(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 741 969**

(51) Int. CI.:

C12N 5/0735 (2010.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61P 5/00 (2006.01)
A61P 5/06 (2006.01)
A61P 5/14 (2006.01)
A61P 5/24 (2006.01)
A61P 5/38 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2012 PCT/JP2012/078250**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13065763**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2012 E 12845639 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2774983**

(54) Título: **Método para el cultivo de células madre**

(30) Prioridad:

31.10.2011 JP 2011239803

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2020

(73) Titular/es:

RIKEN (50.0%)
2-1, Hirosawa, Wako-shi
Saitama 351-0198, JP y
SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED (50.0%)

(72) Inventor/es:

SASAI, YOSHIKI y
SUGA, HIDETAKA

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Método para el cultivo de células madre

Campo técnico

La presente invención versa sobre un método de inducción de la diferenciación de células madre en un cuerpo embrioide que comprende un tejido nervioso central y un tejido de ectodermo no neural de cabeza *in vitro* y similares. Además, la presente invención versa en particular sobre un método de inducción de la diferenciación en un tejido precursor de la hipófisis y diversas células productoras de hormonas de la hipófisis como un tejido nervioso central *in vitro* y similares.

Técnica antecedente

Hasta la fecha se conocen algunos métodos de cultivo para inducir la diferenciación nerviosa de células madre pluripotentes, tales como células ES (documentos no de patente 1-4, documentos de patente 1-3).

Los presentes inventores demostraron previamente que un cultivo flotante disperso en un caldo libre de suero (método SFEB) es efectivo como método de inducción de la diferenciación nerviosa de células madre pluripotentes, tales como células ES animales o humanas, formando nervios (documentos no de patente 3 y 4 and documento de patente 1). Posteriormente, los presentes inventores descubrieron un método de inducción eficaz de la diferenciación de células madre pluripotentes, tales como células ES y similares, formando tejido de la corteza cerebral, neuronas del hipotálamo, células progenitoras de las mismas y similares formando agregados homogéneos de células madre en un caldo libre de suero, y sometiendo los agregados a un cultivo flotante (método SFEBq) (documento no de patente 5 y documento de patente 3).

Es sabido que, en los vertebrados, la glándula pituitaria y los órganos sensoriales (epitelio olfativo, cristalino, oído interno y similares) se desarrollan a partir de una placoda formada en un tejido ectodérmico no neural de cabeza frente a una placa neural, mediante inducción de la placoda, invaginación de la placoda, diferenciación celular y morfogénesis.

De estos, la glándula pituitaria es un órgano endocrino que produce y secreta muchas hormonas. La glándula pituitaria se divide fundamentalmente en adenohipófisis and neurohipófisis (también denominada pituitaria posterior), y la adenohipófisis se subdivide en pituitaria anterior y pituitaria intermedia (intermedia). La adenohipófisis comprende múltiples tipos de células que producen y secretan hormonas hipofisarias.

La adenohipófisis deriva de la bolsa de Rathke generada por la invaginación de la cavidad oral primaria. En el desarrollo inicial de los mamíferos, primordio de la pituitaria anterior se forma como una placoda en un ectodermo no neural de cabeza (ectodermo rostral no neural de cabeza) adyacente al rostral del límite de la placa neural anterior, y la placoda se invagina formando la bolsa de Rathke. Posteriormente, la bolsa de Rathke se separa del ectodermo, convirtiéndose en una bolsa vesicular epitelial. A continuación, la pared anterior de las bolsas vesiculares se convierte en la pituitaria anterior y la pared posterior se convierte en la pituitaria intermedia.

Por otro lado, la neurohipófisis (pituitaria posterior) se forma a partir de un saliente en la parte inferior del tercer ventrículo. El axón se extiende desde las células neuronales neurosecretoras en los núcleos supraópticos y en los núcleos paraventriculares del hipotálamo a la pituitaria posterior, y las hormonas (oxitocina y vasopresina) son transportadas axonalmente.

Los estudios hasta ahora han revelado las interacciones del hipotálamo rostral y el ectodermo rostral no neural de cabeza son necesarias para la inducción de la bolsa de Rathke en las fases de desarrollo (documento no de patente 6).

Según se ha mencionado anteriormente, los procesos de desarrollo tardío de la glándula pituitaria han sido muy estudiados; sin embargo, la especialización del primordio hipofisario en las fases iniciales del ectodermo no se ha dilucidado aún. Aunque hasta la fecha se han descubierto (mencionados anteriormente) métodos para inducir la diferenciación, dando lugar a células nerviosas como las del cerebro, el hipotálamo y similares, aún no se conoce un método de desarrollo de un tejido precursor hipofisario y diversas células productoras de hormonas hipofisarias a partir de células madre pluripotentes, tales como células ES y similares, *in vitro* (*in vitro*).

Además, aunque también se ha considerado antes el tratamiento de la diabetes usando células madre, la posibilidad de una medicina regenerativa tomando nota de trastornos funcionales del hipotálamo-glándula pituitaria apenas ha atraído atención hasta la fecha.

Lista de documentos

Documentos de patente

Documento de patente 1: WO2005/123902

Documento de patente 2: JP-A-2008-99662

Documento de patente 3: WO2009/148170

Documentos no de patente

Documento no de patente 1: Watanabe, K. et al., Nature Biotechnology 25, 681-686 (2007)

Documento no de patente 2: Su, H.-L. et al., Developmental Biology 290, 287-296 (2006)

Documento no de patente 3: Ikeda, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 11331-11336 (2005)

Documento no de patente 4: Watanabe, K. et al., Nature Neurosci. 8, 288-296 (2005)

Documento no de patente 5: Wataya, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 11796-11801 (2008)

Documento no de patente 6: Bharti, K. et al., Development 138, 873-878 (2011)

Compendio de la invención

Problemas que ha de solucionar la invención

La presente invención tiene el objetivo de proporcionar un método de inducción de la diferenciación de una célula madre en un cuerpo embrioide (también denominado “agregado” en lo sucesivo) que comprende un tejido nervioso central y un tejido ectodérmico no neural de cabeza *in vitro*. Además, la presente invención tiene como objetivo, en particular, proporcionar un método de inducción eficaz de la diferenciación en un tejido precursor hipofisario y diversas células productoras de hormonas hipofisarias como un tejido nervioso central *in vitro*.

Medios de solución de los problemas

Los presentes inventores realizaron estudios detalladas en un intento por resolver los problemas anteriormente mencionados y lograron reproducir el desarrollo de la pituitaria anterior *in vitro* y lograron inducir la diferenciación de células madre pluripotentes, tales como células ES y similares, dando lugar a un tejido precursor hipofisario y diversas células productoras de hormonas hipofisarias. Específicamente, estudiaron, además, las condiciones usando el método SFEBq divulgado en el documento de patente 3 y en el documento no de patente 5, y descubrieron por vez primera las condiciones capaces de inducir simultáneamente la diferenciación dando lugar tanto a un tejido nervioso central como a un tejido ectodérmico no neural de cabeza, en particular un tejido rostral de hipotálamo y un tejido ectodérmico rostral no neural de cabeza que es un epitelio continuo de tipo laminar, en un agregado. Además, indujeron un tejido precursor hipofisario (tejido de tipo bolsa de Rathke) a partir de este agregado, y lograron inducir diversas células productoras de hormonas hipofisarias a partir de este tejido. En función de tales hallazgos, los presentes inventores han completado la siguiente invención.

[1] Un método de producción de un agregado que comprende tanto un tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza que comprende:

(i) una etapa de formación de un agregado de células madre en un caldo libre de suero, y

(ii) una etapa de cultivo flotante del agregado formado en el caldo libre de suero, en el que el caldo libre de suero usado para el cultivo flotante comprende un sustituto de suero y un promotor de señales exógenas de BMP2 y/o BMP4 a una concentración que no cause la supresión de la diferenciación neural.

[2] El método de producción de [1] en el que el caldo libre de suero usado para el cultivo flotante comprende un promotor de la señal Shh.

[3] El método de producción de [2] en el que el promotor de la señal Shh es SAG.

[4] El método de producción de cualquiera de [1] a [3] en el que el promotor de señales es BMP2 y/o BMP4.

[5] Un método de producción de una célula productora de hormona adrenocorticotrópica que comprende:

(i) una etapa de producción de un agregado que comprende tanto tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza mediante el método de producción de cualquiera de [1] a [4], y

(ii) una etapa de cultivo flotante adicional del agregado que comprende tanto tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza obtenido en la etapa (i), en un caldo libre de suero que comprende un inhibidor de la señal Notch.

[6] Un método de producción de una célula productora de la hormona del crecimiento que comprende:

(i) una etapa de producción de un agregado que comprende tanto tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza mediante el método de producción de cualquiera de [1] a [4], y

(ii) una etapa de cultivo flotante adicional del agregado que comprende tanto tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza obtenido en la etapa (i), en un caldo libre de suero que comprende glucocorticoide.

[7] Un método de producción de una célula productora de prolactina que comprende:

(i) una etapa de producción de un agregado que comprende tanto tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza mediante el método de producción de cualquiera de [1] a [4], y

(ii) una etapa de cultivo flotante adicional del agregado que comprende tanto tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza obtenido en la etapa (i), en un caldo libre de suero que comprende un estrógeno.

[8] Un método de producción de una célula productora de la hormona estimulante del folículo, de la hormona luteinizante y/o de la hormona estimulante de la tiroides que comprende:

(i) una etapa de producción de un agregado que comprende tanto tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza mediante el método de producción de cualquiera de [1] a [4], y

(ii) una etapa de cultivo flotante adicional del agregado que comprende tanto tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza obtenido en la etapa (i), en un caldo acondicionado por células estromales obtenido cultivando células estromales en un caldo libre de suero.

[9] Un método de producción de un agregado que comprende tanto un tejido nervioso central como un tejido ectodérmico no neural de cabeza que comprende:

(i) una etapa de formación de un agregado de células madre en un caldo libre de suero, y

(ii) una etapa de cultivo flotante del agregado formado en el caldo libre de suero, en la que el caldo libre de suero usado para el cultivo flotante comprende un sustituto de suero y un promotor de señales exógenas de BMP2 y/o BMP4 a una concentración que no cause la supresión de la diferenciación neural.

[10] Un método de producción de una placoda que forma el epitelio olfativo, el cristalino o el oído interno que comprende:

(i) producir un agregado que comprende tanto un tejido nervioso central como un tejido ectodérmico no neural de cabeza mediante el método de producción de [9], y

(ii) autoformar la placoda en el agregado obtenido en la etapa (i).

Efecto de la invención

Según el método de la presente invención, las células madre pluripotentes, tales como células ES y similares, pueden ser inducidas a diferenciarse en agregados que comprenden un tejido nervioso central y un tejido ectodérmico no neural de cabeza, específicamente un agregado que comprende un tejido rostral de hipotálamo y un tejido ectodérmico rostral de cabeza que es un epitelio continuo de tipo laminar, o un tejido precursor hipofisario *in vitro*, y pueden ser inducidas, además, para diferenciarse dando lugar a diversas células productoras de hormonas hipofisarias. La glándula pituitaria es un órgano endocrino central que produce y secreta diversas hormonas, y una secreción anormal de hormonas ejerce una grave influencia en el cuerpo vivo. Por lo tanto, los agregados, los tejidos precursores de la pituitaria y las células productoras de hormonas hipofisarias obtenidos por el método de la presente invención pueden ser utilizados para el tratamiento y similares de las enfermedades causadas por la deficiencia de secreción de hormonas hipofisarias y de las enfermedades que causan una deficiencia en la secreción de hormonas hipofisarias.

Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1] La Fig. 1a muestra un esquema (vista sagital) del desarrollo de la pituitaria *in vivo*. La Fig. 1b muestra la expresión génica en la bolsa de Rathke y la expresión de Rx en el tejido hipotalámico ventral adyacente *in vivo* en E13 (marcador Rx del hipotálamo: verde; marcador Pitx1 del ectodermo no neural de cabeza: rojo). La Fig. 1c muestra el nivel de expresión de Pitx2 en ESC cultivadas por SFEBq/CDM (3000 células/agregado). Se observó poca expresión de Pitx2. La Fig. 1d muestra la elevación de la expresión de Pitx2 en ESC cultivadas por SFEBq/CDM en una condición (rojo) de gran agregación celular (LCA; a partir de 10000 células) o tratadas con BMP4 (azul). Las Figuras 1e y 1f muestran la expresión de Pitx1 (rojo) y Rx (verde, f) en agregados obtenidos poniendo en placas células ES murinas a alta concentración (condición LCA) y cultivándolas mediante el método SFEBq/gfCDM. La Fig. 1g muestra el esquema del resultado de la Fig. 1f. La Fig. 1h muestra que el tejido Rx^+ es $Chx10^-/Nestina^+$. La Fig. 1i muestra un gráfico que indica la influencia del momento de adición del acelerador SAG de la señal Shh sobre el nivel de expresión de lim3. La Fig. 1j muestra un análisis FACS que muestra una población $lim3::venus^+$ en agregados LCA con

tratamiento SAG (verde). La Fig. 1k muestra la comparación de la expresión de lim3 en agregados LCA con (derecha) o sin (izquierda) tratamiento SAG. Barras de escala, 100 µm (b,e,f); 50 µm (h); 500 µm (k).

[Fig. 2] La Fig. 2a muestra una agrupación de células lim3 positivas en agregados LCA tratados con SAG el día 13. La Fig. 2b muestra que las células Lim3 positivas en los agregados no expresan un marcador Tuj1 (Lim3 (verde), Tuj1 (rojo), Pitx1 (blanco)) de célula nerviosa. La Fig. 2c muestra poca expresión del marcador *Braquiuria* de mesodermo en los agregados. Las Figuras 2d-f muestran aspectos de la formación de vesículas de tipo bolsa de Rathke mediante células lim3 positivas en los agregados (días 8-12). Las Figuras 2g-j muestran la expresión de genes marcadores en bolsas vesiculares y tejidos circundantes tratados con SAG (Pitx1 (rojo, g-i), lim3 (verde, g; blanco, h; rojo, j), pancitoqueratina (verde, h), Rx (verde, i, j)). La Fig. 2k muestra una figura esquemática que muestra la expresión de genes marcadores en bolsas vesiculares y la periferia de las mismas. La Fig. 2l muestra la expresión de Pitx1 (rojo) y aPKC (verde) (marcador apical) *in vivo* en la bolsa de Rathke y tejidos circundantes. Las Figuras 2m y 2n muestran imágenes de microscopía electrónica de bolsas vesiculares: células epiteliales altas (m, apicales, arriba), células separadas en el lado basal (m, corchete), cilios apicales (n, puntas de flecha), unión apical (n, flecha). La Fig. 2o muestra células Islet1 positivas en la parte basal de las bolsas vesiculares (Lim3 (verde), Isl1 (rojo)). La Fig. 2p muestra un esquema de la generación *in vitro* de las vesículas de tipo bolsa de Rathke obtenidas. Barras de escala, 100 µm (a-d, f, g); 50 µm (e, i, l); 20 µm (j); 2 µm (k).

[Fig. 3] La Fig. 3a muestra la diferenciación que da lugar a cada una de las células productoras de hormonas hipofisarias. La Fig. 3b muestra la expresión potenciada de Tbx19 debido al tratamiento DAPT con el tejido precursor de la hipófisis obtenido mediante tratamiento SAG (día 20) (tratamiento DAPT (días 18-19)/tratamiento BIO (días 16-18)). La Fig. 3c muestra porcentajes de células $ACTH^+$ en células no neurales ($N\text{-}cad^-$) el día 22 (tratamiento DAPT (días 18-19)/tratamiento BIO (días 16-18)). Las Figuras 3d-g muestran la expresión de genes marcadores en agregados SAG^+ tratados con DAPT —rojo: ACTH, verde: E-cadherina (e)/neurofilamento (f)/PC2 (g)—. La Fig. 3h muestra la expresión atenuada de *Tbx19* y *ACTH* por el silenciamiento génico de lim3 arbitrado por ARNhc mediante tratamiento con desoxiciclina (Dox). La Fig. 3i muestra la expresión de *Rx, lim3* y *ACTH* de agregados SFEBq tratados con LCA+SAG con tratamiento DAPT. La Fig. 3j muestra un esquema de la generación de corticótropos a partir de la bolsa derivada de la ESC. La Fig. 3k muestra un gráfico que muestra las influencias de DAPT, BIO e IWP2 sobre la expresión de Pitx1 (día 26)

Las Figuras 3l y 3m muestran la generación de células GH^+ en agregados LCA+SAG (día 33) (se añadieron hidrocortisona e insulina los días 20-30). Las Figuras 3n y 3o muestran la generación de células $prolactina^+$ en agregados LCA+SAG (día 33) (se añadieron estradiol e insulina los días 20-30). Las Figuras 3p-3s muestran la generación de células LH^+, células FSH^+ y células TSH^+ en agregados LCA+SAG (día 33) (se añadió caldo acondicionado con PA6 (caldo de aclimatación) desde el día 10). Barras de escala, 20 µm (d, e); 50 µm (f, g); 100 µm (m, o, q, r, s).

[Fig. 4] La Fig. 4a muestra un esquema de ensayo de carga de CRH para la secreción de ACTH. La Fig. 4b muestra la potenciación de la secreción de ACTH mediante carga de CRH. La Fig. 4c muestra la potenciación de la secreción de ACTH mediante carga de CRH a diversas dosis. La Fig. 4d muestra la influencia de los tratamientos con SAG, DAPT y CRH sobre la secreción de ACTH partiendo de los agregados. La Fig. 4e muestra que el pretratamiento con hidrocortisona (F), factor negativo de retroalimentación sobre la secreción de ACTH, suprimió la potenciación de la secreción de ACTH mediante CRH. La Fig. 4f muestra que el pretratamiento con estradiol (E2) no influyó en la secreción de ACTH.

[Fig. 5] La Fig. 5a muestra el diseño de un experimento de trasplante de agregados en ratones hipofisectomizados e injerto de agregados (marcados con GFP) trasplantados bajo la cápsula suprarrenal el día 7 tras la operación (rojo: células $ACTH^+$; azul: DAPI; barra de escala, 100 µm). Las Figuras 5b y c muestran la falta de producción de ACTH debida a la hipofisectomía (con (c) o sin (b) carga de CRH). La Fig. 5d muestra los niveles de ACTH en ratones injertados con (derecha) o sin (izquierda) carga de CRH. Las Figuras 5e y 5f muestran mayores producciones de ACTH (e) and corticosterona (f) mediante carga de CRH. Las Figuras 5g y 5h muestran los niveles basales de producción de ACTH y corticosterona sin carga de CRH. Las Figuras 5i y 5j muestran la mejora de la actividad locomotora espontánea en ratones hipofisectomizados por el trasplante de células productoras de ACTH. La Fig. 5k muestra la supervivencia de ratones hipofisectomizados trasplantados con agregados, analizada por el método Kaplan-Meyer.

[Fig. 6] La Fig. 6 muestra la expresión de BMP2 y BMP4 en cultivos de gfCDM/SFEBq iniciados a 3000 células/agregado (LCA^-) o 10000 células/agregado (LCA^+).

[Fig. 7] La Fig. 7 muestra los resultados de un cultivo flotante de agregados usando células ES humanas a 12000 células/agregado. En los agregados a los que se añadieron 5 nM de BMP4 el día 3 de cultivo, se formaron el día 17 del cultivo agregados en los que las células de tejido rostral de hipotálamo Rx^+ están encapsuladas por un epitelio continuo cubierto por una única capa compuesto de tejidos de ectodermo rostral no neural de cabeza de $E\text{-}cadherina^+$. Además, el día 25 del cultivo se halló la formación de ectodermo no neural engrosado por $E\text{-}cadherina^+$.

[Fig. 8] La Fig. 8 muestra los resultados de mediciones de la expresión de Pitx1 en el ARNm, marcador de un tejido de ectodermo rostral no neural de cabeza, mediante PCR cuantitativa usando agregados celulares el día 17 del cultivo

de la Fig. 7. En los agregados a los que se añadieron 5 nM de BMP4, la expresión de Pitx1 en el ARNm aumentó aproximadamente diez veces con respecto a los agregados sin la adición.

Descripción de realizaciones

La presente invención es explicada en detalle a continuación.

(1) Tejidos y células obtenidos por el método de producción de la presente invención

(A) Agregados que comprenden tejido nervioso central y tejido ectodérmico no neural de cabeza

Según el método de producción de la presente invención (denominado a veces método de inducción de la diferenciación), puede inducirse la diferenciación que da lugar a un agregado que comprende tanto un tejido nervioso central como un tejido ectodérmico no neural de cabeza, en particular un tejido rostral de hipotálamo (también denominado simplemente tejido de hipotálamo) y un tejido ectodérmico rostral no neural de cabeza que es un epitelio continuo de tipo laminar (también denominado simplemente tejido ectodérmico no neural de cabeza). El agregado que comprende un tejido rostral de hipotálamo y un tejido ectodérmico rostral no neural de cabeza que es un epitelio continuo de tipo laminar es, por ejemplo, un agregado celular que comprende un tejido ectodérmico rostral no neural de cabeza compuesto por una monocapa de tipo epitelio continuo de tipo laminar de células Pitx1 positivas presentes en la superficie de contacto con un caldo de cultivo, y tejidos rostrales de hipotálamo compuestos de células Rx positivas dentro del tejido ectodérmico rostral no neural de cabeza. En el método de inducción de la diferenciación de la presente invención, dado que ambos tejidos de un tejido nervioso central y un tejido ectodérmico no neural de cabeza se forman simultáneamente en un solo agregado (específicamente, se forma un tejido ectodérmico de tipo laminar no neural de cabeza en el exterior del tejido nervioso central en un solo agregado), estos tejidos pueden interactuar tópicamente.

Es sabido que la interacción del tejido rostral de hipotálamo y el tejido ectodérmico rostral no neural de cabeza es necesaria para inducir la bolsa de Rathke (tejido precursor de la glándula pituitaria) en el proceso de desarrollo de un individuo (Bharti et al (2011) Development 138, 873-878).

Por ejemplo, cuando se forma un tejido ectodérmico rostral no neural de cabeza, que es un epitelio continuo de tipo laminar, en el exterior de un tejido rostral de hipotálamo en un solo agregado, estos tejidos pueden interactuar tópicamente e inducir un tejido precursor hipofisario, y, además, células productoras de hormonas de la hipófisis.

Además, la interacción del tejido nervioso central y el tejido ectodérmico no neural de cabeza también es necesaria para la formación de una placoda ectodérmica de cabeza que forma un órgano sensorial. Específicamente, el epitelio olfativo se desarrolla por una placoda formada por una interacción entre un tejido cerebral y un tejido ectodérmico rostral no neural de cabeza (placoda olfativa); el cristalino se desarrolla por una placoda (placoda de cristalino) formada por una interacción entre un tejido retiniano y un tejido ectodérmico no neural de cabeza; y el oído interno se desarrolla por una placoda (placoda ótica) formada por una interacción entre un tejido metencefálico y un tejido ectodérmico no neural de cabeza.

