

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 204**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2008 PCT/US2008/082356**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2010 WO10053472**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2008 E 08878030 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 2356213**

54 Título: **Composiciones de suspensión de agregados de células madre y métodos para su diferenciación**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.02.2020

73 Titular/es:

**VIACYTE, INC. (100.0%)
3550 General Atomics Court Building No 2-503
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**GREEN, CHAD;
YU, XIAOJIE;
BANG, ANNE;
BRANDON, EUGENE, P.;
KELLY, OLIVIA;
AGULNICK, ALAN;
BAETGE, ED;
D'AMOUR, KEVIN;
SCHULZ, THOMAS, C. y
ROBINS, ALLAN, J.**

74 Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

ES 2 743 204 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de suspensión de agregados de células madre y métodos para su diferenciación

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a composiciones de agregados de células en suspensión que están esencialmente exentas de suero y de células alimentadoras, y métodos para diferenciar las suspensiones de agregados de células.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 **[0002]** Hasta la fecha, no existe ningún sistema eficiente que permita un proceso de fabricación a gran escala (un "aumento de escala") para células eucariotas de mamíferos, en concreto, células pluripotentes de mamíferos, como células madre embrionarias humanas (hES, por sus siglas en inglés). Para mantener las células hES en un estado no diferenciado *in vitro*, las células hES normalmente se mantienen en alimentadores de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, por sus siglas en inglés) y se pasan por disociación mecánica manual (por ejemplo, microdissección) y transfiriendo colonias individuales. Estos métodos son suficientes para los estudios de
15 investigación que no necesitan una producción a gran escala de células hES no diferenciadas o células hES diferenciadas; el reconocimiento génico, el descubrimiento de fármacos, la toxicología *in vitro*, las aplicaciones clínicas futuras necesitan métodos mejorados para la expansión a gran escala de células hES, incluyendo pases enzimáticos.

- 20 **[0003]** Puede llevarse a cabo una expansión enzimática de células hES pero estos métodos presentan desventajas técnicas porque las células hES dependen de las interacciones célula-célula así como señales paracrinas y autocrinas para sobrevivir. Por consiguiente, las células hES prefieren este microambiente celular en comparación con existir como células individuales. Además, hay informes de que la disociación enzimática de células hES puede llevar a cariotipos anormales y resultar en cambios genéticos y epigenéticos. Por tanto, es esencial proporcionar un entorno de cultivo muy favorable que permita al mismo tiempo una expansión sólida a
25 gran escala (es decir, un proceso de fabricación) de células hES diferenciadas o no diferenciadas sin comprometer la pluripotencia, multipotencia o estabilidad genética a lo largo de periodos de cultivo extendidos.

- [0004]** Las células pluripotentes humanas ofrecen oportunidades únicas para investigar las fases iniciales del desarrollo humano, así como para la intervención terapéutica en varios estados patológicos, tales como la diabetes mellitus y la enfermedad de Parkinson. Por ejemplo, el uso de células β productoras de insulina derivadas de células madre embrionarias humanas (hESC, por sus siglas en inglés) ofrecería una gran mejora con respecto a los procedimientos de terapia celular actuales que utilizan células de páncreas de donantes. Actualmente, los tratamientos de terapia celular para diabetes mellitus, que utilizan células de páncreas de donantes, están limitados por la carencia de células de islote de alta calidad necesarias para el trasplante. La terapia celular para un único paciente con diabetes de tipo I requiere un trasplante de aproximadamente 8×10^8
30 células de islote pancreático (Shapiro et al., 2000, N Engl J Med 343:230-238; Shapiro et al., 2001a, Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 15:241-264; Shapiro et al., 2001, British Medical Journal 322:861). Como tal, se requieren al menos dos órganos de donante sano para obtener suficientes células de islote para un trasplante satisfactorio.

- 40 **[0005]** Las células madre embrionarias (ES, del inglés *embryonic stem*) representan por tanto un poderoso sistema modelo para la investigación de los mecanismos que subyacen a la biología y diferenciación de las células pluripotentes en el embrión temprano, así como para proporcionar oportunidades para la manipulación genética de mamíferos y las aplicaciones comerciales, médicas y agrícolas resultantes. Además, la proliferación y diferenciación apropiada de células madre embrionarias pueden usarse potencialmente para generar una fuente ilimitada de células adecuadas para el trasplante para el tratamiento de enfermedades que sean resultado
45 del daño o disfunción celular. Otras células pluripotentes y linajes celulares que incluyen células de tipo ectodermo primitivo temprano (EPL, por sus siglas en inglés), tal como se describen en la solicitud de patente internacional WO 99/53021, epiblasto/ICM obtenido *in vivo* o *in vitro*, ectodermo primitivo obtenido *in vivo* o *in vitro*, células germinales primordiales (células EG), células de teratocarcinoma (células EC), y células pluripotentes obtenidas por desdiferenciación o por transferencia nuclear, compartirán algunas o todas estas propiedades y aplicaciones. La solicitud de patente internacional WO 97/32033 y la patente de Estados Unidos n.º 5,453,357 describen células pluripotentes que incluyen células de especies que no son de roedores. Se han descrito células madre embrionarias humanas en la solicitud de patente internacional WO 00/27995 y en la patente de Estados Unidos n.º 6,200,806, y se han descrito células EG humanas en la solicitud de patente internacional WO 98/43679.

- 55 **[0006]** Los mecanismos bioquímicos que regulan la diferenciación y la pluripotencia de las células ES no se comprenden bien. No obstante, los datos empíricos limitados disponibles (y muchas pruebas anecdóticas)

sugieren que el mantenimiento continuado de células ES pluripotentes en condiciones de cultivo *in vitro* depende de la presencia de citoquinas y de factores de crecimiento presentes en el medio extracelular.

