC.7;

FHC.1.H.iPSC.3; GSD.1.H.iPSC.7; HER.1.H.iPSC.1; LCA.1.H.iPSC.1;

LHON.1.H.iPSC.5; R.1.H.iPSC.1; R.1.H.iPSC.4; R.1.H.iPSC.9; Royan H1; Royan

H10; Royan H2; Royan H3; Royan H4; Royan H5; Royan H6; Royan H7; Royan

H8; Royan H9; RP.1.H.iPSC.2; RP2.H.iPSC.3; TYR.1.H.iPSC.1; USH.1.H.iPSC.6

Instituto Royan (Irán)

Europa

Cellartis AB, Gotenberg (Suecia)

SA00, SA002 (Sahlgrenska 1, Sahlgrenska 2); SA002.2; SA003; AS034.1; AS034.1.1; AS034.2; AS038; AS046; FC018; ASo85; AS094; SA111; SA121; SA142; SA167; SA181; SA191; SA196; SA202; SA203; SA211; SA218; SA240; SA279; SA348; SA352; SA399; SA461; SA502; SA506; SA521; SA540; SA611 HS181; HS207; HS235; HS237; HS293; HS306; HS346; HS351; HS356; H5360; HS361; HS362; HS363; HS364; HS366; HS368; HD380; H5382; HS400; HS401; HS402; HS415; HS420; HS422; HS426; HS429; HS429A; HS429B; HS429C; HS429D; HS475; HS480; HS481; HS539

Instituto Karolinska (Suecia)

Universidad Gutenberg, Gutenberg (Suecia)

SA04—SA19 (Sahlgrenska 4—Sahlgrenska 19)

Instituto Karolinska, Estocolmo (Suecia)

KA08, KA09, KA40, KA41, KA42, KA43 (hICM8, hICM9, hICM40, hICM41, hICM42, MCM43)

Universidad de Ginebra (Suiza)

CH-ES1

Universidad de Basilea (Suiza)

CH-ES3; CH-ES3; CH-ES5

Roslin Cells Ltd (UK)

RC2; RC3; RC4; RC5

Universidad de Newcastle upon Tyne

NCL-1; NCL-2; NCL-3; NCL-4; NCL-5; NCL-6; NCL-7; NCL-8; NCL-9

ES 2 690 663 T3

Instituto Roslin (Edimburgo) y Geron Corporation (R.U.)	RH1; RH2; RH3; RH4; RH5; RH6; RH7; RH9;
Universidad de Manchester (R.U.)	Macho 2
Colegio del rey de Londres (R.U.)	KCL-001 (anteriormente WT3)
La Universidad de Sheffield, Sheffield (R.U.)	SHEF-1; SHEF-2; SHEF-3; SHEF-4; SHEF-5; SHEF-6; SHEF-7; SHEF-8
Universidades de Edimburgo y Oxford; Universidad de Cambridge (R.U.)	Edi-1; Edi-2; Edi-3; Edi-4
Roslin Cells Ltd, Instituto Roslin, Universidades de Edimburgo y Manchester, Hospitales universitarios de niños de Manchester centro y Manchester NHS Trust (R.U.)	RCM-1; RC-1; RC-2; RC-3; RC-4; RC-5; RC-6; RC-7; RC-8; RC-9; RC-10
Hospital universitario del rey y Guy Trust/Fundación benéfica de Guy's y St Thomas (R.U.)	KCL-003-CF1 (anteriormente CFI); KCL-005-HD1; KCL008-HD-2; KCL009-trans-1; KCL-001 (WT-3); KCL-001 (WT-4)
Stem Cell Sciences Ltd Australia (SCS) y centro de células madre australiano (ASCC)	MEL-1; MEL-2; MEL-3; MEL-4
Universidad de Edimburgo (R.U.)	CB660
Axordia Ltd. (R.U.)	Shef-1; Shef-2; Shef-3; Shef-4; Shef-5; Shef-6; Shef-7
Universidad de Nottingham (R.U.)	Nott-1; Nott-2
Centro de medicina regenerativa en Barcelona (España)	ES-2; ES-3; ES-4; ES-5; ES-6; ES-7; ES-8; ES-9; ES-10; ES-11EM; cFA404-KIPS4F-1; cFA404-KiPS4F-3; KiPS3F-7; KiPS4F-1; KiPS4F-8
Centro de investigación príncipe Felipe (España)	VAL-3; VAL-4; VAL-5; VAL-6M; VAL-7; VAL-8; VAL-9; VAL-10B
Universidad libre de Bruselas (Bélgica)	ERA-1; ERA2; ERA-3; ERAMUC-1; ERAMUC-1 VUB01; VUB02; VUB06; VUB07; VUB03DM1; VUB04CF; VUB05HD; VUB08 MFS; VUB09 FSHD; VUB10SCA7; VUBII_FXS; VUB13_FXS; VUB14; VUB19_DM1; VUB20_CMT1A; VUB22CF; VUB230I; VUB24DM1; VUB26; VUB27; VUB28HDMFS
Universidad libre de Bruselas (Bélgica)	
Hospitales universitarios de niños de Manchester centro y Manchester NHS (R.U.)	Macho 1; Macho 2
Universidad París-Sud 11 (Francia)	CL01; CL02; CL03; PB04; PB05; PB05-1; PB06; PB06-1; PB07; PB08; PB09; PB10 OSCAR; STR-I-155-HD; STR-I-171-GLA; STR-I-189-FRAXA; STR-I-203-CFTR; STR-I-209-MEN2a; STR-I-211-MEN2a; STR-I-221-Sca2; STR-I-229-MTMX; STR-I-231-MTMX; STR-I-233-FRAXA; STR-I-251-CFTR; STR-I-301-MFS; STR-I-305-APC; STR-I-315-CMT1a; STR-I-347-FRAXA; STR-I-355-APC; STR-I-359-APC
INSERM (France)	
Universidad de Masaryk (República Checa)	CCTL 6; CCTL 8; CCTL 9; CCTL 10; CCTL 12; CCTL 13; CCRL 14
Universidad de Aalborg (Dinamarca)	CLS1; CLS2; CLS3; CLS4
Universidad de Copenhague (Dinamarca)	LRB001; LRB002; LRB003; LRB004; LRB005; LRB006; LRB007; LRB008; LRB009; LRB010; LRB011; LRB013; LRB014; LRB016; LRB017; LRB018;
Universidad del sur de Dinamarca	KMEB1; KMEB2; KMEB3; KMEB4; KMEB
Universidad de Helsinki (Finlandia)	FES21; FES22; FES29; FES30; FES61; FES75
Universidad de Tampere (Finlandia)	Regea 06/015; Regea 06/040; Regea 07/027; Regea 07/046; Regea 08/013; Regea 08/017; Regea 08/023; Regea 08/056
Centro Médico de la Universidad de Leiden (Países bajos)	HESC-NL1; HESC-NL2; HESC-NL3; HESC-NL4
Academia Rusa de Ciencias (Rusia)	ESM01; ESM02; ESM03;
Hospital memorial de Estambul (Turquía)	MINE: NS-2; NS-3; NS-4; NS-5; NS-6; NS-7; NS-8; NS-9; NS-10; OZ-1; OZ-2; OZ-3; OZ-4; OZ-5; OZ-6; OZ-7; OZ-8
<hr/>	
Australia	
Universidad de Monash (Australia)	Envy
Hospital príncipe de Gales, Sídney (Australia)	E1C1; E1C2; E1C3; E1C4; Endeavour 1; Endeavour 2; hES3.1; hES3.2; hES3.3 SIVF01; SIVF03; SIVF05; SIVF06; SIVF07; SIVF08; SIVF09; SIVF10; SIVF11; SIVF12; SIVF13
Sydney IVF Limited (Australia)	

Asia	
Universidad de Kioto (Japón)	201B1; 201B2; 201B3; 201B6; 201B7; 243H1; 243H7; 246G1; 246G3; 246G4; 246G5; 246G6; khES-1; khES-2; khES-3;
Consorcio de células madre de Singapur	ESI-013; ESI-014; ESI-017; ESI-027; ESI-035; ESI-049; ESI-051; ESI-053
ES Cell International Pte Ld (Singapur)	ES01, ES02, ES03, ES04, ES05, ES06 (HES-1, HES-2, HES-3, HES-4, HES-5, HES-6
Maria Biotech Co. Ltd. — Instituto médico hospitalario de infertilidad Maria Séul (Korea)	MB01, MB02, MB03; MB04; MB05; MB06; MB07; MB08; MB09
Hospital MizMedi-Universidad nacional de Séul, Séul (Korea)	MI01 (Miz-hES1); Miz-hES2; Miz-hE S3; Miz-hE S4; Miz-hES5; Miz-hES6; Miz-hES7; Miz-hES8; Miz-hES9; Miz-hES10; Miz-hES11; Miz-hES12; Miz-hES13; Miz-hES14; Miz-hES15;
Colegio universitario de medicina Pochon CHA (Korea)	CHA-hES3; CHA-hES4
Universidad nacional de Séul (Korea)	SNUhE S1; SNUhE S2; SNUhE S3; SNUhE S4; SNUhES11; SNUhE S16
Centro nacional de ciencias biológicas/Instituto Tata de investigación fundamental, Bangalore (India)	NC01, NC02, NC03 (FCNCBS1, FCNCBS2, FCNCBS3); BJJ-hem19; BJJ-hem20
Reliance Life Sciences, Mumbai (India)	RL05, RL07, RL10, RL13, RL15, RL20, RL21 (RLS ES 05, RLS ES 07, RLS ES 10
Instituto nacional de investigación en salud reproductiva (India)	KIND-1; KIND-2
Instituto Tata de investigación fundamental (India)	FCNCBS1; FCNCBS2; FCNCBS3
Universidad médica de Kaohsiung (Taiwán)	Ti; T2; T3; T4; T5
Universidad Central del Sur (China)	chESC-3 (H3); chESC-8;chESC-20; chESC-22; EBNA1+H9
Universidad graduada de la academia china de las ciencias (China)	hPES-1; hPES-2
Universidad de Huazhong de ciencia y tecnología (China)	hES-8; hES18
Tercer hospital de la Universidad de Pekín (China)	B4; B7; PKU1; PKU2
Universidad de Shanghai Jiao Tong de medicina (China)	SHhES1
Segunda universidad médica de Shanghai (China)	SH1; SH2; SH4; SH7; SH28; SH35; SH35a; SH38; SH39; SH42
Universidad Sun Yat-sen (China)	CHES-1; SYSU-1; SYSU-2
Hospital afiliado a la segunda universidad Sun Yat (China)	CHE-1; CHE-2; CHE-3
El tercer hospital afiliado del colegio médico de Guangzhou (China)	FY-hES-5; FY-hES-9; FY-hES-10;; FY-hES-11

Tabla 3: Listado de líneas celulares pluripotentes inducidas humanas (hiPS)

Institución	Línea celular
Universidad de Wisconsin - Madison (EE.UU)	1. IPS (FORESKIN) -1 (Normal; 46XY; Yu, J., <i>et al.</i> , [Thomson] Science. 2007 Líneas de células madre pluripotentes inducidas procedentes de células somáticas humanas 318(5858):1917-20.) 2. IPS (FORESKIN) -2 (Normal; 46XY; Yu, J., <i>et al.</i> , [Thomson] Science. 2007 Líneas de células madre pluripotentes inducidas procedentes de células somáticas humanas 318(5858):1917-20.) 3. IPS (FORESKIN) -3 (Normal; 46XY; Yu, J., <i>et al.</i> , [Thomson] Science. 2007 Líneas de células madre pluripotentes inducidas procedentes de células somáticas humanas 318(5858):1917-20.) 4. IPS (FORESKIN) -4 (Normal; 46XY; Yu, J., <i>et al.</i> , [Thomson] Science. 2007 Líneas de células madre pluripotentes inducidas procedentes de células somáticas humanas 318(5858):1917-20.) 5. IPS(IMR90)-1 (Normal; 46XX; Yu, J., <i>et al.</i> , [Thomson] Science. 2007 Líneas de células madre pluripotentes inducidas procedentes de células somáticas humanas 318(5858):1917-20.) 6. IPS(IMR90)-2 (Normal; 46XX; Yu, J., <i>et al.</i> , [Thomson] Science. 2007 Líneas de células madre pluripotentes inducidas procedentes de células somáticas humanas 318(5858):1917-20.) 7. IPS(IMR90)-3 (Normal; 46XX; Yu, J., <i>et al.</i> , [Thomson] Science. 2007 Líneas de células madre pluripotentes inducidas procedentes de células somáticas humanas 318(5858):1917-20.)

8. IPS(IMR90)-4 (Normal; 46XX; Yu, J., *et al.*, [Thomson] Science. 2007 Líneas de células madre pluripotentes inducidas procedentes de células somáticas humanas 318(5858):1917-20.)
9. IPS-SMA-3.5 (Normal; 46XY; Atrofia muscular espinal tipo 1; Ebert, AD, *et al.*, 2009. Células madre pluripotentes inducidas de un paciente con atrofia muscular espinal. Nature. 457: 277-80)
10. IPS-SMA-3.6 (Normal; 46XY; Atrofia muscular espinal tipo 1; Ebert, AD, *et al.*, 2009. Células madre pluripotentes inducidas de un paciente con atrofia muscular espinal. Nature. 457: 277-80)
11. IPS-WT (Normal; 46XX; Atrofia muscular espinal tipo 1; Ebert, AD, *et al.*, 2009. Células madre pluripotentes inducidas de un paciente con atrofia muscular espinal. Nature. 457: 277-80)
- Universidad de California, Los Angeles (EE.UU.)
1. IPS-1 (Karumbayaram, S. *et al.* 2009. La diferenciación dirigida de células madre inducidas por humanos genera células madre de neuronas motoras activas. 27: 806-811; Lowry, WE, *et al.* 2008. Generación de células madre pluripotentes inducidas humanas a partir de fibroblastos dérmicos Proc Natl Acad Sci EE.UU. 105: 2883-8)
2. IPS-2 (Karumbayaram, S. *et al.* 2009. La diferenciación dirigida de células madre inducidas por humanos genera células madre de neuronas motoras activas. 27: 806-811; Lowry, WE, *et al.* 2008. Generación de células madre pluripotentes inducidas humanas a partir de fibroblastos dérmicos Proc Natl Acad Sci EE.UU. 105: 2883-8)
3. IPS-5 (Lowry, WE, *et al.* 2008. Generación de células madre pluripotentes inducidas humanas a partir de fibroblastos dérmicos Proc Natl Acad Sci EE.UU. 105: 2883-8)
4. IPS-7 (Lowry, WE, *et al.* 2008. Generación de células madre pluripotentes inducidas humanas a partir de fibroblastos dérmicos Proc Natl Acad Sci EE.UU. 105: 2883-8)
5. IPS-18 (Karumbayaram, S. *et al.* 2009. La diferenciación dirigida de células madre inducidas por humanos genera células madre de neuronas motoras activas. 27: 806-811; Lowry, WE, *et al.* 2008. Generación de células madre pluripotentes inducidas humanas a partir de fibroblastos dérmicos Proc Natl Acad Sci EE.UU. 105: 2883-8)
6. IPS-24 (Lowry, WE, *et al.* 2008. Generación de células madre pluripotentes inducidas humanas a partir de fibroblastos dérmicos Proc Natl Acad Sci EE.UU. 105: 2883-8)
7. IPS-29 (Lowry, WE, *et al.* 2008. Generación de células madre pluripotentes inducidas humanas a partir de fibroblastos dérmicos Proc Natl Acad Sci EE.UU. 105: 2883-8)
- Instituto de investigación Samuel Lunenfeld del hospital Mt Sinai; EE.UU.)
1. (Woltjen, K. *et al.* 2009. La transposición de PiggyBac reprograma fibroblastos a células madre pluripotentes inducidas Nature. 458(7239):766-70)
2. 61 (Woltjen, K. *et al.* 2009. La transposición de PiggyBac reprograma fibroblastos a células madre pluripotentes inducidas Nature. 458(7239):766-70)
3. 66 (Woltjen, K. *et al.* 2009. La transposición de PiggyBac reprograma fibroblastos a células madre pluripotentes inducidas Nature. 458(7239):766-70)
4. 67 (Woltjen, K. *et al.* 2009. La transposición de PiggyBac reprograma fibroblastos a células madre pluripotentes inducidas Nature. 458(7239):766-70)
5. HIPSC117 (Kaji K, *et al.* 2009 Inducción de pluripotencia libre de virus y posterior escisión de factores de reprogramación Nature 458(7239):771-5)
6. HIPSC121 (Kaji K, *et al.* 2009 Inducción de pluripotencia libre de virus y posterior escisión de factores de reprogramación Nature 458(7239):771-5)
7. HIPSC122 (Kaji K, *et al.* 2009 Inducción de pluripotencia libre de virus y posterior escisión de factores de reprogramación Nature 458(7239):771-5)
- Hospital de niños- Boston (EE.UU.)
1. 551-IPS8 (Park IH, *et al.* 2008. Reprogramación de células somáticas humanas para la pluripotencia con factores definidos. Nature 451:141-6).
2. ADA-IPS2 ((ADA-SLID) Inmunodeficiencia combinada grave relacionada con la deficiencia adenosina deaminasa (GGG>AGG, exón 7, gen ADA); Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
3. ADA-IPS3 ((ADA-SLID) Inmunodeficiencia combinada grave relacionada con la deficiencia adenosina deaminasa (GGG>AGG, exón 7, gen ADA); Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
4. BJ1-IPS1 (Park, I. H. *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
5. BMD-IPS1 (macho; (BMD) Distrofia muscular de Becker (mutación en la distrofina no identificada); Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
6. BMD-IPS4 (noona; 46XY; (BMD) Distrofia muscular de Becker (mutación en la distrofina no identificada); Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
7. DH1CF16-IPS1 (normal; 46XY; Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
8. DH1CF32-IPS2 (macho; Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
9. DH1F-IPS3-3 (normal; 46XY; Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)

10. DMD-IPS1 ((normal; 46XY; DMD) Distrofia muscular de Duchenne (eliminación del exón 45-52, gen de la distrofina; Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
 11. DMD-IPS2 (macho; DMD) Distrofia muscular de Duchenne (eliminación del exón 45-52, gen de la distrofina; Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
 12. DS1-IPS4 (macho; síndrome de Down (trisomía 21); Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
 13. DS2-IPS1 (macho; síndrome de Down (trisomía 21); Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
 14. DS2-IPS10 (macho; síndrome de Down (trisomía 21); Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
 15. GD-IPSI (macho; (GD) Enfermedad de Gaucher tipo III (AAC> AGC, exón 9, inserción G, nucleótido 84 de ADNc, gen GBA; Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
 16. GD-IPS3 (macho; (GD) Enfermedad de Gaucher tipo III (AAC> AGC, exón 9, inserción G, nucleótido 84 de ADNc, gen GBA; Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
 17. HFIB2-IPS2 (Park, IH, et al., 2008. Generación de células madre pluripotentes inducidas por humanos Nat Protoc. 3: 1180-6; Park, IH *et al.* 2008. Reprogramación de células somáticas humanas para la pluripotencia con factores definidos. 451: 141-6)
 18. HFIB2-IPS4 (Park, IH, et al., 2008. Generación de células madre pluripotentes inducidas por humanos Nat Protoc. 3: 1180-6; Park, IH *et al.* 2008. Reprogramación de células somáticas humanas para la pluripotencia con factores definidos. 451: 141-6)
 19. HFIB2-IPS5 (Park, IH, et al., 2008. Generación de células madre pluripotentes inducidas por humanos Nat Protoc. 3: 1180-6; Park, IH *et al.* 2008. Reprogramación de células somáticas humanas para la pluripotencia con factores definidos. 451: 141-6)
 20. JDM-IPS1 (normal, 46XX; Diabetes mellitus juvenil (multifactorial); Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
 21. JDM-IPS1 (normal, 46XX; Diabetes mellitus juvenil (multifactorial); Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
 22. JDM-IPS2 (hembra; Diabetes mellitus juvenil (multifactorial); Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
 23. JDM-IPS3 (hembra; Diabetes mellitus juvenil (multifactorial); Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
 24. LNSC-IPS2 (hembra; síndrome de Lesch-Nyhan (portador, heterocigosidad de HPRT1; Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
 25. MRCS-IPS7 (macho; Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
 26. MRC5-IPS12 (normal; 46XY; Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
 27. MRC5-IPS1 (macho; Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
 28. PD-IPS1 (macho; la enfermedad del Parkinson (multifactorial), Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
 29. SBDS-IPS1 (macho; síndrome de Swachman-Bodian-Diamond (IV2 + 2T>C and IV3 - 1G>A, gen SBDS; Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Cell 134(5):877-86)
 30. SBDS-IPS2
 31. SBDS-IPS3 (normal; 46XY; síndrome de Swachman-Bodian-Diamond (IV2 + 2T>C and IV3 - 1G>A, gen SBDS; Park, IH *et al.* 2008. Células madre pluripotentes inducidas específicas de enfermedad Ce11134(5):877-86)
1. A29a (46XX; (ELA) esclerosis lateral amiotrófica (L144F [Leu144> Phe] alelo dominante del gen de la superóxido dismutasa (SOD1); caucásico; Dimos, J.T, et al., 2008. Las células madre pluripotentes inducidas generadas por pacientes con ELA pueden ser diferenciadas en neuronas motoras Science. 321: 1218-21)
 2. A29b (46XX; (ELA) esclerosis lateral amiotrófica (L144F [Leu144> Phe] alelo dominante del gen de la superóxido dismutasa (SOD1); caucásico; Dimos, J.T, et al., 2008. Las células madre pluripotentes inducidas generadas por pacientes con ELA pueden ser diferenciadas en neuronas motoras Science. 321: 1218-21)
 3. A29c (46XX; (ELA) esclerosis lateral amiotrófica (L144F [Leu144> Phe] alelo dominante del gen de la superóxido dismutasa (SOD1); caucásico; Dimos, J.T, et al., 2008. Las células madre pluripotentes inducidas generadas por pacientes con ELA pueden ser diferenciadas en neuronas motoras Science. 321: 1218-21)

Universidad de
Harvard
(EE.UU.)