Es decir, cuando se forma una combinación de los tejidos anteriormente mencionados con la constitución anteriormente mencionada en un solo agregado, estos tejidos pueden interactuar tópicamente, lo que lleva a la formación de cada placoda y al desarrollo de cada órgano sensorial.

Que las células del agregado pertenezcan a un tejido nervioso central o a un tejido ectodérmico no neural de cabeza puede decidirse en función del perfil de expresión génica del tejido nervioso central y el tejido ectodérmico no neural de cabeza, que se observa en un cuerpo vivo desarrollado normalmente. El perfil específico de expresión génica se describe posteriormente en (D). El tejido rostral de hipotálamo puede ser un tejido nervioso Rx^+, N-cadherina$^+$, $Sox1^+$. El tejido rostral de hipotálamo puede ser un tejido nervioso Rx^+, $Chx10^-$, $Nkx2.1^+$, Nestina$^+$. El tejido ectodérmico rostral de cabeza (ectodermo rostral no neural de cabeza) puede ser un tejido epitelial continuo de tipo laminar formado en una capa superficial del agregado, que está compuesta de células monocapa Pitx1 positivas, N-cadherina$^+$.

(B) Tejido de tipo bolsa de Rathke

En el desarrollo de un cuerpo vivo, la adenohipófisis (pituitaria anterior y pituitaria intermedia) se induce a partir de un tejido denominado bolsa de Rathke. La bolsa de Rathke se forma en una etapa muy temprana de ontogénesis por invaginación de una placoda formada en el ectodermo rostral no neural de cabeza, y, posteriormente, se separa del ectodermo para convertirse en una bolsa vesicular epitelial.

Según el método de la presente invención, se forma una bolsa vesicular que tiene una estructura epitelial y una polaridad similares a las de la bolsa de Rathke en el agregado anteriormente mencionado que comprende un tejido rostral de hipotálamo y un tejido ectodérmico rostral no neural de cabeza. La bolsa vesicular está presente en las inmediaciones del tejido de hipotálamo, como la bolsa de Rathke en un cuerpo vivo, y también está adyacente al tejido ectodérmico rostral no neural de cabeza. Es decir, el método de la presente invención puede reproducir el microentorno en el desarrollo de la glándula pituitaria en un cuerpo vivo (véase la Fig. 2p).

Por lo tanto, el “tejido de tipo bolsa de Rathke” o “tejido precursor hipofisario” en la presente invención se define por las características —por ejemplo, tener características morfológicas (vesícula cóncava o bolsa vesicular) similares a las de la bolsa de Rathke observadas en un cuerpo vivo normalmente desarrollado— que están presentes en las inmediaciones del tejido de hipotálamo y el tejido ectodérmico rostral no neural de cabeza que tienen el mismo perfil de expresión génica que el de la bolsa de Rathke en un cuerpo vivo, y similares. Los perfiles específicos de expresión génica se describen posteriormente en (D). El tejido de tipo bolsa de Rathke puede ser una bolsa vesicular epitelial Lim3 positiva.

(C) Células productoras de hormonas hipofisarias

La pituitaria anterior secreta hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona del crecimiento (GH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), prolactina (PRL), hormona estimulante del folículo ovárico (FSH) y hormona luteinizante (LH) (hormona de la pituitaria anterior), y la pituitaria intermedia secreta hormona estimulante de los melanocitos (MSH) (hormona de la pituitaria intermedia). La MSH es uno de los péptidos relacionados con la ACTH, y se forma por degradación enzimática de la propiomelanocortina, que es un precursor común con la ACTH. Por otro lado, dado que la oxitocina (OX) y la vasopresina (VP), que son hormonas secretadas por la pituitaria posterior, se producen en el hipotálamo, no están incluidas en la hormona hipofisaria en la presente memoria. La hormona hipofisaria en la presente memoria se refiere a una hormona de la pituitaria anterior.

(i) Hormona adrenocorticotrópica (ACTH)

También es denominada corticotropina. Es una hormona peptídica que tiene 39 aminoácidos y es secretada de células que producen y secretan hormona adrenocorticotrópica (corticótropos) en la pituitaria anterior. La ACTH presenta una acción secretagoga de glucocorticoides. La secreción de ACTH es promovida por la hormona liberadora de corticotropina (CRH) secretada desde el hipotálamo, y retroalimentada negativamente por glucocorticoide.

(ii) Hormona del crecimiento (GH)

También es denominada somatotropina. Es secretada de células productoras y secretoras de la hormona del crecimiento (somatótropos) en la pituitaria anterior. En el caso de los seres humanos, es una hormona peptídica que tiene 191 aminoácidos. La GH presenta diversas actividades biológicas, como una acción promotora en la síntesis de proteínas y en el crecimiento del cartílago, acción lipolítica y similares. La secreción de GH es estimulada por una hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) secretada del hipotálamo, y es suprimida por la somatostatina. La secreción de GH también es retroalimentada negativamente por la propia GH y por IGF-1.

(iii) Prolactina (PRL)

Es una hormona peptídica secretada principalmente por células productoras y secretoras de prolactina (lactótropos) en la pituitaria anterior, y que tienen 199 aminoácidos. En los seres humanos, la PRL promueve la secreción de leche y la diferenciación y el desarrollo de la glándula mamaria en presencia de estrógeno y presenta una acción en el mantenimiento del embarazo y similares. La secreción de PRL es estimulada por factores liberadores de prolactina (PRF) (por ejemplo, la hormona liberadora de la hormona estimulante de la tiroides (TRH), la vasopresina, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el péptido histidina isoleucina (PHI)) y TRH, y es suprimida por factores inhibidores de la prolactina (PIF) (por ejemplo, dopamina, ácido γ-amino butírico (GABA)).

(iv) Hormona luteinizante (LH)

Es una clase de hormonas gonadotrópicas (gonadotropinas), y es una glucoproteína compuesta por una subunidad α y una subunidad β, que es secretada de células productoras y secretoras de la hormona gonadotrópica (gonadótropos) en la pituitaria anterior. En la hembra, la LH actúa junto con la FSH en el desarrollo del folículo para el crecimiento del folículo, promueve la ovulación y la luteinización, estimula la producción de estrógeno y progesterona, y desempeña un importante papel en la formación del ciclo menstrual. En el varón, actúa sobre las células de Leydig en el testículo para promover la secreción de testosterona. La secreción de LH también es promovida por la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) secretada desde el hipotálamo.

(v) Hormona estimulante del folículo (FSH)

Es una clase de hormonas gonadotrópicas (gonadotropinas), y es una glucoproteína compuesta por una subunidad α y una subunidad β, que es secretada de células productoras y secretoras de la hormona gonadotrópica (gonadótropos) en la pituitaria anterior. La secreción de FSH también es promovida por la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) secretada desde el hipotálamo. En la hembra, la FSH actúa sobre el ovario para crear el folículo primordial en el folículo en desarrollo, actúa junto con la LH para desarrollar el mismo, dando lugar al folículo maduro, y promueve la secreción de estrógeno del folículo. Cuando el estrógeno aumenta, la secreción de GnRH es suprimida por la retroalimentación al hipotálamo y también se suprime la secreción de FSH. Cuando el estrógeno aumenta aún más, la GnRH aumenta debido a una retroalimentación positiva al hipotálamo y a la glándula pituitaria. En el varón, actúa sobre las células de Sertoli en el testículo para promover la secreción de testosterona y promueve la espermatogénesis.

(vi) Hormona estimulante de la tiroides (TSH)

Es una glucoproteína compuesta por una subunidad α y una subunidad β (la subunidad α es común con LH, FSH), que es secretada por células productoras y secretoras de hormona estimulante de la tiroides (tirótropos) en la pituitaria anterior. La TSH actúa sobre la glándula tiroides para promover la producción y la secreción de hormona de la glándula tiroides. La secreción de TSH es estimulada por la hormona liberadora de tirotropina (TRH) secretada desde el hipotálamo, y es retroalimentada negativamente por la hormona tiroidea.

Una célula capaz de producir y secretar cualquiera de estas hormonas hipofisarias, que sea obtenida por el método de inducción de la diferenciación de la presente invención, es denominada genéricamente en la presente memoria "célula productora de hormonas hipofisarias".

Ejemplos de la enfermedad causada por la falta de producción o secreción de cualquiera de las hormonas hipofisarias mencionadas anteriormente incluyen hipoadrenocorticismo, enanismo por deficiencia de la hormona del crecimiento, deficiencia de GH de inicio en edad adulta, enanismo hipofisario, cretinismo, infertilidad y similares. En el panhipopituitarismo (incluido el síndrome de la silla turca vacía, apoplejía hipofisaria, lesión posoperatoria de la hipófisis), hipopituitarismo parcial y deficiencia hormonal aislada de la pituitaria anterior (específicamente, deficiencia aislada de ACTH, deficiencia aislada de la hormona del crecimiento, deficiencia aislada de la TSH, deficiencia aislada de la prolactina, deficiencia aislada de la hormona gonadotrópica), se produce una falta en la producción o la secreción de una o todas las hormonas hipofisarias mencionadas anteriormente.

(D) Identificación de tejidos y células

Puede confirmarse en qué tejidos o células se han diferenciado los tejidos o las células obtenidos por el método de la presente invención, usando, como índice, la presencia o ausencia de expresión de un gen marcador, o la liberación de una hormona hipofisaria en un caldo o la acumulación intracelular de la proteína precursora en el caso de células productoras de hormonas hipofisarias, y similares, o combinándolas según sea necesario. Además, los tejidos o células obtenidos también pueden ser especificados observando la morfología de los tejidos y las células. Además, también se puede aislar un tejido o una célula deseados en función de tales patrones de expresión de marcadores y de la morfología del tejido o de las células.

Ejemplos de los marcadores usados en la presente invención incluyen, sin limitación, hormonas hipofisarias tales como ACTH, GH, PRL, LH, FSH, TSH y similares, N-cadherina, Nkx2.1 (marcador neural), Sox1 (marcador del ectodermo neural), nestina (marcador del ectodermo neural), neurofilamento y NSE (enolasa específica a las neuronas) (marcador neuronal), Rx (marcador del hipotálamo), Pitx1 y Pitx2 (marcador del ectodermo no neural de cabeza), Chx10 (marcador retiniano), Lim3 (marcador de la pituitaria inicial /del tejido precursor de la pituitaria), Islet1 y 2 (marcador tardío de la bolsa de Rathke), E-cadherina (marcador de células epiteliales), Prop1 y Pit1 (marcadores específicos a precursores de gonadótropos, somatótropos, lactótropos o tirótropos caudomediales), Tbx19 (marcador específico a los corticótropos), PC2 (marcador de linaje melanotrópico) y similares. La identidad de la célula obtenida puede especificarse de forma apropiada combinando la presencia o ausencia de la expresión de estos y otros genes marcadores.

Los tejidos o células obtenidos por el método de inducción de la diferenciación de la presente invención pueden ser caracterizados según el perfil de expresión génica de un tejido o una célula realmente presentes en un cuerpo vivo.

Por ejemplo, por definición, usando los marcadores anteriormente mencionados, la célula de tejido rostral de hipotálamo es Rx^+, preferiblemente Rx^+, N-cadherina$^+$, nestina$^+$, $Nkx2.1^+$, $Chx10^-$. La célula de tejido ectodérmico rostral de cabeza (ectodermo rostral no neural de cabeza) es $Pitx1^+$, preferiblemente $Pitx1^+$, $Pitx2^+$, E-cadherina$^+$. La célula de tejido precursor hipofisario (tejido de tipo bolsa de Rathke) es $Lim3^+$, $Pitx1^+$, $Pitx2^+$, $Isl1^+$, E-cadherina$^+$ (que coincide con el perfil de expresión del primordio hipofisario). La célula productora de la hormona hipofisaria (no neural) es neurofilamento$^-$, NSE$^-$. La célula productora de ACTH hipofisaria es ACTH$^+$, $Tbx19^+$, $PC2^-$, y otras células productoras de hormonas hipofisarias son $Tbx19^-$. La célula productora de MSH de la pituitaria intermedia es ACTH$^-$, $Tbx19^+$, $PC2^+$. La célula productora de GH hipofisaria, la célula productora de PRL y la célula productora de TSH son diferenciadas en sendas células productoras de hormonas hipofisarias mediante un precursor intermedio $Pitx1^+$.

Según el método de la presente invención, la diferenciación que da lugar al tejido nervioso central y al tejido ectodérmico no neural de cabeza anteriormente mencionados —por ejemplo, un tejido rostral de hipotálamo y un tejido ectodérmico rostral de cabeza (ectodermo rostral no neural de cabeza)— es inducida simultáneamente en un solo agregado. En este caso, se obtiene un agregado en el que hay presente un tejido ectodérmico rostral de cabeza (ectodermo no neural de cabeza) en una capa superficial, y hay presente un tejido nervioso central (tejido rostral de hipotálamo) dentro del mismo.

Según el método de la presente invención se forma en un agregado, además, un tejido de tipo bolsa de Rathke. La bolsa vesicular presenta la misma expresión de marcadores que los tejidos precursores de la pituitaria y tiene una estructura epitelial y una polaridad morfológicamente similares. Además, como el tejido precursor hipofisario (la bolsa de Rathke) en un cuerpo vivo, está presente en las inmediaciones de un tejido de hipotálamo Rx positivo, y también se forma adyacente a un tejido ectodérmico rostral no neural de cabeza. Esto indica que el método de inducción de la diferenciación de la presente invención imita el microentorno en el desarrollo de un tejido precursor hipofisario en el

proceso de desarrollo embriogénico. Por lo tanto, en la presente invención el tejido de tipo bolsa de Rathke también es denominado tejido precursor hipofisario.

En el caso de células productoras de hormonas hipofisarias, la diferenciación que da lugar a cada célula productora de hormonas hipofisarias puede ser confirmada usando la liberación de cada una de ACTH, GH, PRL, LH, FSH y TSH al medio, la acumulación intracelular de proteínas precursoras de las mismas y similares como índices.

Cuando la expresión de genes marcadores específicos a cada célula productora de hormonas hipofisarias es usada como índice, la célula productora de ACTH puede ser caracterizada por la expresión de ACTH y Tbx19 como índice; la célula productora de GH puede ser caracterizada por la expresión de GH como índice; la célula productora de PRL puede ser caracterizada por la expresión de PRL como índice; la célula productora de TSH puede ser caracterizada por la expresión de TSH como índice; la célula productora de FSH puede ser caracterizada por la expresión de FSH como índice; y la célula productora de LH puede ser caracterizada por la expresión de LH como índice. Aunque hormonas hipofisarias también son secretadas por la neurona, cada célula productora de hormonas hipofisarias obtenida por el método de producción de la presente invención puede ser distinguida de tal neurona, porque los marcadores NSE neurales y el neurofilamento son negativos.

La expresión del gen marcador es analizada llevando a cabo PCR cuantitativa —por ejemplo, en un sistema 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems), según las instrucciones del fabricante—, y normalizando los datos por la expresión de GAPDH. El método de la PCR cuantitativa resulta conocido para las personas con un dominio normal de la técnica. Alternativamente, las células pueden ser manipuladas (por inserción) para permitir la expresión de un gen marcador deseado como proteína de fusión de un producto génico marcador y GFP, venus y similares. También es posible detectar la expresión de la proteína usando un anticuerpo específico al producto génico marcador.

Estas proteínas pueden ser detectadas por inmunotinción o radioinmunoensayo. Además, también se puede analizar la producción de otras hormonas hipofisarias de manera similar usando un anticuerpo y similares específicos a la hormona que haya de producirse y similares. Tal método resulta conocido para las personas con un dominio normal de la técnica.

(2) Células madre

“Célula madre” se refiere a una célula capaz de retener un potencial constante para la diferenciación incluso después de sufrir una división celular. Ejemplos de referencia de células madre incluyen células madre embrionarias (células ES) con pluripotencia derivadas de un huevo fertilizado o de un embrión clonado. Ejemplos de células madre también incluyen células madre somáticas y células madre pluripotentes que están presentes en tejidos en un cuerpo vivo, células madre hepáticas, células madre dérmicas y células madre germinales que sirven de base para respectivos tejidos, células madre pluripotentes derivadas de una célula madre germinal, células madre pluripotentes derivadas de una célula somática que se obtienen por reprogramación nuclear, y similares.

En particular, “célula madre pluripotente” se refiere a una célula madre que permite el cultivo *in vitro*, y que tiene el potencial de diferenciarse dando lugar a todas las células —salvo la placenta— que constituyen el cuerpo (tejidos derivados de las tres capas germinales del embrión (ectodermo, mesodermo, endodermo)) (pluripotencia); también están incluidas en la misma las células madre embrionarias. Como referencia, una “célula madre pluripotente” puede ser obtenida de un huevo fertilizado o de un embrión clonado. También puede obtenerse una “célula madre pluripotente” de una célula madre germinal, o de una célula madre en un tejido. También se incluyen células que tienen una pluripotencia de diferenciación similar a la de las células madre embrionarias, conferida artificialmente transfiriendo varios genes diferentes a una célula somática (también denominadas células madre pluripotentes inducidas). Se pueden preparar células madre pluripotentes por un método conocido por sí mismo. Métodos disponibles incluyen, por ejemplo, los métodos descritos en Cell 131(5), pp. 861-872, Cell 126(4), pp. 663-676 y otros lugares.

Como células madre, pueden usarse, por ejemplo, células derivadas de un animal de sangre caliente, preferiblemente de un mamífero. Los mamíferos incluyen, por ejemplo, animales de laboratorio, incluyendo roedores como ratones, ratas, hámsteres y cobayas, y conejos; animales domésticos como cerdos, ganado vacuno, cabras, caballos y ovejas; animales de compañía como perros y gatos; primates como seres humanos, monos, orangutanes y chimpancés.

En la técnica se divulgan células madre, que incluyen células madre embrionarias de un mamífero o similar, establecidas cultivando un embrión temprano previo a la implantación (abreviadas, en lo sucesivo, como “células madre embrionarias I”), células madre embrionarias establecidas cultivando un embrión temprano preparado por trasplante nuclear del núcleo de una célula somática (abreviadas, en lo sucesivo, como “células madre embrionarias II”), células madre pluripotentes inducidas (células iPS) establecidas transfiriendo varios genes diferentes a una célula somática, y/o actuando como compuesto, y células madre pluripotentes preparadas modificando un gen en un cromosoma de células madre embrionarias I, células madre embrionarias II o células iPS usando una técnica de ingeniería genética (abreviadas, en lo sucesivo, como “células madre pluripotentes modificadas”).

Como referencia, las células madre embrionarias I incluyen células madre embrionarias establecidas a partir de una masa celular interna que constituye un embrión temprano, células EG establecidas a partir de una célula germinal

primordial, células aisladas de una población celular que posee la pluripotencia de los embriones tempranos antes de su implantación (por ejemplo, el ectodermo primordial), células obtenidas cultivando estas células, y similares.

Las células madre embrionarias I pueden prepararse cultivando un embrión temprano antes de su implantación según un método descrito en la bibliografía (Manipulating the Mouse Embryo — A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)).

Únicamente como referencia las células madre embrionarias II pueden ser preparadas usando, por ejemplo, métodos documentados por Wilmut et al. (Nature, 385, 810 (1997)), Cibelli et al. (Science, 280, 1256 (1998)), Akira Iritani et al. (Protein, Nucleic Acid and Enzyme, 44, 892 (1999)), Baguisi et al. (Nature Biotechnology, 17, 456 (1999)), Wakayama et al. (Nature, 394, 369 (1998); Nature Genetics, 22, 127 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14984 (1999)), Rideout III et al. (Nature Genetics, 24, 109 (2000)) y otros; por ejemplo, según se describe más abajo.

También se sabe en la técnica que, extrayendo el núcleo de una célula de mamífero y reprogramando luego el núcleo (una operación de devolver el núcleo a un estado de reanudación del desarrollo), iniciando el desarrollo usando un método que implica su inyección en un huevo no fertilizado enucleado de un mamífero, y cultivar el huevo que ha iniciado el desarrollo, puede obtenerse un huevo que tiene el núcleo de otra célula somática y ha comenzado su desarrollo normal.

Se conocen varios métodos de reprogramación del núcleo de una célula somática. Por ejemplo, el núcleo puede ser reprogramado cambiando el caldo usado para cultivar la célula donante del núcleo de un caldo que comprende del 5 al 30%, preferiblemente el 10%, de suero fetal bovino (por ejemplo, caldo M2) a un caldo oligotrófico que comprende del 0 al 1%, preferiblemente 0,5%, de suero fetal bovino, y cultivando la célula durante entre 3 y 10 días, preferiblemente 5 días, para inducir el ciclo celular a un estado de fase de reposo (etapa G0 o etapa G1).

El núcleo también puede ser reprogramado inyectando el núcleo de la célula donante del núcleo en un huevo no fertilizado enucleado de un mamífero de la misma especie, y cultivando la célula durante varias horas, preferiblemente durante entre 1 y 6 horas.

El núcleo reprogramado es capaz de comenzar el desarrollo en el huevo no fertilizado enucleado. Se conocen varios métodos que permiten que el núcleo reprogramado empiece el desarrollo en el huevo no fertilizado enucleado. Trasplantando un núcleo reprogramado induciendo el ciclo celular a un estado de fase de reposo (fase G0 o fase G1) en un huevo no fertilizado enucleado de un mamífero de la misma especie mediante el método de electrofusión y similares, el huevo puede ser activado y permitirse que comience su desarrollo.

Un núcleo reprogramado inyectando el núcleo en un huevo no fertilizado enucleado de un mamífero de la misma especie se vuelve a trasplantar a un huevo no fertilizado enucleado de un mamífero de la misma especie mediante un método que usa un micromanipulador o similar, y se lo estimula con un activador del huevo (por ejemplo, estroncio y similares), y posteriormente es tratado con un inhibidor de la división celular (por ejemplo, citocalasina B y similares) para suprimir la liberación del segundo cuerpo polar, por lo que puede iniciarse el desarrollo. Este método es adecuado cuando el mamífero es, por ejemplo, un ratón o similar.

Una vez que se obtiene un huevo que haya empezado a desarrollarse, pueden obtenerse células madre embrionarias usando métodos públicamente conocidos descritos en Manipulating the Mouse Embryo — A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994); Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993); Biomanual Series 8: Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice Using ES Cells, Yodosha (1995) y similares.

Puede producirse una célula iPS transfiriendo, por ejemplo, Oct3/4, Sox2 y Klf4 (c-Myc o n-Myc añadidos, además, según se requiera) a una célula somática (por ejemplo, fibroblasto, célula dérmica y similares) (Cell, 126: pp. 663-676, 2006; Nature, 448: pp. 313-317, 2007; Nat Biotechnol, 26: pp. 101-106, 2008; Cell 131: 861-872, 2007). También puede producirse introduciendo Oct3/4 y Sox2, (Klf4, adicionalmente, según sea necesario), haciéndolos reaccionar con un inhibidor de la histona deacetilasa —el ácido valproico (Nature Biotechnology, 26: pp. 1269-1275, 2008), pero el método no se limita a ello.