5 **[0007]** Mientras que las células madre embrionarias (ESC, por sus siglas en inglés) humanas ofrecen una fuente de material de partida a partir del cual desarrollar cantidades considerables de células diferenciadas de gran calidad para tratamientos celulares humanos, estas células deben obtenerse y/o cultivarse en condiciones que sean compatibles con las directrices normativas que se espera que rijan la eficacia y la seguridad clínica. Es posible que estas directrices requieran el uso de medios definidos químicamente. El desarrollo de tales condiciones estándar de prácticas correctas de fabricación/definidas químicamente es necesario para facilitar el uso de hESC y células derivadas de hESC para fines terapéuticos en humanos.

10 **[0008]** Además, la posible aplicación de tratamientos de reemplazo celular basadas en hESC requerirán el desarrollo de métodos que permitan un cultivo a gran escala y condiciones de diferenciación que sean compatibles con las directrices normativas. Aunque varios grupos han informado de condiciones de crecimiento simplificadas para las hESC, hay limitaciones considerables con estos estudios. No obstante, hasta la fecha, el aislamiento satisfactorio, el mantenimiento clónico a largo plazo, la manipulación genética y la transmisión de la línea germinal de células pluripotentes, por lo general, ha resultado difícil.

15 **[0009]** La mayoría de las condiciones de cultivo celular para células madre aún contienen reemplazo de suero (KSR) en el medio (Xu et al., 2005 Stem Cells, 23:315-323; Xu et al., 2005 Nature Methods, 2:185-189; Beattie et al., 2005 Stem Cells, 23:489-495; Amit et al., 2004 Biol. Reprod., 70:837-845; James et al., 2005 Development, 132:1279-1282). El KSR contiene una fracción en bruto de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) en lugar de una fuente altamente purificada. Otros solo han llevado a cabo estudios a corto plazo, y por tanto no está claro si sus condiciones permitirían el mantenimiento de la pluripotencia durante largos periodos de tiempo (Sato et al., (2004) Nature Med., 10:55-63; publicaciones de patentes estadounidenses n.º 2006/0030042 y 2005/0233446). Otros han mostrado un mantenimiento a largo plazo de la pluripotencia en un medio químicamente definido con FGF2, activina A e insulina, pero las células se cultivaron en placas que estaban recubiertas con suero humano, que se "lavó" antes de sembrar las células (Vallier et al., 2005 J Cell Sci., 118(Pt 19):4495-509). Aunque el FGF2 ha sido un componente de todos estos medios, no está claro si es absolutamente necesario; especialmente dado que en algunas formulaciones es necesario utilizarlo a una concentración alta (hasta 100 ng/ml, Xu et al., 2005 Nature Methods, 2:185-189).

20 **[0010]** Asimismo, todos estos grupos o bien han incluido insulina en su medio en niveles de µg/ml, o bien presentan insulina debido al uso de KRS. Se suele considerar que la insulina funciona en el metabolismo de la glucosa y en la señalización de la "supervivencia celular" mediante una unión al receptor de insulina. No obstante, a niveles superiores a las concentraciones fisiológicas, la insulina también puede unirse al receptor de IGF1 con una eficiencia menor y conferir una actividad del factor de crecimiento clásica mediante la vía PI3 quinasa/AKT. La presencia/necesidad de dichos altos niveles de insulina (niveles de µg/ml) en el KSR o estas otras condiciones de medios sugiere que la actividad principal se provoca mediante la unión al receptor IGF1, que se expresa mediante hESC (Sperger et al., 2003 PNAS, 100(23):13350-13355). Otros han observado la expresión de un complemento total del IGF1R y de elementos de la vía de señalización intracelular en hESC, lo que probablemente indica la actividad funcional de esta vía (Miura et al., 2004 Aging Cell, 3:333-343). La insulina o IGF1 puede provocar una señal importante requerida para la autorrenovación de las hESC, tal como sugiere el hecho de que todas las condiciones desarrolladas hasta la fecha para el cultivo de hESC contienen o bien insulina, o insulina proporcionada por KSR, o bien IGF1 proporcionado por suero. A favor de este concepto, se ha mostrado que la PI3 quinasa se inhibe en cultivos de hESC, las células se diferencian (D'Amour et al., 2005 Nat. Biotechnol., 23(12):1534-41; McLean et al., 2007 Stem Cells 25:29-38).

30 **[0011]** Una publicación reciente resume un medio definido humanizado para hESC (Ludwig et al., Nature Biotechnology, publicado en línea el 1 de enero de 2006, doi:10.1038/nbt1177). No obstante, esta formulación reciente incluye varios factores que se sugiere que influyen en la proliferación de hESC, incluyendo FGF2, TGFβ, LiCl, ácido γ-aminobutírico, y ácido pipercolico. Cabe destacar que este medio de cultivo celular recientemente definido también contiene insulina.

35 **[0012]** La familia de factores de crecimiento del EGF tiene al menos 14 miembros, incluyendo, pero sin carácter limitativo, EGF, TGFβ, EGF de unión a heparina (hb-EGF), neuregulina-β (también llamada heregulina-β (HGR-β), factor de crecimiento glial y otros), HRG-α, anfiregulina, betacelulina, y epiregulina. Todos estos factores de crecimiento contienen un dominio de EGF y se suelen expresar primero como proteínas transmembrana que son procesadas por proteínas metaloproteinasas (en concreto, ADAM) para generar factores de crecimiento de ectodominio soluble. Los miembros de la familia del EGF interactúan con homo o heterodímeros de los receptores de superficie celular ErbB1, 2, 3 y 4 con distintas afinidades (Jones et al., FEBS Lett, 1999, 447:227-231). El EGF, TGFα y hbEGF se unen a los homodímeros de ErbB1/1 (EGFR) y a los heterodímeros de ErbB1/2 con una elevada afinidad (intervalo de 1-100 nM), mientras que la HRG-β se une al ErbB3 y al ErbB4 con una afinidad muy alta (intervalo de <1 nM). Los receptores de ErbB activados señalizan mediante la vía de PI3 quinasa/AKT y también la vía MAPK. El ErbB2 y ErbB3 están entre los receptores de factores de crecimiento más altamente expresados en hESC (Sperger et al., 2003 PNAS, 100(23):13350-13355) y se ha mostrado previamente que la HRG-β soporta la expansión de células germinales primordiales de ratón (Toyoda-Ohno et