Instituto Salk (EE.UU.)	<ol style="list-style-type: none"> 1. HAIR-IPS1 (Aasen, T., <i>et al.</i>, [Belmonte, JC] (2008). Generación eficiente y rápida de células madre pluripotentes inducidas a partir de queratinocitos humanos <i>Nat Biotechnol.</i> 26: 1276-84) 2. HAIR-IPS2 (Aasen, T., <i>et al.</i>, [Belmonte, JC] (2008). Generación eficiente y rápida de células madre pluripotentes inducidas a partir de queratinocitos humanos <i>Nat Biotechnol.</i> 26: 1276-84)
Instituto Royan (Irán)	<ol style="list-style-type: none"> 1. R.1.H.iPSC.1(OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos) 2. BOM.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos) 3. FHC.1.H.iPSC.3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos) 4. GSD.1.H.iPSC.7 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos) 5. TYR.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos) 6. HER.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos) 7. R.1.H.iPSC.4 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos) 8. R.1.H.iPSC.9 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos) 9. RP2.H.iPSC.3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; células iPS) 10. LCA.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; células iPS) 11. USH.1.H.iPSC.6 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos) 12. RP.1.H.iPSC.2 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos) 13. ARMD.1.H.iPSC.2 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos) 14. LHON.1.H.iPSC.5 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; células iPS) 15. CNS.1.H.iPSC.10 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; células iPS) 16. CNS.2.H.iPSC.7 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; células iPS)
Centro de medicina regenerativa en Barcelona (España)	<ol style="list-style-type: none"> 1. KiPS4F-1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; queratinocitos de prepucio humano; 46XY) 2. KiPS3F-7 (OCT4, Sox2, KLF4); queratinocitos de prepucio humano) 3. KiPS4F-8 (OCT4, Sox2, KLF4, queratinocitos de prepucio humano c-Myc; 46XY) 4. cFA404-KiPS4F-1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; queratinocitos epidérmicos; 46XY) 5. cFA404-KiPS4F-3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; queratinocitos epidérmicos; 46XY)
Universidad París-Sud 11 (Francia)	<ol style="list-style-type: none"> 1. PB03 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; amniocitos primarios; 46XX; lentivirus) 2. PB04 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; amniocitos primarios; beta-talasemia afectada; 46XY; lentivirus) 3. PB05-1 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; amniocitos primarios; beta-talasemia afectada; 46XY; lentivirus) 4. PB05 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; amniocitos primarios; beta-talasemia afectada; 46XY; lentivirus) 5. PB06 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; amniocitos primarios; síndrome de Down; 47XY, +21; lentivirus) 6. PB06-1 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; amniocitos primarios; síndrome de Down; 47XY, +21; lentivirus) 7. PB07 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; amniocitos primarios; 46XY; retrovirus) 8. PB08 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; amniocitos primarios; 46XY; retrovirus) 9. PB09 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; amniocitos primarios; 46XY; lentivirus) 10. PB10 (Oct4, Sox2; amniocitos primarios 46XY, lentivirus)
Universidad de Kioto (Japón)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 201B1 (fibroblasto humano; 46XX) 2. 201B2 (fibroblasto humano; 46XX) 3. 201B3 (fibroblasto humano; 46XX) 4. 201B6 (fibroblasto humano; 46XX) 5. 201B7 (fibroblasto humano; 46XX) 6. 243H1 (fibroblasto humano) 7. 243H7 (fibroblasto humano) 8. 246B1 (Normal, 46XX) 9. 246B2 (Normal, 46XX) 10. 246B3 (Normal, 46XX) 11. 246B4 (Normal, 46XX) 12. 246B5 (Normal, 46XX) 13. 246B6 (Normal, 46XX) 14. 246G1 (fibroblasto humano; Takahashi, K., <i>et al.</i>, 2007. Inducción de células madre pluripotentes de fibroblastos humanos adultos por factores definidos <i>Cell.</i> 131: 861-72) 15. 246G3 (fibroblasto humano; Takahashi, K., <i>et al.</i>, 2007. Inducción de células madre pluripotentes de fibroblastos humanos adultos por factores definidos <i>Cell.</i> 131: 861-72) 16. 246G4 (fibroblasto humano; Takahashi, K., <i>et al.</i>, 2007. Inducción de células madre pluripotentes de fibroblastos humanos adultos por factores definidos <i>Cell.</i> 131: 861-72) 17. 246G5 (fibroblasto humano; Takahashi, K., <i>et al.</i>, 2007. Inducción de células madre pluripotentes de fibroblastos humanos adultos por factores definidos <i>Cell.</i> 131: 861-72) 18. 246G6 (fibroblasto humano; Takahashi, K., <i>et al.</i>, 2007. Inducción de células madre pluripotentes de fibroblastos humanos adultos por factores definidos <i>Cell.</i> 131: 861-72) 19. 253F1 (Normal, 46XX; Takahashi, K., <i>et al.</i>, 2007. Inducción de células madre pluripotentes de fibroblastos humanos adultos por factores definidos <i>Cell.</i> 131: 861-72)

20. 253F2 (Normal, 46XX; Takahashi, K., et al., 2007. Inducción de células madre pluripotentes de fibroblastos humanos adultos por factores definidos Cell. 131: 861-72)
21. 253F3 (Normal, 46XX; Takahashi, K., et al., 2007. Inducción de células madre pluripotentes de fibroblastos humanos adultos por factores definidos Cell. 131: 861-72)
22. 253F4 (Normal, 46XX; Takahashi, K., et al., 2007. Inducción de células madre pluripotentes de fibroblastos humanos adultos por factores definidos Cell. 131: 861-72)
23. 253F5 (Normal, 46XX; Takahashi, K., et al., 2007. Inducción de células madre pluripotentes de fibroblastos humanos adultos por factores definidos Cell. 131: 861-72)
- Institutos de
Shanghai para
ciencias
biológicas
(China)
1. AFDC-IPS-6 (Li C., et al., 2009 La pluripotencia puede ser inducida rápida y eficientemente en células procedentes de fluido amniótico humano Hum Mol Genet. 15 nov de 2009; 18(22):4340-9)
2. IPS-S (Liao, J., et al., 2008. Mayor eficiencia de generación de células madre pluripotentes inducidas (iPS) de células somáticas humanas mediante una combinación de seis factores de transcripción Cell Res. 18: 600-3)

Ejemplo de referencia 1: Identificación de compuestos citotóxicos para células hES pero no células diferenciadas

- 5 **Cribado de compuestos candidatos inhibidores o citotóxicos para células madre embrionarias humanas (hESC).** Determinados compuestos se seleccionaron de la biblioteca de compuestos farmacológicamente activos (LOPAC), específicamente la colección LOPAC1280™ (Sigma-Aldrich, catálogo n.º LO1280). Los compuestos LOPAC1280™ son conocidos o tienen propiedades bien caracterizadas. La lista completa de LOPAC1280™ se puede ver en la web mundial en sigmaaldrich.com/chemistry/drug-discovery/validation-libraries/lopac1280-navigator.html. El cribado inicial se realizó usando un subconjunto de la biblioteca LOPAC1280™ que consistía en
- 10 176 compuestos que se seleccionaron porque eran inhibidores conocidos de las rutas de señalización celular, eventos de fosforilación o receptores y similares. Véase la Tabla 4, que enumera los 176 compuestos seleccionados. Estos compuestos se dispusieron en bandejas de 2 x 96 pocillos, incluyendo los pocillos de control que contenían DMSO.

15 **Tabla 4: 176 compuestos LOPAC1280™ seleccionados**

N.º	Compuesto	Acción
1	Acetamida	Inhibidor
2	Hemididrocloruro de O-(carboximetil)hidroxilamina	Inhibidor
3	Actinonina	Inhibidor
4	Oxalato de S(-)-p-bromotetramisol	Inhibidor
5	Acetazolamida	Inhibidor
6	4-androsten-4-ol-3,17-diona	Inhibidor
7	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico	Activador
8	Inhibidor de la diacilglicerol quinasa I	Inhibidor
9	Fulvestrant	SERD
10	Clorhidrato de fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo	Inhibidor
11	TBBz	Inhibidor
12	L-alilglicina	Inhibidor
13	Clorhidrato de betaína	Metabolito
14	SB 202190	Inhibidor
15	Budesonida	
16	BTO-1	Inhibidor
17	Clorhidrato de benzamidina	Inhibidor
18	ML-9	Inhibidor
19	Betametasona	
20	Clorhidrato de bestatina	Inhibidor
21	Corticosterona	
22	Clorhidrato de benserazida	Inhibidor
23	DAPH	Inhibidor
24	Cortisona	
25	Cloruro de queleritrina	Inhibidor
26	Ciclosporina A	Inhibidor
27	Roscovitina	Inhibidor
28	Cantaridina	Inhibidor
29	Clorotiazida	Inhibidor
30	Clorhidrato de beta-cloro-L-alanina	Inhibidor
31	Cloruro de calmidazolio	Inhibidor
32	Ácido 4-cloromercuribenzoico	Inhibidor
33	Clorhidrato de CGP-74514A	Inhibidor
34	Acetato de ciprosterona	Antagonista
35	Calcimicina	
36	Ácido cantárido	Inhibidor
37	Dafnetina	Inhibidor

ES 2 690 663 T3

38	Dihidrocloruro de Y-27632	Inhibidor
39	inhibidor de CK2 2	Inhibidor
40	1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinitol	Inhibidor
41	Inhibidor de la diacilglicerol quinasa II	Inhibidor
42	2,4-dinitrofenil 2-fluoro-2-deoxi-beta-D-glucopiranosido	Inhibidor
43	Trifostina AG 1296	Inhibidor
44	S-(-)-carbidopa	Inhibidor
45	P1,P4-di(adenosina-5')tetrafosfato triamonio	Inhibidor
46	SD-169	Inhibidor
47	PD 169316	Inhibidor
48	Defostatina	Inhibidor
49	2,4-diamino-6-pirimidona	Inhibidor
50	Dantroleno de sodio	Inhibidor
51	Ácido dietilentriaminopentaacético	Inhibidor
52	3,4-dicloroisocoumarino	Inhibidor
53	Clorhidrato de 1-deoxinojirimicina	Inhibidor
54	7-ciclopentil-5-(4-fenoxi)fenil-7H-pirrolo [2,3-d] pirimidin-4-ilamina	Inhibidor
55	DL-eritro-dihidroesfingosina	Inhibidor
56	(R,R)-cis-dietil tetrahidro-2,8-crisenediol	Antagonista
57	Clorhidrato de epibestatina	Inhibidor
58	2,2'-bipiridilo	Inhibidor
59	SP600125	Inhibidor
60	yoduro de AC-93253	Agonista
61	E-64	Inhibidor
62	SB 415286	Inhibidor
63	rac-2-etoxi-3-octadec anamido-1-propilfosfocolina	Inhibidor
64	Forskolina	Activador
65	Beta-estradiol	
66	GW2974	Inhibidor
67	GW5074	Inhibidor
68	Estrona	
69	Furegrelato de sodio	Inhibidor
70	Genisteína	Inhibidor
71	Endotal	Inhibidor
72	rac-2-etoxi-3-hexadec anamido-1-propilfosfocolina	Inhibidor
73	Emodina	Inhibidor
74	Flutamida	Inhibidor
75	17 alfa-hidroxiprogesterona	Metabolito
76	4-hidroxibenzidrazida	Inhibidor
77	Lodoacetamida	Inhibidor
78	1,3,5-tris(4-hidroxifenil)-4-propil-1H-pirazol	Agonista
79	HA-100	Inhibidor
80	Clorhidrato de HA-1004	Inhibidor
81	Hidrocortisona	
82	MNS	Inhibidor
83	ibudilast	Inhibidor
84	Hidroclorotiazida	Inhibidor
85	NSC 95397	Inhibidor
86	Hispidina	Inhibidor
87	Imazodán	Inhibidor
88	ML-7	Inhibidor
89	Kenpaulona	Inhibidor
90	LFM-A13	Inhibidor
91	Dihidrocloruro de 1-(5-isoquinolinilsulfonilo)-3-metilpiperazina	Inhibidor
92	Dihidrocloruro de 1-(5-isoquinolinilsulfonilo)-2-metilpiperazina	Inhibidor
93	Aurotioglucosa	Inhibidor
94	L-leucinetiol, dihidrocloruro oxidizado	Inhibidor
95	Clorhidrato de (-)- tetramisol	Inhibidor
96	K 185	Antagonista
97	Clorhidrato de LY-294.002	Inhibidor
98	Milrinona	Inhibidor
99	Miricetina	Inhibidor
100	8-metoximetil-3-isobutil-1-metilxantina	Inhibidor
101	BIO	Inhibidor
102	MK-886	Inhibidor

ES 2 690 663 T3

103	Melatonina	Agonista
104	Mifepristona	Antagonista
105	Inhibidor de PRL-3 I	Inhibidor
106	Dihidrocloruro de H-8	Inhibidor
107	Norcantaridina	Inhibidor
108	Clorhidrato de ZM 39923	Inhibidor
109	L-alfa-metil DOPA	Inhibidor
110	Me-3,4-defostatina	Inhibidor
111	Ácido de nordihidroguaiarético	Inhibidor
112	Nilutamida	Inhibidor
113	Olomoucina	Inhibidor
114	Ácido oleico	Activador
115	Progesterona	
116	Piceatanol	Inhibidor
117	NS 2028	Inhibidor
118	SB 216763	Inhibidor
119	TBB	Inhibidor
120	Pentoxifilina	Inhibidor
121	PD 404.182	Inhibidor
122	Cloruro de palmitoil-DL-carnitina	Modulador
123	ODQ	Inhibidor
124	Clorhidrato de papaverina	Inhibidor
125	Protoporfirina IX disodio	Activador
126	SU 6656	Inhibidor
127	monohidrato de 1,10-fenantrolina	Inhibidor
128	IC 261	Inhibidor
129	Bay 11-7082	Inhibidor
130	Clorhidrato de A3	Inhibidor
131	PD 98.059	Inhibidor
132	Forbol 12 -miristato 13-acetato	Activador
133	Cortexolona	Precursor
134	Inhibidor de IRAK-1/4 I	Inhibidor
135	Clorhidrato de raloxifeno	Modulador
136	Rotlerin	Inhibidor
137	Espironolactona	Antagonista
138	Fosforamidon de disodio	Inhibidor
139	PQ401	Inhibidor
140	SU 5416	Inhibidor
141	Clorhidrato de DL-estearoilcarnitina	Inhibidor
142	SU 4312	Inhibidor
143	Tirfostina AG 1478	Inhibidor
144	Tirfostina AG 528	Inhibidor
145	Tirfostina AG 112	Inhibidor
146	Tirfostina AG 494	Inhibidor
147	Tirfostina AG 537	Inhibidor
148	Tirfostina 1	Inhibidor
149	N-p-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona	Inhibidor
150	Tirfostina AG 555	Inhibidor
151	Tirfostina 23	Inhibidor
152	Tirfostina AG 490	Inhibidor
153	Tirfostina AG 698	Inhibidor
154	Tirfostina AG 34	Inhibidor
155	Tirfostina AG 879	Inhibidor
156	Tirfostina AG 527	Inhibidor
157	Tirfostina AG 808	Inhibidor
158	Triamcinolona	Agonista
159	Tetraisopropil pirofosforamida	Inhibidor
160	Tirfostina 25	Inhibidor
161	SQ 22536	Inhibidor
162	Clorhidrato de tetramisol	Inhibidor
163	Tolazamida	Liberador
164	Tirfostina AG 835	Inhibidor
165	Citrato de tamoxifeno	Inhibidor
166	U0126	Inhibidor
167	Tirfostina 47	Inhibidor
168	YC-1	Activador

169	Tirfostina 51	Inhibidor
170	Wortmannin de <i>Penicillium funiculosum</i>	Inhibidor
171	I-OMe-Trifostina AG 538	Inhibidor
172	Tirfostina A9	Inhibidor
173	CGP 57380	Inhibidor
174	Tirfostina AG 538	Inhibidor
175	Tapsigargina	Liberador
176	Tirfostina AG 126	Inhibidor

Los anteriores 176 compuestos seleccionados de la biblioteca completa LOPAC1280™ se usaron luego para cribar células madre pluripotentes humanas, *por ejemplo*, hESCs, y la diferenciación de cultivos durante la etapa 1 (endodermo definitivo) usando un ensayo de impedancia en tiempo real (Biosciences ACEA sistema RT-CES). El sistema RT-CES usa bandejas de 96 pocillos que contienen microsensores integrados para controlar los cambios en la impedancia eléctrica, lo que se traduce en una medida del índice celular. Se puede detectar cualquier alteración evidente dentro de un cultivo celular, que incluye, pero sin limitación, proliferación celular, migración, diseminación celular, apoptosis, diferenciación y similares. Experimentos anteriores han demostrado que las células hES se unen y se expanden de manera efectiva en las bandejas RT-CES. Un aumento en el índice celular indica la proliferación de las células, por ejemplo, la proliferación de las células indiferenciadas. La proliferación fue confirmada por RCP-C. Véase también la **Figura 1**. Una disminución o reducción en el índice celular (impedancia) indicó que el compuesto tenía un efecto inhibitorio o citotóxico sobre las células. Por el contrario, los compuestos inactivos, o los compuestos que se encuentran que no son inhibidores y/o citotóxicos, normalmente tienen índices celulares (impedancia) similares como los que se demostraron en el control de DMSO. Un índice de células "scallop" es aquel que permanece alto debido a un cultivo de células confluyente, pero descenderá y subirá (scallop) entre las alimentaciones diarias. Por el contrario, las células que experimentan diferenciación tienen patrones distintivos, tales como picos y valles en el índice celular, potencialmente indicativos de una transición epitelial a mesenquimal, aplanamiento, migración celular, apoptosis o diferenciación similar y cambios relacionados con el crecimiento.

Ensayo de impedancia para agentes inhibidores y citotóxicos. Las células madre pluripotentes humanas, *por ejemplo*, 2 x 10⁴ hESC (BG02), se cultivaron en DC-HALF, un medio definido basado en heregulina, con alimentación diaria en las placas de control de la impedancia. Después de aproximadamente 24 horas, y se añadieron 10 µM del compuesto LOPAC1280™ seleccionado a cada pocillo (véase la punta de flecha en las **Figuras 3A y B**) y se cultivaron durante aproximadamente 5 días adicionales. Siete compuestos (BTO-1 (comp. n.º 16), cloruro de queleritina (comp. n.º 25), defostatina (comp. n.º 48), Tirfostina AG 494 (AGA494; comp. n.º 146), Tirfostina AG 490 (AGA490; comp. n.º 152), SU 6656 (Comp. n.º 126) y ácido nordihidroguaiarético (NDGA; comp. n.º 111)) se identificaron porque causaban una disminución significativa en el índice (o impedancia) de la célula, lo que indicaba un efecto inhibitorio o citotóxico en las hESC, en comparación con el control de DMSO; que se llevaron a cabo en paralelo en el transcurso de estos estudios. El pico en la impedancia observado en el pocillo de defostatina alrededor de las 112 horas se debió a la contaminación y es un artefacto (**Figuras 3A**).

El ensayo de impedancia en las hESC que usa los compuestos en la **Tabla 4** anterior dio más de veinte (20) visitas. Sin embargo, el compuesto candidato ideal de la presente invención no solo debe ser inhibitorio o citotóxico para células madre pluripotentes humanas, tales como hESC o hPSC, sino que al mismo tiempo no debe afectar la viabilidad celular de poblaciones celulares diferenciadas o en diferenciación, incluidos los cultivos de células tipo de las etapas 1, 2, 3, 4 y 5 (endodermo definitivo, endodermo del tracto digestivo superior, endodermo del tracto digestivo superior posterior, endodermo pancreático y células endocrinas, respectivamente). Por lo tanto, los compuestos en la **Tabla 4** se cribaron luego en cultivos celulares diferenciadores de endodermo definitivo (DE) (**Figuras 3C y D**). Aproximadamente 3 x 10⁴ células Hes se sembraron en placas por pocillo y se desarrollaron durante 24 horas en medio definido DC-HAIF (es decir, medio StemPro® hESC SFM (Life Technologies, Carlsbad, CA). La etapa 1 o la diferenciación del endodermo definitivo se indujo luego cambiando el medio y cultivando en RPMI, 100 ng/ml de activina A, y 10 ng/ml de FGF2. 10 nM/ml de inhibidor de GSK-3 beta 15 (Calbiochem n.º 361558) se añadió al cultivo durante las primeras 24 horas de diferenciación solamente. Se añadieron 10 µM de cada uno de los compuestos candidatos aproximadamente 48 horas o 2 días después de la inducción de que se indujera la diferenciación (véase las **Figuras 3C y D**, punta de flecha grande), y las células se cultivaron durante 2 días adicionales. De los compuestos enumerados en la **Tabla 4**, los siguientes compuestos en la **Tabla 5** a continuación demostraron citotoxicidad o efectos inhibidores del crecimiento y proliferación de hESC mientras que al mismo tiempo aparentemente no afectaron la viabilidad celular de las hESC en diferenciación o las células de endodermo diferenciadas.