Pueden prepararse células madre pluripotentes modificadas usando, por ejemplo, tecnología de recombinación homóloga. Ejemplos del gen del cromosoma que ha de modificarse en la preparación de células madre pluripotentes modificadas, genes antigénicos de histocompatibilidad, genes relacionados con enfermedades basadas en trastornos de células del sistema nervioso, y similares. Puede llevarse a cabo una modificación del gen diana en el cromosoma usando métodos descritos en Manipulating the Mouse Embryo — A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994); Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993); Biomanual Series 8: Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice Using ES Cells, Yodosha (1995) y similares.

Específicamente, se aísla, por ejemplo, un gen genómico de un gen diana que ha de modificarse (por ejemplo, genes antigénicos de histocompatibilidad, genes relacionados con enfermedades y similares), y se prepara un vector diana para la recombinación homóloga del gen diana usando el gen genómico aislado. Transfiriendo el vector diana preparado a una célula madre embrionaria, y seleccionando células sometidas a recombinación homóloga entre el gen diana y el vector diana, pueden prepararse células madre que tienen un gen modificado en el cromosoma.

Métodos de aislamiento de un gen genómico de un gen diana incluyen métodos públicamente conocidos descritos en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) y otros lugares. También se puede aislar un gen genómico de un gen diana usando un sistema de selección por biblioteca de ADN genómico (producido por Genome Systems), equipos de reactivos Universal GenomeWalker™ (producidos por CLONTECH) y similares.

Pueden lograrse la preparación de un vector diana para una recombinación homóloga de un gen diana y la clasificación eficaz de un recombinante homólogo mediante un método descrito en Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993); Biomanual Series 8: Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice Using ES Cells, Yodosha (1995) y en otros lugares. El vector diana usado puede ser uno cualquiera del tipo de reemplazo y del tipo de inserción; métodos útiles de clasificación incluyen la selección positiva, la selección de promotores, la selección negativa, la selección poli A y similares.

Métodos disponibles de selección de un recombinante homólogo deseado de entre las líneas celulares clasificadas incluyen la hibridación de Southern, PCR y similares, para ADN genómico.

Hay disponibles células madre en las organizaciones especificadas, y pueden adquirirse productos comerciales. Por ejemplo, las células madre embrionarias humanas KhES-1, KhES-2 y KhES-3 están disponibles en el Instituto de Ciencias Médicas Punteras, Universidad de Kioto. Ejemplos de células madre embrionarias murinas incluyen células EB5 y similares.

Las células madre pueden ser cultivadas para su mantenimiento mediante un método conocido por sí mismo. Por ejemplo, las células madre pueden mantenerse por cultivo sin fibroblastos con la adición de suero fetal bovino (FCS), Knockout™ Serum Replacement (sustitución de suero de inhibición, KSR) y LIF.

(3) Formación de aglutinados homogéneos de células madre y cultivo flotante de los mismos

La etapa de formación de agregados homogéneos de células madre y la etapa de cultivo flotante de los agregados que han de usarse en el método de inducción de la diferenciación de la presente invención son casi iguales que las del “método SFEBq” divulgado en el documento de patente 3 y en el documento no de patente 5.

“Formación de agregados homogéneos de células madre” se refiere a la formación de agregados cualitativamente homogéneos de células madre permitiendo que “un número dado de células madre dispersas se agreguen rápidamente” al permitir que las células madre se ensamblen y formen agregados de células madre y cultivar los agregados (cultivo agregado). Lo mismo se refiere en particular a promover la epitelización de células derivadas de células madre permitiendo que “las células se agreguen rápidamente”. Por ende, según se usa en la presente memoria, la expresión “permitir que las células se agreguen rápidamente” se refiere a la formación con alta reproducibilidad una estructura de tipo epitelial en las células producidas, permitiendo que las células madre se agreguen de manera homogénea.

“Cultivo flotante de los agregados homogéneos de células madre” o “Cultivo de los agregados homogéneos de células madre como agregados flotantes (también denominados masa agregada)” se refiere a cultivo de las células madre ensambladas para formar agregados homogéneos obtenidos en la etapa anteriormente mencionada, en un caldo de cultivo en condiciones que no son adhesivas para el recipiente de cultivo celular (en la presente memoria, estas etapas se describen conjuntamente como “método SFEBq”). Cuando se cultivan de forma flotante las células madre, el cultivo se lleva a cabo, preferiblemente, en ausencia de fibroblastos para facilitar la formación de agregados suspendidos, y/o para logar una inducción eficaz de la diferenciación (por ejemplo, la inducción de la diferenciación dando lugar a células ectodérmicas, como células del sistema nervioso).

Puede emplearse cualquier método para formar agregados homogéneos de células madre, siempre y cuando se formen agregados homogéneos de células madre al permitir que “las células se agreguen rápidamente”, y se forme una estructura de tipo epitelial de las células producidas de las células madre con elevada reproducibilidad; tales métodos incluyen, por ejemplo, un método en el que las células están rodeadas en un espacio pequeño usando una placa con pocillos pequeños (placa de 96 pocillos), microporos o similares, un método en el que las células se agregan por centrifugación durante un tiempo breve usando un tubo centrífugo pequeño, y similares.

Para formar agregados puede usarse cualquier recipiente de cultivo, siempre y cuando permita que se forme un agregado homogéneo de células madre al permitir que “las células se agreguen rápidamente”; los expertos en la técnica son capaces de determinar la opción según sea apropiado. Tales recipientes de cultivo incluyen, por ejemplo, matraces, matraces de cultivos tisulares, placas, placas de Petri, placas de cultivos tisulares, multiplatos, microplacas, placas de micropocillos, multiporos, multiplacas, placas de múltiples pocillos, portaobjetos con cámara, placas de Petri, tubos, bandejas, bolsas de cultivo y frascos con bola. Para la rápida agregación de las células, según se ha mencionado anteriormente, es preferible el uso de un recipiente de cultivo que tenga un espacio de cultivo comparativamente pequeño. Desde el punto de vista de la formación de agregados homogéneos, es preferible que estos recipientes de cultivo sean no adhesivos para las células. Recipientes útiles de cultivo no adhesivos para las células incluyen recipientes de cultivo cuyas superficies no han sido sometidas a un tratamiento artificial para mejorar la adherencia de las células (por ejemplo, un tratamiento de recubrimiento con una matriz extracelular y similares).

Un recipiente de cultivo que haya de ser usado para el cultivo flotante no está particularmente limitado, siempre y cuando el cultivo flotante de células sea posible, y pueden usarse los mismos que los recipientes de cultivo anteriormente mencionados. Cuando los agregados son sometidos a un cultivo flotante, el recipiente de cultivo es, preferiblemente, no adhesivo a las células, como los mencionados anteriormente. Como recipiente de cultivo para ser usado para un cultivo flotante, puede usarse directamente el usado para formar los agregados.

La concentración de células madre en el momento de la formación del agregado puede regularse según resulte apropiado para permitir que los expertos en la técnica formen agregados de células madre se formen de manera más homogénea y eficaz. Sin embargo, preferiblemente se emplea una alta densidad celular (HCD) (también denominada condición de gran agregación celular (LCA)), para que aumente la expresión de factores endógenos de crecimiento en el agregado y, en consecuencia, se induzca simultáneamente la diferenciación, dando lugar tanto a un tejido nervioso central como a un tejido ectodérmico no neural de cabeza (en particular, un tejido rostral de hipotálamo y un tejido ectodérmico rostral de cabeza). Aunque la formación de agregados se ha llevado a cabo sembrando células a bajas concentraciones en la técnica anterior (por ejemplo, el documento no de patente 5, el documento de patente 3, etc.), con tan baja concentración celular, es menos probable que aumente la expresión de factores endógenos de crecimiento en el agregado y, a no ser que se aplique estimulación con un promotor exógeno de la señal BMP (por ejemplo, BMP4), es difícil que se induzca una diferenciación simultánea que dé lugar tanto a un tejido nervioso central como a un tejido ectodérmico no neural de cabeza (en particular, un tejido rostral de hipotálamo y un tejido ectodérmico rostral de cabeza).

El “factor endógeno de crecimiento” anteriormente mencionado se refiere a las BMP (proteínas morfogenéticas óseas); en particular, BMP2, BMP4, o tanto BMP2 como BMP4. La expresión “aumentada” de factores endógenos de crecimiento en el agregado significa un aumento en la expresión de factores endógenos de crecimiento en un instante del día 7 o posteriormente desde el inicio del cultivo con una concentración celular elevada, en comparación con la que se produce cuando el agregado se forma con una concentración celular baja (por ejemplo, 3000 células/agregado), y se refiere a un aumento de al menos no menos de 1,8 veces, preferiblemente no menos de 1,9 veces, más preferiblemente no menos de 2,0 veces. Al contrario, cuando la expresión de factores endógenos de crecimiento es demasiado alta, puede suprimirse la formación de un tejido nervioso central y un tejido ectodérmico no neural de cabeza que induzca la formación de la placoda para la glándula pituitaria y el órgano sensorial, en particular un tejido rostral de hipotálamo and a tejido ectodérmico rostral de cabeza (en el caso de la placoda hipofisaria). Por lo tanto, el aumento en la expresión del factor endógeno de crecimiento generalmente no es más de 5,0 veces, preferiblemente no más de 4,0 veces, más preferiblemente no más de 3,5 veces.

Aunque la expresión de factores endógenos de crecimiento puede ser medida ya sea por el nivel de ARNm o el nivel de proteína, es medida preferiblemente en el nivel de ARNm. La cuantificación de la proteína y el ARNm puede realizarse usando métodos conocidos en la técnica. La cuantificación del ARNm se lleva a cabo, preferiblemente, mediante PCR cuantitativa (por ejemplo, PCR en tiempo real). En una realización, el nivel de expresión de factores endógenos de crecimiento se refiere al nivel de expresión de una de BMP4 y BMP2.

En un instante del día 7 o posteriormente desde el inicio del cultivo con una concentración celular elevada, la expresión ya sea de BMP2 o BMP4 en el agregado formado a una concentración celular elevada puede ser al menos no menos de 1,8 veces, preferiblemente no menos de 1,9 veces, más preferiblemente no menos de 2,0 veces, en comparación con la que se produce cuando el agregado se forma con una concentración celular baja (por ejemplo, 3000 células/agregado). Además, en el mismo instante, la expresión ya sea de BMP2 o BMP4 en el agregado es generalmente no más de 5,0 veces, preferiblemente no más de 4,0 veces, más preferiblemente no más de 3,5 veces, en comparación con las que se producen con una concentración celular baja.

En un instante del día 7 o posteriormente desde el inicio del cultivo con una concentración celular elevada, la expresión ya sea de BMP2 o BMP4 en el agregado formado a una concentración celular elevada puede ser al menos no menos de 1,8 veces, preferiblemente no menos de 1,9 veces, más preferiblemente no menos de 2,0 veces, en comparación con la que se produce cuando el agregado se forma con una concentración celular baja (por ejemplo, 3000 células/agregado). Además, en el mismo instante, la expresión tanto de BMP2 como de BMP4 en el agregado es generalmente no más de 5,0 veces, preferiblemente no más de 4,0 veces, más preferiblemente no más de 3,5 veces, en comparación con las que se producen con una concentración celular baja.

En una realización, inducir una diferenciación simultánea que dé lugar tanto a un tejido nervioso central como a un tejido ectodérmico no neural de cabeza (en particular, un tejido rostral de hipotálamo y un tejido ectodérmico rostral de cabeza que sea un epitelio continuo de tipo laminar) en un agregado, es importante formar el agregado con una concentración que permita lograr un “aumento” en la expresión de los factores endógenos de crecimiento (es decir, BMP2 y/o BMP4), según se ha mencionado anteriormente, en el agregado (condiciones de alta densidad celular (HCD) o gran agregación celular (LCA)). En particular, cuando está ausente la estimulación con promotor exógeno de la señal BMP (por ejemplo, BMP4), es preferible formar el agregado con una concentración celular que logre un “aumento” en la expresión de los factores endógenos de crecimiento (es decir, BMP2 y/o BMP4) en el agregado (condiciones de alta densidad celular (HCD) o gran agregación celular (LCA)).

Cuando sea necesario, para inducir una diferenciación que dé lugar tanto a un tejido nervioso central como a un tejido ectodérmico no neural de cabeza (en particular, un tejido rostral de hipotálamo y un tejido ectodérmico rostral de

cabeza) en un agregado, puede añadirse un promotor de señales exógenas de una proteína perteneciente a la subfamilia BMP en la superfamilia TGF-β al siguiente caldo libre de suero, además de las condiciones anteriormente mencionadas, a una concentración que no cause la supresión de la diferenciación neural o durante un periodo que no cause la supresión de la diferenciación neural. Aquí, las proteínas pertenecientes a la subfamilia BMP se refieren a las clasificadas como BMP (grupo BMP2/4 (BMP2, BMP4), grupo OP-1 (BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b), grupo BMP9 (BMP9, BMP10), grupo GDF5 (GDF5, GDF6, GDF7)) y los GDF (factores de crecimiento y diferenciación). Es o son particularmente preferibles la BMP2 y/o la BMP4, y la BMP4 es la más preferible.

El promotor (por ejemplo, BMP4) de una señal de una proteína perteneciente a la subfamilia exógena BMP (por ejemplo, las BMP) puede estar comprendido en el caldo libre de suero desde el momento de la formación del agregado, o puede ser añadido al caldo libre de suero después del transcurso de un tiempo dado desde el inicio del cultivo flotante. El periodo desde el inicio del cultivo flotante del agregado después del inicio del cultivo flotante hasta la adición del promotor anteriormente mencionado de la señal es generalmente inferior a 240 horas, preferiblemente inferior a 96 horas, más preferiblemente inferior a 72 horas.

En una realización, desde el punto de vista de la no supresión de la diferenciación neural, se añade un promotor de señal (por ejemplo, BMP2 y/o BMP4) de una proteína perteneciente a la subfamilia BMP (por ejemplo, las BMP) a un caldo libre de suero después del transcurso de un periodo de tiempo predeterminado desde el inicio del cultivo flotante. Es decir, el promotor de señales anteriormente mencionado es añadido a un caldo libre de suero después del transcurso de 48 horas, como pronto, desde el inicio del cultivo flotante.

La concentración del promotor de señales de una proteína perteneciente a la subfamilia BMP exógena (por ejemplo, las BMP) se encuentra, por ejemplo, en el intervalo de 0,01 - 10 nM cuando se usa BMP2 o BMP4.

Además, para promover la diferenciación que da lugar a un tejido nervioso central y a un tejido ectodérmico no neural de cabeza (en particular, un tejido rostral de hipotálamo y un tejido ectodérmico rostral de cabeza que sea un epitelio continuo de tipo laminar) en un agregado, el caldo libre de suero puede comprender un promotor de la señal Shh.

El promotor de la señal Shh no está limitado en particular, siempre y cuando sea capaz de potenciar la traducción de señales arbitrada por Shh. Los promotores de la señal Shh incluyen, por ejemplo, proteínas pertenecientes a la familia Hedgehog [literalmente, erizo] (por ejemplo, Shh, Shh-N), receptores Shh, agonistas de receptores Shh (por ejemplo, purmorfamina, SAG); lo más preferible es que sea SAG.

Dado que el SAG tiene una actividad varias veces mayor que el Shh y puede ser usado hasta a altas concentraciones de forma relativamente económica, puede inducir una intensa actividad de señalización hedgehog (Danjo et al, JNS, 2010).

El promotor de la señal Shh puede estar comprendido en un caldo libre de suero desde el momento de la formación del agregado, o puede ser añadido a un caldo libre de suero después del transcurso de un tiempo dado desde el inicio del cultivo flotante del agregado. El periodo desde el inicio del cultivo flotante del agregado después del inicio del cultivo flotante hasta la adición del promotor de la señal Shh es generalmente inferior a 192 horas, preferiblemente inferior a 168 horas, más preferiblemente inferior a 144 horas.

La concentración del promotor de la señal Shh que ha de usarse solo precisa ser una concentración que pueda promover una diferenciación que dé lugar tanto a un tejido nervioso central como a un tejido ectodérmico no neural de cabeza (en particular, un tejido rostral de hipotálamo y un tejido ectodérmico rostral de cabeza que sea un epitelio continuo de tipo laminar) en un agregado. Tal concentración, cuando se usa SAG, es, por ejemplo, generalmente de aproximadamente 10 - 2000 nM, preferiblemente de aproximadamente 50 - 1000 nM, siendo lo más preferible que sea de aproximadamente 100 - 400 nM, en el siguiente caldo libre de suero.

En una realización preferible, para inducir una diferenciación que dé lugar tanto a un tejido nervioso central como a un tejido ectodérmico no neural de cabeza (en particular, un tejido rostral de hipotálamo y un tejido ectodérmico rostral de cabeza) en un agregado, se añaden un promotor de señal (preferiblemente BMP2 y/o BMP4) de una proteína perteneciente a la subfamilia BMP exógena (por ejemplo, las BMP), y un promotor de la señal Shh (preferiblemente, SAG) a un caldo libre de suero usado para la formación del agregado y/o del cultivo flotante. En este caso, el promotor de la señal de una proteína perteneciente a la subfamilia BMP exógena (por ejemplo, las BMP) puede estar comprendido en el caldo libre de suero desde el momento de formación del agregado, o puede ser añadido al caldo libre de suero después del transcurso de un tiempo dado desde el inicio del cultivo flotante. El periodo desde el inicio del cultivo flotante hasta la adición del promotor de señal mencionado anteriormente es generalmente inferior a 240 horas, preferiblemente inferior a 96 horas, más preferiblemente inferior a 72 horas. El promotor de señal es añadido a un caldo libre de suero, preferiblemente, después del transcurso de 48 horas, como pronto, desde el inicio del cultivo flotante, para que no se suprima la diferenciación neural. El promotor de la señal Shh puede estar comprendido en un caldo libre de suero desde el momento de formación del agregado, o puede ser añadido a un caldo libre de suero después del transcurso de un tiempo dado desde el inicio del cultivo flotante del agregado. El periodo desde el inicio del cultivo flotante hasta la adición del promotor de la señal Shh es generalmente inferior a 192 horas, preferiblemente inferior a 168 horas. El intervalo de concentración de cada factor es según se ha mencionado anteriormente.

Cuando se usan células madre de ratón, los expertos en la técnica pueden regular la concentración de células madre en el momento de la formación del agregado según resulte apropiado para formar agregados de células madre de manera más homogénea y eficaz. La concentración de las células madre en la formación del agregado se inicia preferiblemente a partir de una concentración celular elevada, para que se formen agregados de células madre que comprenden 5×10^3 - $1,5\times10^4$ células madre (preferiblemente 8×10^3 - $1,5\times10^4$ células madre) por agregado, lo que aumentará la expresión de factores endógenos de crecimiento en el agregado, y permitirá la inducción de una diferenciación simultánea que dé lugar tanto a un tejido nervioso central como a un tejido ectodérmico no neural de cabeza; por ejemplo, tanto un tejido rostral de hipotálamo como un tejido ectodérmico rostral de cabeza. Por ejemplo, cuando se usa una placa de micropocillos de 96 pocillos, se añade un líquido preparado para que comprenda aproximadamente $4,5\times10^3$ - 5×10^4 células, preferiblemente aproximadamente 5×10^3 - $1,5\times10^4$ células, siendo lo más preferible que comprenda aproximadamente 8×10^3 - $1,5\times10^4$ células, por pocillo (150 µl), y se deja reposar la placa para permitir la formación de agregados. Usando un recipiente de cultivo que tenga un espacio de cultivo suficientemente pequeño, puede formarse un agregado por pocillo. En este caso, se añade a un pocillo el mismo número de células madre que el número de células madre comprendidas en un agregado formado (5×10^3 - $1,5\times10^4$ células, preferiblemente 8×10^3 - $1,5\times10^4$ células), o un número algo mayor, y se las cultiva, por lo que pueden formarse agregados deseados de células madre que comprenden 5×10^3 - $1,5\times10^4$ células madre (preferiblemente 8×10^3 - $1,5\times10^4$ células madre) por agregado. Las personas con un dominio normal de la técnica pueden regular fácil y debidamente el número de células que han de añadirse a un pocillo para formar agregados de células madre que comprendan 5×10^3 - $1,5\times10^4$ células madre (preferiblemente 8×10^3 - $1,5\times10^4$ células madre) por agregado, en consideración de condiciones tales como tamaño, forma del pocillo, volumen de caldo y similares.

Incluso cuando se usan células madre de seres humanos, los expertos en la técnica pueden regular la concentración de células madre en el momento de la formación del agregado según resulte apropiado para formar agregados de células madre de manera más homogénea y eficaz. La concentración de las células madre en la formación del agregado se inicia preferiblemente a partir de una concentración celular elevada, para que aumente la expresión de factores endógenos de crecimiento en el agregado, y pueda inducirse una diferenciación simultánea que dé lugar tanto a un tejido nervioso central como a un tejido ectodérmico no neural de cabeza (en particular, tanto un tejido rostral de hipotálamo como un tejido ectodérmico rostral de cabeza). En el caso de seres humanos, para inducir una diferenciación simultánea que dé lugar tanto a un tejido nervioso central como a un tejido ectodérmico no neural de cabeza (en particular, un tejido rostral de hipotálamo y un tejido ectodérmico rostral de cabeza que sea un epitelio continuo de tipo laminar) en un agregado, puede ser necesario aumentar el número de células por encima de la concentración anteriormente mencionada para ratones. Por ejemplo, la concentración celular elevada para seres humanos es, preferiblemente, una concentración que pueda formar agregados de células madre que comprendan aproximadamente $0,9\times10^4$ - 3×10^4 células madre por agregado. Por ejemplo, cuando se usa una placa de micropocillos de 96 pocillos, las células se preparan para que sean aproximadamente $0,9\times10^4$ - 3×10^4 por pocillo (150 µl) o un número de células algo mayor, y pueden formarse agregados deseados de células madre que comprenden $0,9\times10^4$ - 3×10^4 células madre por agregado. Por otro lado, según se ha mencionado anteriormente, cuando se añade un promotor de señal (por ejemplo, BMP2 y/o BMP4) de una proteína perteneciente a la subfamilia BMP (por ejemplo, las BMP) a un caldo libre de suero, no siempre es preciso que la concentración celular sea elevada, y es preferible una concentración que forme agregados de células madre que comprendan $0,3\times10^4$ - 3×10^4 células madre por agregado. Las personas con un dominio normal de la técnica pueden regular fácil y debidamente el número de células en consideración de condiciones tales como tamaño, forma del pocillo, volumen de caldo y similares.