al., 1999 Dev. Biol., 215(2):399-406). Asimismo, la sobreexpresión, y la posterior activación inadecuada del ErbB2 se asocia con la tumorigénesis (Neve et al., 2001 Ann. Oncol., 12 Suppl 1:S9-13; Zhou & Hung, 2003 Semin. Oncol., 30(5 Suppl 16):38-48; Yarden, 2001 Oncology, 61 Suppl 2:1-13). El ErbB2 (cromosoma 17q), y el ErbB3 (cromosoma 12q) humanos están presentes en cromosomas que se ha observado que se acumulan como trisomías en algunas hESC (Draper et al., 2004 Nat. Biotechnol., 22(1):53-4; Cowan et al., 2004 N Engl. J. Med., 350(13):1353-6; Brimble et al., 2004 Stem Cells Dev., 13(6):585-97; Maitra et al., 2005 Nat. Genet. 37(10):1099-103; Mitalipova et al., 2005 Nat. Biotechnol. 23(1): 19-20; Draper et al., 2004 Stem Cells Dev., 13(4):325-36; Ludwig et al., Nature Biotechnology, publicado en línea el 1 de enero de 2006, doi:10.1038/nbt1177).

[0013] El ErbB2 y el ErbB3 (Brown et al., 2004 Biol. Reprod., 71:2003-2011; Salas-Vidal & Lomeli, 2004, Dev Biol., 265:75-89) están expresados en el blastocisto del ratón, aunque no está restringido específicamente al embrioblasto (ICM, del inglés *inner cell mass*), y el ErbB1, EGF y TGF β están expresados en el blastocisto humano (Chia et al., 1995 Development, 1221(2):299-307). El HB-EGF tiene efectos de proliferación en los cultivos de blastocistos para la FIV humana (Martin et al., 1998 Hum. Reprod., 13(6):1645-52; Sargent et al., 1998 Hum. Reprod. 13 Suppl 4:239-48), y efectos adicionales modestos en el crecimiento de células madre embrionarias de ratón en suero al 15 % (Heo et al., 2005, Am. J. Phy. Cell Physiol., en prensa). El desarrollo temprano posterior y previo a la implantación no parece verse afectado en embriones negativos en ErbB2 $^{-/-}$, ErbB3 $^{-/-}$, Neuregulina1 $^{-/-}$ (Britsch et al., 1998 Genes Dev., 12:1825-36), ADAM17 $^{-/-}$ (Peschon, et al., 1998 Science, 282: 1281-1284) y ADAM19 $^{-/-}$ (Horiuchi, 2005 Dev. Biol., 283(2):459-71). Por consiguiente, la importancia de la señalización mediante la familia de receptores de ErbB en hESC es, hasta ahora, confusa.

[0014] La neuregulina-1 (NRG1) es un gran gen que exhibe múltiples variantes de procesamiento de proteínas y de cortes y empalmes. Esto genera un gran número de isoformas, a las que se les hace referencia en el presente documento de manera colectiva como neuregulina. La neuregulina está expresada de manera predominante como una proteína transmembrana de superficie celular. La zona extracelular contiene un dominio análogo al de la inmunoglobulina, una zona modificada de carbohidratos, y el dominio de EGF. Se han analizado previamente las isoformas de expresión de NRG1 (Falls, 2003 Exp. 1993; 24(284):14-30). Se ha mostrado que las metaloproteasas de la membrana celular ADAM17 y ADAM19 procesan la(s) forma(s) transmembrana de la neuregulina-1 en neuregulina/herregulina soluble. La HRG- α y - β son los ectodominios escindidos de neuregulina, que contienen el EGF y otros dominios. Como el dominio de EGF es responsable de la unión y activación de los receptores ErbB, una molécula recombinante que contenga solo este dominio puede exhibir esencialmente todos los efectos del factor de crecimiento soluble de esta proteína (Jones et al., 1999 FEBS Lett., 447:227-231). Además, existen isoformas transmembranas procesadas de neuregulina que se cree que desencadenan una señalización yuxtacrina en células adyacentes mediante la interacción del dominio de EGF con receptores ErbB.

[0015] Aun así, un desarrollo importante en la progresión de la investigación de hESC hacia el mantenimiento de la pluripotencia en los cultivos será la elucidación de las condiciones de cultivo celular y los medios que son compatibles con las directrices normativas previstas que regulan la seguridad clínica y la eficacia. Aunque el mejor resultado sería la disponibilidad de medios definidos químicamente para hESC, los componentes que no están definidos químicamente serían aceptables si se produjeran según el estándar de prácticas correctas de fabricación. Existe una necesidad, por lo tanto, de identificar métodos y composiciones para el cultivo y estabilización de una población de células madre pluripotentes que puedan utilizarse para fines terapéuticos; donde las composiciones de cultivo estén definidas y/o producidas según el estándar de prácticas correctas de fabricación.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0016] La exposición se refiere a composiciones que comprenden una solución de nutrientes salina basal y un ligando ErbB3, con las composiciones estando esencialmente libres de suero.

[0017] Esta exposición también se refiere a composiciones que comprenden una solución de nutrientes salina basal y un medio para estimular la actividad de tirosina quinasa dirigida por ErbB2 en células diferenciables.

[0018] La invención se refiere a un método para generar agregados celulares derivados de células pluripotentes humanas en suspensión a partir de una suspensión de células individuales de células pluripotentes, tal como se define en la reivindicación 1. Las características preferidas y opcionales del método se exponen en las reivindicaciones dependientes. También se exponen métodos para cultivar células diferenciables, con los métodos comprendiendo sembrar las células diferenciables en una superficie de cultivo celular, proporcionar una solución nutritiva salina basal a las células diferenciables y proporcionar un ligando que se una específicamente a ErbB3.

[0019] De manera alternativa, los métodos dados a conocer pueden comprender sembrar las células diferenciables en una superficie de cultivo celular y suministrar una solución nutritiva salina basal a las células diferenciables y un medio para estimular la actividad de tirosina quinasa dirigida por ErbB2 en las células diferenciables.