Tabla 5: Selección de los compuestos LOPAC1280™ candidatos

Comp. n.º (Tabla 4)	Nombre del compuesto	Actividad	Objetivo	Descripción	Viabilidad de endodermo definitivo
16	BTO-1	Inhibidor	Plk	inhibidor de las quinasa de tipo Polo (Plk)	Viable

25	Cloruro de queleritrina	Inhibidor	PKC	Inhibidor de PKC; afecta a la translocación de PKC de citosol de la membrana plasmática	Viable
48	Defostatina	Inhibidor	CD45	inhibidor de la proteína tirosina quinasa CD45	Viable
111	Ácido nordihidroguaiarético	Inhibidor	Lipoxigenasa	Inhibidor de la lipooxigenasa	
125	Protoporfirina IX	Activador	Guanililo	Activa la guanilil ciclasa soluble	
126	SU 6656	Inhibidor	Familia Src	Inhibidor selectivo de la quinasa de la familia Src	Viable
142	SU 4312	Inhibidor	KDR	Inhibidor de VEGFR1/2 y PDGFR	
146	Tirfostina AG 494	Inhibidor	EGFR	inhibidores de la proteína tirosina quinasa; inhibe la actividad del receptor quinasa del EGF	
150	Tirfostina AG 555	Inhibidor	EGFR	inhibidor de la proteína tirosina quinasa EGFR	N/D
152	Tirfostina AG 490	Inhibidor	JAK2	inhibidores de la proteína tirosina quinasa Jak-2	Viable

Cribado secundario con compuestos seleccionados. Se realizó un cribado secundario usando 9 de los 10 compuestos candidatos en la **Tabla 5** añadiendo los compuestos para diferenciar los cultivos de la etapa 1 (endodermo definitivo) como se describió anteriormente. Para el cribado secundario, se usaron bandejas convencionales de 6 pocillos más grandes en lugar de las placas de cultivo RT-CEAS de 96 pocillos usadas en los cribados primarios que empleaban ensayos de impedancia. Solo se ensayaron 9 de los 10 compuestos en la **Tabla 5**, porque los 10 no estaba disponible en cantidad suficiente en el momento en que se realizaron los ensayos. En las bandejas más grandes de 6 pocillos, 5 de los 9 compuestos enumerados en la **Tabla 5** no tuvieron ningún efecto sobre la viabilidad para diferenciar células o endodermo definitivo diferenciado. Dicho de otra manera, las células de endodermo definitivas eran capaces de crecimiento y proliferación en presencia de los siguientes cinco compuestos: cloruro de queleritrina (Ch.Cl; comp. n.º 25), defostatina (Def.; comp. n.º), SU 6656 (SU; comp. n.º 126) y tirfostina AG 490 (AG490; comp. n.º 152). Este ensayo también confirmó que la viabilidad para diferenciar células y células endodérmicas definitivas diferenciadas era aparentemente uniforme independientemente del número de células analizadas, o del tamaño, volumen o fuente del vaso de cultivo.

Cribado de efectos en las etapas 1-5 de diferenciación. Para determinar aún más si estos 5 compuestos candidatos añadidos en la etapa 1 afectaron a otros tipos de células diferenciadas (*por ejemplo*, etapas 2-5: endodermo del tracto digestivo superior, endodermo del tracto digestivo superior posterior, endodermo pancreático y células precursoras endocrinas, respectivamente), hES se diferenciaron en presencia o ausencia de compuestos, y se tomaron muestras de ARN en diversas etapas para el análisis de expresión génica por RCP-C.

los niveles de expresión génica se trazaron en relación con un control tratado con DMSO al final de la etapa 1 (**Figura 4**), y en relación con los agregados hESC indiferenciados (**Figuras 5 y 6**). Véase "Control" en las **Figuras 4, 5 y 6**. Los cultivos tratados con cloruro de queleritrina (Ch.Cl; comp. n.º 25); defostatina (Def; comp. N.º 248); SU 6656 (SU; comp. n.º 126) y tirfostina AG 490 (AG; comp. 152) mostraron una sutil disminución relativa en la expresión del gen OCT4 y NANOG (**Figuras 4A y 4B**, 2ª, 3ª, 5ª y 6ª barras) en comparación con el control DMSO (**Figuras 4A y 4B**, 1ª barra). Los compuestos de cloruro de queleritrina, defostatina, SU 6656 y tirfostina AG 490 causaron cada uno un aumento en la expresión del gen SOX17 en comparación con el control DMSO, uniforme con el perfil de expresión génica para cultivos de células de endodermo definitivas de la etapa 1 (**Figura 4D**). Sin embargo, tirfostina AG 490 (AG) y SU 6656 (SU) causaron cada uno una disminución en la expresión de FOXA2 (HNF313) en comparación con el control de DMSO, lo que indica efectos adversos de estos dos compuestos en el endodermo definitivo (**Figura 4C**). Sin embargo, ninguno de los compuestos pareció afectar sustancialmente la expresión de marcadores de endodermo no definitivos, incluidos SOX7, PAX6 o ZIC1 (**Figuras 4E, 4F y 4G**), y no fueron, por lo tanto, excluidos sobre la base de inducir la diferenciación a otros tipos de células. BTO-1 (BT01; comp. n.º 16) no pareció tener ningún efecto (**Figuras 4A, 4B, 4C y 4D**) y, por lo tanto, fue excluido de un análisis posterior. Este compuesto no disminuyó la expresión de OCT4 o NANOG, ni aumentó la expresión de FOXA2 (HNF3(3) o SOX17, como se hubiera esperado de un inhibidor/agente citotóxico selectivo de células madre pluripotentes.

Efectos del inhibidor candidato/agentes citotóxicos en el cultivo de agregados en suspensión. El inhibidor ideal candidato para terapia celular sería compatible con la viabilidad del linaje de células pancreáticas en un proceso de escalamiento de fabricación (por ejemplo, un cultivo de agregados en suspensión que podría propagarse en un biorreactor grande), así como en cultivos de células a pequeña escala, como en placas de 96 pocillos o bandejas de 6 pocillos. Por lo tanto, un cribado adicional incluía condiciones similares a las de un proceso a escala comercial. Como se ha señalado anteriormente, debido a que BTO-1 no pareció tener ningún efecto sobre OCT4,

NANOg, FOXA2 o SOX17, no se incluyó en este experimento. Los 4 compuestos restantes, cloruro de queleritrina (Ch.Cl; comp. n.º 25) y tirfostina AG 490 (AG; comp. n.º 152), defostatina (Def; comp. n.º 48) y SU 6656 (SU; comp. n.º 126) se cribaron para una inhibición selectiva del crecimiento de células madre pluripotentes en un cultivo de tipo agregado en suspensión, que es susceptible de un proceso de escalonamiento de fabricación. En pocas palabras, las ESC humanas se agregaron en cultivo rotacional y se diferenciaron a través de las etapas 1-4 para fabricar el endodermo pancreático sustancialmente como se describe en la solicitud de Patente de los EE.UU. n.º 11/838.054, titulada COMPOSICIONES Y MÉTODOS ÚTILES PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS DIFERENCIABLES, presentada el 13 de agosto de 2007; y la solicitud de Patente de los EE. UU. n.º 12/264.760, titulada COMPUESTOS EN SUSPENSIÓN DE AGREGADOS DE CÉLULAS MADRE Y MÉTODOS DE DIFERENCIACIÓN DE LOS MISMOS, presentada el 4 de noviembre de 2008. Se recogieron muestras de ARN de control y cultivos de células tratadas con compuestos en diversos momentos durante la diferenciación como anteriormente, para el análisis por RCP-C. Las Figuras 5A-5M muestran la expresión de marcadores característicos de células madre pluripotentes o al menos una de las etapas 1-5. Las Figuras 6A-6F muestran la expresión de marcadores que normalmente no se expresan en células madre pluripotentes o las etapas 1-5. Cada gráfico incluye 5 secciones: las muestras de RCP se normalizaron hasta el día 0 (hESC), que es la sección "control" más a la izquierda en cada gráfico de las Figuras 5A-5M; las otras cuatro secciones a la derecha de la sección de control corresponden a los cuatro compuestos usados para tratar las células (cloruro de queleritrina (Ch.Cl; comp. n.º 25); Tirfostina AG 490 (AG490; comp. n.º 152), defostatina (Def; comp. n.º 48) y SU 6656 (SU6656; comp. n.º 126) de izquierda a derecha, respectivamente). Los controles incluyeron células no tratadas (d0 y d2) y células tratadas con DMSO (d3, d5, d7, d9 y d11 (de izquierda a derecha). El análisis de los datos mostró que 3 de los 4 compuestos, cloruro de queleritrina, defostatina, y SU 6656 aumentó la expresión del gen PDX1 y NKX6.1 en las etapas 2, 3 y 4 (tracto digestivo superior, tracto digestivo superior posterior y endodermo pancreático, respectivamente) en comparación con los controles. Véase las Figuras 5H y 5K, últimas 3 barras. Los cultivos tratados con tirfostina AG 490 tenían expresión génica reducida para al menos PDX1 y NKX6.1, lo que sugiere una pobre diferenciación del endodermo pancreático. Véase las Figuras 5H e 5L. Además, el análisis de marcadores de tipos de células de endodermo no pancreáticas (Figuras 6A-6F.) indicó que tirfostina AG 490 y SU 6656 indujeron la expresión génica elevada de AFP y CDX2, respectivamente. Véase las Figuras 6E e 6F.

Los paradigmas de cribado descritos anteriormente describen un enfoque para la identificación de compuestos que muestran citotoxicidad selectiva hacia e/o inhiben el crecimiento y proliferación de hESC indiferenciadas mientras que al mismo tiempo tienen un efecto sustancialmente pequeño o nulo en la diferenciación de hESC y/o células diferenciadas, incluidas las células de las etapas 1, 2, 3 y 4 (endodermo definitivo, endodermo del tracto digestivo superior, endodermo del tracto digestivo superior posterior, progenitores pancreáticos o endodermopancreático, respectivamente).

Ejemplo de referencia 2: Identificación de los compuestos selectivos citotóxicos/inhibidores en la colección completa de LOPAC1280™

Para expandir el número de posibles compuestos citotóxicos e inhibidores hESC candidatos, se cribó la colección completa LOPAC1280™ (que contiene 1280 compuestos). En el cribado primario, se analizó la citotoxicidad en hESC indiferenciadas (aproximadamente 3×10^4 células BG01) en 16 bandejas convencionales de 96 pocillos, en medio DC-HAIF definido en MATRIGEL™ factor de crecimiento reducido diluido 1: 200, que se alimentaron diariamente (Figura 7A). Se añadieron 10 μ M de cada compuesto a las hESC un día después de la siembra en placas, y las células se cultivaron durante 2 días adicionales. Las placas se fijaron luego y se tiñeron con fosfatasa alcalina (AP) para identificar disminuciones relativas en la proliferación o crecimiento de hESC (como tinción de AP reducida), indicativo de menores proporciones de hESC. Véase los pocillos marcados por un círculo en la Figura 7A.

Además, la colección completa de LOPAC1280™ también se cribó para determinar los efectos sobre las células progenitoras neurales (NPC) procedentes de hESC. Se sembraron en placas progenitores neurales en medio acondicionado Medll libre de suero a 6×10^4 células/pocillo y se alimentaron diariamente. Dos días después de la siembra en placa, se añadieron 10 μ M de cada compuesto y las células se cultivaron durante 2 días adicionales. Las placas se fijaron y se tiñeron con violeta cristal, una tinción celular general que es capaz de revelar la proliferación relativa o actividad de crecimiento. La reducción de la tinción violeta cristal indicaba una menor proporción de NPC. Véase los pocillos marcados por un círculo en la Figura 7B. Las columnas izquierda y derecha de las placas LOPAC1280™ de las que se dispensaron los compuestos estaban vacías y se utilizaron como controles no tratados. Se identificaron aquellas muestras de hESC o NPC que mostraban citotoxicidad y/o inhibición del crecimiento (es decir, AP reducida o tinción con violeta cristal). Véase los pocillos marcados por un círculo en las Figuras 7A y 7B. Los cribados primarios identificaron cuarenta y uno (41) compuestos diferentes que muestran algún efecto citotóxico o inhibidor sobre al menos dos tipos de células diferentes, hESC y NPC. Véase la Tabla 6 a continuación que enumera el nombre y la clase de actividad de cada compuesto candidato identificado en este cribado (excepto el cloruro de queleritrina, que se enumera en la Tabla 5). ChCl no se incluyó en la siguiente ronda de cribado. Por lo tanto, solo 40 compuestos se analizaron más.

Usando un intervalo de diferentes concentraciones de 0,1 a 50 μ M, los cuarenta compuestos de la Tabla 6 se volvieron a cribar (cribado secundario) usando hESCS y NPC. La dosis efectiva (DE) se definió como la concentración más baja de un compuesto que provocó citotoxicidad durante el cribado secundario. La Figura 8

muestra los resultados de la tinción de los pocillos que contienen células con AP. Los pocillos más oscuros fueron indicativos del aumento del número o porcentaje de proliferación o crecimiento de células madre pluripotentes en los pocillos. Además, estos 40 compuestos se cribaron para diferenciar cultivos de células de endodermo definitivos (ED) en ensayos de impedancia de placa de 96 pocillos (descritos anteriormente) para determinar cuáles de estos compuestos no eran citotóxicos para células de endodermo definitivas a la dosis efectiva más baja en hESC o NPC. Los compuestos que no parecían ser citotóxicos para diferenciar los cultivos ED se marcaron como "viables", lo que significa que el compuesto no afectó a la supervivencia, el crecimiento, la proliferación o la diferenciación de las células diferenciadas. Véase la columna "ACEA ED" en la **Tabla 6** Veinte (20) compuestos, incluyendo dos (2) que fueron identificados en el cribado enfocado anterior (véase el Ejemplo 1) fueron citotóxicos a hESC pero al mismo tiempo no afectaban aparentemente la supervivencia, el crecimiento, la proliferación o la diferenciación de las células de endodermo definitivas (ED).

Tabla 6: Dosis efectiva más baja de los 40 compuestos candidatos LOPAC1280™

Cat. N.º	PM	Nombre	Clase	ED hESC (µM)	ED NPC ACEA DE (µM)	
L6668	648,20564	Clorhidrato de lercanidipina	Canal de calcio	10	10	
A 9809	429,92885	Clorhidrato de amsacrina	Reparación de ADN	1	0,1	
B 7651	280,36728	Brefeldin A de <i>Penicillium</i>	Citoesqueleto	<0,1	<0,1	
C 8221	284,31467	Éster fenético del ácido caféico	Ciclo celular	<0,1	5	Viable
C 3930	687,71276	Cloruro de calmidazolol	Intracelular	5	5	Viable
C 9510	110,11352	Pirocatecol	Ciclo celular	5	5	Viable
C 5982	256,69363	7-cloro-4-hidroxi-2-fenil-1,8-naftiridina	Adenosina	5	5	Viable
C 7522	523,63474	Calcimicina	Intracelular	1	<0,1	
D 3768	527,5861	Cloruro de decualinio hidrato	Canal de K+	5	5	
D 0670	586,68277	Dihidroouabaína	Bomba de iones	1	<0,1	
D 2926	314,55496	Cloruro de difenilenyodo	Óxido nítrico	0,1	<0,1	
C-191	376,90842	Capsazepina	Vaniloide	5	25	Viable
D-122	425,92188	Domperidona	Dopamina	25	0,1	Viable
E 2375	553,57509	Dihidrocloruro de emetina hidrato	Apoptosis	<0,1	0,1	
A9605	488,4375	yoduro de AC-93253	Hormona	5	<0,1	
H 7779	391,55841	p-hidroxianilida de ácido retinoico	Ciclo celular	1	5	Viable
U 6881	466,66969	U-73343	proteína G	10	5	Viable
N 0287	564,5766	NNC 55-0396	Canales de Ca ²⁺	25	5	
1-146	510,29433	IB-MECA	Adenosina	50	>50	
I8898	875,11658	Ivermectina	Colinérgico	5	>50	Viable
L 2037	242,27703	beta-lapachona	Apoptosis	5	5	
M 6383	302,41727	2-metoxiestradiol	Hormona	10	1	
M 5441	568,56485	Dihidrocloruro de mibefradil	Canales de Ca ²⁺	25	25	
L-119	598,48582	Oxalato de L-703.606	Taquiquinina	25	>50	
M 3184	437,36781	MG 624	Colinérgico	0,1	5	Viable
N 5023	302,37364	Ácido nordihidroguaiarético de Larrea	Leucotrieno	5	5	Viable
P 0547	592,69217	Isetionato de pentamidina	Glutamato	1	25	Viable
P 4405	414,41584	Podofilotoxina	Citoesqueleto y	<0,1	<0,1	Viable
O 3125	584,66683	Ouabaína	Bomba de iones	<0,1	<0,1	
Q 3251	472,88999	Dihidrocloruro de quinacrina	Neurotransmisión	10	25	Viable
P 8293	562,67448	Protoporfirina IX disodio	Nucleótidos cíclicos	10	>50	Viable
S 9692	371,46152	SU 6656	Fosforilación	25	>50	Viable
P 8765	164,29279	Amonio	Óxido nítrico	10	>50	Viable
02139	417,63751	N-oleoildopamina	Neurotransmisión	5	1	Viable
S 7809	402,92509	SKT 96365	Canales de Ca ²⁺	25	5	Viable
S-009	349,40249	PAPP	Serotonina	25	>50	
T 3434	294,31273	Tirfostina AG 490	Fosforilación	25	10	Viable
S-201	557,09781	Clorhidrato de SB 224289	Serotonina	25	50	
T 9652	471,68907	Terfenadina	Histamina	25	10	
V 1377	909,0741	Sal sulfato de vinblastina	Citoesqueleto	<0,1	<0,1	

Los veinte compuestos candidatos anteriores (**Tabla 6**: ACEA DE "viable") se cribaron luego usando hESC diferenciadas en cultivo de agregados en suspensión. Las CES humanas (células CyT49) se cultivaron y se diferenciaron en suspensión a través de la etapa 1 (endodermo definitivo) y la etapa 2 (endodermo del tracto intestinal superior). La dosis efectiva más baja para cada compuesto se determinó como se describió anteriormente y se muestra en la **Tabla 6**, y los cultivos celulares de diferenciación se expusieron a esta concentración de compuesto desde el día 1 (d1) hasta el día 2 (d2). Los cultivos se diferenciaron aún más al final de la etapa 2 (aproximadamente el día 5, d5). Se recogieron muestras de ARN a d2 y d5 para el análisis de la expresión del gen

marcador mediante RCP-C. Las muestras tratadas con compuesto se compararon con las muestras en diferenciación de control no tratadas, y se normalizaron a una muestra d2 a partir de una diferenciación de endodermo definitiva anteriormente calificada. Véase los controles de la **Figura 9**. Varios compuestos se eliminaron de la consideración adicional porque los agregados diferenciadores tratados se deterioraron, no eran viables o no se podían examinar mediante RCP-C. Varios compuestos adicionales se eliminaron de una consideración adicional porque parecían inducir una diferenciación fuera del objetivo (linaje no endodermo o linaje no pancreático) y una expresión aumentada de PAX6 o CDX2 (**Figuras 9G y 9H**).

Para determinar aún más los efectos de los compuestos anteriores (excluyendo los compuestos que inducen la diferenciación fuera del objetivo), tres compuestos seleccionados (cloruro de queleritrina (**Figuras 5 y 6**), ácido cafeico e ivermectina) se cribaron para determinar los efectos en etapas posteriores de la diferenciación pancreática, (como las etapas 2-5). Las ESC humanas se diferenciaron primero a través de la etapa 1 y luego a las etapas 2 a 5 en cultivos de agregados en suspensión similares a los anteriores. Los cultivos de la etapa 1 se trataron con DMSO, ácido cafeico o ivermectina sustancialmente como se describió anteriormente. Las muestras de control no tratadas se recogieron en d0 (hESC) y d1 (**Figura 10**, estudio de panel izquierdo), mientras que las muestras tratadas se recogieron los días 2, 3, 5, 7, 9, 11 y 13 (**Figura 10** d2, d3, d5, d7, d9, d11 y d13, respectivamente). Los niveles de expresión génica en las muestras recogidas se analizaron usando RCP-C y se compararon con la muestra d0 (hESC) así como con el endodermo pancreático calificado (**Figura 10**, estudio de panel derecho). El control del endodermo pancreático calificado consistió en aproximadamente un 50 % de endodermo pancreático, aproximadamente un 46 % de células endocrinas y aproximadamente un 4 % de "otras" células, según lo determinado por citometría de flujo. Ni el ácido cafeico ni la ivermectina afectaron la supervivencia, el crecimiento y/o la proliferación de las diferenciaciones del endodermo pancreático. Es decir, los compuestos seleccionados inhibieron o evitaron el crecimiento y la proliferación de hESC o fueron citotóxicos para hESC, mientras que al mismo tiempo no afectaron la viabilidad del endodermo pancreático. Los niveles típicos de expresión génica para las células de las etapas 3, 4 y 5 fueron normales; por ejemplo, se observó un aumento de la expresión de NKX6.1 y PTF1A en la etapa 4, endodermo pancreático (**Figura 10H y 10I**), y de NGN3 y NKX2.2 en la etapa 5, precursores endocrinos y células endocrinas (**Figura 10F y 10G**).

En resumen, los tres (3) candidatos finales identificados de los cribados principal y secundario del Ejemplo de referencia 1 y el cribado completo de la colección LOPAC1280™ del Ejemplo de referencia 2 fueron cloruro de queleritrina, ácido cafeico e ivermectina. La **Figura 11** enumera el(los) modo(s) de acción conocidos o inferidos para estos tres compuestos, así como sus estructuras. Los valores CE₅₀ para los respectivos efectos citotóxicos sobre hESC indiferenciadas que crecen en cultivo adherente se determinaron usando ensayos de impedancia en tiempo real.