Incluso cuando se usan células madre distintas de las murinas y las de seres humanos, el número de células madre por agregado puede ser debidamente regulado según la especie animal de la que se derivan las células madre, para que aumente la expresión de factores endógenos de crecimiento en el agregado, y pueda inducirse una diferenciación simultánea que dé lugar tanto a un tejido nervioso central como a un tejido ectodérmico no neural de cabeza, en particular tanto a un tejido rostral de hipotálamo como a un tejido ectodérmico rostral de cabeza que sea un epitelio continuo de tipo laminar.

Otras condiciones de cultivo, como la temperatura de cultivo y la concentración de CO_2 en el momento de la formación del agregado pueden regularse según resulte apropiado. La temperatura de cultivo no está limitada en particular, y se encuentra, por ejemplo, entre aproximadamente 30 y 40°C, preferiblemente aproximadamente 37°C. La concentración de CO_2 está, por ejemplo, entre aproximadamente un 1 y un 10%, preferiblemente aproximadamente el 5%.

Aunque el tiempo hasta la formación del agregado puede determinarse según sea apropiado según la célula madre usada, siempre y cuando se permita que las células se agreguen rápidamente, es deseable que la formación se lleve a cabo tan pronto como sea posible para garantizar la formación de agregados homogéneos. Tal formación de agregados se ha llevado a cabo durante aproximadamente (véanse, por ejemplo, Watanabe, K. et al., Nature Neurosci. 8,288-296, Schuldiner M, Benvenisty N. Factors controlling human embryonic stem cell differentiation. Methods Enzymol. 2003; 365:446-461); en cambio, este tiempo se ha acortado para permitir una inducción eficaz de la diferenciación de tejidos, células deseados y similares. En el caso de células madre embrionarias murinas, por ejemplo, es deseable que los agregados se forman preferiblemente inferior en menos de 12 horas, más preferiblemente en menos de 6 horas. Por otro lado, en el caso de células madre embrionarias humanas, es deseable que los agregados se forman preferiblemente en menos de 24 horas, más preferiblemente en menos de 12 horas. Si se supera este tiempo, pueden no formarse agregados homogéneos de células madre, lo que, a su vez, puede causar una reducción notable en la eficacia de la diferenciación en la etapa subsiguiente. Los expertos en la técnica pueden

regular este tiempo hasta la formación de los agregados según resulte apropiado escogiendo un instrumento para la agregación celular, condiciones de centrifugado y similares.

Los expertos en la técnica son capaces de evaluar la formación “homogénea” de agregados de células madre y la formación de una estructura de tipo epitelial en cada tipo de célula que forme los agregados, en función del tamaño de la masa del agregado y del número de células en la misma, de la morfología microscópica, de la morfología macroscópica y de la homogeneidad de la misma, analizada por tinción histológica, la expresión de marcadores de diferenciación e indiferenciación y la homogeneidad de la misma, la regulación de la expresión de marcadores de diferenciación y la sincronicidad de los mismos, la producibilidad de la eficacia de la diferenciación entre agregados, y similares.

Específicamente, los agregados homogéneos de células madre pueden formarse, por ejemplo, mediante un método que comprende el cultivo de células madre embrionarias para su mantenimiento, la suspensión de las células madre embrionarias tratadas en dispersión (por ejemplo, tratadas con tripsina/EDTA) en un caldo apropiado (cambiado al caldo mencionado posteriormente según el tejido o la célula objeto), y la flotación de las células en 150 µL del caldo anteriormente descrito, preferiblemente a razón de 1×10^3 - 5×10^4 células, más preferiblemente 3×10^3 - 3×10^4 células por pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos de fondo en U no adhesivos para las células para formar un agregado rápidamente.

Otras condiciones de cultivo en el cultivo flotante de los agregados, como la temperatura de cultivo, la concentración de CO_2 y similares también pueden ser reguladas según resulte apropiado y, por ejemplo, pueden mencionarse las mismas condiciones que las descritas anteriormente como condiciones de cultivo para la formación de agregados y similares. Aunque el tiempo para esta etapa no está limitado en particular, es generalmente de 48 horas o más.

Un caldo usado para formar agregados y un caldo usado para el cultivo flotante pueden ser iguales o diferentes, y para el cultivo flotante puede usarse directamente un caldo usado para formar agregados.

El caldo que haya de usarse para la formación de agregados o el cultivo flotante puede ser preparado usando un caldo usando para cultivar células animales en un caldo basal. El caldo basal no está limitado en particular, siempre y cuando pueda ser usado para el cultivo de células animales, y puede ser un caldo BME, caldo BGJb, caldo CMRL 1066, caldo Glasgow MEM, caldo de opción cinc MEM mejorada, caldo IMDM, caldo 199, caldo Eagle MEM, caldo αMEM, caldo DMEM, caldo Ham, caldo RPMI 1640, caldo de Fischer, un caldo mezclado de los mismos y similares.

El caldo libre de suero usado para la formación de agregados o el cultivo flotante significa un caldo libre de suero no ajustado o no purificado. En la presente invención, se pueden enumerar los anteriormente mencionados.

Generalmente, al caldo libre de suero se le añaden a menudo varios factores de crecimiento (Wnt, TGFβ, BMP, ácido retinoico, FGF, albúmina rica en lípidos y similares) como alternativa al suero. Sin embargo, estos factores de crecimiento inhiben todos la diferenciación del tejido precursor hipofisario. Además, la insulina, que es añadida al caldo libre de suero con mucha frecuencia, inhibe muchísimo la diferenciación del tejido precursor hipofisario. Se considera que la inhibición es causada por la activación de la enzima intracelular (fosfoenzima) Akt, que es una señal de fase posterior de la insulina (documento no de patente 5 y documento de patente 3).

Por lo tanto, el caldo libre de suero anteriormente mencionado, en particular un caldo usado para el cultivo flotante (también denominado “caldo de diferenciación” en la presente memoria) es, preferiblemente, un caldo libre de suero sustancialmente libre de factores de crecimiento (promotor de señal Nodal, promotor de señal Wnt, promotor de señal FGF, promotor de señal BMP, ácido retinoico y similares, preferiblemente cualquier factor de crecimiento no limitado a los mismos) e insulinas.

El caldo libre de suero anteriormente mencionado puede ser, por ejemplo, uno que comprenda un sustituto de suero. El sustituto de suero puede ser, por ejemplo, uno que comprenda de forma apropiada una albúmina, transferina, ácidos grasos, insulina, precursor de colágeno, oligoelementos, 2-mercaptoetanol o 3′-tiolglicerol o sus equivalentes y similares. Tal sustituto de suero puede prepararse, por ejemplo, mediante un método descrito en el documento WO98/30679. Para facilitar una implementación más sencilla de un método de la presente invención, pueden utilizarse sustitutos de suero disponibles comercialmente. Ejemplos de tales sustitutos de suero disponibles comercialmente incluyen el Knockout Serum Replacement (sustitución de suero de inhibición, KSR), concentrado de lípidos químicamente definidos (producido por Gibco Company) y Glutamax (producido por Gibco Company).

Cuando estos sustitutos de suero comprenden factores de crecimiento e insulinas, preferiblemente se añaden al caldo inhibidores contra los factores de crecimiento y las insulinas según se describe posteriormente. Sin embargo, es preferible no usar un sustituto de suero que comprenda factores de crecimiento e insulinas. El sustituto de suero es, preferiblemente, un producto químicamente definido evidentemente libre de factores de crecimiento e insulinas.

Sin embargo, en el caso de células madre pluripotentes de primates, incluidos los seres humanos, un cultivo flotante sin insulinas puede conducir a una baja viabilidad, según se describe posteriormente. En tal caso, también es preferible la adición de insulinas al caldo.

Además, el caldo libre de suero usado en el método de la presente invención puede comprender ácidos grasos o lípidos, aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos no esenciales), vitaminas, factores de crecimiento, antioxidantes, 2-mercaptoetanol, ácido pirúvico, agentes tampón, sales inorgánicas y similares, según resulte necesario. Sin embargo, lo más preferible es que no comprenda factores de crecimiento, según se ha mencionado anteriormente.

El "caldo libre de suero que sustancialmente no comprende factores de crecimiento ni insulinas" se refiere a un caldo libre de suero que no comprende en absoluto factores de crecimiento ni insulinas, o a caldo libre de suero que comprende factores de crecimiento y/o insulinas en una cantidad que no influya de manera adversa en la diferenciación selectiva de tejido precursor hipofisario y células productoras de hormonas hipofisarias. Tal caldo libre de suero puede ser preparado, por ejemplo, mediante la no adición de factores de crecimiento e insulinas como componentes del caldo, o mediante un tratamiento que elimine estos factores del caldo que comprenda estos factores, que son factores de crecimiento e insulinas.

Alternativamente, el caldo libre de suero que sustancialmente no comprende factores de crecimiento e insulinas puede ser un caldo libre de suero en el que los factores de crecimiento y las insulinas han sido sustancialmente inactivados; este caldo se refiere a un caldo libre de suero en el que al añadir un inhibidor de la señal del factor de crecimiento y/o un inhibidor de la señal de la insulina a un caldo libre de suero que comprende factor de crecimiento e insulina, las actividades de los factores de crecimiento y de las insulinas se han perdido hasta un grado que no influye de forma adversa en la diferenciación selectiva del tejido precursor hipofisario ni de las células productoras de hormonas hipofisarias.

Con referencia a "un caldo que está sustancialmente libre de factores de crecimiento", mencionado en la presente memoria, "un factor de crecimiento" significa un factor elegido opcionalmente que generalmente se añade como sustituto de suero en el cultivo celular usando un caldo libre de suero, y que tiene la acción de inhibir/suprimir la diferenciación selectiva del tejido precursor hipofisario y de las células productoras de hormonas hipofisarias a partir de una célula ES. Ejemplos de los "factores de crecimiento" incluyen, sin limitación, promotores de señal Nodal, promotores de señal Wnt, promotores de señal FGF, promotores de señal BMP, ácido retinoico y similares. "Un caldo que sustancialmente no comprende un factor de crecimiento" es, preferiblemente, un caldo que sustancialmente no comprende todos los promotores de señal Nodal, promotores de señal Wnt, promotores de señal FGF, promotores de señal BMP y ácido retinoico. En el "factor de crecimiento" también se incluye la albúmina rica en lípidos; el caldo usado en la presente invención es, preferiblemente, un caldo que no comprende albúmina rica en lípidos.

Según se usa aquí, "insulinas" significa un compuesto que promueve las señales de insulina. Un promotor de la señal de insulina no está limitado en particular, siempre y cuando actúe promoviendo la transducción de señales de insulina, y el promotor pueda actuar en cualquier fase del sistema de señalización de la insulina (factores que actúan en una fase anterior o posterior de la insulina, agonistas de la insulina, sustancias similares, y similares).

Las insulinas incluyen la insulina y análogos de la insulina. Los análogos de la insulina se refieren a una sustancia escogida opcionalmente que tiene una acción semejante a la de la insulina (en la presente memoria, se refiere a una acción inhibidora/supresora de la diferenciación selectiva que da lugar a un tejido precursor hipofisario y a células productoras de hormonas hipofisarias a partir de células madre pluripotentes); ejemplos incluyen IGF-I y similares.

Para el tratamiento para eliminar los factores de crecimiento y las insulinas del caldo que comprende los factores de crecimiento y las insulinas para obtener el caldo libre de suero anteriormente descrito, pueden usarse por ejemplo, anticuerpos contra los factores de crecimiento (por ejemplo, promotores de señal Nodal, promotores de señal Wnt, promotores de señal FGF, promotores de señal BMP, ácido retinoico, albúmina rica en lípidos y similares) y las insulinas descritos anteriormente. La inactivación de los factores de crecimiento y de las insulinas puede realizarse por la adición de un inhibidor de la señal del factor de crecimiento y de un inhibidor de la señal de insulina. Estos inhibidores pueden ser sustancias escogidas opcionalmente que inhiben la fase anterior o la posterior del sistema de transducción de señales por los factores de crecimiento o insulinas; ejemplos incluyen anticuerpos contra los factores de crecimiento/insulinas, receptores solubles de factores de crecimiento/insulinas, anticuerpos contra los receptores del factor de crecimiento/insulina, antagonistas de los factores de crecimiento/insulinas y similares. Estas sustancias son añadidas al caldo en cantidades adecuadas para obtener el efecto deseado (una diferenciación selectiva que da lugar a un tejido precursor hipofisario y a células productoras de hormonas hipofisarias).

Sin embargo, según se ha mencionado anteriormente, el caldo libre de suero anteriormente mencionado puede comprender un promotor de señales exógenas de BMP2 y/o BMP4 (por ejemplo, BMP2 y/o BMP4), a una concentración que no cause la supresión de la diferenciación neural, para que pueda inducirse una diferenciación simultánea que dé lugar tanto a un tejido nervioso central como a un tejido ectodérmico no neural de cabeza, en particular tanto un tejido rostral de hipotálamo como un tejido ectodérmico rostral de cabeza que sea un epitelio continuo de tipo laminar. Cuando se añade o añaden BMP2 y/o BMP4, se añaden, preferiblemente, a una concentración de 0,01 - 10 nM para que la diferenciación neural no se suprima con facilidad.

Aunque en lo que sigue se explican las sustancias utilizables para el tratamiento de eliminación de factores de crecimiento/insulinas enumerados específicamente más arriba, no hace falta decir que la selección de sustancias utilizables para el tratamiento de eliminación de otros factores de crecimiento/insulinas, el ajuste de la cantidad de uso

de los mismos y similares se encuentran dentro del ámbito de las técnicas generales de las personas con un dominio normal de la técnica.

El inhibidor de señal Nodal no está limitado en particular, siempre y cuando sea capaz de suprimir la transducción de señales arbitrada por Nodal. Los inhibidores de señal Nodal incluyen, por ejemplo, SB431542 (Sigma), Lefty-A, Lefty-B, Lefty-1, Lefty-2, receptores Nodal solubles, anticuerpos Nodal e inhibidores de receptores Nodal; en particular, es preferible SB431542 (4-(5-benzo[1,3] dioxol-5-il-4-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)-benzamida).

El inhibidor de señal Wnt no está limitado en particular, siempre y cuando sea capaz de suprimir la transducción de señales arbitrada por Wnt. Los inhibidores de señal Wnt incluyen, por ejemplo, Dkk1, la proteína Cerbero, inhibidores del receptor Wnt, receptores Wnt solubles, anticuerpos Wnt, inhibidores de la caseína quinasa, y proteína Wnt negativa dominante; en particular, es preferible Dkk1.

El inhibidor de señal FGF no está limitado en particular, siempre y cuando sea capaz de suprimir la transducción de señales arbitrada por FGF. Los inhibidores de señal FGF incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-FGF, receptores FGF solubles, e inhibidores del receptor FGF (por ejemplo, Su5402).

El inhibidor de señal BMP no está limitado en particular, siempre y cuando sea capaz de suprimir la transducción de señales arbitrada por BMP. Los inhibidores de señal BMP incluyen, por ejemplo, BMPRFc (I+D), anticuerpos anti-BMP, receptores BMP solubles, e inhibidores del receptor BMP; en particular, es preferible BMPRFc.

El inhibidor de ácido retinoico (RA) no está limitado en particular, siempre y cuando sea capaz de suprimir la transducción de señales arbitrada por RA. Los inhibidores de RA incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-RA, receptores RA solubles, e inhibidores del receptor RA.

La concentración de cada uno de los inhibidores de señales descritos anteriormente usados para el cultivo flotante puede ser una concentración que permita que se logre la diferenciación selectiva que da lugar a células progenitoras de neuronas hipotalámicas. Por ejemplo, para SB431542, la concentración se encuentra entre aproximadamente 0,1 y 100 nM, preferiblemente entre aproximadamente 5 y 30 nM. Para Dkk1, la concentración se encuentra entre aproximadamente 10 y 1000 ng/ml, preferiblemente entre aproximadamente 100 y 1000 ng/ml. Para BMPRFc, la concentración se encuentra entre aproximadamente 0,1 to 10 µg/ml, preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y 3 µg/ml.

Lo más preferible es que cada uno de los inhibidores de señales descritos más arriba sea añadido al caldo ya al comienzo del cultivo de las células madre pluripotentes.

La señalización intracelular de la insulina es objeto de implicación por parte de aproximadamente dos sistemas (sistema MAPK y sistema PI3K-Akt); los inhibidores de la señal de insulina que pueden usarse en el cultivo flotante de la presente invención incluyen los inhibidores de PI3K, que es un factor de fase posterior en el sistema de señalización de la insulina, y los inhibidores de Akt, que es un factor de fase más posterior. Los inhibidores de PI3K que pueden usarse en la presente invención incluyen LY294002 (clorhidrato de 2-(4-morfolinil)-8-fenil-1(4H)-benzopiran-4-ona) (Cayman Chemical), Wortmanina (FERMENTEK) y similares; es preferible LY294002. Los inhibidores de Akt que pueden usarse en la presente invención incluyen los inhibidores de Akt I a X (Calbiochem) y similares; es preferible el inhibidor de Akt VIII (1,3-dihidro-1-(1-((4-(6-fenil-1H-imidazo[4,5-g]quinoxalin-7-il)fenil)metil)-4-piperidinil)-2H-bencimidazol-2-ona).

Siempre y cuando se inhiban las señales de insulina, y se logre la diferenciación selectiva de tejido precursor hipofisario o de células productoras de hormonas hipofisarias, en el cultivo flotante, puede usarse por sí solo un inhibidor cualquiera seleccionado entre los inhibidores PI3K y los inhibidores Akt anteriormente descritos, o pueden usarse en combinación un inhibidor PI3K y un inhibidor Akt. Entre los respectivos inhibidores pueden seleccionarse y usarse en combinación dos tipos o más.

La concentración del inhibidor PI3K/inhibidor Akt usado en el cultivo flotante puede ser una concentración que permita que se logre una diferenciación selectiva que dé lugar al tejido precursor hipofisario o a células productoras de hormonas hipofisarias. Por ejemplo, para LY294002, la concentración se encuentra entre aproximadamente 0,5 y 30 µM, preferiblemente entre aproximadamente 2 y 10 µM. Para el inhibidor Akt VIII, la concentración se encuentra entre aproximadamente 0,1 y 10 µM, preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y 5 µM.

El caldo de diferenciación usado en una realización preferida de la presente invención es un caldo químicamente definido que no comprende ni los factores de crecimiento anteriormente descritos ni insulina (CDM libre de factores de crecimiento; abreviado gfCDM). Específicamente, como caldo de diferenciación, se usa caldo de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM)/de Ham F12 1:1 (Invitrogen) suplementado con concentrado 1× lipídico químicamente definido (Invitrogen), monotioglicerol (450 µM; Sigma) y albúmina de suero bovino (producto purificado por recristalización con una pureza >99%; Sigma) (Wataya et al., PNAS. 105(33), 11796-11801). Este caldo gfCDM es una modificación de un caldo CDM documentado previamente (Mol. Cell. Biol. 15:141-151(1995)).

Para suprimir la acción de factores endógenos de crecimiento/insulinas, puede añadirse al caldo gfCDM o a otro caldo, además, un inhibidor del factor de crecimiento/ inhibidor de la insulina.

En otra realización preferida, el caldo de diferenciación usado en la presente invención es un caldo libre de suero que comprende al menos un inhibidor seleccionado del grupo constituido por inhibidores PI3K e inhibidores Akt e insulinas, y que sustancialmente no comprende los factores de crecimiento anteriormente descritos distintos de la insulina. Por ejemplo, en particular, cuando se lleva a cabo un cultivo flotante usando un caldo libre de insulina en la inducción de la diferenciación de células madre pluripotentes de primate, hay algunos casos en los que las células mueren y es improbable que proliferen. Para evitar tal muerte celular, es preferible que se añada insulina para facilitar la proliferación celular, y que, a la vez, se añada un inhibidor de la señal de la insulina que antagonice el efecto inhibidor de la inducción de la diferenciación de la insulina (por ejemplo, inhibidor PI3K/inhibidor Akt). En este caso, la concentración de la insulina comprendida en el caldo de diferenciación es una concentración que permite que se promueva la proliferación de células madre pluripotentes. Por ejemplo, la concentración se encuentra normalmente entre aproximadamente 0,02 y 40 µg/ml, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y 10 µg/ml, para la insulina. Los intervalos de las concentraciones del inhibidor PI3K y del inhibidor Akt son según se ha descrito anteriormente.

Aunque lo más preferible es que el inhibidor PI3K/inhibidor Akt sea añadido al caldo ya al comienzo del cultivo de las células madre pluripotentes, el inhibidor debería ser añadido al caldo de diferenciación en un momento al menos hasta el día 6 de cultivo (preferiblemente al menos hasta el día 2 de cultivo) para la diferenciación de células pluripotentes de roedor (por ejemplo, de ratón), y en un momento al menos hasta el día 24 de cultivo (preferiblemente añadido al menos hasta el día 9 de cultivo) para la diferenciación de células pluripotentes de primate (por ejemplo, humanas).

Para suprimir la muerte celular durante el cultivo flotante en dispersión, es preferible que, además de la adición de insulina, se añada un inhibidor ROCK (Y-27632 (diclorhidrato de (+)-(R)-trans-4-(1-aminoetil)-N-(4-piridil)ciclohexanocarboxamida); Watanabe et al., Nature Biotechnology, 25, 681-686, 2007) desde el inicio del cultivo. La concentración del inhibidor ROCK usado para el cultivo flotante es una concentración que permite suprimir la muerte celular durante el cultivo flotante en dispersión. Por ejemplo, para Y-27632, esta concentración se encuentra normalmente entre aproximadamente 0,1 y 200 µM, preferiblemente entre aproximadamente 2 y 50 µM.

(4) Inducción de una diferenciación ulterior

En la presente invención, dado que pueden formarse los agregados en condiciones de concentración celular elevada de células madre pluripotentes según se ha mencionado anteriormente, la expresión de factores endógenos de crecimiento aumenta en el agregado de células madre, y se induce una diferenciación simultánea que da lugar a tejido rostral de hipotálamo y a un tejido ectodérmico rostral de cabeza que es un epitelio continuo de tipo laminar. En tales agregados, para promover la inducción de una diferenciación que dé lugar a células Lim3 positivas, para promover la inducción de una diferenciación que dé lugar a un tejido de tipo bolsa de Rathke (tejido precursor hipofisario), o para diferenciar ulteriormente el tejido precursor hipofisario obtenido dando lugar a células productoras de hormonas hipofisarias, puede llevarse a cabo un cultivo flotante usando el caldo descrito posteriormente.

En la Fig. 1a se muestran dibujos esquemáticos de un desarrollo hipofisario *in vivo*, y en la Fig. 3a se muestra un dibujo esquemático del desarrollo de diversas células productoras de hormonas hipofisarias.