[0020] Los métodos dados a conocer para cultivar células diferenciables pueden comprender proporcionar una solución de digestión a una capa de células diferenciables que estén contenidas en una cámara de cultivo antes de la digestión, donde la digestión rompe la capa de células en células individuales. Tras la digestión, las células individuales se colocan en una nueva cámara de cultivo tisular con una solución de cultivo de células diferenciables, donde la solución de cultivo de células diferenciables comprende una solución nutritiva salina basal y un ligando ErbB3. Una vez cultivadas, las células diferenciables individuales se sitúan en condiciones que permiten el crecimiento y la división de células individuales.

[0021] También se dan a conocer métodos para generar un agregado de células hES en suspensión a partir de un cultivo adherente de hES pluripotentes, al cultivar células hES en una condición de cultivo de crecimiento adherente que permite la expansión en un estado no diferenciado; disociar el cultivo de células hES adherente en un cultivo de suspensión de células individuales; poner en contacto el cultivo en suspensión de células individuales con una primera condición de cultivo de diferenciación que permite la formación de agregados de células derivadas de hES en suspensión al agitar el cultivo en suspensión de células individuales hasta un periodo de tiempo tal en el que el cultivo en suspensión de células individuales forme un agregado de células derivadas de hES en suspensión, y por tanto generar un agregado de células derivadas de hES en suspensión. En modos de realización preferidos, la agitación del cultivo en suspensión de células individuales se lleva a cabo por rotación a aproximadamente de 80 rpm a 160 rpm.

[0022] Los métodos para generar un agregado de células derivadas de hES en suspensión a partir de una suspensión de células individuales derivadas de hES pueden comprender cultivar una célula hES en una condición de cultivo de crecimiento adherente que permite la expansión en un estado no diferenciado; poner en contacto la célula hES no diferenciada con una primera condición de cultivo de diferenciación adecuada para diferenciar la célula hES y que da como resultado una célula derivada de hES adherente; disociar la célula derivada de hES adherente en un cultivo de suspensión de células individuales; poner en contacto el cultivo de suspensión de células individuales con una segunda condición de cultivo de diferenciación que permite la formación de agregados de células derivadas de hES en suspensión al agitar el cultivo en suspensión de células individuales hasta un periodo de tiempo tal en el que el cultivo en suspensión de células individuales forme un agregado de células derivadas de hES en suspensión, y por tanto, generar un agregado de células derivadas de hES en suspensión. En modos de realización preferidos, la agitación del cultivo en suspensión de células individuales se lleva a cabo por rotación a aproximadamente de 80 rpm a 160 rpm.

[0023] También se dan a conocer métodos para enriquecer o variar la composición del cultivo celular resultante y/o la población de una suspensión de agregados de células derivadas de hES al optimizar la densidad celular de los cultivos de células pluripotentes o al variar la concentración de varios factores de crecimiento, por ejemplo, FGF10, EGF, KGF, nogina y ácido retinoico, inhibidores apoptóticos, inhibidores de Rho-quinasa, y similares.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0024]

La FIGURA 1 representa un análisis de la expresión por RT-PCR a tiempo real de ADAM19, Neuregulina1 y ErbB1-3 en BGOlv cultivados en condiciones definidas (8 ng/ml de FGF2, 100 ng/ml de LR-IGF1, 1 ng/ml de Activina A). Se indican las reacciones de control de GAPDH y OTC4.

La FIGURA 2 representa la inhibición de la proliferación de células BGOlv utilizando AG879. Las células BGOlv se colocaron en bandejas de 6 pocillos y se expusieron a dimetilsulfóxido (DMSO) (A), 50 nM-20 µM de AG1478 (B), o 100 mM-20 µM de AG879 (C) 24 horas después de su colocación. Después de 5 días en el cultivo, los cultivos se fijaron y se tiñeron para observar su actividad de fosfatasa alcalina. El AG1478 no parecía afectar a la proliferación a estas concentraciones (20 µM, mostrado en B), pero el AG879 ralentizó sustancialmente el crecimiento celular a 5 µM (C).

La FIGURA 3 representa la morfología de células BGOlv cultivadas en DC-HAIF, que es un medio de cultivo definido que contiene 10 ng/ml de HRG-β, 10 ng/ml de Activina A, 200 ng/ml de LR-IGF1 y 8 ng/ml de FGF2 (A y B), y en un medio de cultivo definido (DC) que contiene 10 ng/ml de HRG-β, 10 ng/ml de Activina A, y 200 ng/ml de LR-IGF1 (C y D).

La FIGURA 4 representa la expresión de ADAM19 y Neuregulina1, y ErbB1-4 por RT-PCR en células madre embrionarias de ratón (A) y MEF (B).

La FIGURA 5 representa la inhibición de la señalización de ErbB1 y ErbB2-4 en células madre embrionarias de ratón. Se colocaron 2×10^5 células madre embrionarias de ratón R1 sobre MATRIGEL™ a 1:1000 en FBS al 10%, KSR al 10% con 1000 U/ml de LIF de ratón (ESGRO). Al día siguiente, se añadió DMSO (control de portador), 1-50 µM de AG1478, o 1-50 µM de AG879 con medio nuevo. Los cultivos se fijaron en el día 8, y se tiñeron para observar su actividad de fosfatasa alcalina. El DMSO (A) y los 1-50 µM de AG1478 (B y C) no inhibieron claramente la proliferación. El AG879 inhibió sustancialmente el crecimiento celular a 50 µM (comparando D y F) y puede haber ralentizado la proliferación a 20 µM (E).

La FIGURA 6 representa la inhibición de la proliferación de células BG02 cultivadas en medio condicionado (CM). (A) 50 μM de AG825 inhibieron la proliferación de células hESC BG02 creciendo en CM. (B) El AG825 inhibe la fosforilación de ErbB2 Y1248 en células hES. (C) Conteo de colonias de pases en serie de células hES CyT49 en distintas combinaciones de factores de crecimiento. (D) Análisis del conteo de colonias de la función de IGF1 y HRG en la proliferación de células hES utilizando células BG02 (izquierda). (E) La inmunotinción de OCT4/DAPI de un experimento repetido por duplicado demostró que el IGF1 y la HRG aumentaron de manera significativa la proporción de células OCT4⁺ en comparación con las condiciones de ActA/FGF2. (F) Análisis por transferencia RTK de células hES DC-HAIF BG01 desprovistas de factores de crecimiento durante toda la noche; se dejaron sin alimento, luego se pulsaron con DC-HAIF durante 15 minutos; o se muestran cultivos en estado estable (izquierda). En una gráfica se representa la media y el intervalo de intensidad relativa normalizada (derecha).