Ejemplo de referencia 3: Selección contra células madre pluripotentes en una población celular diferenciada

Con el fin de rastrear la presencia o el agotamiento de células madre pluripotentes indiferenciadas en un cultivo celular (por ejemplo, una población de cultivos celulares diferenciadores o diferenciados), se desarrolló un ensayo para mejorar la detección y, por lo tanto, el agotamiento de las células madre pluripotentes. Aunque los cambios en la expresión de ARNm se pueden medir mediante RCP-C, solo este método no es suficientemente dinámico para detectar una disminución en los niveles ya bajos de células madre pluripotentes indiferenciadas. De forma similar, la detección inmunofluorescente (o inmunohistoquímica) de la proteína OCT4 sola durante la etapa 1 (diferenciación endodérmica definitiva) no es definitiva, porque las células en el proceso de diferenciación pueden parecer que todavía expresan niveles bajos o a veces intermedios de esta proteína, *por ejemplo*, las células hES que inician la transición a células de endodermo definitivas pueden ser positivas conjuntamente para OCT4⁺/SOX17.

Se formaron agregados de suspensión de células ES humanas en cultivo rotacional como se describió anteriormente y se diferenciaron a través de la etapa 1 (endodermo definitivo). A continuación, se sembraron en placas aproximadamente 20-30 agregados por pocillo en placas de cultivo tisular de 4 pocillos recubiertas con MATRIGEL® diluido 1: 200 y se cultivaron durante 24 horas en medio hESC (DMEM/F12, 10 % XF-KSR, 10 ng/ml de activina A y 10 ng/ml de heregulin). Este enfoque está destinado a aumentar el contraste en la expresión de OCT4 entre hESC indiferenciadas y células comprometidas con la diferenciación. En presencia de heregulin-ERBB2/3 y señalización insulina-insulina R/IGF1R, hESC indiferenciadas deben mostrar fuerte expresión del gen OCT4, mientras que las células comprometidas con la diferenciación deben mostrar regulación negativa de la expresión del gen OCT4. Dicho de otra manera, los cultivos de células de población mixta en medio hESC soportarían potencialmente la expansión/proliferación de indiferenciados residuales (hESC), por lo que muestran una mayor expresión del gen OCT4, en comparación con las células comprometidas con la diferenciación, que habrían disminuido la expresión del gen OCT4. Los agregados en placa se inmunotiñeron para la proteína OCT4 y se contratiñeron con DAPI, una tinción nuclear (**Figura 12**). Los agregados celulares que se sembraron en placa se aplanaron y se extendieron dentro de un período de 24 horas; mientras que los centros de los agregados todavía estaban abovedados. Las cúpulas eran visibles, lo que sugiere que estaban en el orden de solo 2040 micrómetros de altura. Las células positivas para OCT4 con tinción brillante se identificaron fácilmente y se distinguieron de la mayoría de las células negativas para OCT4. Las células positivas para OCT4 generalmente se encontraron en grupos y, con mayor frecuencia, dentro del área abovedada de un agregado sembrado en placa. Normalmente, solo se observó un solo grupo positivo para OCT4 en los agregados sembrados en placa más pequeños, mientras que los agregados más

grandes tenían 2 o más grupos. Véase las Figuras **12A y 12B** en comparación con las **Figuras 12C-E**. El análisis de los cultivos de células teñidas con DAPI sugirió que los agregados más grandes consistían en agregados más pequeños porque cuando se identificaban múltiples grupos positivos para OCT4, cada uno parecía estar asociado con un agregado o subregión diferente más pequeño dentro del agregado más grande. Los agregados más pequeños que residen en un agregado más grande se pueden producir como resultado de las etapas iniciales del cultivo rotacional, o el proceso de agregación, durante el cual se forman inicialmente pequeños grupos (agregados primarios). La agregación de dos o más agregados primarios probablemente conduzca a la formación de agregados secundarios más grandes, que pueden tener un diámetro de 100-150 μm . Por lo tanto, es posible que existan grupos individuales de células positivas para OCT4 en el centro de un agregado primario y resistan la diferenciación. Dichas agrupaciones permanecerían sustancialmente indiferenciadas y teñirían positivo para OCT4. Una hipótesis es que los agregados primarios se especifican para la diferenciación en relación con su posicionamiento en los agregados primarios y secundarios. Por ejemplo, **Las Figuras 12A a 12E** muestran una serie representativa de imágenes, desde agregados sembrados en placa pequeños (primarios) (por ejemplo las **Figuras 12A y 12B**) y más grandes (secundarios) (por ejemplo las **Figuras 12C-12E**) que contienen grupos positivos para OCT4 (círculos oscuros). Por lo tanto, es posible que alterar el proceso y/o la cinética de agregación pueda mejorar la eficiencia general de la diferenciación, pero también tener una influencia sobre aquellas células aparentemente resistentes a la diferenciación o no diferenciadas.

Se examinó el agotamiento de las células positivas para OCT4 durante la diferenciación de la etapa 1 usando el ensayo de sembrado en placas descrito anteriormente. Las diferenciaciones de la etapa 1 de células HES se trataron desde el día 1 a 2 con los compuestos candidatos como se describe en el Ejemplo 2 (cloruro de queleritina, ácido cafeico e ivermectina), en sus CE_{50} para células hES. Los agregados sembrados en placa no tratados fueron indistinguibles, y ambos contenían grupos discretos de células positivas para OCT4. Véase los estudios de panel superior e inferior de la **Figura 13A** para un ejemplo tratado con DMSO. La intensidad de la tinción positiva para OCT4 en cultivos celulares de agregados diferenciados tratados con DMSO (control) fue equivalente a células hES indiferenciadas. Sin embargo, los cultivos celulares de agregados tratados con cloruro de queleritina 1,4 μM (**Figura 13B**), ivermectina 0,17 μM (**Figura 13C**), o ácido cafeico 0,1 μM (**Figura 13E**) mostraron una intensidad significativamente disminuida para la tinción OCT4. Los grupos de células que eran positivas para OCT4 fueron observables, pero a niveles mucho más bajos en comparación con los controles no tratados o DMSO. Aun así, en otro estudio, el tratamiento con ácido cafeico 0,1 μM causó una disminución aún más sustancial en el tamaño de los grupos positivos para OCT4 presentes 24 horas después de la siembra en placa en el medio hESC. Véase la **Figura 14**.

Se realizaron experimentos adicionales usando concentraciones más altas de compuestos y efectos prolongados de los compuestos en agregados sembrados en placa de cultivo celular en medio hESC durante 24 o 72 horas antes de la tinción (**Figuras 15 y 16**). El tiempo prolongado de cultivo en medio hESC apoyó una expansión general del tamaño de los grupos positivos para OCT4 de agregados tratados con DMSO (**Figura 15A**), sugiriendo fuertemente que las células podrían proliferar para generar células adicionales indiferenciadas que no estaban comprometidas con la diferenciación. Otro grupo de cultivos diferenciadores de la etapa 1 se procesaron en paralelo, pero se trataron con 10 μM de cloruro de queleritina. El cloruro de queleritina dio como resultado un número sustancialmente menor de células positivas para OCT4 24 horas después de la siembra. Aproximadamente a las 72 horas, las células positivas para OCT4 parecían haber proliferado, pero claramente por debajo del alcance observado para las células positivas para OCT4 en los cultivos de control. De forma similar, en agregados de suspensión celular tratados con ácido cafeico de 5 o 10 μM (**Figura 16**) los grupos de células positivas para OCT4 parecían de menor tamaño en comparación con aquellos en controles tratados con DMSO (o no tratados) a las 24 horas, y no se expandieron sustancialmente en comparación con el control tratado con DMSO a las 72 horas. Véase la **Figura 16**.

Estos datos indican que si se mantienen y se exponen al medio hESC, las células pluripotentes indiferenciadas pueden persistir hasta el final de una diferenciación de 2 días en la etapa 1, y son capaces de proliferar y mantener su estado indiferenciado o pluripotente como lo indica la presencia de expresión de la proteína OCT4. El tratamiento con los compuestos citotóxicos selectivos candidatos que incluyen, al menos, cloruro de queleritina y ácido cafeico, reduce las proporciones (o números) de células positivas para OCT4 en comparación con los controles no tratados o DMSO; así como también la disminución de la persistencia de células positivas para OCT4 en cultivos de más largo plazo. El uso de compuestos citotóxicos pluripotentes selectivos puede por lo tanto reducir efectivamente los niveles de células indiferenciadas o pluripotentes, y potencialmente si se implantan para terapia celular, en última instancia, reducir las frecuencias de teratomas *in vivo*. Además, la reducción de niveles de células indiferenciadas o pluripotentes puede reducir aún más la posible hiperproliferación de linajes indeseables fuera del objetivo (no endodermo) en terapias basadas en células, tales como aquellas para el tratamiento de diabetes de tipo I y II.

Ejemplo de referencia 4: Identificación de compuestos selectivos citotóxicos/inhibidores adicionales

También es de interés identificar compuestos que son selectivamente citotóxicos o inhibidores hacia tipos de células fuera del objetivo o no de endodermo, así como compuestos útiles en la diferenciación de hESC con otros tipos de células. Los compuestos citotóxicos e inhibidores de hESC y/o los compuestos inhibidores y citotóxicos candidatos adicionales, tales como las bibliotecas de compuestos, se criban para detectar actividad inhibidora o citotóxica

selectiva. En un cribado primario, se prueba la citotoxicidad en hESC, linaje de endodermo (es decir, células de linaje de endodermo pancreático o no pancreático), linaje de ectodermo o células de linaje de mesodermo. Aproximadamente 3×10^4 células/pocillo de bandejas convencionales de 96 pocillos, se desarrollan en un medio adecuado y se alimentan diariamente. Se añaden $10 \mu\text{M}$ de cada compuesto candidato a las células un día después de la siembra en placas, y las células se cultivan durante 1-2 días adicionales hasta aproximadamente 2 semanas.

Las placas se fijan y se tiñen con violeta cristal u otra tinción celular general capaz de revelar proliferación relativa o actividad de crecimiento. Las placas que contienen hESC se tiñen para fosfatasa alcalina. La tinción reducida es indicativa de números más bajos o proporciones de células en muestras tratadas con compuestos candidatos. Se identifican muestras que muestran citotoxicidad e/o inhibición del crecimiento. El cribado primario identifica compuestos que muestran algún efecto citotóxico o inhibidor hacia el tipo de célula analizado.

Usando un intervalo de diferentes concentraciones de aproximadamente $0,1$ a aproximadamente $50 \mu\text{M}$, los compuestos identificados en el cribado primario se vuelven a cribar (cribado secundario) frente a dos o más tipos de células seleccionadas de hESCs y células de linaje endodermo no objetivo, linaje de ectodermo células o células de linaje mesodermo. La dosis efectiva (DE) se determina como la concentración más baja de un compuesto que provoca citotoxicidad durante el cribado secundario. Los compuestos del cribado secundario se criban luego en cultivos celulares de diferenciación objetivo, tales como endodermo definitivo (DE). En determinados experimentos, se usan ensayos de impedancia de placa de 96 pocillos (descritos anteriormente) para determinar cuáles de los compuestos candidatos del cribado secundario no son citotóxicos para las células objetivo que diferencian (por ejemplo, endodermo dedefinitivo) a la dosis efectiva más baja. Los compuestos que no parecían ser citotóxicos hacia las células en diferenciación objetivo se marcan como "viables", lo que significa que el compuesto no afectó a la supervivencia, el crecimiento, la proliferación o la diferenciación de las células diferenciadas objetivo.

Los compuestos candidatos puntuados como "viables" se criban después usando hESCs diferenciadas en cultivo de agregados en suspensión. Las ESC humanas se cultivan y se diferencian en suspensión en el tipo de célula diferenciada objetivo. La dosis efectiva más baja se determina a partir del cribado secundaria (descrita anteriormente), y los cultivos celulares que se diferencian a lo largo del linaje objetivo se exponen a esta concentración de compuesto en diversos momentos durante el proceso de diferenciación. Opcionalmente, los cultivos se diferencian adicionalmente a un punto final a lo largo del proceso de diferenciación. Las muestras de ARN se recogen en diversos puntos del proceso de tratamiento y diferenciación para el análisis de la expresión génica de marcadores característicos de la diferenciación objetivo y fuera del objetivo. Las muestras tratadas con compuesto se comparan con las muestras en diferenciación de control sin tratar, y se normalizan a muestras de una diferenciación de objetivo anteriormente puntuada. Los compuestos se eliminan de una consideración adicional debido a que la diferenciación del tipo de célula objetivo se ve afectada, o porque las células en diferenciación objetivo se deterioran o se vuelven inviables tras el tratamiento. Los compuestos adicionales se eliminan de una consideración adicional porque inducen la diferenciación fuera del objetivo.

Para determinar adicionalmente los efectos de los compuestos así identificados anteriormente, los compuestos seleccionados se criban para determinar los efectos en etapas posteriores de la diferenciación objetivo. Las ESC humanas se diferencian primero a etapas tempranas a medias de la diferenciación objetivo en cultivos de agregados en suspensión. Los cultivos se tratan con DMSO o compuestos candidatos sustancialmente como se describió anteriormente durante una etapa de diferenciación temprana a media. Las muestras no tratadas, tratadas con DMSO y tratadas con compuesto candidato se recogen en d0 (hESC), d1, y en intervalos durante el proceso de diferenciación. Los niveles de expresión génica para los marcadores de diferenciación objetivo y fuera del objetivo en las muestras recogidas se analizan y comparan con las muestras d0 (hESC) así como con las diferenciaciones objetivo calificadas. En algunos experimentos, los tipos de células presentes en las muestras recogidas como se indica anteriormente también se determinan mediante citometría de flujo, observación directa o inmunohistoquímica. Cuando el porcentaje o el número de hESCs o la diferenciación fuera del objetivo es pequeño, las muestras de células se pueden expandir en condiciones no en diferenciación (por ejemplo, en un medio de células ES), antes del análisis. Los compuestos candidatos que no afectan la supervivencia, el crecimiento y/o la proliferación de la diferenciación objetivo, pero evitan el crecimiento y la proliferación, o son citotóxicos para hESC y/o tipos de células diferenciadas fuera del objetivo, se seleccionan para estudios adicionales.

En consecuencia, será evidente para un experto en la técnica que se pueden hacer sustituciones, modificaciones u optimización variables, o combinaciones a las realizaciones divulgadas en el presente documento.

Como se usa en las reivindicaciones a continuación y a lo largo de esta divulgación, con la expresión "consiste esencialmente en" se entiende cualquier elemento enumerado después de la expresión y limitado a otros elementos que no interfieren o contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos enumerados. Por lo tanto, la expresión "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes dependiendo de si afectan o no a la actividad o acción de los elementos enumerados.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> VIACYTE, INC.
SCHULZ, Thomas C
ROBINS, Allan J

5	<120> AGENTES Y MÉTODOS PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES HUMANAS <130> 140-01000.WO	
	<160> 46	
10	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15		
	<220> <223> Cebador sintético	
20		
	<400> 1 aagaggccat caagcagatc a	21
25	<210> 2 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
30		
	<400> 2 caggaggcgc atccaca	17
35	<210> 3 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> CTGGCCTGTACCCCTCATCA	
	<400> 3 ctggcctgta cccctcatca	20
45	<210> 4 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> CTTCCCGTCTTTGTCCAACAA	
	<400> 4 cttcccgtct ttgtccaaca a	21
55	<210> 5 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> AAGTCTACCAAAGCTCACGCG	
65	<400> 5	

	aagtctacca aagctcacgc g	21
	<210> 6	
	<211> 15	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> GTAGGCGCCGCTGC	
10	<400> 6	
	gtaggcgccg cctgc	15
	<210> 7	
	<211> 24	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
20	<400> 7	
	gctcatcgct ctctattctt ttgc	24
	<210> 8	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador sintético	
	<400> 8	
	ggttgaggcg tcatcctttc t	21
35	<210> 9	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador sintético	
	<400> 9	
	gggagcggtg aagatgga	18
45	<210> 10	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 10	
55	tcatgttgct cacggaggag ta	22
	<210> 11	
	<211> 24	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
65	<400> 11	

	aagcatttac tttgtggctg gatt	24
	<210> 12	
	<211> 25	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
10	<400> 12	
	tgatctggat ttctcctctg tgtct	25
	<210> 13	
	<211> 18	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
20	<400> 13	
	cgctccgctt agcagcat	18
	<210> 14	
25	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador sintético	
	<400> 14	
	gtgttgccctc tacccttccc at	22
35	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 15	
45	gaagaaggaa gccgtccaga	20
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 16	
55	gaccttcgag tgctgatccg	20
	<210> 17	
	<211> 18	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
65	<400> 17	

	ggcgcagcag aatccaga	18
	<210> 18 <211> 18	
5	<212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador sintético	
10	<400> 18 ccacgacttg cccagcat	18
	<210> 19 <211> 16	
15	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
20	<400> 19 caccgcgggc atgac	16
	<210> 20 <211> 19	
25	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
30	<400> 20 acttccccag gaggttcga	19
	<210> 21 <211> 20	
35	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
40	<400> 21 ggccttcagt actccctgca	20
	<210> 22 <211> 21	
45	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
50	<400> 22 gggacttgga gcttgagtcc t	21
	<210> 23 <211> 21	
55	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
60	<400> 23	
	<220> <223> Cebador sintético	
65	<400> 23	

	gaaggtcatc atctgccatc g	21
	<210> 24 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador sintético	
5		
	ggccataatc agggctcgct	19
	<210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador sintético	
10		
	ccccagactc cgtcagtttc	20
	<210> 26 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador sintético	
15		
	tccgtctggt tgggttcag	19
	<210> 27 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador sintético	
20		
	ccagaaagga tgcctcataa agg	23
	<210> 28 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador sintético	
25		
	tctgcgcgcc cctagtta	18
	<210> 29 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador sintético	
30		
	<400> 29	
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

	tgggctcgag aaggatgtg	19
	<210> 30	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
10	<400> 30	
	gcatagtcgc tgcttgatcg	20
	<210> 31	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
20	<400> 31	
	ccgagtccag gatccagta	20
	<210> 32	
25	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador sintético	
	<400> 32	
	ctctgacgcc gagacttgg	19
35	<210> 33	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 33	
45	cctcttgcaa tgcggaaag	19
	<210> 34	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 34	
55	cgggaggaag gctctcact	19
	<210> 35	
	<211> 23	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
65	<400> 35	

	gaggagaaag tggaggtctg gtt	23
	<210> 36	
	<211> 21	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
10	<400> 36	
	ctctgatgag gaccgcttct g	21
	<210> 37	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
20	<400> 37	
	acagtgccct tcagccagac t	21
	<210> 38	
25	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador sintético	
	<400> 38	
	acaactactt tttcacagcc ttcgt	25
35	<210> 39	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 39	
45	gagaaaccca ctggagatga aca	23
	<210> 40	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 40	
55	ctcatggcaa agttcttcca gaa	23
	<210> 41	
	<211> 19	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
65	<400> 41	

	atgcaccgct acgacatgg	19
	<210> 42	
	<211> 21	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
10	<400> 42	
	ctcatgtagc cctgcgagtt g	21
	<210> 43	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
20	<400> 43	
	ctggctgtgg caaggtcttc	20
	<210> 44	
25	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador sintético	
	<400> 44	
	cagccctcaa actcgcactt	20
35	<210> 45	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 45	
45	atcgaggagc gccacaac	18
	<210> 46	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 46	
55	tgctggatgg tgtcctggt	19

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para reducir el número o el porcentaje de células madre pluripotentes en una población de células, que comprende:
- 5 poner en contacto una población de células que comprende al menos una célula madre pluripotente con un inhibidor o un agente citotóxico selectivos de células madre pluripotentes en donde el inhibidor o el agente citotóxico selectivos se seleccionan de entre el grupo que consiste en ácido cafeico, ivermectina, cloruro de queleritina y combinaciones de los mismos, reduciendo de ese modo el número o el porcentaje de células madre pluripotentes en la población de células.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la célula pluripotente es una célula de primate.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la célula de primate es una célula humana.
- 15 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la célula madre pluripotente es una célula ES o una célula IPS.
- 20 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la población de células se incuba en un medio de cultivo celular que contiene al menos ácido cafeico aproximadamente 1 μM , o al menos ivermectina 1 μM o al menos cloruro de queleritina 5 μM .
- 25 6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la población de células comprende además células en diferenciación o diferenciadas.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que las células en diferenciación o diferenciadas se obtienen de las células madre pluripotentes.
- 30 8. Un método de acuerdo con la reivindicaciones 6 o 7, en el que el inhibidor o el agente citotóxico selectivos no tienen ningún efecto sobre la viabilidad o la proliferación de las células en diferenciación o diferenciadas.
- 35 9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que las células en diferenciación o diferenciadas comprenden al menos un tipo de célula seleccionada de entre: células de endodermo definitivas, células de endodermo del tracto digestivo superior negativas para PDX1, células de endodermo del tracto digestivo superior positivas para PDX1, células de endodermo pancreáticas positivas para PDX-1, células progenitoras endocrinas y células precursoras endocrinas.
- 40 10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además confirmar una reducción en el número o el porcentaje de células madre pluripotentes en la población de células.
- 45 11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor o el agente citotóxico selectivos no inhiben la diferenciación o el potencial de diferenciación de las células en diferenciación o diferenciadas en la población.
- 50 12. Un método *in vitro* para diferenciar una población de células madre pluripotentes, que comprende
- a) poner en contacto la población de células madre pluripotentes con al menos una condición diferenciadora, produciendo de ese modo una población diferenciada de células, en donde al menos algunas de las células están diferenciándose y al menos algunas de las células no están diferenciándose; y
- b) tratar la población diferenciada de células con un inhibidor o un agente citotóxico específicos de células madre pluripotentes, en donde el inhibidor o el agente citotóxico específicos de células madre se selecciona de entre ácido cafeico, ivermectina, cloruro de queleritina y combinaciones de los mismos, diferenciando de ese modo la población de células madre pluripotentes.
- 55 13. Una composición que comprende:
- a) una célula madre pluripotente y al menos una célula seleccionada de entre el grupo que consiste en un derivado diferenciador de la célula madre pluripotente, o un derivado diferenciado de la célula madre pluripotente; y
- 60 b) un inhibidor o un agente citotóxico selectivos de células madre pluripotentes en donde el inhibidor o el agente citotóxico selectivos se seleccionan de entre ácido cafeico, ivermectina, cloruro de queleritina y combinaciones de los mismos.