(A) Inducción de la diferenciación de células Lim3 positivas y de tejidos precursores de la pituitaria

En la presente invención, dado que pueden formarse agregados en condiciones de concentración celular elevada de células madre pluripotentes, aumenta la expresión de factores endógenos de crecimiento en el agregado de células madre, y es induce en un agregado la diferenciación que da lugar a un tejido rostral de hipotálamo y a un tejido ectodérmico rostral de cabeza que sea un epitelio continuo de tipo laminar. Para promover la diferenciación de las células comprendidas en el agregado dando lugar a células Lim3 positivas, y para promover una diferenciación que dé lugar a un tejido precursor hipofisario (la bolsa de Rathke), un caldo libre de suero que haya de usarse para el cultivo flotante puede comprender un promotor de la señal Shh.

Solo es preciso que la concentración del promotor de la señal Shh que ha de usarse sea una concentración que pueda promover una diferenciación que dé lugar a células Lim3 positivas. Tal concentración, cuando se usa SAG, es generalmente, por ejemplo, aproximadamente 10 - 2000 nM, preferiblemente aproximadamente 50 - 1000 nM, siendo lo más preferible que sea aproximadamente 100 - 400 nM, en a caldo libre de suero (preferiblemente gfCDM).

El momento de adición de un promotor de la señal Shh a un caldo libre de suero no está limitado en particular, siempre y cuando pueda promover la inducción de células Lim3 positivas en los agregados, y puede ser añadido al caldo cuando se inicia el cultivo flotante. Sin embargo, al aumentar el tiempo hasta la adición del promotor de la señal Shh, disminuye el nivel de expresión del ARNm de Lim3 inducido en los agregados (véase la Fig. 1i), y, por lo tanto, es preferible añadir el promotor de la señal Shh desde el inicio del cultivo flotante. Por ejemplo, preferiblemente se añade un promotor de la señal Shh a un caldo en el momento de inicio del cultivo flotante hasta tres días después del inicio del cultivo flotante, más preferiblemente en el momento de inicio del cultivo flotante hasta dos días después del inicio del cultivo flotante, aún preferiblemente en el momento de inicio del cultivo flotante hasta un día después del inicio del cultivo flotante, siendo lo más preferible que se produzca en el momento de inicio del cultivo flotante.

Aunque el periodo de cultivo flotante en un caldo libre de suero que comprende un promotor de la señal Shh no está limitado en particular, siempre y cuando sea suficiente para inducir células Lim3 positivas, por ejemplo, es

generalmente de aproximadamente 7 - 14 días para agregados murinos y generalmente de aproximadamente 10 - 30 días para agregados humanos.

La concentración del promotor de la señal Shh en el caldo puede cambiar según sea necesario durante el cultivo. Por ejemplo, los agregados pueden ser sometidos al cultivo flotante en un caldo libre de suero que comprende un promotor de la señal Shh, hasta que se induzcan células Lim3 positivas en los agregados, y, una vez que se induzcan las células Lim3 positivas, el cultivo flotante puede continuar en un caldo libre de suero libre de un promotor de la señal Shh. En una realización, cuando se usa SAG, puede promoverse la inducción de la diferenciación de tejidos precursores de la pituitaria usando un caldo que comprenda SAG a una concentración entre 100 nM y 400 nM desde el inicio del cultivo flotante hasta la inducción de las células Lim3 positivas (por ejemplo, hasta el día 10 de cultivo), y, posteriormente, usar un caldo libre de SAG. En una realización, cuando se induce una diferenciación de tejidos precursores de la pituitaria que da lugar a diversas células productoras de hormonas hipofisarias, se usa un caldo que comprende 400 nM de SAG desde el inicio del cultivo flotante hasta el día 7 de cultivo; después se usa un caldo que comprende 100 nM de SAG hasta el día 10 de cultivo y posteriormente puede usarse un caldo libre de SAG, y, en otra realización, se usa un caldo que comprende 400 nM de SAG desde el inicio del cultivo flotante hasta el día 10 de cultivo, y, posteriormente, se intercambia la mitad del caldo y el cultivo puede continuar hasta el día 8. Siempre y cuando se promueva la inducción de una diferenciación que dé lugar a tejido precursor hipofisario, las condiciones no están limitadas a lo anterior. Después de la inducción de células Lim3 positivas, el cultivo flotante puede continuar en un caldo libre de suero que comprende un promotor de la señal Shh para inducir una diferenciación que dé lugar a células productoras de hormonas hipofisarias. Preferiblemente, el agregado es sometido a cultivo flotante en un caldo libre de suero que comprende un promotor de la señal Shh hasta que se inducen células Lim3 positivas en el agregado, y, una vez que se inducen las células Lim3 positivas, el cultivo flotante continúa en un caldo libre de suero libre de un promotor de la señal Shh, con lo que las células Lim3 positivas en el agregado forman una bolsa vesicular epitelial (es decir, tejido precursor hipofisario) Lim3 positiva.

En un caldo libre de suero pueden formarse agregados de células madre que comprenden 8×10^3 - $1{,}5\times10^4$ células madre por agregado (en el caso de células madre murinas) o agregados de células madre que comprenden 9×10^3 - 3×10^4 células madre por agregado (en el caso de células madre humanas), y los agregados formados son sometidos a un cultivo flotante en un caldo libre de suero que comprende un promotor de la señal Shh, con lo que se forman agregados que comprenden tanto un tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza. En los agregados se inducen células Lim3 positivas, como resultado de lo cual pueden obtenerse agregados que comprenden tanto un tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza, y células Lim3 positivas.

En una realización, un agregado que comprende tanto un tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza (que, preferiblemente, comprende, además células Lim3 positivas) es sometido adicionalmente a un cultivo flotante en un caldo libre de suero sustancialmente libre de un promotor de la señal Shh, con lo que se forma en el agregado una bolsa vesicular epitelial Lim3 positiva y puede obtenerse un tejido precursor de la hipófisis.

(B) Promoción de la inducción de la diferenciación de tejido precursor hipofisario

Para promover la inducción de una diferenciación que dé lugar a tejido precursor hipofisario en la inducción de una diferenciación que da lugar a un tejido precursor hipofisario, concretamente, para aumentar el número de bolsas vesiculares epiteliales Lim3 positivas formadas en los agregados o aumentar el nivel de expresión del ARNm de Lim3, también puede usarse un caldo que comprende un promotor de señal FGF después de un cultivo flotante en el caldo libre de suero anteriormente mencionado que comprende un promotor de la señal Shh.

El promotor de señal FGF no está limitado en particular, siempre y cuando pueda mejorar la señalización arbitrada por FGF. Ejemplos preferibles del promotor de señal FGF incluyen los FGF (por ejemplo, FGF1 - 23), un agonista FGF, y un péptido agonista del receptor FGF. El o los promotores de señal FGF preferible es o son FGF8 y/o FGF10.

Aunque únicamente es preciso que la concentración del promotor de señal FGF que haya de usarse sea una concentración que pueda aumentar el número de células formadas que expresen lim3 o que pueda aumentar el nivel de expresión del ARNm de Lim3, en el caso de FGF8 o FGF10, tal concentración es, por ejemplo, de aproximadamente 2 - 1000 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 20 - 400 ng/ml, siendo lo más preferible que sea de aproximadamente 200 ng/ml, en a caldo libre de suero, preferiblemente gfCDM.

Aunque el promotor de señal FGF puede ser añadido al caldo en cualquier momento del cultivo flotante de los agregados, es añadido, preferiblemente, al caldo anteriormente mencionado libre de un promotor de la señal Shh, que es usado después del cultivo en un caldo libre de suero que comprende un promotor de la señal Shh. Por ejemplo, los agregados pueden ser sometidos a un cultivo flotante en un caldo libre de suero que comprende un promotor de la señal Shh, hasta que se induzcan células Lim3 positivas en los agregados, y, una vez que se inducen las células Lim3 positivas, el cultivo flotante puede continuar en un caldo libre de suero libre de un promotor de la señal Shh y que comprende un promotor de señal FGF (preferiblemente FGF8 o FGF10). Puede usarse un caldo que comprende SAG (por ejemplo, un caldo que comprenda entre 100 nM y 400 nM de SAG) desde el inicio del cultivo flotante hasta la inducción de células Lim3 positivas (por ejemplo, hasta el día 10 de cultivo); posteriormente se usa un caldo libre de SAG y que comprende un promotor de señal FGF (preferiblemente FGF8 o FGF10). En este caso, el promotor de señal FGF (preferiblemente FGF8 o FGF10) puede ser añadido al caldo en cualquier momento después de la inducción

de células Lim3 positivas (por ejemplo, el día 10 de cultivo y con posterioridad); el promotor de señal FGF (preferiblemente FGF8 o FGF10) se mantiene en al intervalo de concentración anteriormente mencionado, preferiblemente durante 3 días, preferiblemente entre el día 10 de cultivo y el día 18 de cultivo, más preferiblemente entre el día 10 de cultivo y el día 13 de cultivo.

(C) Inducción de la diferenciación para dar lugar a células productoras de ACTH

Para inducir la diferenciación del tejido precursor hipofisario formado dando lugar a células productoras de ACTH después de la formación del tejido precursor hipofisario, el tejido precursor hipofisario puede ser sometido ulteriormente a un cultivo flotante en un caldo libre de suero que comprende un inhibidor de la señal Notch. “Células productoras de ACTH”, usado en la presente memoria, se refiere a células hipofisarias productoras de ACTH, y no incluye la neurona $ACTH^+$.

El inhibidor de la señal Notch no está limitado en particular, siempre y cuando sea capaz de suprimir la transducción de señales arbitrada por Notch. Los inhibidores de la señal Notch incluyen, por ejemplo, DAPT, DBZ, MDL28170 y similares; en particular, es preferible DAPT.

La concentración del inhibidor de la señal Notch que haya de usarse puede ser una concentración que pueda lograr la inducción de una diferenciación que dé lugar a células productoras de ACTH. En el caso de DAPT, tal concentración es, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 - 1000 µM, preferiblemente de aproximadamente 0,5 - 500 µM, más preferiblemente de aproximadamente 1 - 100 µM, siendo lo más preferible que sea de aproximadamente 10 µM, en un caldo libre de suero, preferiblemente caldo gfCDM.

Se usa un caldo libre de suero que comprende un inhibidor de la señal Notch después de la formación de tejido precursor hipofisario mediante el cultivo flotante anteriormente mencionado. Tal caldo puede ser usado en cualquier momento después de la formación del tejido precursor hipofisario. Preferiblemente, un caldo libre de suero que comprende un promotor de la señal Notch no comprende un promotor de la señal Shh. Por ejemplo, según se ha mencionado anteriormente, cuando se usa un caldo que comprende SAG desde el comienzo del cultivo hasta la formación de bolsas vesiculares epiteliales Lim3 positivas (por ejemplo, hasta el día 10 de cultivo) (por ejemplo, un caldo que comprenda 400 nM de SAG desde el comienzo del cultivo hasta el día 7, y un caldo que comprenda 100 nM de SAG entre el día 7 y el día 10), y posteriormente se usa un caldo libre de SAG, puede añadirse un inhibidor de la señal Notch (por ejemplo, DAPT) en cualquier momento después de la formación de bolsas vesiculares epiteliales Lim3 positivas en los agregados (es decir, después de la formación de tejido precursor hipofisario). Preferiblemente, el tejido precursor hipofisario es sometido a un cultivo flotante en un caldo libre de suero (preferiblemente, caldo gfCDM) que comprende un inhibidor de la señal Notch (por ejemplo, DAPT) en el intervalo de concentraciones anteriormente mencionado, durante aproximadamente 3 días, preferiblemente aproximadamente 1 día, entre el día 10 de cultivo flotante y el día 30 de cultivo, más preferiblemente entre el día 14 de cultivo y el día 22 de cultivo, aún más preferiblemente entre el día 18 de cultivo y el día 22 de cultivo, siendo lo más preferible que sea de los días 18 - 19 de cultivo o de los días 20 - 21 de cultivo. Después del cultivo en un caldo que comprende SAG y en el día 18 de cultivo, pueden añadirse 10 µm de DAPT al caldo, y se intercambia la mitad del caldo el día 19 y el cultivo se efectúa durante 1 día.

(D) Inducción de la diferenciación dando lugar a células productoras de hormonas hipofisarias distintas de las células productoras de ACTH

Para inducir la diferenciación del tejido formado precursor de la pituitaria dando lugar a células productoras de hormonas hipofisarias distintas de las células productoras de ACTH (células productoras de GH, células productoras de PRL, células productoras de LH, células productoras de FSH y células productoras de TSH), el tejido precursor hipofisario puede ser sometido ulteriormente a un cultivo flotante en el siguiente caldo después de la formación del tejido precursor hipofisario.

(i) Inducción de una diferenciación que da lugar a células productoras de GH

Para la inducción de una diferenciación que dé lugar a células productoras de GH, puede usarse un caldo libre de suero que comprenda glucocorticoides. Ejemplos de glucocorticoides incluyen hidrocortisona (también denominada cortisol), corticosterona, compuestos sintéticos que tengan la misma actividad biológica que la suya (dexametasona y similares) y similares. Preferiblemente, para potenciar la eficacia de la inducción de una diferenciación que dé lugar a células productoras de GH, el caldo libre de suero comprende, además, insulinas. Como ejemplos de insulinas, pueden mencionarse las enumeradas en la presente memoria y similares.

Por ejemplo, el caldo que se puede usar para inducir la diferenciación, dando lugar a células productoras de GH en la presente invención es un caldo libre de suero, preferiblemente caldo gfCDM, que comprende entre aproximadamente 2 y aproximadamente 2000 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 20 - 1000 ng/ml, siendo lo más preferible que sea de aproximadamente 200 ng/ml, de hidrocortisona, o entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 100 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 1 - 50 ng/ml, siendo lo más preferible que sea de 10 ng/ml, de dexametasona, y de aproximadamente 0,2 - 30 nM, preferiblemente de aproximadamente 0,5 - 10 nM, siendo lo más preferible que sea de aproximadamente 1 nM, de insulinas.

El caldo anteriormente mencionado es usado, preferiblemente, después de un tratamiento con un inhibidor de señal Shh. Por ejemplo, cuando se usa un caldo que comprende SAG desde el comienzo del cultivo hasta la formación de bolsas vesiculares epiteliales Lim3 positivas (por ejemplo, hasta el día 10 de cultivo) (por ejemplo, un caldo que comprenda 400 nM de SAG desde el comienzo del cultivo hasta el día 7, y un caldo que comprenda 100 nM de SAG durante los días 7 - 10), y posteriormente se usa un caldo libre de SAG, pueden añadirse glucocorticoide e insulinas en cualquier momento después de la formación de las bolsas vesiculares epiteliales Lim3 positivas en los agregados (es decir, después de la formación de tejido precursor hipofisario). Preferiblemente, el tejido precursor hipofisario es sometido a un cultivo flotante en un caldo libre de suero que comprende glucocorticoide e insulinas durante los días 10 - 40 desde el inicio del cultivo flotante, preferiblemente los días 15 - 35 desde el inicio del cultivo flotante, preferiblemente los días 20 - 33 desde el inicio del cultivo flotante, siendo lo más preferible que sea en los días 20 - 30 desde el inicio del cultivo flotante.

(ii) Inducción de una diferenciación que da lugar a células productoras de PRL

Para la inducción de una diferenciación que dé lugar a células productoras de PRL, puede usarse un caldo libre de suero que comprenda un estrógeno. Ejemplos de estrógeno incluyen estradiol, estrona, estriol, estetrol, compuestos sintéticos que tengan la misma actividad biológica que la suya y similares. Preferiblemente, para potenciar la eficacia de la inducción de una diferenciación que dé lugar a células productoras de PRL, el caldo libre de suero comprende, además, insulinas. Como ejemplos de insulinas, pueden mencionarse las enumeradas en la presente memoria y similares.

Por ejemplo, el caldo que se puede usar para inducir la diferenciación, dando lugar a células productoras de PRL en la presente invención es un caldo libre de suero, preferiblemente caldo gfCDM, que comprende entre aproximadamente 5 y aproximadamente 500 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 10 - 200 ng/ml, siendo lo más preferible que sea de aproximadamente 50 ng/ml, de estradiol, y de aproximadamente 0,2 - 30 nM, preferiblemente de aproximadamente 0,5 - 10 nM, siendo lo más preferible que sea de aproximadamente 1 nM, de insulinas.

El caldo anteriormente mencionado es usado, preferiblemente, después de un tratamiento con un inhibidor de señal Shh. Por ejemplo, cuando se usa un caldo que comprende SAG desde el comienzo del cultivo hasta la formación de bolsas vesiculares epiteliales Lim3 positivas (por ejemplo, hasta el día 10 de cultivo) (por ejemplo, un caldo que comprenda 400 nM de SAG desde el comienzo del cultivo hasta el día 7, y un caldo que comprenda 100 nM de SAG durante los días 7 - 10), y posteriormente se usa un caldo libre de SAG, pueden añadirse estradiol e insulinas en cualquier momento después de la formación de las bolsas vesiculares epiteliales Lim3 positivas en los agregados (es decir, después de la formación de tejido precursor hipofisario). Preferiblemente, el tejido precursor hipofisario es sometido a un cultivo flotante en un caldo libre de suero que comprende estradiol e insulinas durante los días 10 - 40 desde el inicio del cultivo flotante, preferiblemente los días 14 - 34 desde el inicio del cultivo flotante, preferiblemente los días 20 - 33 desde el inicio del cultivo flotante, siendo lo más preferible que sea en los días 20 - 30 desde el inicio del cultivo flotante.

(iii) Inducción de una diferenciación que da lugar a células productoras de LH, células productoras de FSH y células productoras de TSH

Puede inducirse una diferenciación que dé lugar, por ejemplo, a células productoras de LH, células productoras de FSH y células productoras de TSH mediante el cultivo flotante del tejido precursor hipofisario en un caldo libre de suero que comprenda un sobrenadante de cultivo obtenido cultivando células estromales en un caldo libre de suero (preferiblemente gfCDM) (caldo acondicionado de células estromales) (durante 4 - 10 días).

Aquí, “caldo acondicionado de células estromales” se refiere a un caldo que comprende un factor soluble derivado de células estromales, que puede ser preparado recuperando el sobrenadante de un caldo después del cultivo de células estromales.

Ejemplos de las células estromales incluyen células PA6, células MEF, células OP9 y similares, dándose preferencia particular a las células PA6.

El caldo libre de suero anteriormente mencionado es usado, preferiblemente, después del tratamiento con un inhibidor de señal Shh. Por ejemplo, cuando se usa un caldo que comprende SAG desde el comienzo del cultivo hasta la formación de bolsas vesiculares epiteliales Lim3 positivas (por ejemplo, hasta el día 10 de cultivo) (por ejemplo, un caldo que comprenda 400 nM de SAG desde el comienzo del cultivo hasta el día 7, y un caldo que comprenda 100 nM de SAG durante los días 7 - 10), y posteriormente se usa un caldo libre de SAG, puede añadirse un caldo acondicionado de células estromales en cualquier momento después de la formación de bolsas vesiculares epiteliales Lim3 positivas en los agregados (es decir, después de la formación de tejido precursor hipofisario). Preferiblemente, el tejido precursor hipofisario es sometido a un cultivo flotante en un caldo libre de suero que comprende un caldo de aclimatación de células estromales durante los días 10 - 30 desde el comienzo del cultivo, preferiblemente los días 10 - 20 desde el comienzo del cultivo, siendo lo más preferible que sea en los días 10 - 15 desde el comienzo del cultivo.

Cuando se induce la diferenciación que da lugar a células, que son diferenciadas mediante células progenitoras intermedias Pitx1 positivas (es decir, células productoras de GH, células productoras de PRL y células productoras de

TSH), de entre las células productoras de hormonas hipofisarias de los (i) - (iii) anteriormente mencionados, la proporción de cada célula productora de hormonas puede aumentar adicionalmente usando un caldo libre de suero que comprenda cada componente que haya de ser añadido para la inducción de la diferenciación y que comprenda, además, un promotor de señal Wnt (véase la Fig. 3a). Por ejemplo, en las condiciones de cultivo anteriormente mencionadas, puede usarse un caldo que comprenda un promotor de señal Wnt preferiblemente durante al menos 2 días durante los días 10 - 30 desde el comienzo del cultivo, preferiblemente los días 12 - 24 desde el comienzo del cultivo, siendo lo más preferible que se produzca en los días 16 - 18 desde el comienzo del cultivo. Cuando se induce una diferenciación que da lugar a células productoras de GH o a células productoras de PRL, puede añadirse un promotor de señal Wnt a un caldo libre de suero antes de la adición de glucocorticoide o estrógeno (e insulina según sea necesario), o simultáneamente con la misma. Preferiblemente, se añade a un caldo libre de suero antes de la adición de glucocorticoide o estrógeno (e insulina según sea necesario).

El promotor de señal Wnt no está limitado en particular, siempre y cuando sea capaz de potenciar la señalización arbitrada por Wnt. Los promotores de señal Wnt incluyen, por ejemplo, proteínas pertenecientes a la familia Wnt (por ejemplo, Wnt1-16), inhibidores GSK3β, receptores Wnt, el ion Li^+ y similares; en particular, son preferibles los inhibidores GSK3β.

Ejemplos del inhibidor GSK3β incluyen, sin limitación, inhibidores GSK-3β I, VI, VII, VIII, XI, XII, CHIR 99021, ácido valproico, TDZD-8, SB-216763, BIO (6-bromoindirrubina-3′-oxima) y similares.

La concentración del promotor de señal Wnt no está limitada, siempre y cuando pueda aumentar la proporción de células productoras de hormonas hipofisarias con respecto a la que existe sin un promotor de señal Wnt. Por ejemplo, cuando se usa BIO, la concentración de la misma es generalmente de aproximadamente 20 - 2000 nM, preferiblemente de aproximadamente 50 - 500 nM, siendo lo más preferible que sea de aproximadamente 250 nM.

Puede usarse un caldo libre de suero que comprenda 250 nM de BIO desde el día 16 desde el comienzo del cultivo, pudiendo intercambiarse la mitad del caldo el día 18 y el cultivo se efectúa durante 2 días.

(5) Promoción de la secreción de hormonas hipofisarias

Cada célula productora de hormonas hipofisarias obtenida por el método anteriormente descrito es tratada con una sustancia que promueve la producción y la secreción de cada hormona hipofisaria, por lo que puede estimularse la producción y la secreción de hormonas hipofisarias. La sustancia que promueve la producción y la secreción de cada hormona hipofisaria (también denominada secretagoga hormonal) puede ser una sustancia que actúe directamente en cada célula productora de hormonas hipofisarias o una sustancia que actúe indirectamente *in vivo*; por ejemplo, después de su trasplante y similares.

Específicamente, la producción y la secreción de ACTH es promovida por CRH y similares, la producción y la secreción de GH es promovida por GHRH y similares, la producción y la secreción de TSH es promovida por TRH y similares, la producción y la secreción de PRL es promovida por PRF (anteriormente se mencionan ejemplos específicos), TRH y similares, y la producción y la secreción de FSH and LH es promovida por GnRH y similares. Estas sustancias promotoras que han de usarse pueden ser aisladas de fuentes naturales, o pueden ser sintetizadas por recombinación y similares.