La FIGURA 7 representa células madre embrionarias de ratón cultivadas en condiciones definidas con distintas combinaciones de factores de crecimiento. (A) muestra el puntaje de las colonias AP⁺ después de que se cultivaran 2×10^5 células en distintas combinaciones de factores de crecimiento durante 8 días. (B-G) muestran imágenes con un aumento de 4x de colonias AP⁺ cultivadas en distintas combinaciones de factores de crecimiento.

La FIGURA 8 representa la caracterización de células ES humanas que se mantienen en medio DC-HAIF. (A) El análisis de teratomas de células p25 DC-HAIF BG02 mostró un potencial de diferenciación pluripotente en ectodermo, mesodermo y endodermo. (B) Inmunotinción de células BG02 cultivadas en FCS al 15 %/KSR al 5 % que se han diferenciado. (C) Diagrama de Venn de la distribución de las transcripciones detectadas utilizando Beadchips Sentrix Human-6 Expression de Illumina que contienen 47 296 sondas de transcripción en células BG02 mantenidas en CM (64 pases) o DC-HAIF (10 o 32 pases en un medio definido). (D) Análisis de un diagrama de dispersión que muestra que el perfil de transcripción de las células p32 DC-HAIF BG02 es muy similar al de las células BG02 mantenidas en CM (arriba), y no se había alterado sustancialmente en cultivos de pases tempranos y tardíos en DC-HAIF (abajo). (E) Dendrograma del agrupamiento jerárquico de la expresión de genes relativos en distintas poblaciones generado utilizando el software *Beadstudio*.

La FIGURA 9 representa la morfología de células cultivadas en matrices extracelulares humanizadas (ECM, por sus siglas en inglés), en presencia de medio DC-HAIF. (A) células CyT49 (diluidas a 1:200) en crecimiento sobre MATRIGELTM con factor de crecimiento reducido (diluido a 1:200). Las células CyT49 también podrían crecer en placas de cultivo tisular recubiertas con (B) suero humano entero, (C) fibronectina humana, y (D) VITROGROTM.

La FIGURA 10 representa el pase de células individuales de células madre embrionarias humanas. (A-D) Imágenes por etapas de células BG02 tras pasarlas con ACCUTASETM y colocar aproximadamente 5×10^5 células en una placa de cultivo de 60 mm (A) 1,5 horas después del sembrado inicial, mostrando las células viables adhiriéndose a la placa. (B) 20 horas tras el sembrado, la gran mayoría de las células se han agregado para formar pequeñas colonias. Estas colonias se expanden por proliferación en el día 4, tras el sembrado (C), y en el transcurso de 5-6 días forman una monocapa similar a la epitelial que cubre la placa entera (D). (E) Cariotipo masculino normal mostrado en un cultivo BG02 pasado 19 veces con ACCUTASETM en DC-HAIF.

La FIGURA 11 representa la morfología celular después de un pase de células individuales de células madre embrionarias humanas utilizando (A) ACCUTASETM, (B) Tripsina/EDTA al 0,25 %, (C) TrypLE, o (D) Versene.

La FIGURA 12 representa el crecimiento a gran escala de células madre embrionarias humanas cultivadas en DC-HAIF. (A) Análisis por citometría de flujo de células BG02 tras su expansión hasta $>10^{10}$ células. $>85\%$ de células expresaron OCT4, CD9, SSEA-4, TRA-1-81. (B) Análisis por RT-PCR de la expresión de los marcadores de pluripotencia OCT4, NANOG, REX1, SOX2, UTF1, CRIPTO, FOXD3, TERT y DPPA5. No se detectaron marcadores de linajes diferenciados, α -fetoproteína (AFP), MSX1 y HAND1. (C) La hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés) que utiliza repeticiones específicas de cromosomas humanos mostró un mantenimiento del número de copias normales para los cromosomas humanos (hChr) 12, 17, X e Y.

La FIGURA 13 representa la morfología (A) y el cariotipo normal (B) de células BG02 hESC cultivadas en un medio definido que comprende HRG- β e IGF1, pero en ausencia de FGF2 durante 7 pases, o >2 meses.

La FIGURA 14 representa un análisis de un diagrama de dispersión de transcripciones de hESC (BG02) que se mantienen en DC-HAIF (32 pases) o DC-HAI (10 pases). Una gran proporción de las transcripciones expresadas se detectaron en ambas muestras, y la transcripción no se alteró sustancialmente al cultivar hESC en ausencia de FGF2 exógeno. Los coeficientes de correlación (R^2) se generaron utilizando todas las transcripciones detectadas con un nivel de expresión de >0 (todos los puntos), o con transcripciones que exhiben un nivel de confianza de detección de >0.99 (selección de R^2 , puntos indicados por el óvalo discontinuo). Las líneas angulares delimitan la media y los límites de una diferencia del doble.

La FIGURA 15 representa un dendrograma del agrupamiento jerárquico de la expresión de genes relativa en distintas poblaciones de células BG02 de pases tempranos y tardíos mantenidas en DC-HAIF. Las células se agruparon firmemente ($\sim 0,0075$) y conservaron una gran similitud a las células BG02 y BG03 mantenidas en un medio condicionado (CM) ($\sim 0,037$). Las células BG02 mantenidas en DC-HAI también se agruparon firmemente con las otras poblaciones de hESC examinadas. A modo de explicación, en la FIGURA 15, CM es medio condicionado, DC es medio de cultivo definido, DC-HAIF es tal como se ha definido anteriormente, ap es un pase de células individuales en ACCUTASE™; DC-HAI es idéntico a DC-HAIF tal como se define en el presente documento, pero sin FGF2.