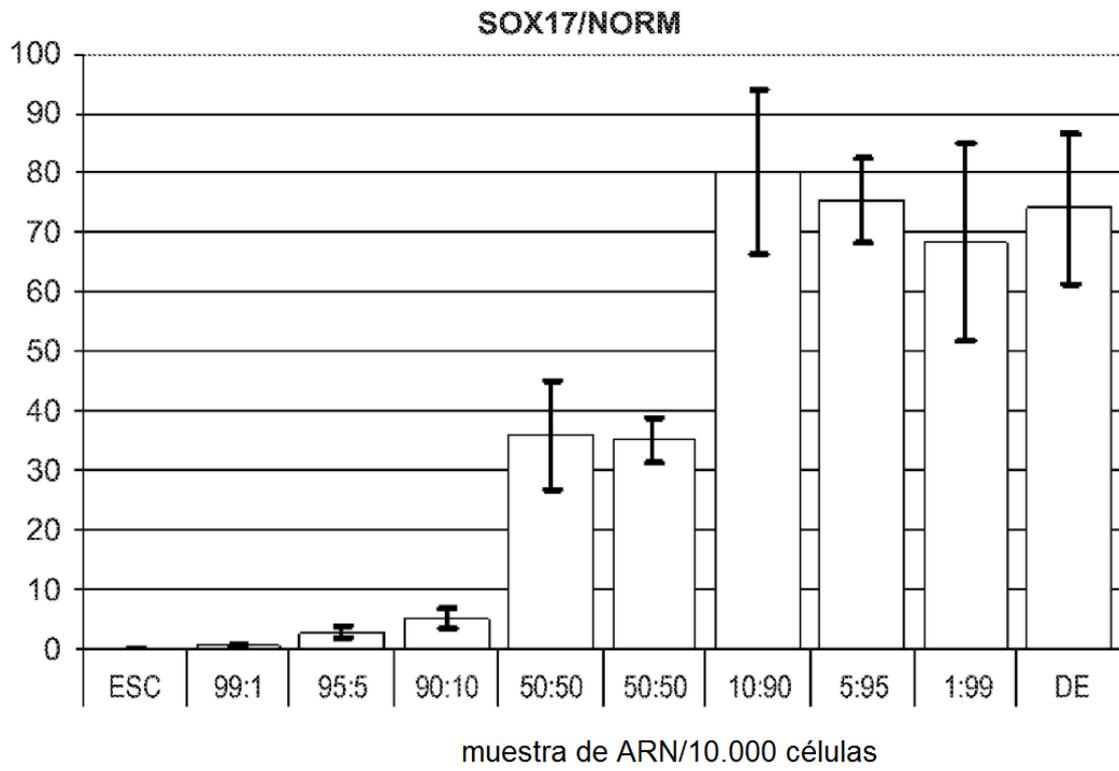


FIG. 1A

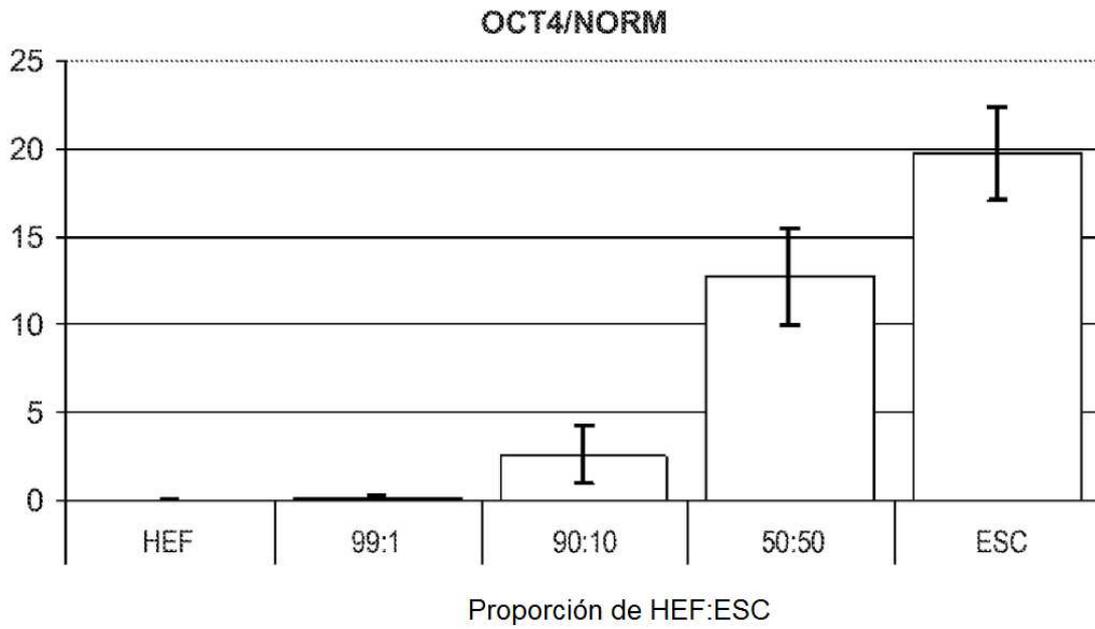


FIG. 1B

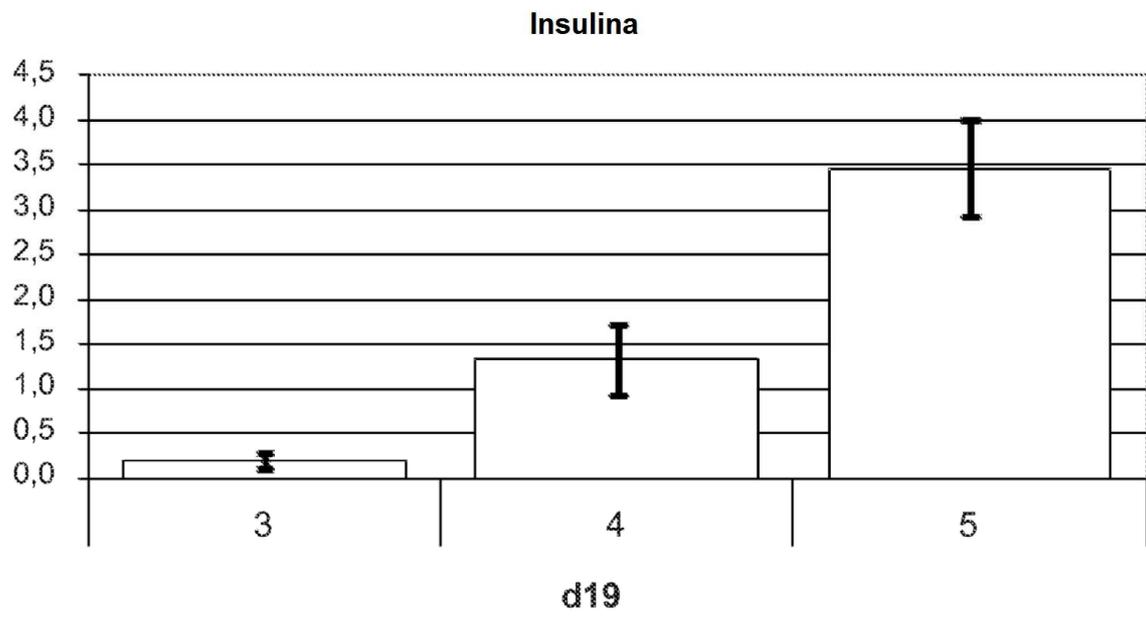


FIG. 1C

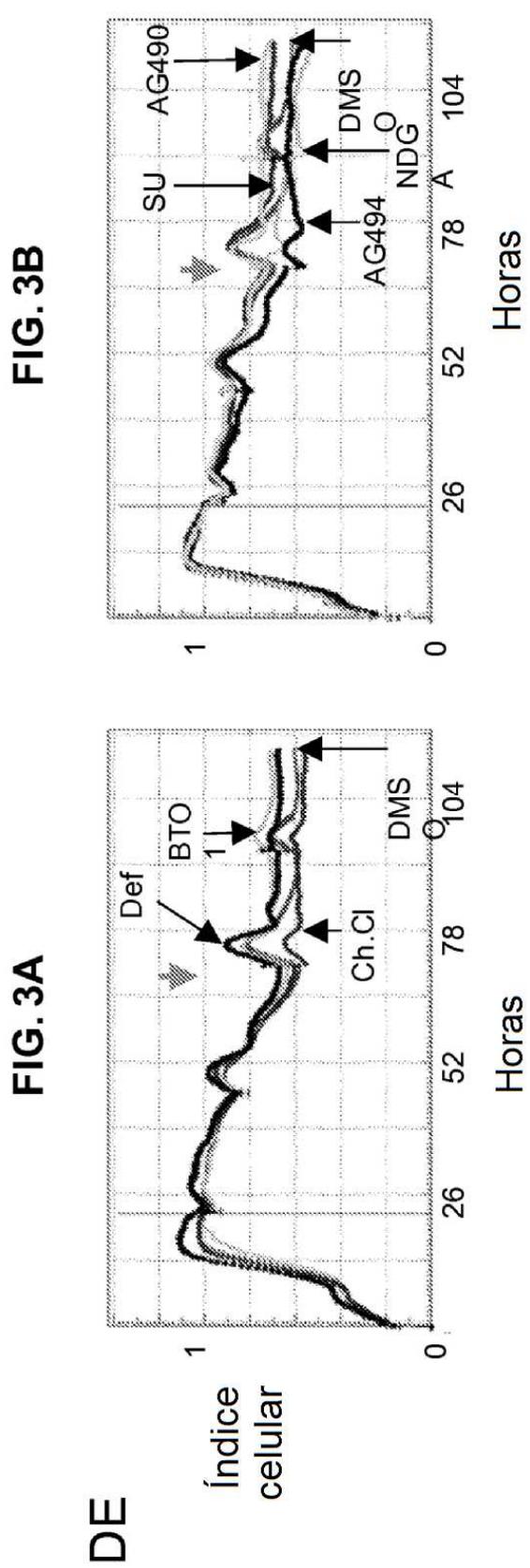
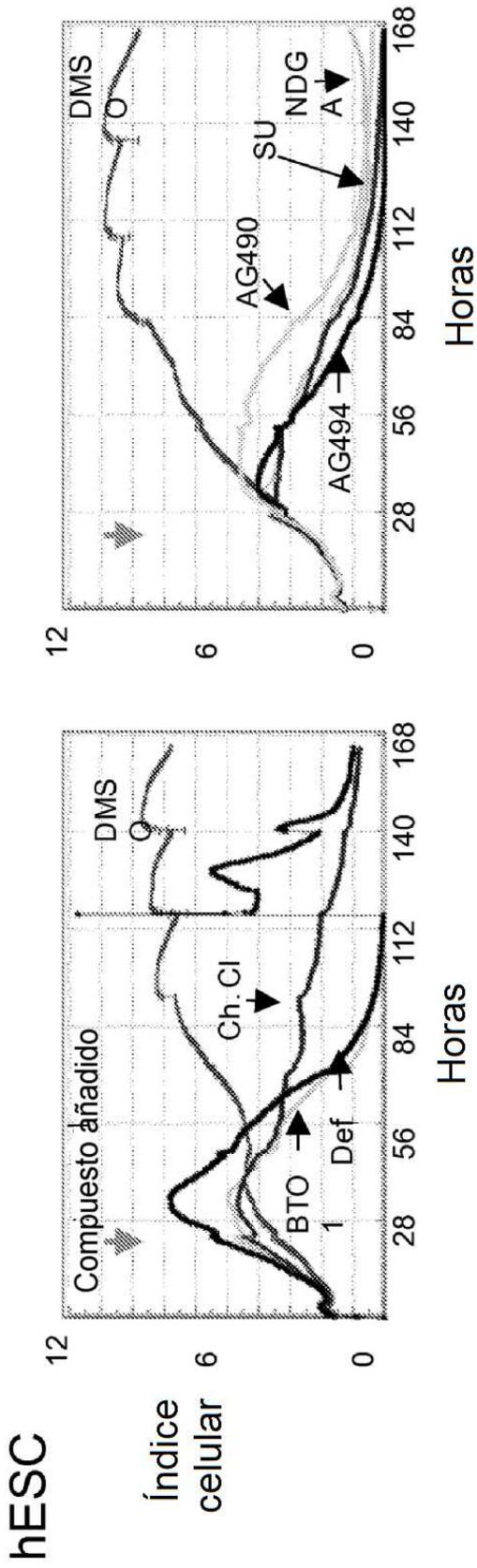