Las condiciones de cultivo para secretar hormona hipofisaria a partir de células productoras de hormonas hipofisarias pueden regularse de forma apropiada siempre y cuando no afecten de forma adversa a la supervivencia y a proliferación de células productoras de hormonas hipofisarias, y promuevan la producción y la secreción de hormonas hipofisarias. Por ejemplo, se ponen ocho agregados que comprenden las células productoras de hormonas hipofisarias en 500 µl de solución de HBSS y, después de una preincubación durante 10 minutos, se añade cada estimulador a una concentración final apropiada a 37°C, y las células son incubadas durante 10 minutos más a 37°C.

Cuando las células productoras de ACTH diferenciadas son estimuladas con CRH, la producción y la secreción de ACTH son inducidas generalmente de forma notable usando no menos de aproximadamente 10 ng/ml de CRH. La CRH se usa, preferiblemente, a una concentración de aproximadamente 10 - 10000 ng/ml, más preferiblemente de aproximadamente 100 - 10000 ng/ml, siendo lo más preferible que sea de aproximadamente 1000 - 10000 ng/ml.

Cuando la producción y la secreción de GH son estimuladas con GHRH, un intervalo preferible de concentración es 100 nM - 500 nM; cuando la producción y la secreción de TSH son estimuladas con TRH, un intervalo preferible de concentración es 1 nM - 5 nM; cuando la producción y la secreción de PRL son estimuladas con PRF (por ejemplo, el péptido de liberación de la prolactina mencionado anteriormente), un intervalo preferible de concentración es 2 nM - 10 nM; cuando la producción y la secreción de FSH son estimuladas con GnRH, un intervalo preferible de concentración es 1 nM - 20 nM; y cuando la producción y la secreción de LH son estimuladas con GnRH, un intervalo preferible de concentración es 1 nM - 20 nM.

Las hormonas hipofisarias producidas a partir de células productoras de hormonas hipofisarias pueden ser aisladas y purificadas a partir del cultivo. Las hormonas hipofisarias pueden ser aisladas y purificadas, por ejemplo, a partir de un sobrenadante del cultivo por un método conocido por sí mismo para el aislamiento y la purificación de péptidos y proteínas (métodos conocidos como la cromatografía de filtración en gel y de intercambio iónico).

(6) Productos de cultivo celular y su uso como fármacos

La presente divulgación también proporciona un producto de cultivo celular obtenido directamente por un método de la presente invención. El producto de cultivo celular de la presente divulgación puede ser, por ejemplo, un agregado flotante que comprenda células madre o células diferenciadas a partir de las células madre, células preparadas por tratamiento en dispersión (por ejemplo, tratamiento con tripsina/EDTA) del agregado flotante, células obtenidas cultivando las células tratadas en dispersión y similares. La presente divulgación también proporciona el tejido precursor hipofisario o las células productoras de hormonas hipofisarias aislados y purificados del producto de cultivo celular hasta un grado que permite que el tejido o las células sean administrados a un sujeto.

"Producto de cultivo" se refiere a un producto resultante obtenido cultivando células, e incluye células, caldo y, en algunos casos, componentes secretados de células y similares. "Aislamiento" significa eliminar componentes distintos de los tejidos o de las células deseados (células, proteínas, caldo y similares).

El tejido precursor hipofisario o las células productoras de hormonas hipofisarias obtenidos por el método de la presente invención pueden ser usados como fármaco terapéutico para las siguientes enfermedades, para suplementar el tejido de la pituitaria o las células productoras de hormonas hipofisarias cuando el tejido o las células hipofisarios están dañados debido a otras causas, y similares.

Alternativamente, la hormona hipofisaria producida por las células productoras de hormonas hipofisarias obtenidas por el método de la presente invención puede ser usada como fármaco terapéutico para las siguientes enfermedades, para suplementar una hormona hipofisaria apropiada en la deficiencia de secreción de hormonas hipofisarias causada por lesión a cualquier tejido hipofisario o las respectivas células productoras de hormonas hipofisarias (terapia de sustitución hormonal) y similares.

Ejemplos de las enfermedades tratables por el tejido precursor hipofisario o las células productoras de hormonas hipofisarias obtenidos por el método de la presente invención incluyen hipoadrenocorticismo, enanismo por deficiencia de la hormona del crecimiento, deficiencia de GH de inicio en edad adulta, enanismo hipofisario, cretinismo, infertilidad, panhipopituitarismo (incluido el síndrome de la silla turca vacía, apoplejía hipofisaria, lesión posoperatoria de la hipófisis), hipopituitarismo parcial, deficiencia hormonal aislada de la pituitaria anterior (específicamente, deficiencia aislada de ACTH, deficiencia aislada de la hormona del crecimiento, deficiencia aislada de la TSH, deficiencia aislada de la prolactina, deficiencia aislada de la hormona gonadotrópica) y similares.

Cuando el tejido precursor hipofisario o las células productoras de hormonas hipofisarias obtenidos por el método de la presente invención son usados como fármaco terapéutico para las enfermedades basadas en trastornos del tejido hipofisario o en células productoras de hormonas hipofisarias, es preferible que las células sean trasplantadas al sujeto después de aumentar la pureza del tejido precursor hipofisario o de las células productoras de hormonas hipofisarias.

Puede usarse cualquier método de aumento de la pureza celular, siempre y cuando sea un método de separación y purificación celulares de conocimiento público; tales métodos incluyen, por ejemplo, un método que usa un citómetro de flujo (véanse, por ejemplo, Antibodies — A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Monoclonal Antibodies: principles and practice, tercera edición, Acad. Press (1993), Int. Immunol., 10, 275 (1998)), el método con batea (véanse, por ejemplo, Monoclonal Antibodies: principles and practice, tercera edición, Acad. Press (1993), Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1996), J. Immunol., 141, 2797 (1988)), y fraccionamiento celular basado en diferencias de la densidad de la sacarosa (véase, por ejemplo, Soshiki Baiyou no Gijyutsu (3ª edición)).

El método para el aumento de la pureza de las células comprende una etapa de cultivo del tejido precursor hipofisario o de células productoras de hormonas hipofisarias obtenidos induciendo la diferenciación de las células madre anteriormente descritas, en un caldo que comprende un agente anticancerígeno. Con ello, pueden eliminarse las células indiferenciadas, haciendo posible obtener células diferenciadas de mayor pureza, que son más adecuadas para un uso farmacéutico. Por ende, mediante tratamiento con un agente anticancerígeno, pueden eliminarse células distintas de las células diferenciadas deseadas; por ejemplo, células indiferenciadas.

Aquí, el agente anticancerígeno está ejemplificado por mitomicina C, 5-fluorouracilo, Adriamicina, Ara-C, metotrexato y similares. Estos agentes anticancerígenos son usados preferiblemente a concentraciones que son más citotóxicas a las células indiferenciadas que a las células diferenciadas inducidas. Específicamente, el cultivo con estos agentes anticancerígenos puede llevarse a cabo según los procedimientos de cultivo anteriormente descritos para determinar las concentraciones óptimas; por ejemplo, en la farmacopea japonesa se menciona un método en el que se cultivan células en una incubadora de CO_2 aireada con un 5% de dióxido de carbono a 37°C durante varias horas, preferiblemente durante 2 horas, usando un caldo que comprende estos agentes anticancerígenos a concentraciones de una centésima a una veces las concentraciones para los cuerpos vivos especificados.

Aquí puede usarse cualquier caldo que permita el cultivo del tejido precursor hipofisario o de las células productoras de hormonas hipofisarias inducidos por diferenciación. Específicamente, pueden mencionarse los caldos anteriormente mencionados y similares.

En la terapia de trasplante, el rechazo del injerto debido a la diferencia en el antígeno de histocompatibilidad es a menudo problemático, problema que, sin embargo, puede solucionarse usando una célula madre a la que se ha trasplantado el núcleo de una célula somática, o una célula madre que tiene un gen modificado en el cromosoma de la misma.

Únicamente como referencia, induciendo la diferenciación usando una célula madre a la que se ha trasplantado el núcleo de una célula somática, pueden obtenerse un tejido precursor hipofisario o células productoras de hormonas hipofisarias del individuo que es el donante de la célula somática. Los tejidos o las células de tal individuo son no solo efectivos en la terapia de trasplante tal cual, sino que también son útiles como material de diagnóstico para determinar si un fármaco existente es eficaz o no para el individuo. Además, cultivando los tejidos o las células diferenciados inducidos durante un largo periodo, es posible determinar su susceptibilidad al estrés oxidativo y a la senescencia; comparando sus funciones o lapsos de vida con los de células de otros individuos, es posible evaluar los riesgos individuales de contraer las enfermedades anteriormente mencionadas; estos datos de evaluación son útiles para proporcionar un método profiláctico eficaz para enfermedades para las que se emita un diagnóstico de desarrollo con gran incidencia en el futuro.

Un sujeto al que hayan de trasplantarse el tejido precursor hipofisario o células productoras de hormonas hipofisarias es un animal de sangre caliente, preferiblemente de un mamífero, más preferiblemente de un animal de la misma especie que el animal del que derivan las células madre originales. Ejemplos de mamífero incluyen roedores como ratones, ratas, hámsteres, cobayas y similares; animales de experimentos, como el conejo y similares; animales domésticos como cerdos, ganado vacuno, cabras, caballos, ovejas y similares; animales de compañía como perros, gatos y similares; y primates como seres humanos, monos, orangutanes, chimpancés y similares. Cuando el trasplante tiene como objetivo el tratamiento de una enfermedad, el sujeto es, preferiblemente, un paciente humano.

El tejido precursor hipofisario o las células productoras de hormonas hipofisarias diferenciados de células madre inducidos por el método de la presente invención pueden ser trasplantados a la pituitaria anterior o a una región correspondiente a la misma mediante un método conocido por sí mismo.

Cuando se desea la producción y la secreción de hormona hipofisaria, el tejido precursor hipofisario o las células productoras de hormonas de la hipófisis pueden ser trasplantados a cualquier parte del sujeto, siempre y cuando se puedan inducir la producción y la secreción de la hormona. Por ejemplo, el tejido precursor hipofisario o las células productoras de hormonas hipofisarias pueden ser trasplantados a la pituitaria del sujeto o en las inmediaciones de la misma, o, cuando la pituitaria ha sido extirpada, al sitio en el que la pituitaria debería estar presente (es decir, la fosa pituitaria), o en las inmediaciones de un órgano diana sobre el que actúe la hormona hipofisaria secretada y similares (por ejemplo, bajo la cápsula suprarrenal para las células productoras de ACTH, etc.). Como se muestra en los Ejemplos, las células productoras de ACTH pueden cumplir la función de producción de ACTH incluso cuando sea trasplantadas ectópicamente.

La producción y la secreción de hormona hipofisaria en el sujeto después de la implantación pueden ser estimuladas administrando al sujeto una secretagoga hormonal según se ha descrito anteriormente, o pueden ser estimuladas de forma natural por tales sustancias endógenas. Puede seleccionarse debidamente dependiendo del objeto del trasplante y de la condición del sujeto y similares.

Específicamente, como método para trasplantar células productoras de hormonas hipofisarias a un sujeto murino, puede mencionarse un método que comprende la inyección de aproximadamente 1 - 1000, preferiblemente de aproximadamente 5 - 500, más preferiblemente de aproximadamente 10 - 50, agregados celulares que comprenden dichas células obtenidas por el método de inducción de la diferenciación de la presente invención bajo la cápsula suprarrenal con una jeringa Hamilton y similares. El método no está limitado a ello, siempre y cuando pueda garantizarse el injerto de las células trasplantadas. Para el trasplante como un tejido precursor hipofisario (tejido de tipo bolsa de Rathke), puede mencionarse un método que comprende el aislamiento de un tejido de tipo bolsa de Rathke a partir de los agregados celulares y la inyección del mismo debajo de la cápsula suprarrenal con la jeringa Hamilton y similares.

Cuando el sujeto es un ser humano, puede mencionarse un método que comprende el trasplante de los agregados celulares a tejidos subcutáneos o en las inmediaciones de la pituitaria, aunque sin limitación al mismo.

El injerto del tejido o de las células trasplantados puede confirmarse por tinción histoquímica de la hormona hipofisaria producida y secretada por las células u otros productos apropiados de genes marcadores con un anticuerpo de fluorescencia después del transcurso de tiempo suficiente después del trasplantes (por ejemplo, 7 días después del trasplante), y similares.

Alternativamente, también puede ser confirmado midiendo la producción de otra hormona (por ejemplo, glucocorticoide (por ejemplo, corticosterona) para la ACTH) que muestre la producción y la secreción promovidas por dicha hormona hipofisaria; por ejemplo, la concentración en sangre. Dicha otra hormona y similares, cuya producción y secreción son promovidas por la hormona hipofisaria, son según se ha mencionado anteriormente.

En particular, el efecto del trasplante de las células productoras de ACTH también puede ser evaluado por la mejora de la actividad locomotora espontánea del receptor. Por ejemplo, la actividad locomotora espontánea del ratón es

evaluada por la distancia del movimiento espontáneo en una jaula por día y el número de rotaciones espontáneas de una rueda de correr en una jaula por día. La distancia del movimiento de un ratón en un jaula puede ser medida por un sistema de análisis usando un sensor IR de MDC-W02 (BrainScienceIdea, Osaka) y similares, y el número de rotaciones de la rueda de correr puede ser medido usando ENV-044 (MedAssociates, Georgia) y similares. Estas mediciones se llevan a cabo como experimentos separados poniendo cada aparato en una jaula (jaula inicial) en la que se cría de forma normal al ratón que ha de ser medido. Así, puede medirse con estrés bajo la cantidad de actividad locomotora espontánea.

El efecto del trasplante de células productoras de ACTH también puede ser evaluado por la tasa de supervivencia de los receptores. Por ejemplo, la tasa de supervivencia después del trasplante de células productoras de ACTH puede ser analizada por el método Kaplan-Mayer.

Además, dado que los agregados y el tejido precursor hipofisario obtenidos por el método de la presente invención reproducen bien el microentorno durante el desarrollo hipofisario *in vivo*, también es útil como material de investigación relativo al desarrollo de la pituitaria la inducción de células productoras de hormonas hipofisarias y similares.

Además, el método de la presente invención es sumamente útil, dado que puede proporcionar un “material tisular” útil en el campo de la medicina regenerativa, para el descubrimiento de los medicamentos anteriormente mencionados y el correspondiente ensayo de toxicidad farmacológica y similares.

(7) Método de selección

Se divulga un método de selección de una sustancia de ensayo que comprende el uso del producto de cultivo celular o el producto de cultivo. En particular, dado que el producto de cultivo construye un tejido precursor hipofisario de forma sumamente similar al proceso inicial de histogénesis del tejido precursor hipofisario en un cuerpo vivo, y comprende células sumamente similares a las células productoras de hormonas hipofisarias en un cuerpo vivo, puede ser aplicado a una selección de fármacos terapéuticos para enfermedades basadas en trastornos del tejido hipofisario o diversas células productoras de hormonas hipofisarias, a una selección de fármacos terapéuticos para lesiones celulares debidas a otras causas, o a estudios de toxicidad de los mismos, y al desarrollo de un nuevo método terapéutico para enfermedades del sistema nervioso y similares.

Aquí, “una sustancia de ensayo” es ejemplificada por sustancias cuya eficacia como fármacos terapéuticos para las enfermedades anteriormente mencionadas ha de ser determinada y por sustancias que son fármacos terapéuticos para otras enfermedades cuyas influencias (por ejemplo, su toxicidad) sobre el tejido hipofisario o sobre diversas células productoras de hormonas hipofisarias deben ser determinadas. La sustancia puede ser una cualquiera de compuestos de bajo peso molecular, compuestos de alto peso molecular, proteínas, genes (ADN, ARN y similares), virus y similares. Los expertos en la técnica pueden escoger tales sustancias según resulte apropiado.

La presente invención es descrita en lo que sigue más específicamente por medio de los siguientes Ejemplos, que, sin embargo, tienen únicamente fines ilustrativos y nunca limitan el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Inducción simultánea de una diferenciación *in vitro* que dé lugar a tejido prosencefálico y a ectodermo no neural de cabeza mediante cultivo flotante libre de suero de agregados de células ES

Método

Se cultivaron agregados de células ES murinas durante 7 días por el método SFEBq/gfCDM (Wataya et al, 2008, PNAS vol. 105, pp. 11796-11801), que es un método de diferenciación selectiva que da lugar al prosencéfalo, en particular a tejido de hipotálamo. Específicamente, las células ES murinas dispersadas formando células individuales mediante un tratamiento con tripsina fueron puestas en placas a razón de 3000, 8000, 10000 o 15000 células por pocillo de fondo en U de una placa de 96 pocillos con recubrimiento de baja adherencia para las células para formar agregados. Como caldo se usó un caldo gfCDM químicamente sintetizado (Wataya et al, 2008, PNAS vol. 105, pp. 11796-11801). La detección se llevó a cabo usando Rx::GFP (GFP insertada en el locus del gen Rx) como marcador del tejido de hipotálamo, y anticuerpo Pitx1 como marcador del ectodermo no neural de cabeza.

Resultados

Los agregados flotantes de células ES cultivados por el método SFEBq/gfCDM durante 7 días comprendían, en todas las condiciones de cultivo, un marcador Rx del hipotálamo::GFP positivo, marcador neural N-cadherina y tejido de hipotálamo Sox1 positivo. En un cultivo formador de agregados de 8000 - 15000 células por pocillo, se formaron tejidos epiteliales continuos de tipo laminar Pitx1 positivos en la capa superficial (capa superficial adicional sobre Rx::GFP positiva) en no menos del 90% de los agregados flotantes el día 5 de cultivo y posteriormente (Fig. 1f). La agregación partiendo de 3000 células resultó en la dispersión de un pequeño número de células Pitx1, y no se formó un gran epitelio continuo. En qPCR usando otro marcador Pitx2 de ectodermo no neural de cabeza, el agregado que parte de 10000 células indujo una expresión cuádruple de ARN Pitx2 en comparación con el agregado que parte de 3000 células, y el nivel de expresión de los ARNm de BMP2 y BMP4 aumentó hasta aproximadamente entre el doble y el

triple (Fig. 6). Se descubrió que la expresión de Pitx2 aumenta no solo al aumentar el número de células para formar agregados, sino también añadiendo al caldo BMP4 a una concentración de 0,5 nM (Fig. 1d).

Ejemplo 2: Cultivo flotante libre de suero de agregados de células ES e inducción de una diferenciación *in vitro* que dé lugar a tejido precursor hipofisario pro tratamiento de señales hedgehog

Método

Se formaron agregados de células ES murinas desde 10000 células por agregado usando el método SFEBq/gfCDM (Wataya et al, 2008, PNAS vol. 105, pp. 11796-11801), y sometiéndolos al cultivo flotante como en el Ejemplo 1. Inmediatamente después del inicio del cultivo de diferenciación, se añadió SAG (Danjo et al, JNS, 2011, vol. 31, pp. 1919-1933), agonista hedgehog, a razón de 100 o 400 nM, y los agregados se cultivaron un total de 10-13 días. Dado que el SAG tiene una actividad varias veces mayor que el Shh, es comparativamente económico y puede ser usado hasta a alta concentración, puede causar una intensa actividad de señalización hedgehog (Danjo et al, JNS, 2011, vol. 31, pp. 1919-1933). La expresión de Lim3, marcador del tejido precursor hipofisario (la bolsa de Rathke) y similares fue confirmada por PCR o tinción citoquímica de una sección congelada por el método de anticuerpos de fluorescencia. La expresión de Lim3 también fue confirmada usando células ES en las que se había insertado Lim3::GFP.

Resultados

En el grupo añadido con SAG a 100 o 400 nM, la expresión de Lim3 con genes marcados (15 veces la de las células ES indiferenciadas, 7 veces las del grupo sin adición de SAG) fue confirmada por PCR el día 10 y posteriormente (véanse también las Figuras 1j, k). Dado que esta inducción de Lim3 fue inhibida por SANT-1, antagonista del receptor hedgehog, se descubrió a través de la señal hedgehog que la acción de SAG es un efecto.

Los agregados fueron cultivados adicionalmente en gfCDM durante 3 días (13 días en total). En consecuencia, se formaron varias (1-7) bolsas vesiculares epiteliales Lim3 positivas en el agregado en el grupo de adición de SAG (Fig. 2a). En las Figuras 2d-f se muestra la manera de la formación de las bolsas vesiculares (d8 - d10). El tejido lim3 positivo emergió en primer lugar como una placoda epitelial engrosada, luego invaginada, y, por último, formada como una vesícula epitelial hueca. Estas bolsas vesiculares fueron negativas para Rx, Sox1 y Nestina y positivas para Pitx1 y Pitx2 (Figuras 2g-j), mostraron las mismas expresiones de marcadores que las del tejido precursor hipofisario, y empezaron a expresar el marcador tardío de la bolsa de Rathke Islet 1/2, además de Lim3, antes del día 13 (Fig. 2o). Tenían estructuras epiteliales y pluralidad morfológicamente similares a las del tejido precursor hipofisario (Figuras 2m, n). Además, como el tejido precursor hipofisario (la bolsa de Rathke) en un cuerpo vivo, estuvieron presentes en las inmediaciones del tejido de hipotálamo Rx positivo, y se formaron adyacentes al tejido ectodérmico no neural de cabeza Pitx1 positivo y Lim3 negativo (Figuras 2h, k). Esto sugiere que en este sistema de cultivo de agregados flotantes de células ES se imitó el microentorno para el desarrollo de un tejido precursor hipofisario en el proceso del desarrollo embriogénico. Tal tejido de tipo bolsa de Rathke apenas se formó en el cultivo iniciado partiendo de un agregado de 3000 células.

Se usó gfCDM sin SAG para el cultivo durante los días 10-13. Cuando se añadió FGF8 a 200 ng/ml durante este periodo, los tejidos que expresaban Lim3 aumentaron un 30-50%.

Ejemplo 3: Producción y tratamiento con DAPT de células productoras de ACTH a partir de tejido precursor hipofisario derivado de células ES

Método

Usando el método del Ejemplo 2, se diferenciaron células ES murinas dando lugar a tejido precursor hipofisario por un tratamiento con SAG (400 nM durante 7 días y 100 nM durante 3 días, 10 días en total). Además, usando caldo gfCDM, los agregados fueron cultivados en un 40% de O_2 y un 5% de CO_2 durante 12 días en total (22 días en total). Además, los agregados fueron tratados con un inhibidor de la señal Notch, 10 µM de DAPT, durante un día durante los días 18-19 o los días 20-21 de cultivo. La expresión de Tbx19 y de ACTH expresada en células productoras de ACTH fue confirmada por tinción citoquímica de una sección congelada por el método de anticuerpos de fluorescencia.