La FIGURA 16 representa la morfología y tinción de fosfatasa alcalina de células BG02 cultivadas en DC-HAIF en placas de 96 y 384 pocillos. (A) Imágenes de contraste de fase y (B) tinción de fosfatasa alcalina de células BG02 (10^4 células/pocillo) cultivadas en un pocillo de una placa de 96 pocillos. (C) Imágenes de contraste de fase y (D) tinción de fosfatasa alcalina de células BG02 (10^3 células/pocillo) cultivadas en un pocillo de una placa de 384 pocillos.

La FIGURA 17 representa imágenes de campo oscuro de BG02 cultivadas en DC-HAIF en un cultivo en suspensión. Se muestran los cultivos en el día 2 y 6. Las imágenes se tomaron utilizando un aumento de 4x.

La FIGURA 18 representa los índices de crecimiento en cultivos adherentes y en suspensión en DC-HAIF. Se colocaron 1×10^6 células BG02 en pocillos paralelos en cultivos en suspensión y adherentes y se llevaron a cabo recuentos de células en los días 1-6.

La FIGURA 19 representa un análisis por qPCR de la suspensión y las hESC adherentes. Las células BG02 creciendo en suspensión (S. hESC) y el cultivo adherente (hESC) exhibieron niveles comparables de OCT4, y carecían de expresión de SOX17. Las células adherentes diferenciadas en endodermo definitivo (DE) y las células hESC en suspensión diferenciadas en endodermo definitivo en suspensión (S. DE d3) exhibieron la disminución acentuada esperada de OCT4 y el aumento esperado de la expresión de SOX17.

La FIGURA 20 representa el incremento de la agregación de hESC en presencia de Y27632 en el cultivo en suspensión. Se sembraron 2×10^6 células BG02 en 3 ml de DC-HAIF o DC-HAIF + Y27632, en bandejas de 6 pocillos, en una incubadora sobre una plataforma giratoria a 100 rpm. Las imágenes de los agregados se tomaron en los días 1 y 3.

La FIGURA 21 representa un análisis por RT-PCR de agregados en suspensión en presencia de Y27632. Se llevó a cabo una RT-PCR en los cultivos expandidos para evaluar la expresión de los marcadores de pluripotencia. Se detectó la expresión de OCT4, NANOG, REX1, SOX2, UTF1, CRIPTO, FOXD3, TERT y DPPA5, mientras que no se detectaron marcadores de los linajes diferenciados AFP, MSX1 y HAND1.

Las FIGURAS 22 A-N son gráficos de barras que muestran los patrones de expresión de los genes marcadores OCT4 (panel A), BRACH (panel B), SOX17 (panel C), FOXA2 o HNF3beta (panel D), HNF1beta (panel E), PDX 1 (panel F), NKX6.1 (panel G), NKX2.2 (panel H), INS (panel I), GCG (panel J), SST (panel K), SOX7 (panel L), ZIC1 (panel M), AFP (panel N), HNF4A (panel O) y PTF1A (panel P), que no es una lista exhaustiva, sino marcadores que pueden utilizarse para identificar células madre embrionarias humanas (células hES) pluripotentes (etapa 0, d0), células del endodermo definitivo (etapa 1; d2), células del endodermo del intestino anterior negativas en PDX1 (etapa 2; d5), células del endodermo del intestino anterior positivas en PDX1 (etapa 3, d8), células del endodermo pancreático (etapa 4; d11), células precursoras endocrinas pancreáticas y/o secretoras de hormonas (etapa 5; d15).

La FIGURA 23 es un gráfico que muestra el intervalo de los diámetros de los agregados celulares en suspensión (micras) en relación con el volumen total (ml) de medio en el cultivo.

Las FIGURAS 24 A-D son gráficos de barras que muestran patrones de expresión de los genes marcadores PDX1 (panel A), NKX6.1 (panel B), NGN3 (panel C) y NKX2.2 (panel D) en células derivadas de hES en relación con la densidad celular de los cultivos de células hES a partir de los que se derivan.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0025] A diferencia de los métodos conocidos anteriormente de ingeniería de tejidos, que se basan en sembrar células individuales en soportes poliméricos, matrices y/o geles, los métodos descritos en el presente documento utilizan suspensiones de agregados de células formadas a partir de suspensiones de células madre individuales embrionarias humanas pluripotentes o suspensiones de células individuales derivadas de hES (diferenciadas) como bloques de construcción de formación de tejidos. Los agregados de células normalmente están conformados de cientos de miles de células individuales, conectadas mediante adhesiones de unión y una matriz extracelular que contribuyen colectivamente al producto final diferenciado. A este respecto, los agregados celulares pueden definirse como un tipo de tejido que proporciona un número de ventajas de rendimiento en relación con tejidos modificados más tradicionales.

[0026] En el presente documento, se describen métodos para producir suspensiones de agregados de células hES a partir de una suspensión de células individuales de cultivos de células madre pluripotentes o a partir de cultivos de células derivadas de hES. La célula madre pluripotente puede cultivarse inicialmente sobre alimentadores de fibroblastos, o puede estar exentas de células alimentadoras. Se describieron métodos para aislar hESC y cultivarlas en células alimentadoras humanas en la patente estadounidense n.º 7,432,104, titulada *Methods for the culture of human embryonic stem cells on human feeder cells*. Los cultivos en suspensión de agregados de células madres embrionarias pluripotentes hechos directamente o iniciados a partir de hESC cultivadas sobre células alimentadoras evitan la necesidad de hacer monocapas de hESC, por ejemplo, como en los cultivos adherentes. Estos métodos se describen con más detalle en los Ejemplos 17 y 18.

[0027] En la presente memoria, se describen métodos para producir suspensiones de agregados de células directamente en un medio de diferenciación, por ejemplo, un medio de diferenciación un agente, preferiblemente un miembro de la familia del TGF β , que sea capaz de activar una familia de TGF β del receptor. Dichos agentes incluyen, pero sin carácter limitativo, Activina A, Activina B, GDF-8, GDF-11 y Nodal. Los métodos para producir una suspensión de agregados de células en un medio de diferenciación se distinguen de otros métodos, que también se describen en la presente memoria, que proporcionan una producción de cultivos en suspensión de agregados de células en un medio de células madre pluripotentes, por ejemplo, StemPro.