FIG. 3C

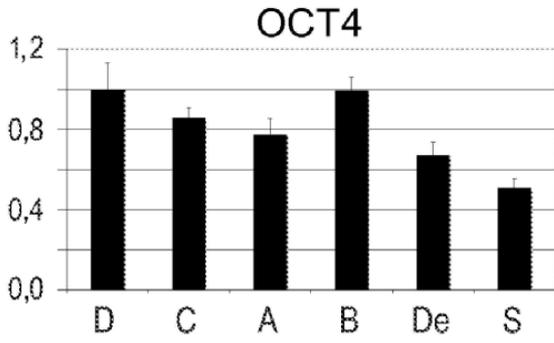


FIG. 4A

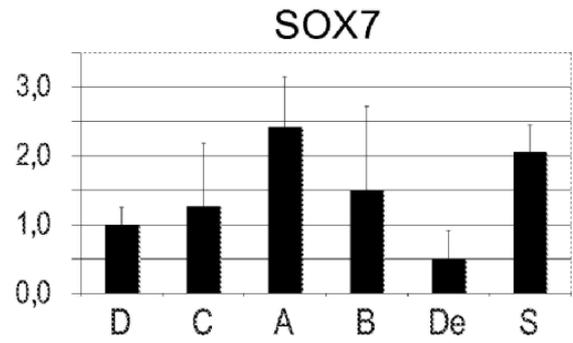


FIG. 4E

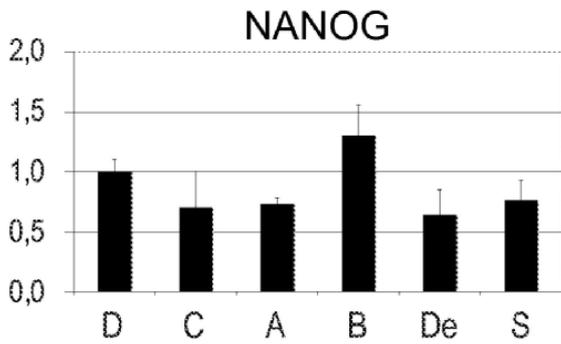


FIG. 4B

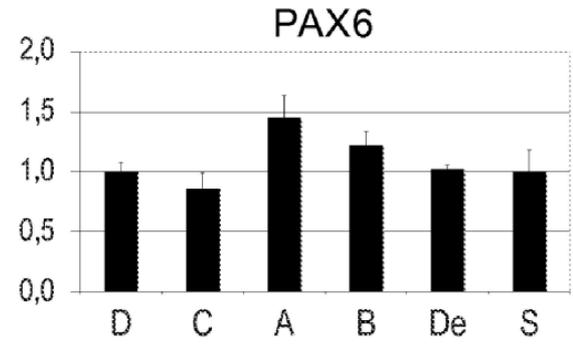


FIG. 4F

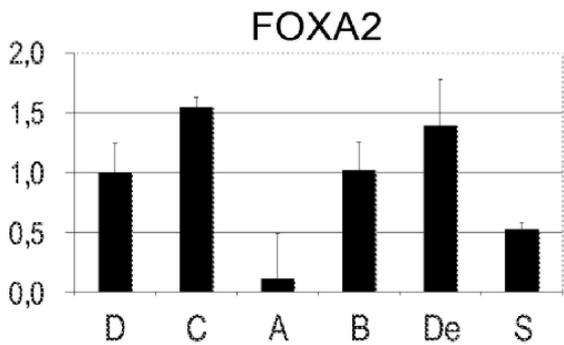


FIG. 4C

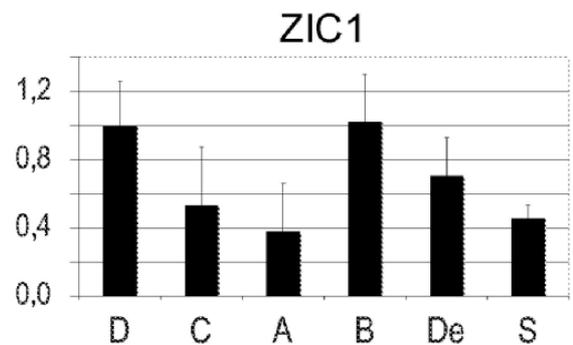


FIG. 4G

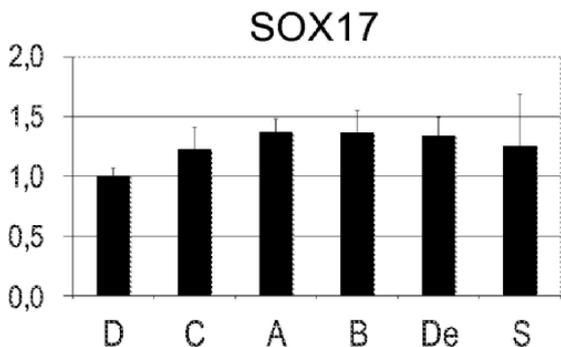


FIG. 4D

FIG. 5A

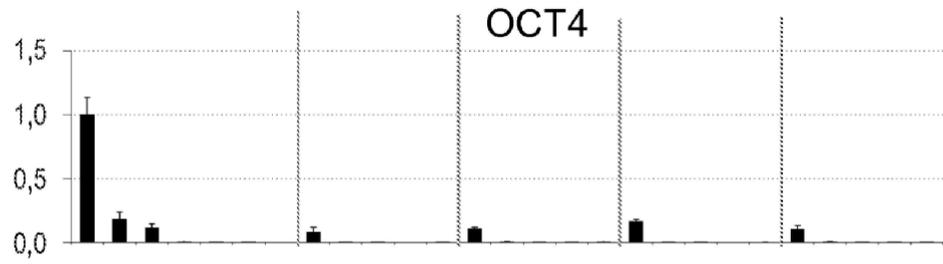


FIG. 5B

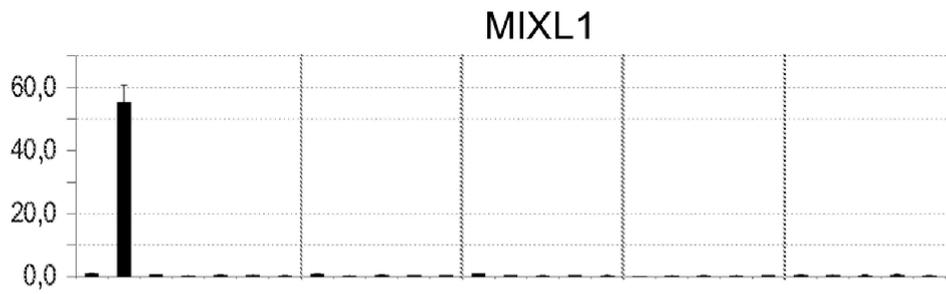


FIG. 5C

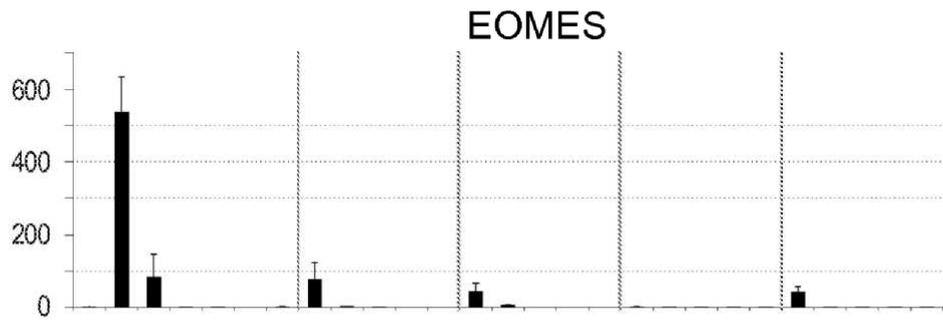


FIG. 5D

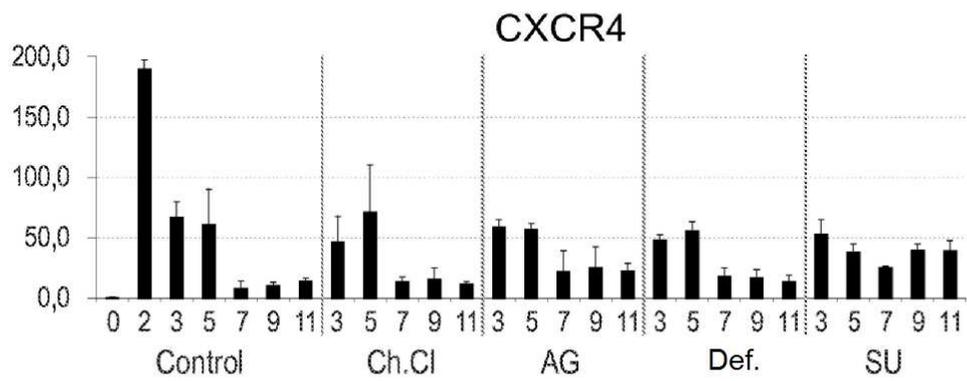


FIG. 5E

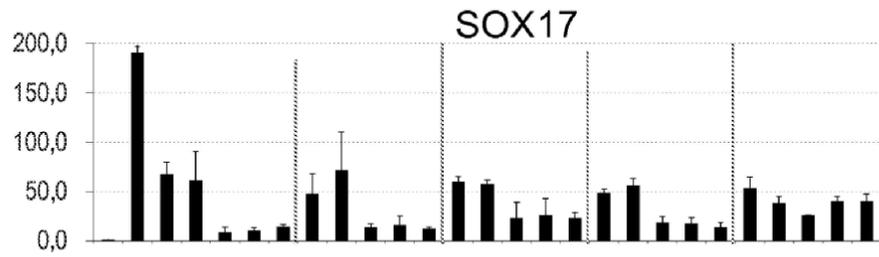


FIG. 5F

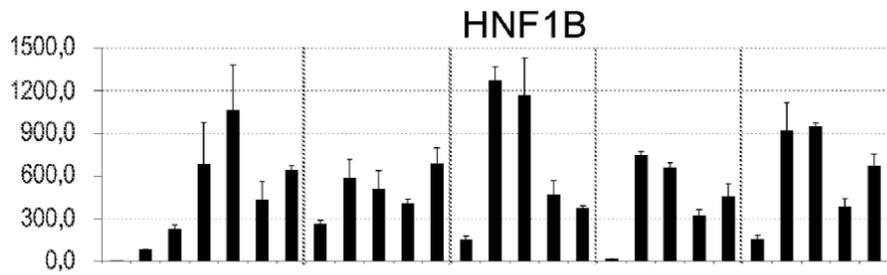


FIG. 5G

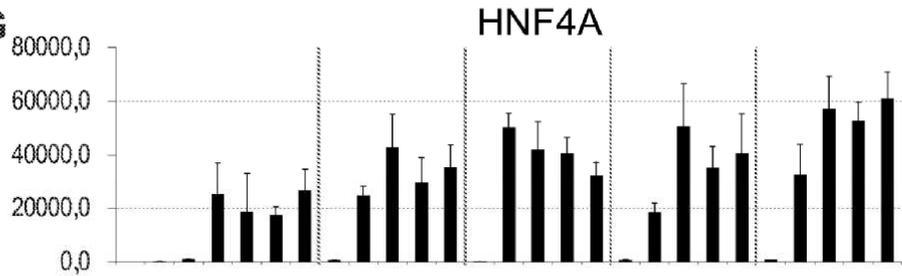


FIG. 5H

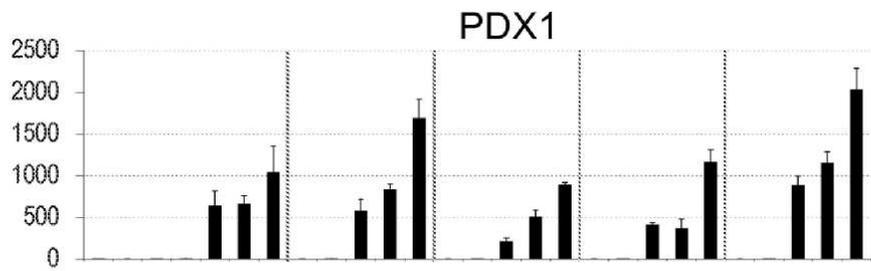


FIG. 5I

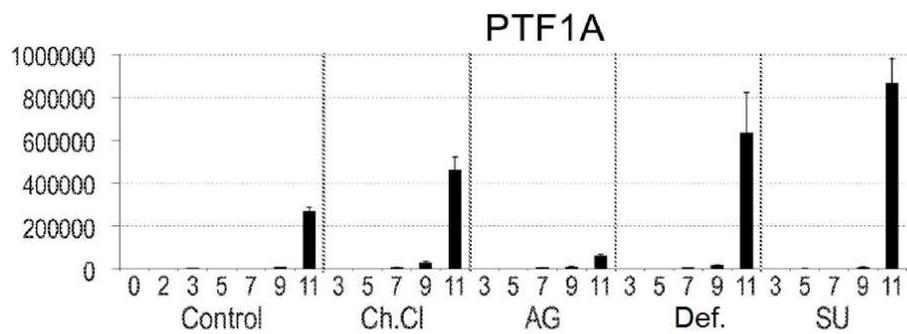


FIG. 5J

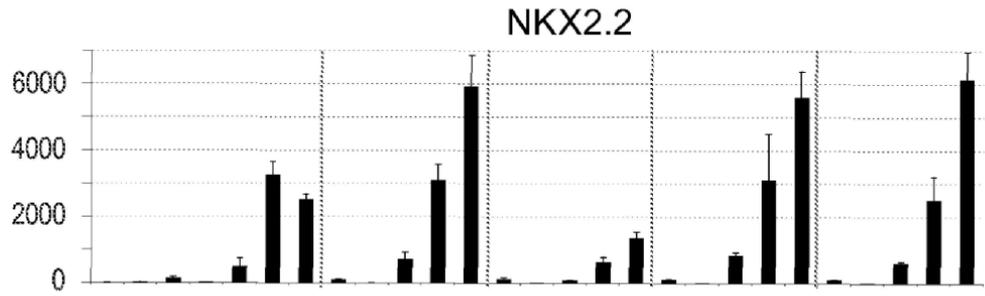


FIG. 5K

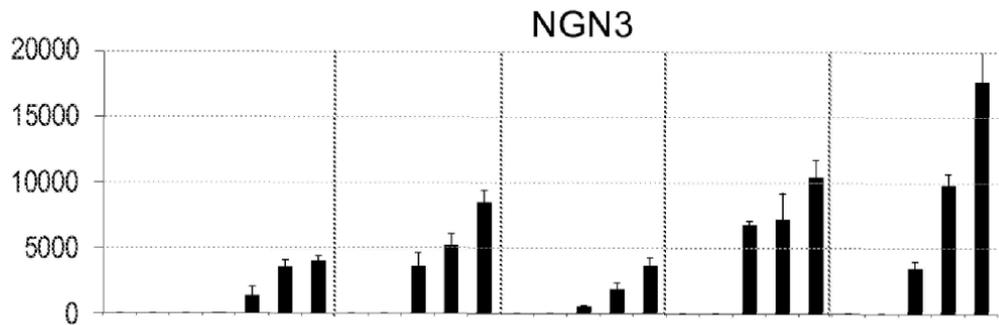


FIG. 5L

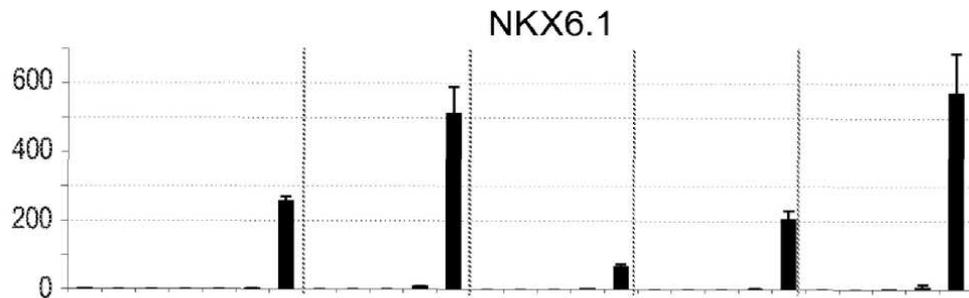


FIG. 5M

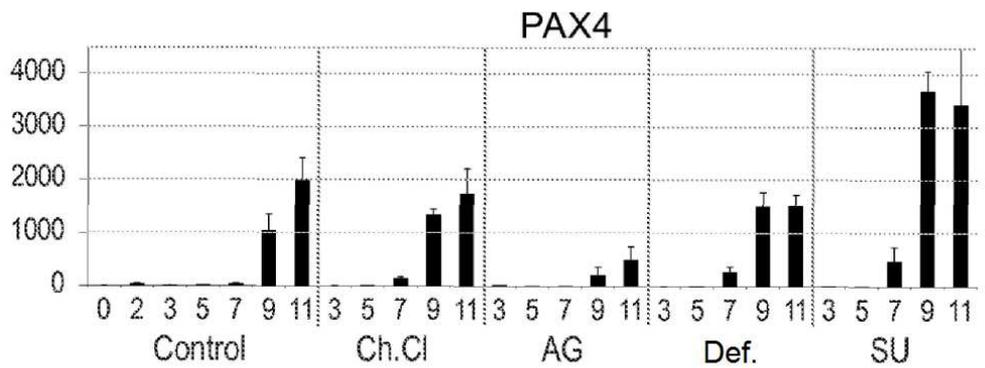


FIG. 6A

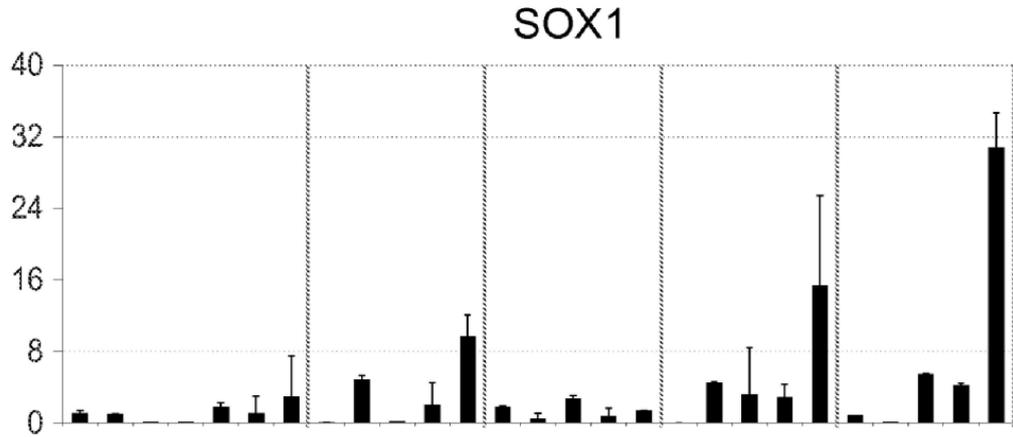


FIG. 6B

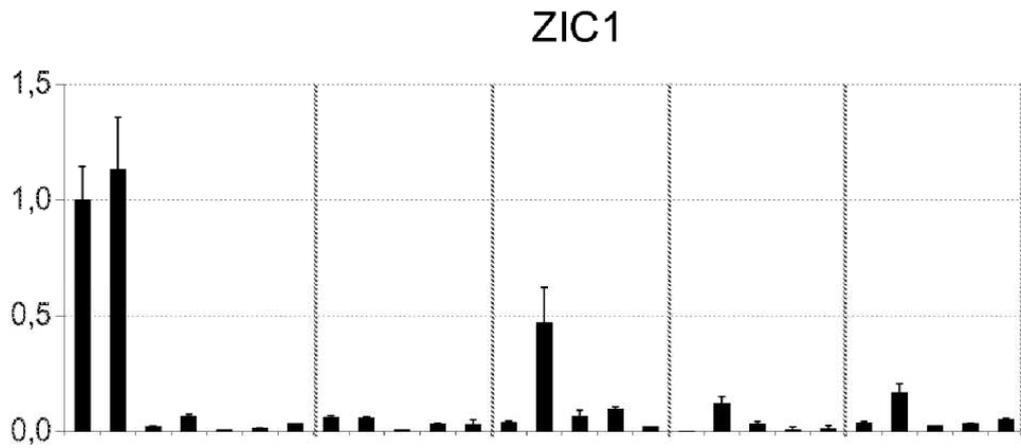


FIG. 6C

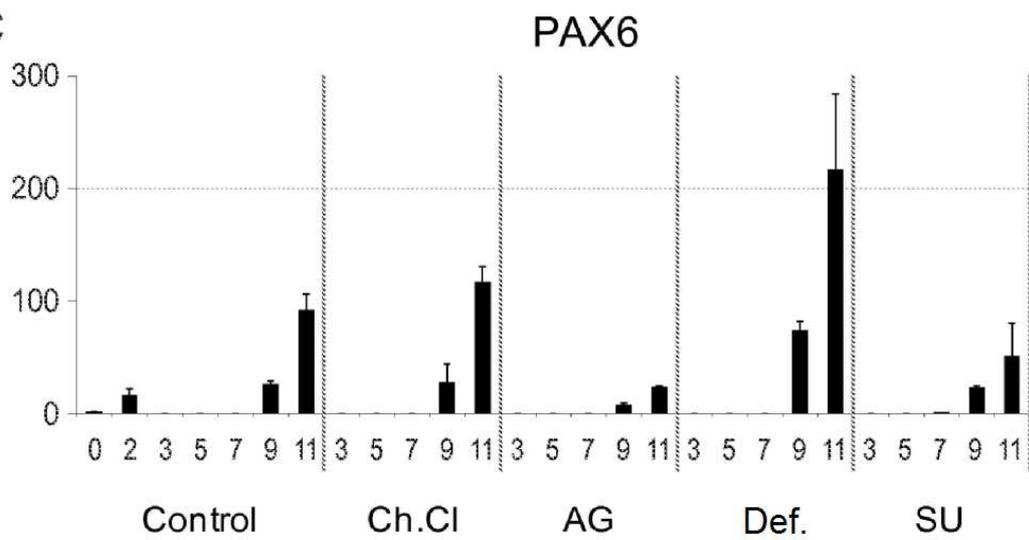


FIG. 6D

SOX7

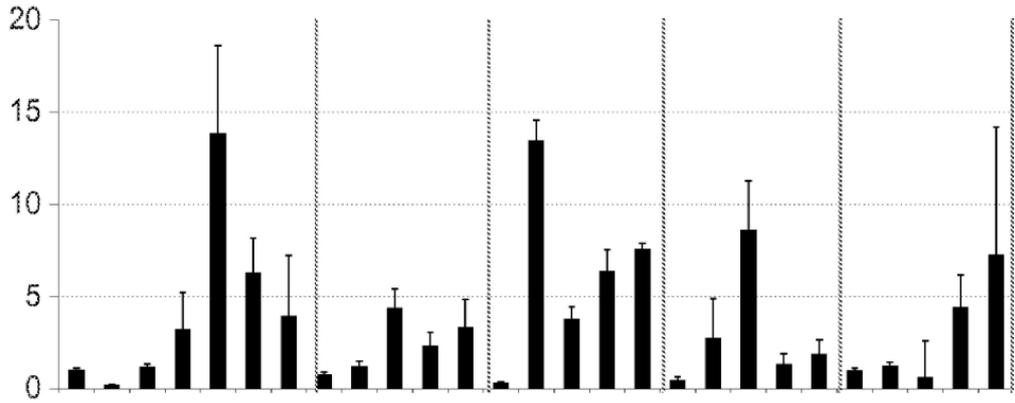


FIG. 6E

AFP

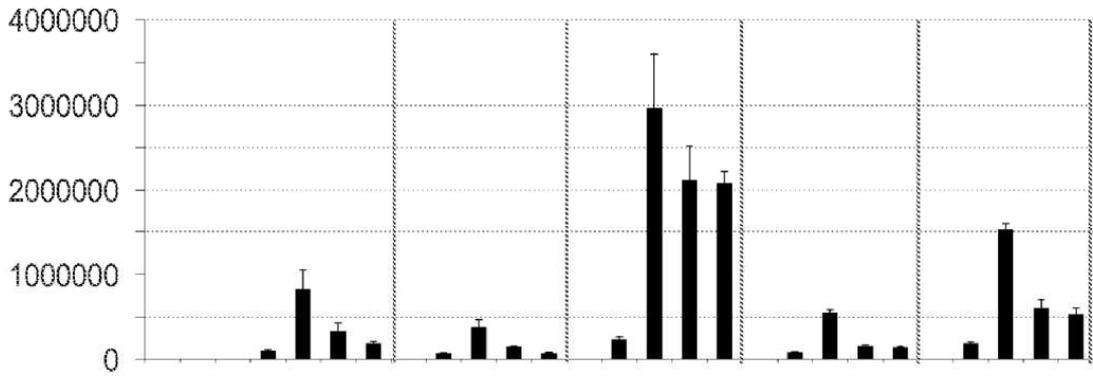
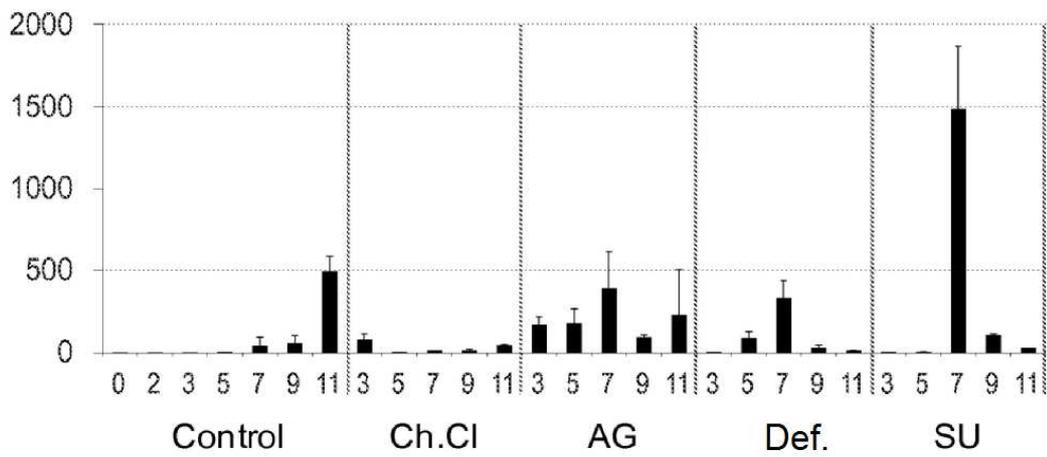