Resultados

Como resultado del análisis mediante el método de anticuerpos de fluorescencia, el agregado anteriormente mencionado con tratamiento DAPT mostró una expresión potenciada de Tbx19 con respecto al que no tenía tratamiento DAPT (Fig. 3b), un mayor porcentaje de células ACTH positivas (Fig. 3c), y comprendía conjuntos de muchas células $Tbx19^-$ y ACTH muy positivas (>30 células o más) en múltiples sitios. El agregado sin tratamiento DAPT meramente mostró un número pequeño de células dispersas $Tbx19^-$ y ACTH positivas. Dado que las células ACTH positivas eran negativas para marcadores neurales como NSE, neurofilamento y similares, se consideraron distintas de la neurona cerebral $ACTH^+$ (Fig. 3f), y no expresaron el marcador PC2 de linajes celulares productores de melanina (Fig. 3g). Además, las células $ACTH^+$ era E-cadherina negativas como *in vivo* (Fig. 3e).

In vivo, durante el desarrollo de la pituitaria, el precursor Tbx19 negativo genera un precursor intermedio Pitx1 positivo, y este precursor se diferencia posteriormente dando lugar a células productoras de GH, células productoras de PRL y

células productoras de TSH. La expresión de Pitx1 se confirmó al hallar que la expresión no aumentaba, sino que más bien disminuía, por el tratamiento con DAPT y aumentaba muchísimo por el tratamiento con BIO. La expresión de Pitx1 tendió a disminuir con el tratamiento con IWP2 del inhibidor Wnt (Fig. 3k).

Ejemplo 4: Producción de células productoras de hormonas hipofisarias distintas de las células productoras de ACTH a partir de tejido precursor hipofisario derivado de células ES

Método

Usando el método del Ejemplo 2, se diferenciaron células ES murinas dando lugar a tejidos precursores de la pituitaria mediante un tratamiento con SAG (400 nM durante 7 días y 100 nM durante 3 días, 10 días en total). Además, los agregados se cultivaron continuamente de forma flotante en un 40% de O_2 y un 5% de CO_2. El caldo usado fue un gfCDM que comprendía corticosteroide (200 ng/ml de hidrocortisona) y 1 nM de insulina, gfCDM que comprendía estrógeno (50 ng/ml de estradiol) y 1 nM insulina, o sobrenadante de cultivo (caldo acondicionado) de fibroblasto murino, la célula PA6, en gfCDM.

La expresión de la hormona del crecimiento (GH), la prolactina (PRL), la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH) fue confirmada por tinción citoquímica de una sección congelada por el método de anticuerpos de fluorescencia.

Resultados

Cuando fueron cultivadas en gfCDM que comprendía corticosteroide (200 ng/ml de hidrocortisona) y 1 nM de insulina durante 10 días desde el día 20 de cultivo, se confirmó la presencia de muchas células GH positivas en el agregado (Figuras 3l, m). Además, cuando el sistema de transducción Wnt estimulante con BIO (250nM) fue tratado con un inhibidor GSK3β durante los días 16-18 de cultivo, las células GH positivas aumentaron adicionalmente un 30-50%. Cuando fueron cultivadas en gfCDM que comprendía estrógeno (50 ng/ml de estradiol) and 1 nM de insulina durante 10 días desde el día 20 de cultivo, se confirmó la presencia de muchas células prolactina positivas en el agregado (Figuras 3n, o). Cuando fueron cultivadas en el sobrenadante de cultivo de la célula PA6 en gfCDM durante 15 días desde el día 10 de cultivo, se confirmó la presencia de muchas células LH positivas y de muchas células FSH positivas, y se observó un número pequeño de células TSH positivas (células LH positivas> células FSH positivas>células TSH positivas) (Figuras 3p-s).

Ejemplo 5: Secreción de ACTH *in vitro* mediante CRH a partir de células productoras de ACTH derivadas de células ES

Método

Usando el método del Ejemplo 3, se diferenciaron células ES murinas dando lugar a células productoras de ACTH mediante un tratamiento con SAG y un tratamiento con DAPT (22 días en total). Los agregados fueron tratados con CRH (factor liberador de corticotropina) y se cuantificó la secreción de ACTH. Específicamente, se pusieron ocho agregados en 500 µl de solución HBSS y , tras una preincubación a 37°C durante 10 minutos, se añadió CRH a una concentración final de 10-10000 ng/ml, y los agregados se incubaron durante 10 minutos. A continuación, el sobrenadante del cultivo fue recuperado y medido por el método ELISA (Fig. 4a).

Resultados

En un grupo sin adición de CRH, la concentración de ACTH del sobrenadante del cultivo no fue más de 0,2 pg/ml; sin embargo, se detectaron 1,4 pg/ml de ACTH en un grupo de 10 ng/ml de CRH, se detectaron 4 pg/ml de ACTH en un grupo de 100 ng/ml de CRH, y se detectaron 8,5-9,5 pg/ml de ACTH en grupos de 1000 y 10000 ng/ml de CRH (Fig. 4c). Por otro lado, los agregados sin tratamiento SAG no mostraron un aumento significativo en la secreción de ACTH ni siquiera cuando se les añadieron 1000 ng/ml de CRH, y los agregados con tratamiento SAG pero sin tratamiento DAPT no mostraron mucho aumento en la secreción de ACTH ni siquiera cuando se les añadió CRH (Fig. 4d). La inducción de la secreción de ACTH fue específica a la CRH, y no fue observada ni siquiera cuando se añadieron otras hormonas liberadoras (Fig. 4b).

Además, cuando se llevó a cabo durante 60 minutos un pretratamiento con hidrocortisona (100 ng/ml), que se sabe que suprime la secreción de ACTH procedente de la glándula pituitaria, el efecto de la CRH promotor de la secreción de ACTH fue suprimido casi por completo (Fig. 4e); sin embargo, un pretratamiento con estradiol no afectó a la secreción de ACTH (Fig. 4f).

Ejemplo 6: Secreción de ACTH y corticotropina *in vivo* mediante CRH a partir de células productoras de ACTH derivadas de células ES

Método

Usando el método del Ejemplo 3, se diferenciaron células ES murinas dando lugar a células productoras de ACTH mediante un tratamiento con SAG y un tratamiento con DAPT, y los agregados celulares obtenidos fueron

trasplantados debajo de la cápsula suprarrenal de ratones hipofisectomizados (Fig 5a, derecha). Antes del trasplante, se confirmó que estos ratones habían perdido la capacidad de secretar ACTH (reactividad a CRH) (Figuras 5b, c).

Específicamente, después de un cultivo durante 22 días en total, los agregados celulares fueron inyectados debajo de la cápsula suprarrenal de ratones hipofisectomizados con una jeringa Hamilton. Después de 7 días desde el trasplante y bajo una carga de administración intraperitoneal de CRH, se recuperó el plasma y se midieron las concentraciones de ACTH y corticotropina (corticosterona) por el método ELISA.

Resultados

Se confirmó que las células ACTH positivas, derivadas de células ES, trasplantadas debajo de la cápsula suprarrenal se habían injertado tópicamente incluso 7 días después del trasplante por tinción histoquímica por el método de anticuerpos de fluorescencia (Fig. 5a, izquierda). En el grupo de control (operación simulada), la ACTH en sangre era menos de 1 pg/ml y la corticosterona era menos de 3 pg/ml incluso después de la carga de CRH. En cambio, en el grupo de trasplante de células ACTH positivas derivadas de células ES, la ACTH alcanzó la concentración de 25-30 pg/ml y la corticosterona alcanzó la concentración de 300 pg/ml después de la carga de CRH (Figuras 5e, f: con carga de CRH; Figuras 5g, h: sin carga de CRH).

Ejemplo 7: Mejora de la supervivencia y de la actividad de ratones hipofisectomizados mediante trasplante ectópico de células ACTH positivas derivadas de células ES

Método

De la misma manera que en el Ejemplo 6, se trasplantaron células productoras de ACTH derivadas de células ES murinas debajo de la cápsula suprarrenal de ratones hipofisectomizados (de 9 semanas de edad). La supervivencia y el aumento en peso corporal de los ratones trasplantados fueron observados y comparados con los del grupo de control (operación simulada). También fue examinado el movimiento espontáneo de los ratones. Como movimiento espontáneo del ratón, se midió cuánto se muevo espontáneamente el ratón en una jaula en un día usando un sensor IR (MDC-W02 (BrainScienceIdea, Osaka)). Además, usando ENV-044 (MedAssociates, Georgia) se midió de forma separada cuántas veces hacía rotar el ratón espontáneamente una rueda de correr por día.

Resultados

Aunque todos los ratones hipofisectomizados en el grupo de control murieron antes de las 8 semanas después de la operación simulada, aproximadamente el 85% de los animales en el grupo de trasplante con células productoras de ACTH derivadas de células ES seguía vivo en ese momento (Fig. 5k). Además, en la fase de 8 semanas, cuando murieron todos los del grupo de control, el 60% de los ratones del grupo de trasplante ganó más peso que en el momento del trasplante.

Además, los ratones en el grupo de trasplante mostraron un mayor nivel de movimiento espontáneo que los del grupo de control (Figuras 5i, j).

Ejemplo 8: Inducción de la diferenciación de células ES humanas dando lugar a células progenitoras hipofisarias

Método

Células ES humanas (12000 células) dispersadas con tripsina formando células individuales fueron sometidas a cultivo en agregados flotantes en presencia de un inhibidor ROCK 10 μM Y-27632 (Watanabe et al, Nature Neuroscience, 2007) de la misma manera que en el Ejemplo 1. El caldo de cultivo usado fue gfCDM al que se añadió un 5% de KSR. Desde el día 3 de cultivo, se añadieron 0,5 nM, 1,5 nM o 5,0 nM de BMP4 al caldo de cultivo, se añadieron 1000 nM de SAG desde el día 6 de cultivo, y se continuó el cultivo flotante.

Resultados

El día 17 de cultivo, todos los agregados comprendían muchas células precursoras neurales Rx positivas en los agregados, y las células ectodérmicas no neurales E-cad y citoqueratina positivas formaban una estructura epitelial de tipo laminar compuesta de células monocapa en la superficie de las mismas, de la misma manera que en el cultivo de células ES murinas (Fig. 7). Mediante análisis por qPCR, se indujo la expresión de Pitx1 aproximadamente 10 veces más en el grupo tratado con 5 nM de BMP que en el grupo sin el tratamiento (Fig. 8). El grupo tratado con BMP comprendía ectodermo no neural E-cad positivo en la superficie de una estructura neuroepitelial Rx positiva el día 25 de cultivo y, de la misma manera que en la formación de la placoda hipofisaria en el cultivo murino, una parte de la misma estaba engrosada, mostrando una estructura de tipo placoda (Fig. 7).

Se obtuvieron resultados equivalentes incluso cuando se partió de células ES humanas (3000 células y 6000 células) dispersadas con tripsina formando células individuales. Por lo tanto, se demostró la posibilidad de inducción de una diferenciación simultánea que dé lugar tanto a un tejido rostral de hipotálamo como a un tejido ectodérmico rostral no neural de cabeza que sea un epitelio continuo de tipo laminar incluso cuando se usan agregados compuestos de un número comparativamente pequeño de células, añadiendo BMP4 al caldo.

Aunque la presente invención ha sido descrita haciendo hincapié en realizaciones preferidas, es obvio para los expertos en la técnica que las realizaciones preferidas pueden ser modificadas. La presente invención se propone que la presente invención pueda ser implementada por métodos distintos de los descritos en detalle en la presente memoria. En consecuencia, la presente invención abarca todos los aspectos abarcados por las “REIVINDICACIONES” adjuntas.

Aplicabilidad industrial

Según el método de la presente invención, se puede inducir *in vitro* una diferenciación de células madre pluripotentes, tales como células ES y similares, dando lugar a agregados que comprenden un tejido nervioso central y un tejido ectodérmico no neural de cabeza, en particular agregados que comprenden un tejido rostral de hipotálamo y un tejido ectodérmico rostral de cabeza y un tejido precursor hipofisario, y se puede inducir una diferenciación que dé lugar a diversas células productoras de hormonas hipofisarias. La glándula pituitaria es un órgano endocrino central que produce y secreta muchas hormonas, y una secreción anormal de hormonas ejerce una grave influencia en el cuerpo vivo. Por lo tanto, el agregado, el tejido precursor hipofisario y las células productoras de hormonas hipofisarias obtenidos por el método de la presente invención pueden ser utilizados en particular para el tratamiento y similares de las enfermedades causadas por la deficiencia de secreción de hormonas hipofisarias y de las enfermedades que causan una deficiencia en la secreción de hormonas hipofisarias.

A partir de los agregados que comprenden un tejido nervioso central y un tejido ectodérmico no neural de cabeza puede formarse no solo la pituitaria, sino también placodas sensoriales tales como el epitelio olfativo, el cristalino, el oído interno y similares.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de un agregado que comprende tanto un tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza que comprende:

(i) una etapa de formación de un agregado de células madre en un caldo libre de suero, y

(ii) una etapa de cultivo flotante del agregado formado en el caldo libre de suero, en el que el caldo libre de suero usado para el cultivo flotante comprende un sustituto de suero y un promotor de señales exógenas de BMP2 y/o BMP4 a una concentración que no cause la supresión de la diferenciación neural.

2. El método de producción según la reivindicación 1 en el que el caldo libre de suero usado para el cultivo flotante comprende un promotor de la señal Shh.

3. El método de producción según la reivindicación 2 en el que el promotor de la señal Shh es SAG.

4. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el promotor de señales es BMP2 y/o BMP4.

5. Un método de producción de una célula productora de hormona adrenocorticotrópica que comprende:

(i) una etapa de producción de un agregado que comprende tanto tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza mediante el método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y

(ii) una etapa de cultivo flotante adicional del agregado que comprende tanto tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza obtenido en la etapa (i), en un caldo libre de suero que comprende un inhibidor de la señal Notch.

6. Un método de producción de una célula productora de la hormona del crecimiento que comprende:

(i) una etapa de producción de un agregado que comprende tanto tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza mediante el método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y

(ii) una etapa de cultivo flotante adicional del agregado que comprende tanto tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza obtenido en la etapa (i), en un caldo libre de suero que comprende glucocorticoide.

7. Un método de producción de una célula productora de prolactina que comprende:

(i) una etapa de producción de un agregado que comprende tanto tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza mediante el método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y

(ii) una etapa de cultivo flotante adicional del agregado que comprende tanto tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza obtenido en la etapa (i), en un caldo libre de suero que comprende un estrógeno.

8. Un método de producción de una célula productora de la hormona estimulante del folículo, de la hormona luteinizante y/o de la hormona estimulante de la tiroides que comprende:

(i) una etapa de producción de un agregado que comprende tanto tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza mediante el método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y

(ii) una etapa de cultivo flotante adicional del agregado que comprende tanto tejido de hipotálamo como un ectodermo no neural de cabeza obtenido en la etapa (i), en un caldo acondicionado por células estromales obtenido cultivando células estromales en un caldo libre de suero.

9. Un método de producción de un agregado que comprende tanto un tejido nervioso central como un tejido ectodérmico no neural de cabeza que comprende:

(i) una etapa de formación de un agregado de células madre en un caldo libre de suero, y

(ii) una etapa de cultivo flotante del agregado formado en el caldo libre de suero, en la que el caldo libre de suero usado para el cultivo flotante comprende un sustituto de suero y un promotor de señales exógenas de BMP2 y/o BMP4 a una concentración que no cause la supresión de la diferenciación neural.

10. Un método de producción de una placoda que forma el epitelio olfativo, el cristalino o el oído interno que comprende:

(i) producir un agregado que comprende tanto un tejido nervioso central como un tejido ectodérmico no neural de cabeza mediante el método de producción según la reivindicación 9, y

(ii) autoformar la placoda en el agregado obtenido en la etapa (i).

Fig. 1

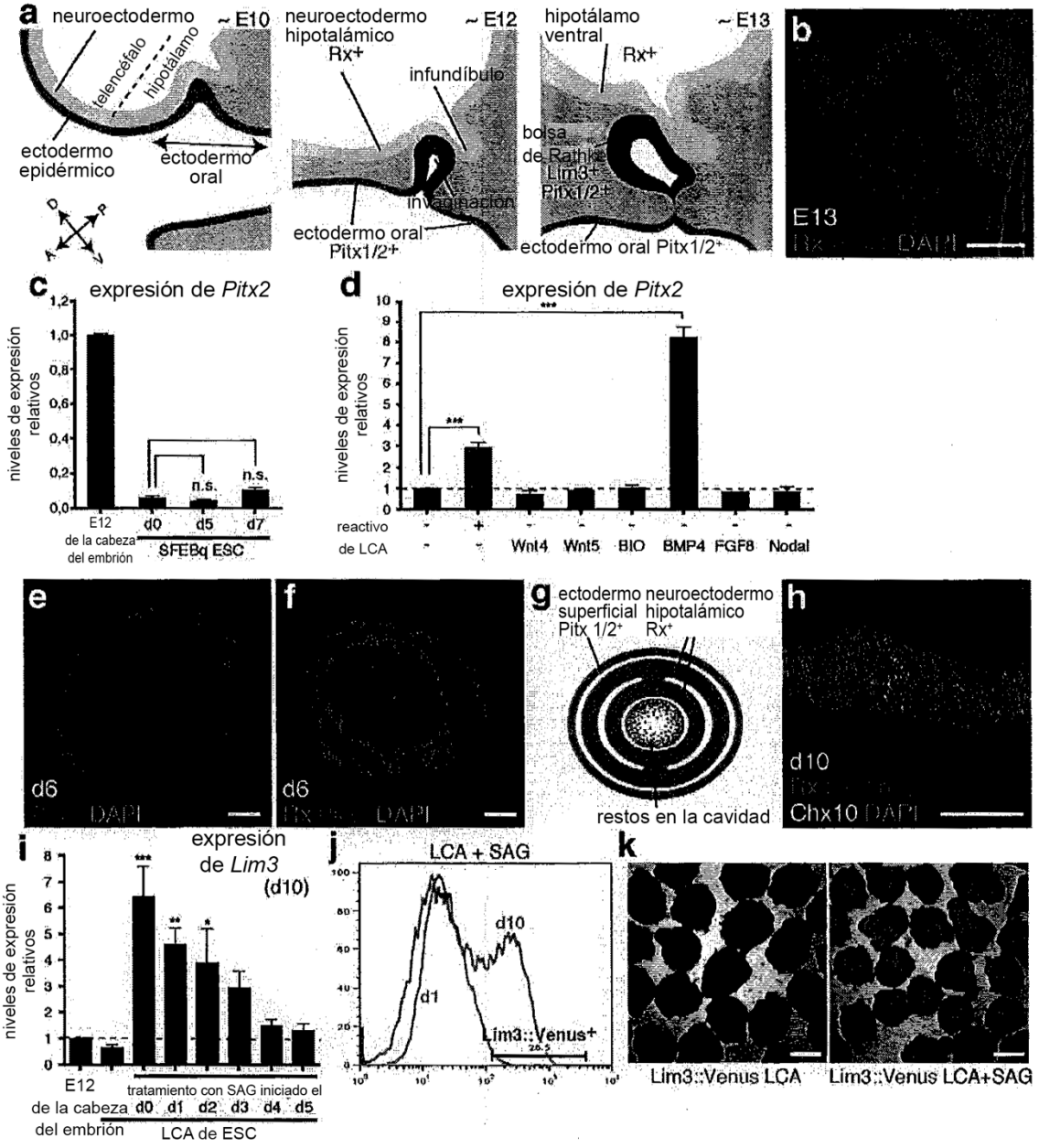

a
neuroectodermo
~ E10
telencéfalo
hipotálamo
ectodermo epidérmico
ectodermo oral
neuroectodermo hipotalámico
Rx+
~ E12
infundíbulo
invaginación
ectodermo oral Pitx1/2+
hipotálamo ventral
~ E13
Rx+
bolsa de Rathke
Lim3+
Pitx1/2+
ectodermo oral Pitx1/2+
b
E13
Rx
DAPI
c
expresión de Pitx2
niveles de expresión relativos
n.s.
n.s.
E12
d0
d5
d7
de la cabeza del embrión
SFEBq ESC
d
expresión de Pitx2
niveles de expresión relativos
reactivo de LCA
Wnt4
Wnt5
BIO
BMP4
FGF8
Nodal
e
d6
DAPI
f
d6
Rx
DAPI
g
ectodermo superficial Pitx 1/2+
neuroectodermo hipotalámico Rx+
restos en la cavidad
h
d10
Rx
Chx10 DAPI
i
expresión de Lim3 (d10)
niveles de expresión relativos
E12
tratamiento con SAG iniciado el
de la cabeza del embrión
d0
d1
d2
d3
d4
d5
LCA de ESC
j
LCA + SAG
d10
d1
Lim3::Venus+
k
Lim3::Venus LCA
Lim3::Venus LCA+SAG