[0028] En el presente documento se describen métodos para producir suspensiones de agregados de células formadas a partir de cultivos de células hES diferenciadas (a las que también se les hace referencia como "cultivos de células derivadas de células hES" o "célula(s) derivada(s) de células hES"), por ejemplo, células de las etapas 1, 2, 3, 4, y 5 tal como se describe en d'Amour 2005 and 2006, *supra*. Por consiguiente, los métodos para hacer los agregados de células descritos en la presente memoria no están limitados a ninguna etapa multipotente o pluripotente de una célula hES o derivada de hES, sino que el modo de empleo y la necesidad de la optimización del tipo de célula dictarán qué métodos se prefieren. Estos métodos se describen con más detalle en los Ejemplos 19-22.

[0029] En la presente memoria, se describen métodos para controlar la composición celular resultante, por ejemplo, controlar el porcentaje de células del endodermo pancreático, de células endocrinas pancreáticas, y/o de células endodérmicas con PDX-1, variando la concentración de distintos factores de crecimiento. Estos métodos se describen con más detalle en el Ejemplo 21.

[0030] A menos que se indique de otra manera, los términos empleados en el presente documento deben entenderse según el uso convencional por los expertos en la materia pertinente. Además de las definiciones de términos proporcionadas a continuación, también pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología molecular en Rieger et al., 1991 *Glossary of genetics: classical and molecular*, 5ª Ed., Berlín: Springer-Verlag; y en *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., Eds., Current Protocols, un proyecto común entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley e Hijos, Inc., (Suplemento 1998). Debe entenderse que, como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, "un", "una" o "uno" puede significar uno o más, dependiendo del contexto en que se utilice. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula" puede significar que se puede utilizar al menos una célula.

[0031] Asimismo, a efectos de esta memoria y de las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, porcentajes o proporciones de materiales, condiciones de reacción, y otros valores numéricos utilizados en la memoria y reivindicaciones, deben entenderse como que se modifican en todos los ejemplos por el término "aproximadamente". En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente memoria y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretendan obtener mediante los métodos de la presente invención. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe al menos interpretarse en el contexto del número de dígitos significativos presentados y aplicando técnicas de redondeo ordinarias.

[0032] En la presente memoria se describen métodos para la producción de agregados de células derivadas de hES a partir de suspensiones de células individuales derivadas de hES. Debido a que varios factores mecánicos y no fisiológicos efectúan el movimiento y la agregación de las células en el cultivo, el microentorno mecánico fluido que se correlaciona con un rendimiento y viabilidad de agregados de célula óptimos, así como para proporcionar una variable normalizadora que pueda utilizarse para un aumento de escala, era necesario caracterizar el movimiento de las células en crecimiento o que están diferenciándose en varios recipientes de cultivo, placas, biorreactores y similares, y los efectos, en caso de que hubiese alguno, de varias condiciones de medio en las células. Algunos de estos factores incluyen, pero sin carácter limitativo, una velocidad de cizallamiento y una tensión de cizallamiento, la densidad celular y la concentración de varios factores de crecimiento en cualquier medio celular.

[0033] La velocidad y la tensión de cizallamiento son características mecánicas que definen el cizallamiento del fluido en un sistema. La velocidad de cizallamiento se define como la velocidad del fluido a lo largo de una distancia determinada, y se expresa como s^{-1} . La velocidad de cizallamiento es proporcional a la tensión de cizallamiento, donde la velocidad de cizallamiento (γ) = tensión de cizallamiento (t)/viscosidad (μ). La tensión de

cizallamiento se define como la fuerza de cizallamiento del fluido actuando tangencialmente en la superficie de la célula, y se expresa como fuerza por unidad de área (dyn/cm^2 o N/m^2). La tensión de cizallamiento puede generarse por un líquido agitado pasando por células estáticas, células agitadas moviéndose a través de un líquido estático o por células moviéndose dentro de un entorno fluido dinámico agitado. La viscosidad de un fluido se suele medir en poises, donde $1 \text{ poise} = 1 \text{ dyn seg/cm}^2 = 100 \text{ centipoises (cP)}$. La viscosidad del agua, uno de los fluidos menos viscosos que se conocen, es de $0,01 \text{ cP}$. La viscosidad de una suspensión normal de células eucariotas en un medio es de $1,0$ y $1,1 \text{ cP}$ a una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. La densidad y la temperatura pueden afectar a la viscosidad de un fluido.