FIG. 6F

CDX2



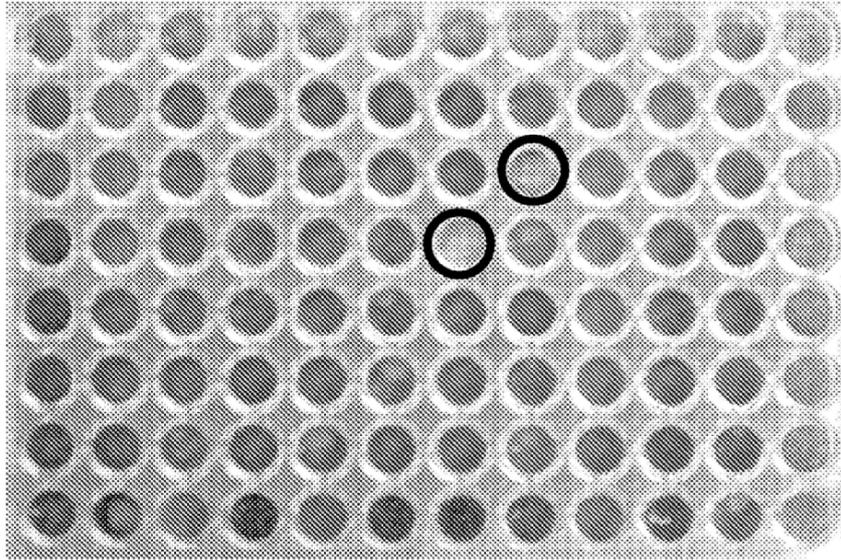


FIG. 7A

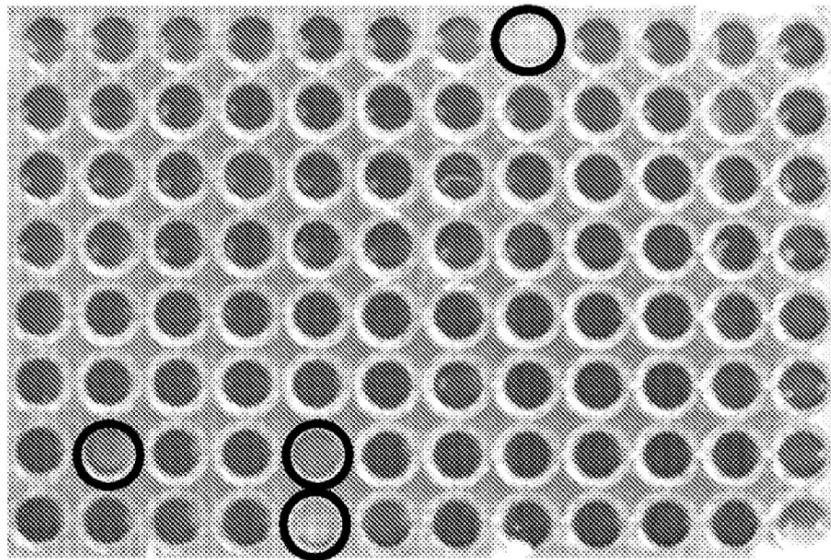


FIG. 7B

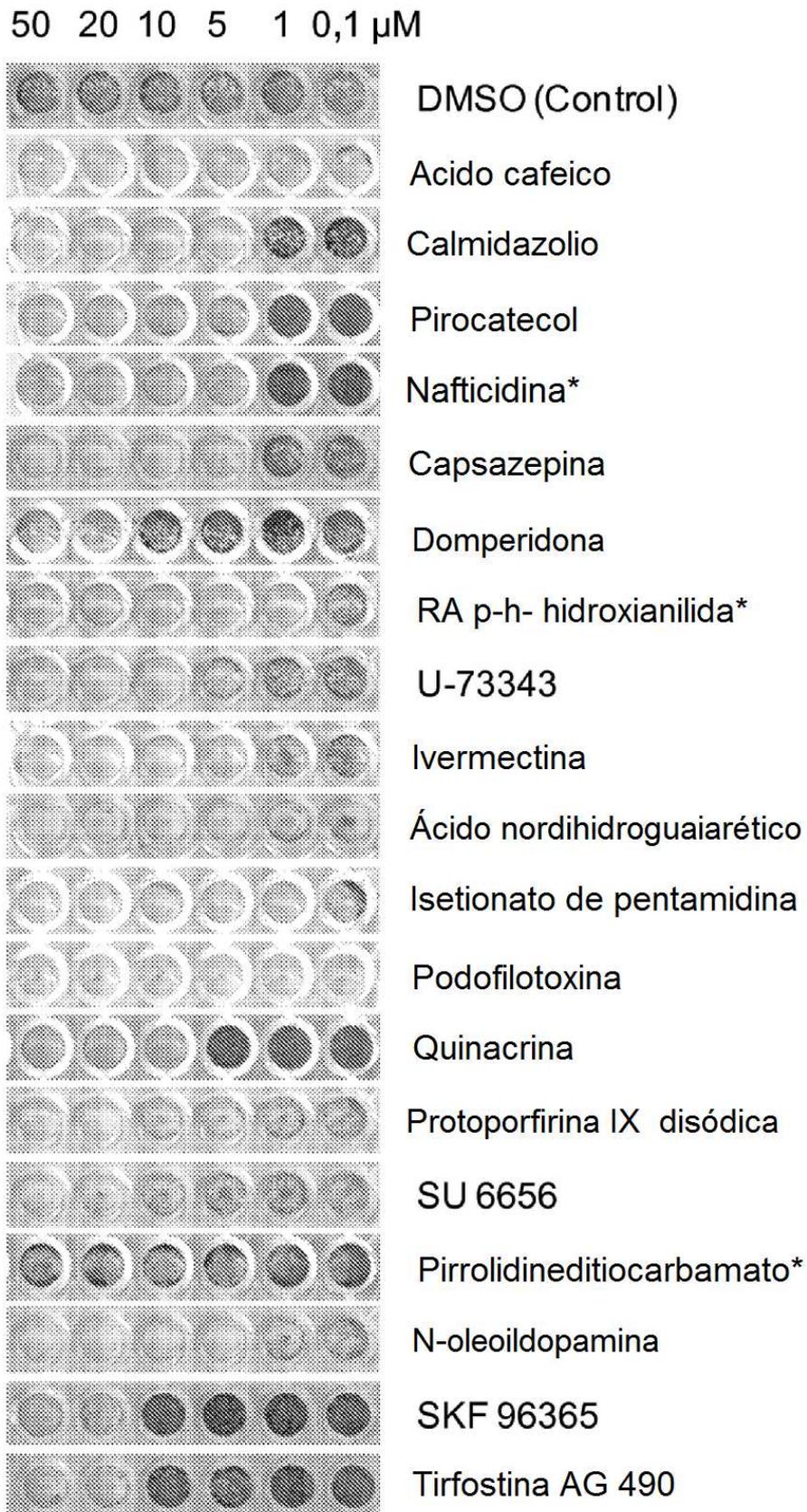


FIG. 8

FIG. 9A

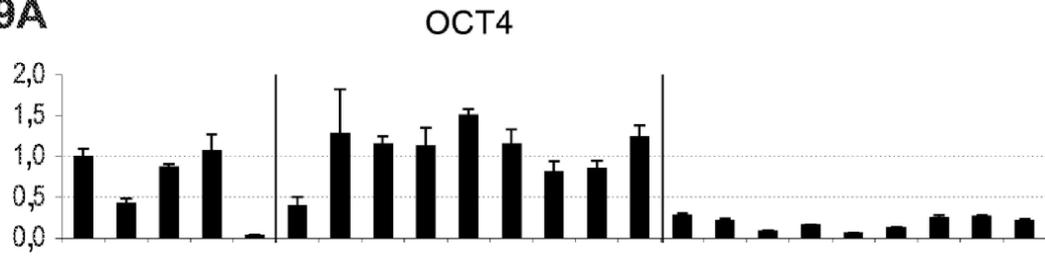


FIG. 9B

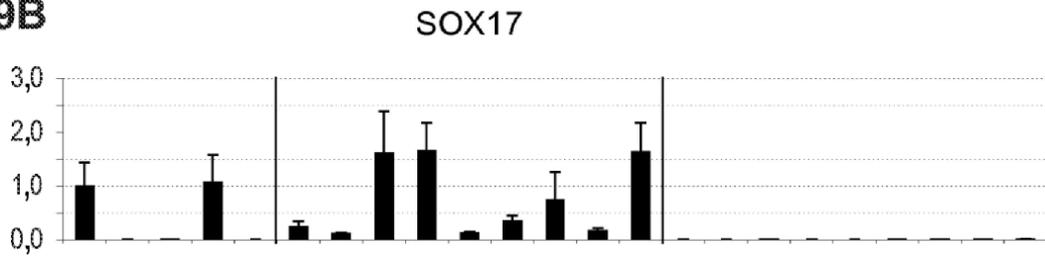


FIG. 9C

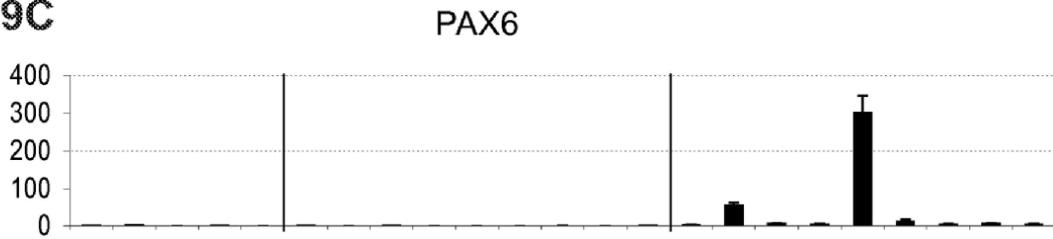


FIG. 9D

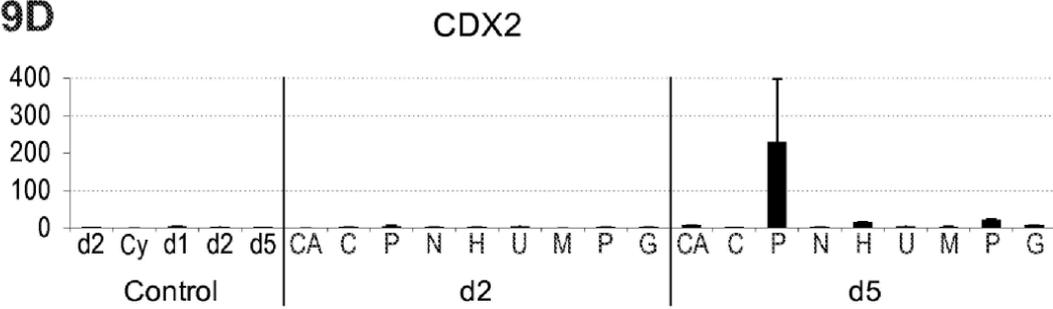


FIG. 9E

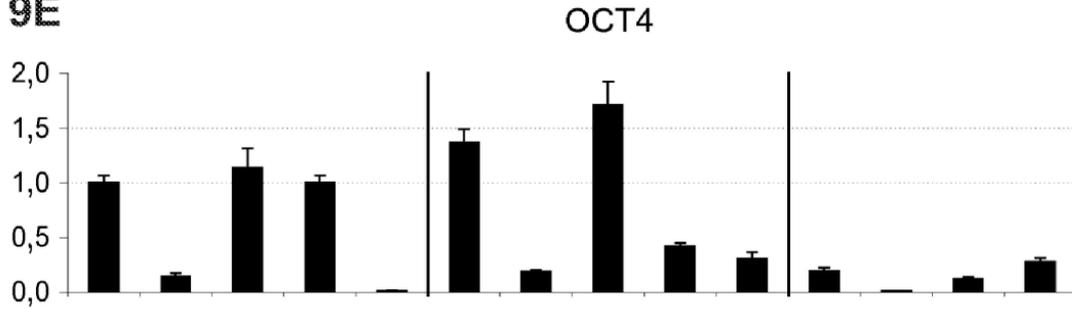


FIG. 9F

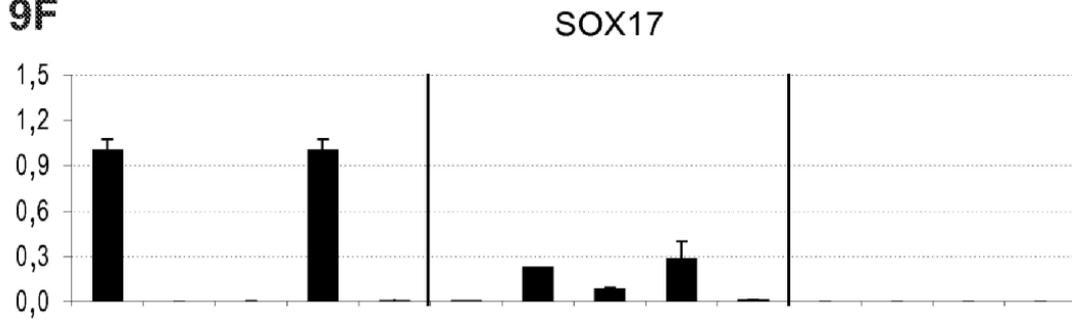


FIG. 9G

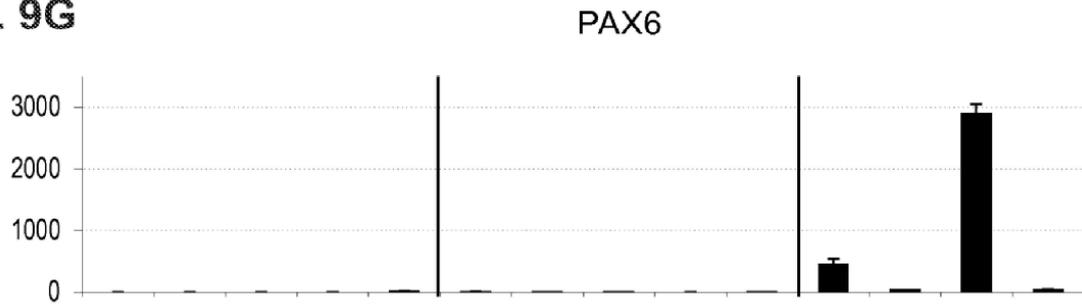


FIG. 9H

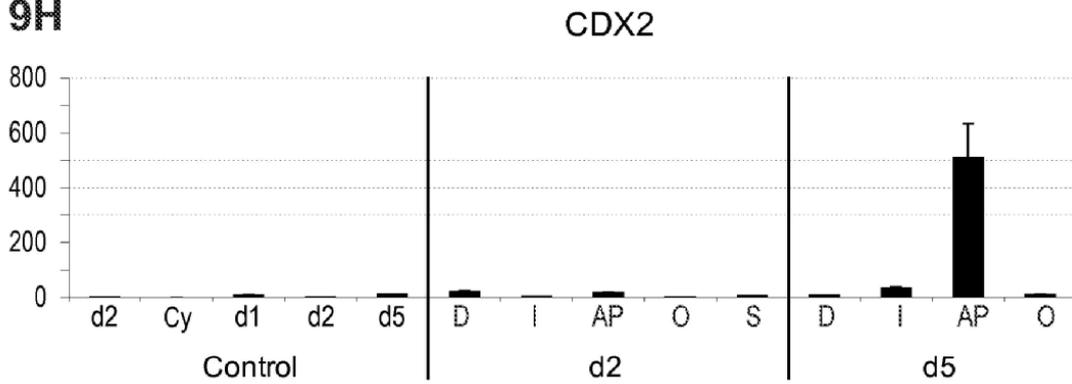


FIG. 10A

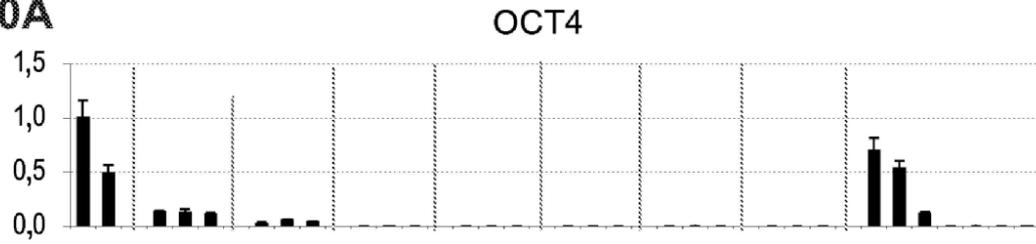


FIG. 10B

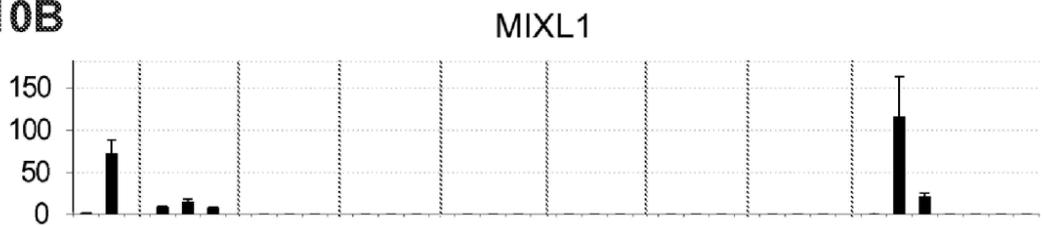


FIG. 10C

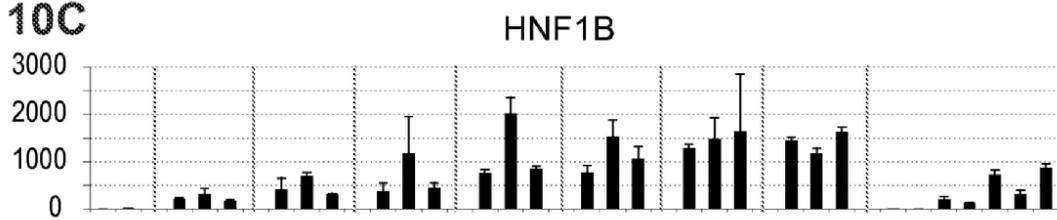


FIG. 10D

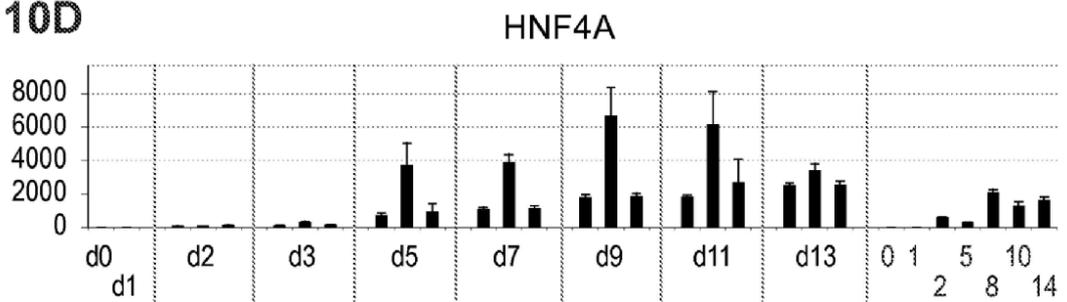
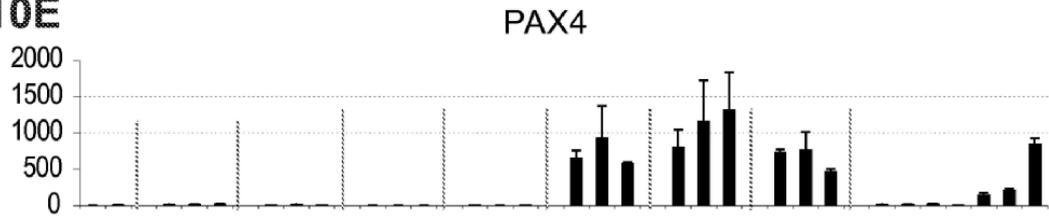


FIG. 10E



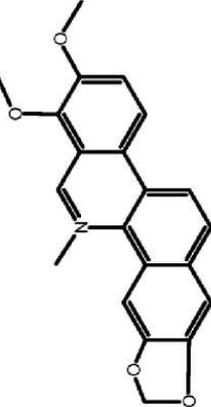
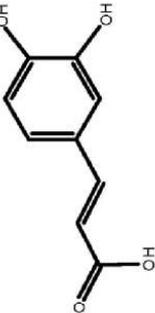
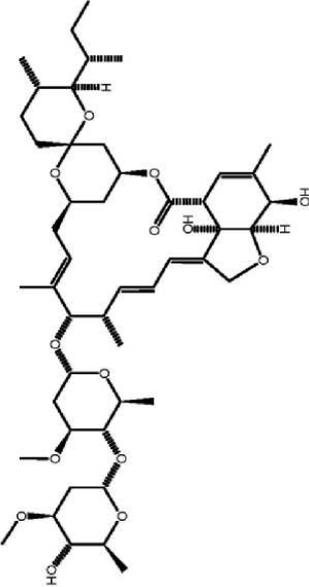
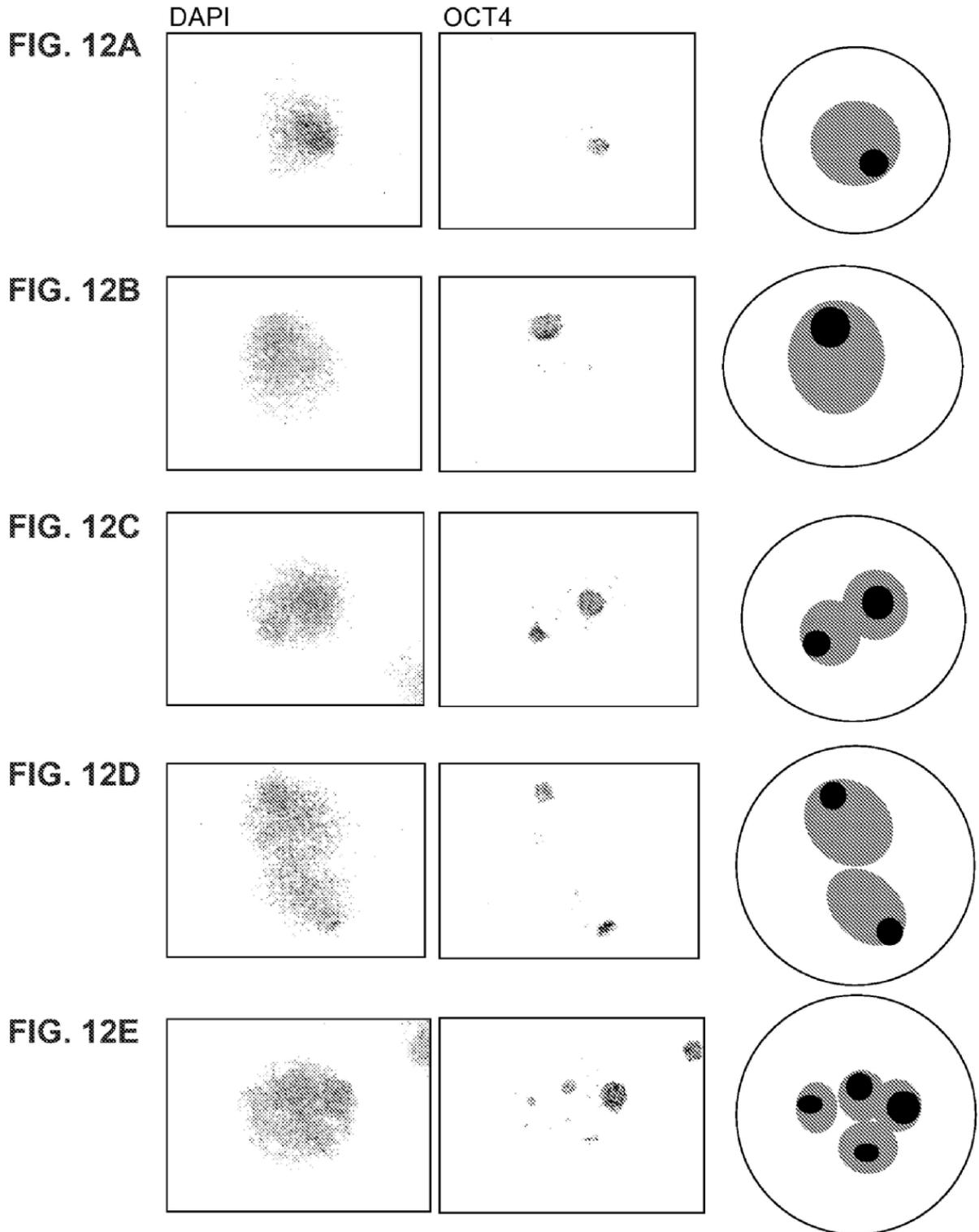
Acciones	CE 50 de Matrigel	CE50 de suero Solh	Estructura
Cloruro de queleritrina	1,2 μ M	1,4 μ M	
Ácido cafeico	0,17 μ M	0,1 μ M	
Ivermectina	0,15 μ M	0,17 μ M	