Fig. 2

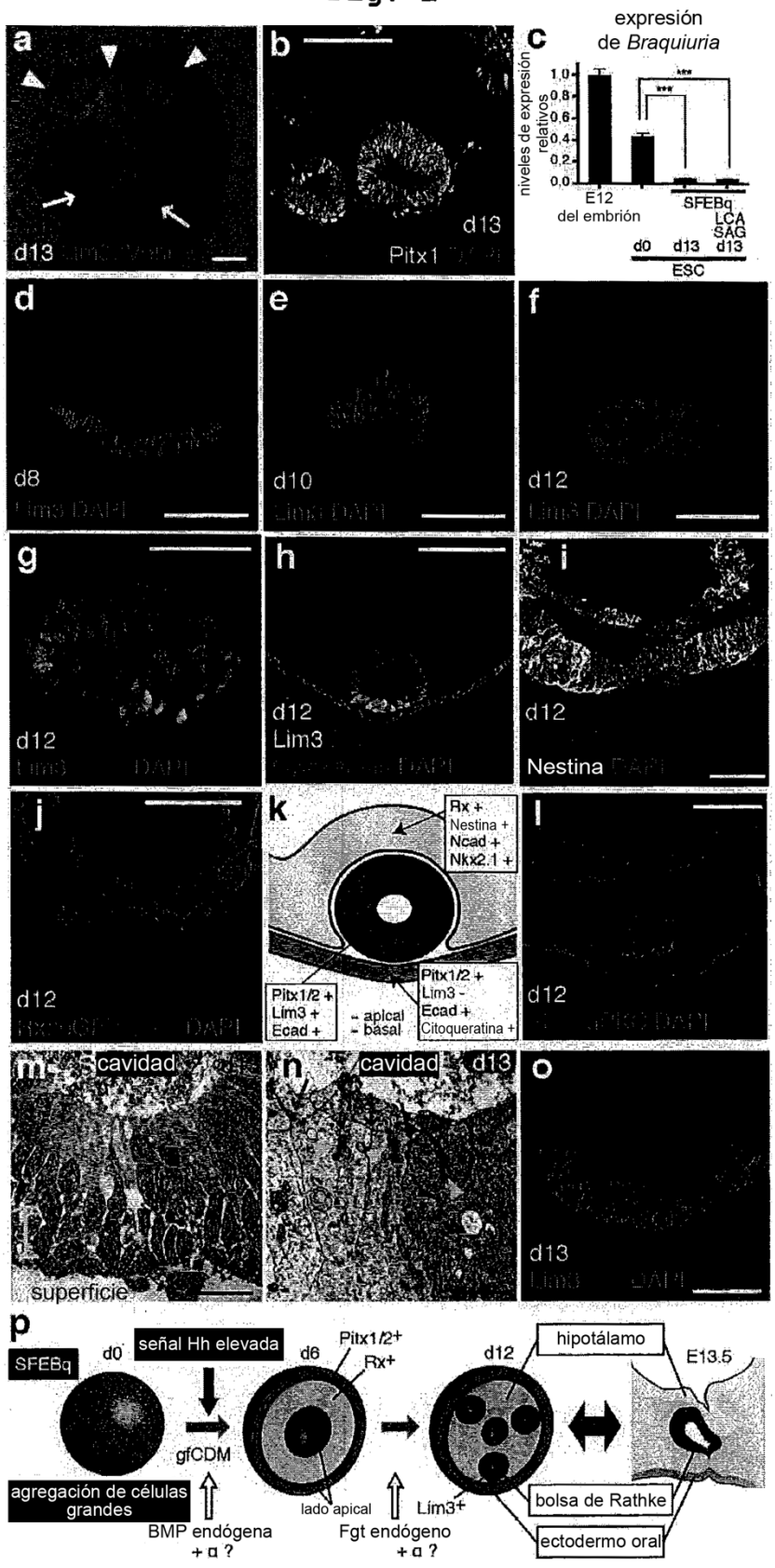

a
d13
b
d13
Pitx1
c
expresión de *Braquiuria*
niveles de expresión relativos
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
***
***
E12
del embrión
SFEBq
LCA
SAG
d0
d13
d13
ESC
d
d8
e
d10
f
d12
g
d12
h
d12
Lim3
i
d12
Nestina
j
d12
k
Rx +
Nestina +
Ncad +
Nkx2.1 +
Pitx1/2 +
Lim3 +
Ecad +
- apical
- basal
Pitx1/2 +
Lim3 -
Ecad +
Citoqueratina +
l
d12
m
cavidad
superficie
n
cavidad
d13
o
d13
p
SFEBq
d0
señal Hh elevada
gfCDM
agregación de células grandes
BMP endógena
+ α ?
d6
Pitx1/2+
Rx+
lado apical
Lím3+
Fgt endógeno
+ α ?
d12
hipotálamo
E13.5
bolsa de Rathke
ectodermo oral

Fig. 3

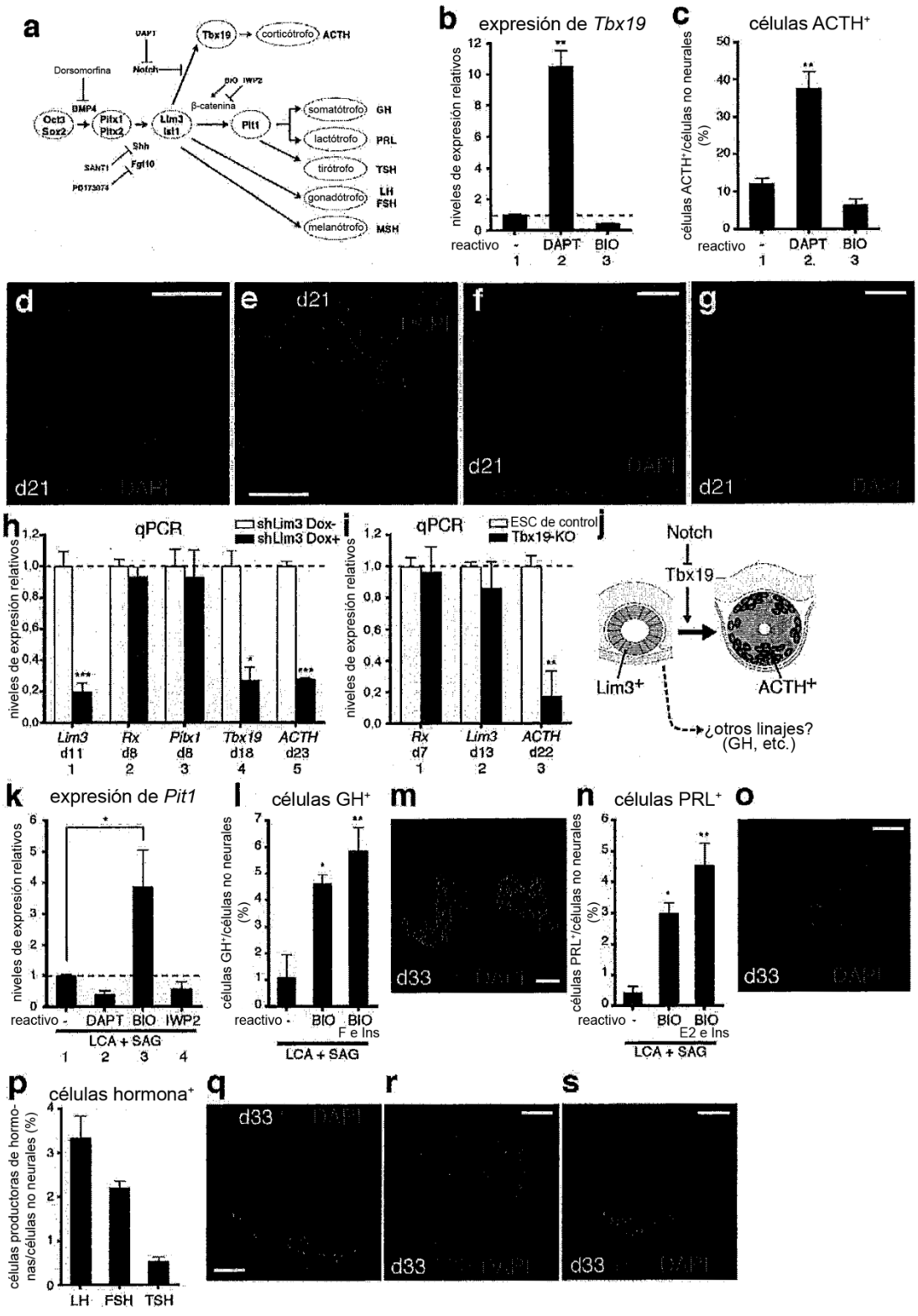

a
DAPT
Notch
Tbx19
corticótrofo
ACTH
Dorsomorfina
BMP4
Oct3
Sox2
Pitx1
Pitx2
Lim3
Isl1
β-catenina
BIO IWP2
Pit1
somatótrofo
GH
lactótrofo
PRL
tirótrofo
TSH
gonadótrofo
LH
FSH
melanótrofo
MSH
Shh
SAG21
Fgf10
PD173074
b
expresión de Tbx19
niveles de expresión relativos
reactivo - DAPT BIO
1 2 3
c
células ACTH+
células ACTH+/células no neurales (%)
reactivo - DAPT BIO
1 2 3
d
d21
DAPI
e
d21
f
d21
DAPI
g
d21
DAPI
h
qPCR
shLim3 Dox-
shLim3 Dox+
niveles de expresión relativos
Lim3 d11 1
Rx d8 2
Pitx1 d8 3
Tbx19 d18 4
ACTH d23 5
i
qPCR
ESC de control
Tbx19-KO
niveles de expresión relativos
Rx d7 1
Lim3 d13 2
ACTH d22 3
j
Notch
Tbx19
Lim3+
ACTH+
¿otros linajes?
(GH, etc.)
k
expresión de Pit1
niveles de expresión relativos
reactivo - DAPT BIO IWP2
LCA + SAG
1 2 3 4
l
células GH+
células GH+/células no neurales (%)
reactivo - BIO BIO
F e Ins
LCA + SAG
m
d33
DAPI
n
células PRL+
células PRL+/células no neurales (%)
reactivo - BIO BIO
E2 e Ins
LCA + SAG
o
d33
DAPI
p
células hormona+
células productoras de hormonas/células no neurales (%)
LH FSH TSH
q
d33
DAPI
r
d33
DAPI
s
d33
DAPI

Fig. 4

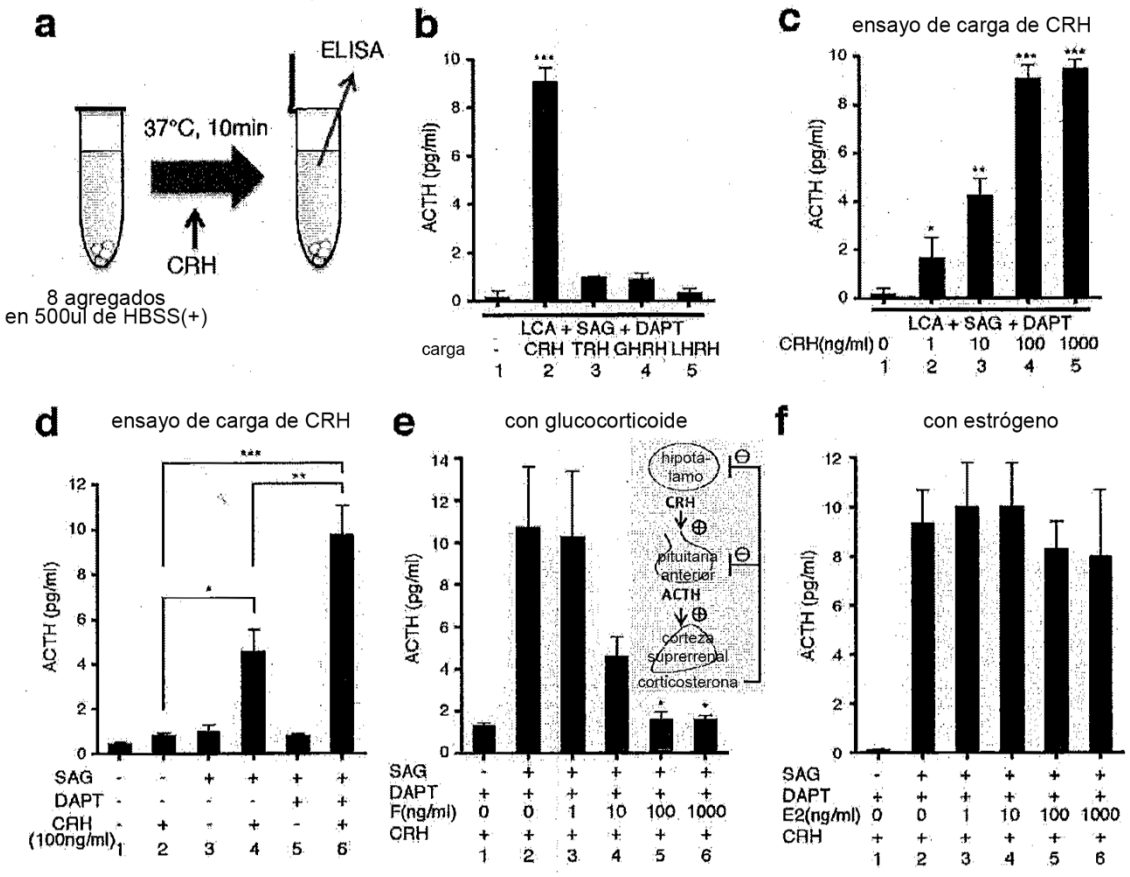

a
ELISA
37°C, 10min
CRH
8 agregados
en 500ul de HBSS(+)
b
ACTH (pg/ml)
LCA + SAG + DAPT
carga - CRH TRH GHRH LHRH
1 2 3 4 5
c
ensayo de carga de CRH
ACTH (pg/ml)
LCA + SAG + DAPT
CRH(ng/ml) 0 1 10 100 1000
1 2 3 4 5
d
ensayo de carga de CRH
ACTH (pg/ml)
SAG - - + + + +
DAPT - - - - + +
CRH (100ng/ml) - + - + - +
1 2 3 4 5 6
e
con glucocorticoide
ACTH (pg/ml)
hipotá-lamo
CRH
pituitaria anterior
ACTH
corteza suprerrenal
corticosterona
SAG - + + + + +
DAPT + + + + + +
F(ng/ml) 0 0 1 10 100 1000
CRH + + + + + +
1 2 3 4 5 6
f
con estrógeno
ACTH (pg/ml)
SAG - + + + + +
DAPT + + + + + +
E2(ng/ml) 0 0 1 10 100 1000
CRH + + + + + +
1 2 3 4 5 6

Fig. 5

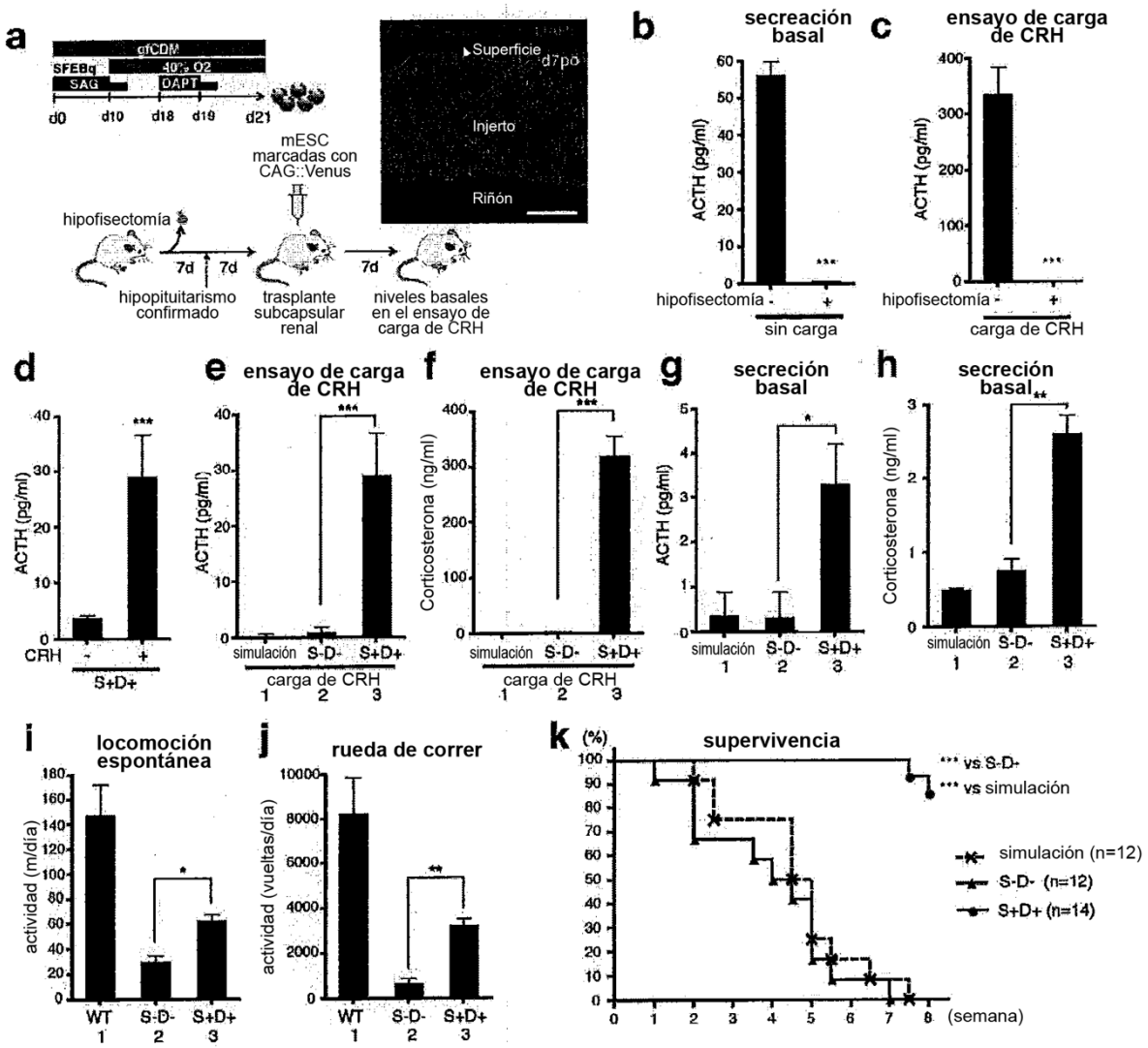

a
gfCDM
SFEBq
40% O2
SAG
DAPT
d0
d10
d18
d19
d21
mESC marcadas con CAG::Venus
hipofisectomía
7d
7d
7d
hipopituitarismo confirmado
trasplante subcapsular renal
niveles basales en el ensayo de carga de CRH
Superficie
d7po
Injerto
Riñón
b
secreación basal
ACTH (pg/ml)
hipofisectomía - +
sin carga
c
ensayo de carga de CRH
ACTH (pg/ml)
hipofisectomía - +
carga de CRH
d
ACTH (pg/ml)
CRH - +
S+D+
e
ensayo de carga de CRH
ACTH (pg/ml)
simulación S-D- S+D+
carga de CRH
1 2 3
f
ensayo de carga de CRH
Corticosterona (ng/ml)
simulación S-D- S+D+
carga de CRH
1 2 3
g
secreción basal
ACTH (pg/ml)
simulación S-D- S+D+
1 2 3
h
secreción basal
Corticosterona (ng/ml)
simulación S-D- S+D+
1 2 3
i
locomoción espontánea
actividad (m/día)
WT S-D- S+D+
1 2 3
j
rueda de correr
actividad (vueltas/día)
WT S-D- S+D+
1 2 3
k
supervivencia
(%)
*** vs S-D+
*** vs simulación
simulación (n=12)
S-D- (n=12)
S+D+ (n=14)
(semana)

Fig. 6

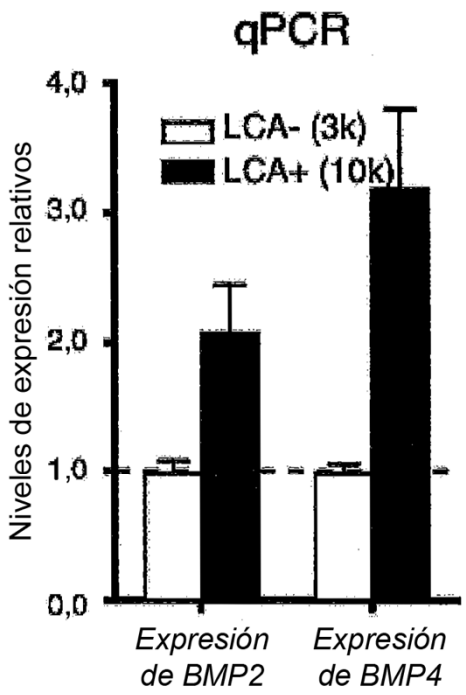

qPCR
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
LCA- (3k)
LCA+ (10k)
Niveles de expresión relativos
Expresión de BMP2
Expresión de BMP4

Fig. 7

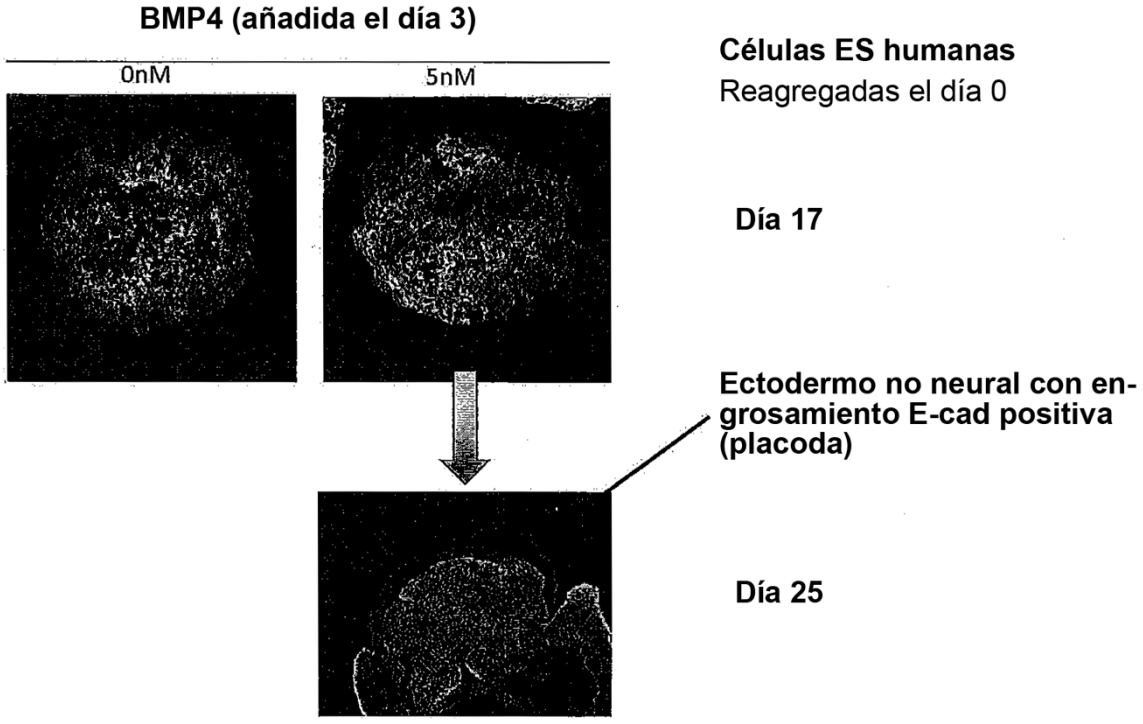
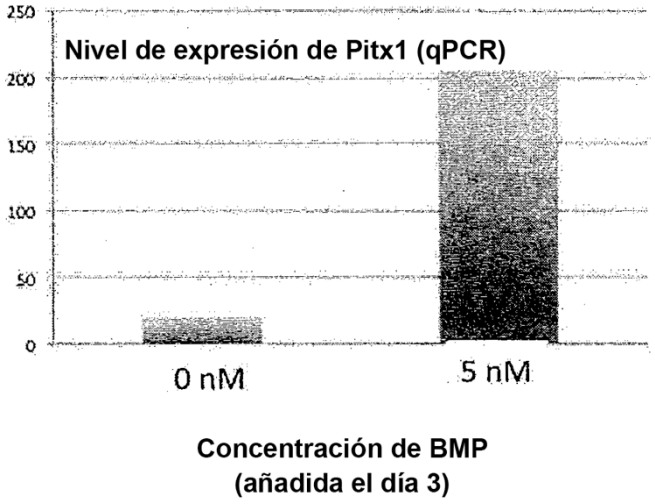

BMP4 (añadida el día 3)
0nM
5nM
Células ES humanas
Reagregadas el día 0
Día 17
Ectodermo no neural con engrosamiento E-cad positiva (placoda)
Día 25

Fig. 8


Nivel de expresión de Pitx1 (qPCR)
250
200
150
100
50
0
0 nM
5 nM
Concentración de BMP
(añadida el día 3)