FIG. 11



4x

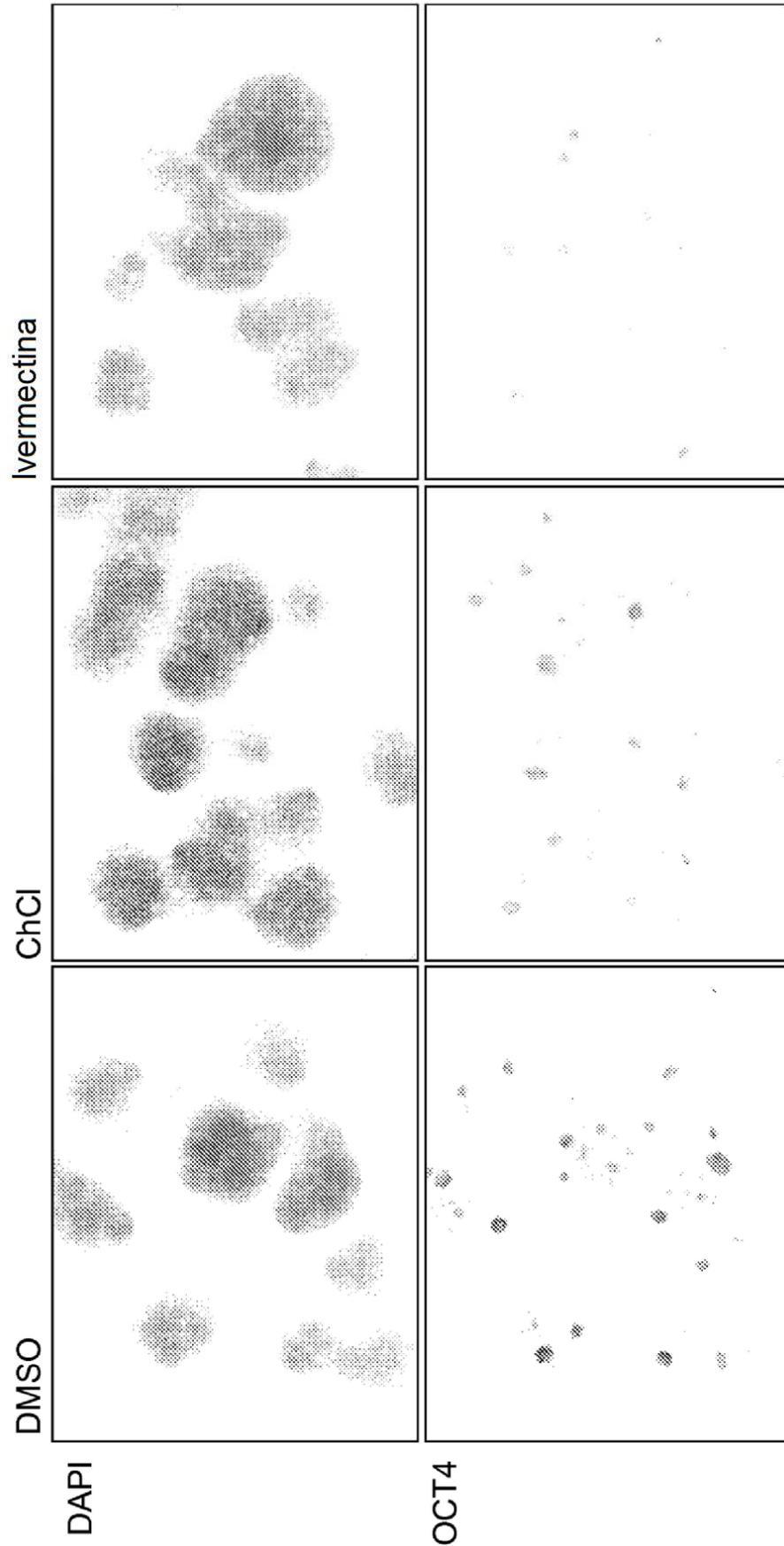


FIG. 13A

FIG. 13B

FIG. 13C

4x

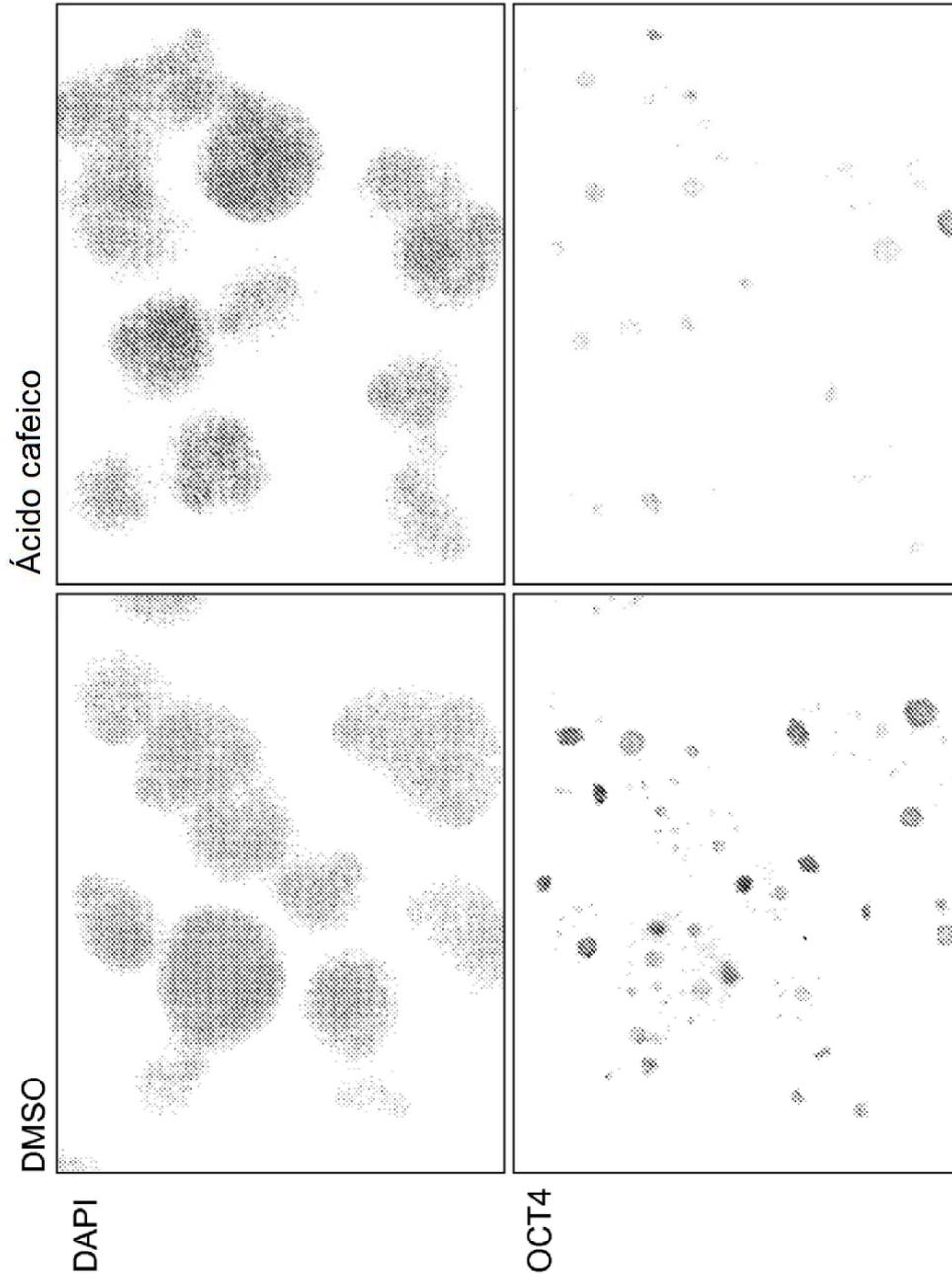


FIG. 13E

FIG. 13D

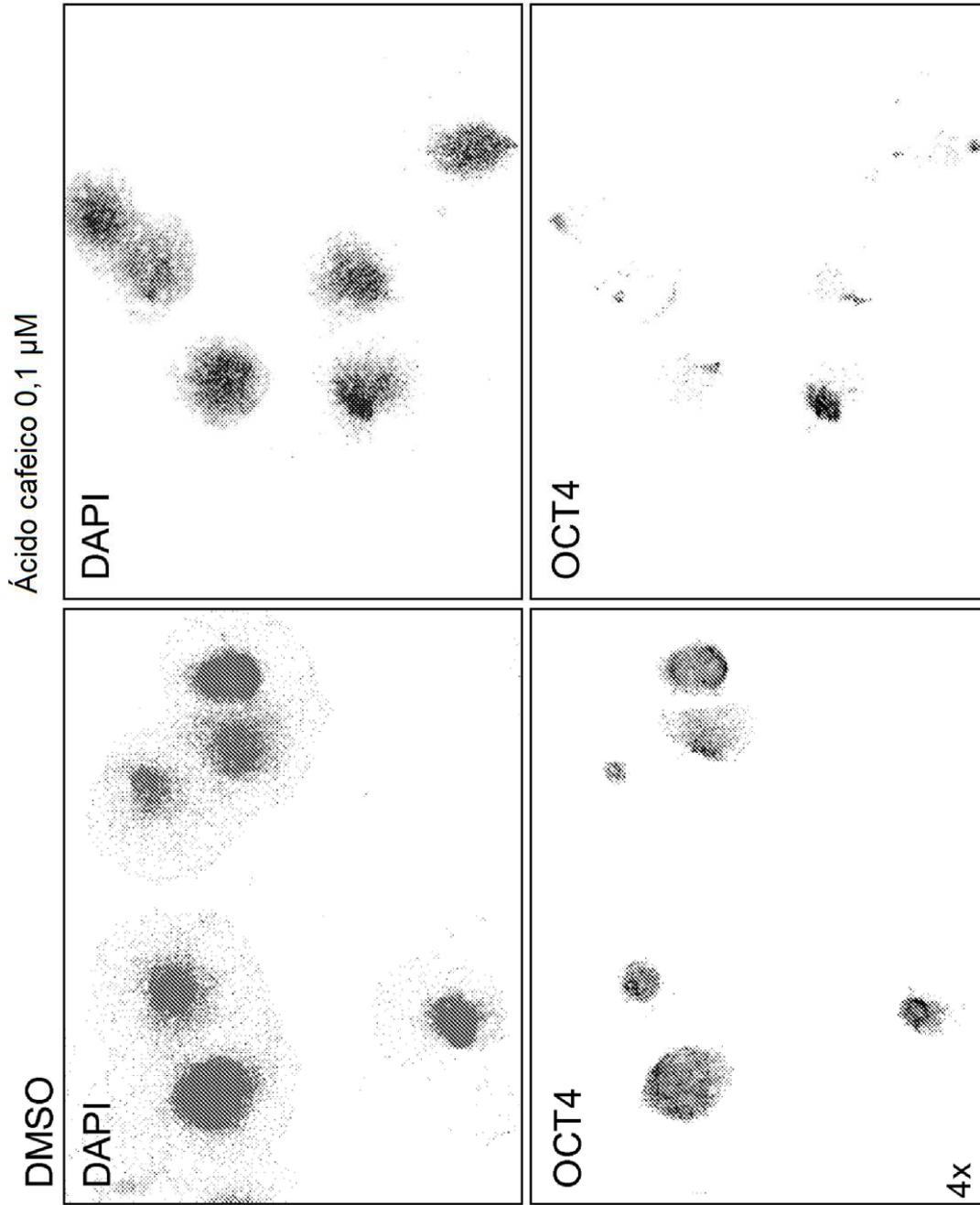


FIG. 14B

FIG. 14A

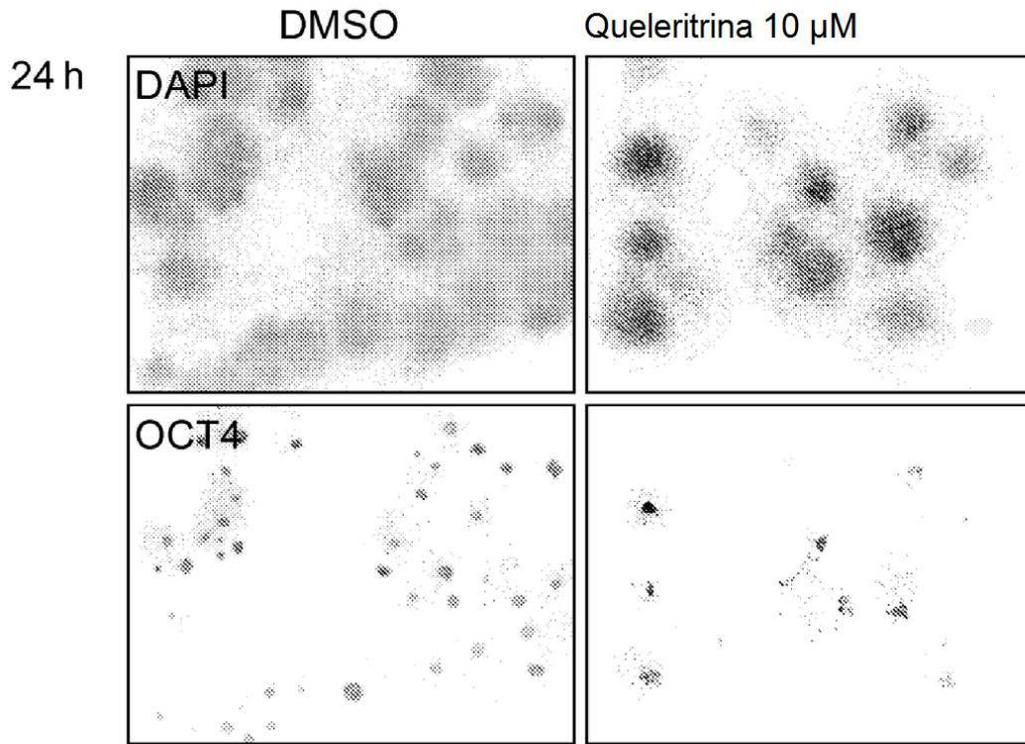


FIG. 15A

FIG. 15B

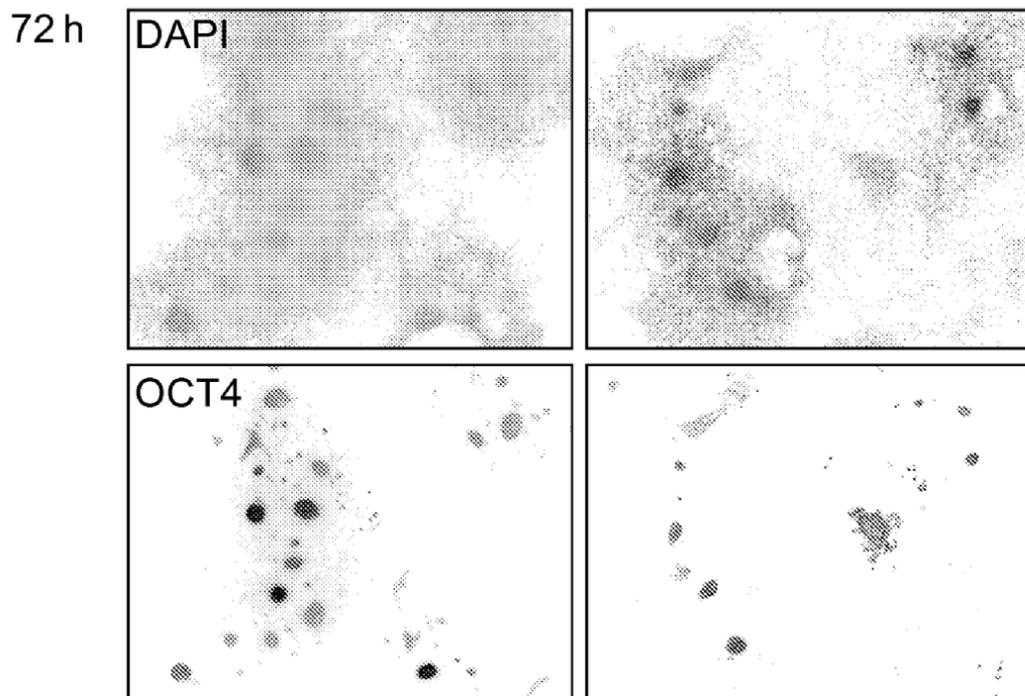


FIG. 15C

FIG. 15D

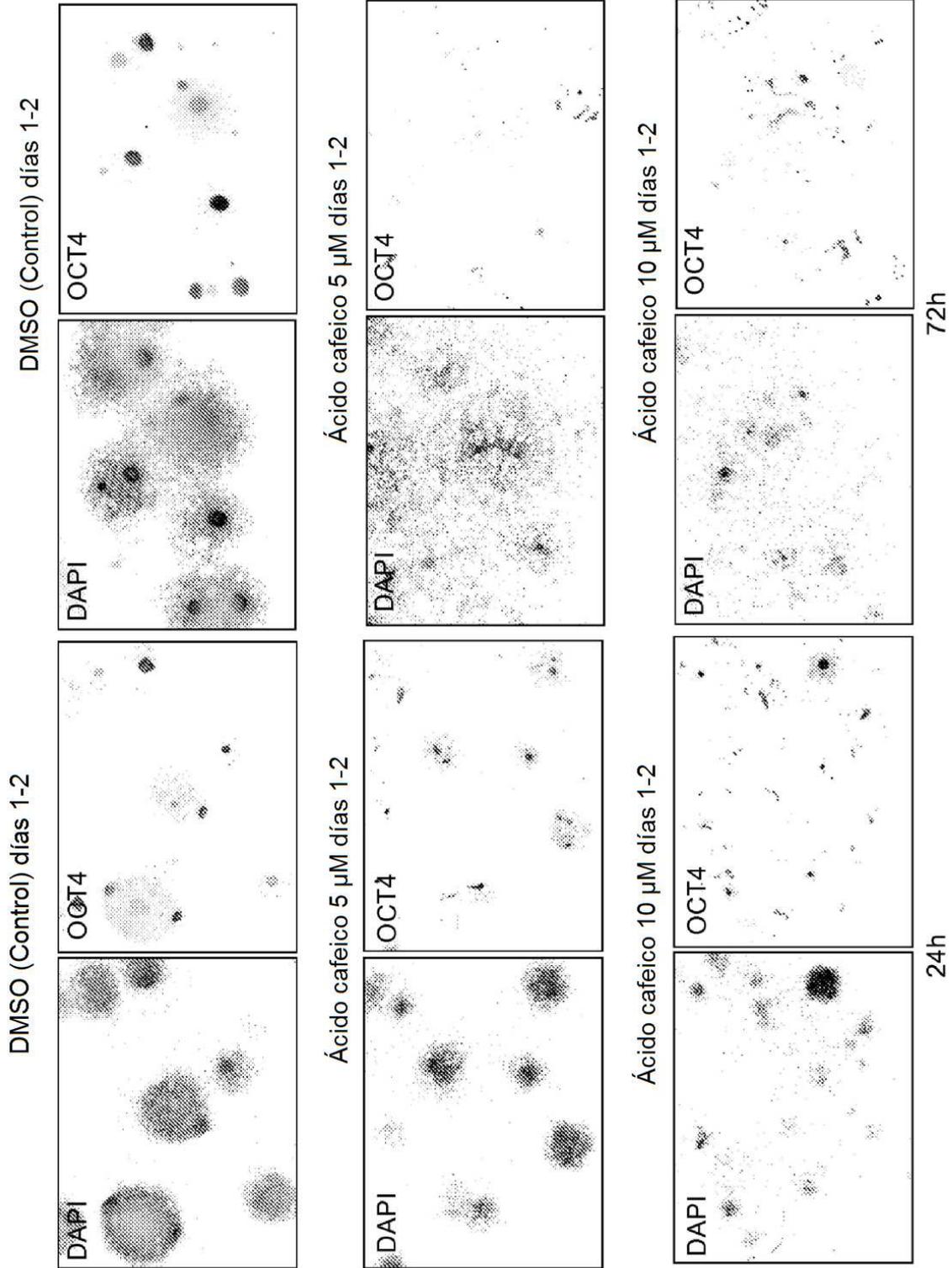


FIG. 16

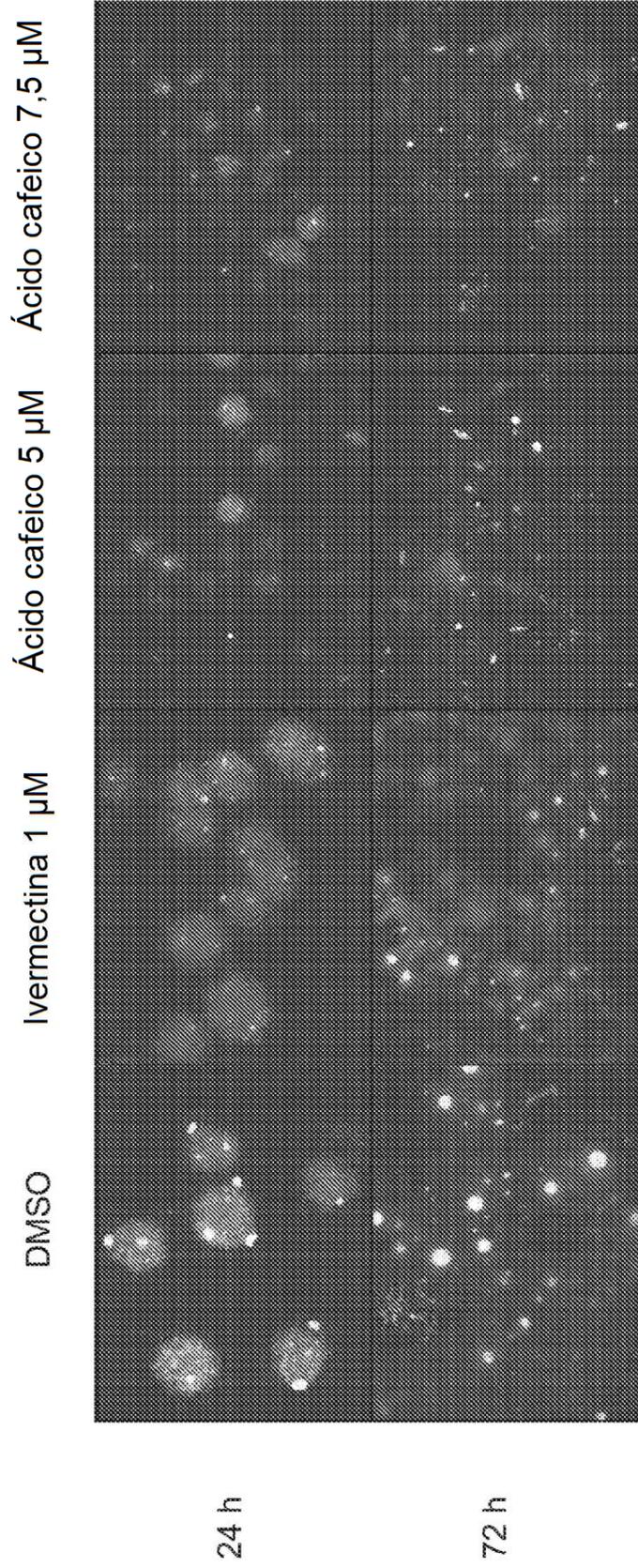


FIGURA 17