[0034] La velocidad del fluido también dicta si el flujo será laminar o turbulento. El flujo laminar ocurre cuando predominan las fuerzas viscosas y se caracteriza por líneas de corriente uniformes y lisas a bajas velocidades. Por el contrario, las fuerzas inerciales y las altas velocidades predominan durante un flujo turbulento, que se caracteriza por la aparición de remolinos, vórtices y fluctuaciones caóticas en el flujo a lo largo del espacio y del tiempo. Un valor adimensional conocido como el número de Reynolds (Re) se utiliza normalmente para cuantificar la presencia de un flujo laminar o turbulento. El número de Reynolds es la relación de fuerzas inerciales y viscosas y se cuantifica como $(\text{densidad} \cdot \text{velocidad} \cdot \text{escala de longitudes}) / (\text{viscosidad})$. El flujo laminar domina cuando $Re < 2300$, mientras que el flujo turbulento domina cuando $Re > 4000$. En función de esta relación con la velocidad del fluido, el número de Reynolds, y por tanto el grado al que un flujo de fluido es laminar o turbulento es directamente proporcional a la velocidad de cizallamiento y la tensión de cizallamiento experimentados por las células en suspensión. No obstante, las condiciones de alta tensión de cizallamiento pueden generarse en entornos de fluidos laminares y turbulentos. Inicialmente, existe una tendencia de que el líquido se resista al movimiento, con el fluido más cercano a una superficie sólida experimentando fuerzas atractivas que generan una capa límite o una zona sin flujo inmediatamente adyacente a la superficie. Esto crea un gradiente en la velocidad de fluido desde la superficie al centro del fluido de flujo. La inclinación del gradiente de velocidad es una función de la velocidad a la que el líquido se mueve y la distancia desde la capa límite a la zona con la mayor velocidad de flujo. Según acelera la velocidad del caudal a través o en torno a un recipiente, la velocidad del flujo supera a la viscosidad del líquido y el gradiente laminar uniforme se rompe produciendo un flujo turbulento. Thomas *et al.* mostraron que la lisis celular en condiciones turbulentas ocurre más frecuentemente en zonas con una tensión de cizallamiento alta y una capacidad de disipación de energía alta. Véase Thomas *et al.* (1994) *Cytotechnology* 15: 329-335. Estas zonas aparecen de manera aleatoria, pero normalmente se encuentran cerca de la capa límite donde el gradiente de velocidad está al máximo. Estas fluctuaciones aleatorias en la velocidad de fluido pueden generar zonas con una tensión de cizallamiento muy alta que en última instancia tienen un efecto negativo en el aumento de escala de los sistemas de fabricación basados en el cultivo celular. Por tanto, existe una necesidad de métodos que puedan mantener la densidad celular y la viabilidad en un sistema de aumento de escala de fabricación de cultivos de células de mamíferos al controlar las principales fuentes de fuerzas de cizallamiento en dichos sistemas.

[0035] Siguiendo los métodos proporcionados por Henzler (Henzler, 2000, "Particle stress in bioreactors", En: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Schepfer, T. Ed. Springer-Verlag, Berlín) y Colomer *et al.* (Colomer, J. *et al.* 2005. *Experimental analysis of coagulation of particles under low-shear flow*. *Water Res.* 39:2994), se calcularon las propiedades mecánicas fluidas del fluido a granel en una placa giratoria de 6 pocillos. La Tensión Adimensional es igual a la constante de turbulencia $\cdot (\text{diámetro del agregado/microescala de Kolmogórov})^{\text{exponente de turbulencia}}$. La Tensión de Cizallamiento es igual a la Tensión Adimensional $\cdot \text{densidad del fluido} \cdot (\text{viscosidad cinemática} \cdot \text{potencia de entrada})^{0,5}$. La Velocidad de Cizallamiento es igual a la Tensión de Cizallamiento/viscosidad cinemática. Para calcular la potencia de entrada y la microescala de Kolmogórov, se necesita el número de Reynolds en cada velocidad de rotación y es igual a la $(\text{velocidad de rotación} \cdot \text{diámetro del matraz})^2 / \text{viscosidad}$. Como la potencia de entrada y la microescala de Kolmogórov son funciones del número de Reynolds, todos los cálculos de la tensión de cizallamiento y de la velocidad de cizallamiento varían con la velocidad de rotación.

[0036] Asimismo, la tensión de cizallamiento y la velocidad de cizallamiento son funciones de la Tensión Adimensional, que depende del diámetro de los agregados en formación, por tanto la velocidad y la tensión de cizallamiento experimentadas por los agregados se espera que aumente con el tiempo en rotación. Los cálculos de ejemplo se muestran en el Ejemplo 17 para diámetros de agregados de entre $100\text{-}200 \mu\text{m}$ y velocidades de rotación de entre $60\text{-}140 \text{ rpm}$. Estos métodos se utilizaron para proporcionar una estimación del cizallamiento medio en el fluido a granel a lo largo del tiempo. No obstante, se espera que la tensión de cizallamiento en la pared del recipiente sea la más alta debido a los efectos de límite. Para estimar la tensión de cizallamiento en las paredes, Ley *et al.* propusieron que la tensión de cizallamiento en las paredes en una placa de 6 pocillos es igual al radio de giro $\cdot (\text{densidad} \cdot \text{viscosidad dinámica} \cdot (2 \cdot \pi \cdot \text{velocidad de rotación})^3)^{0,5}$. Utilizando este enfoque, la tensión de cizallamiento en las paredes se calculó para velocidades de rotación que varían entre 60 rpm y 140 rpm , y se muestra en el Ejemplo 18. Cabe destacar que, a diferencia de la tensión de cizallamiento promediada en cuanto al tiempo que es experimentada por los agregados en el fluido a granel, la tensión de cizallamiento que ocurre en las paredes es independiente del diámetro del agregado.

[0037] La densidad celular del cultivo también es un factor crítico para la función de los tejidos y es difícil de conseguir y/u optimizar en tejido tradicional, que es bidimensional (por ejemplo, constructos modificados

adherentes). El efecto de la densidad celular sobre la diferenciación se describe con más detalle en el Ejemplo 20. Los agregados de células pueden superar esta limitación asumiendo una arquitectura tridimensional (3D) organizada que refleje con más precisión una conformación y una densidad celular *in vivo*. Como resultado, el periodo de tiempo para que las células consigan la estructura prevista puede reducirse de manera significativa y/o hacerse más consistente y eficiente. Asimismo, las células en el formato de agregado 3D pueden diferenciarse y funcionar de una manera más óptima, dado que esta arquitectura se asemeja más a la fisiología normal que los cultivos adherentes. Además, las dificultades mecánicas implicadas en el proceso de fabricación son menos dañinas para los agregados de células que están flotando libremente en un cultivo en suspensión en comparación con las dificultades mecánicas, por ejemplo, en un cultivo adherente.

[0038] Los cultivos en suspensión a una escala de fabricación normal también utilizan una perfusión continua de medio como un método para mantener la viabilidad celular a la vez que maximiza la densidad celular. En este contexto, el intercambio de medio contribuye al cizallamiento fluido del cultivo que afecta a las células adherentes y a los agregados en suspensión de manera diferente. Las células adherentes inmóviles están sujetas a una tensión de cizallamiento de fluido dado que el medio fluye de manera tangencial por la superficie celular. Por el contrario, los agregados en suspensión experimentan significativamente menos tensión de cizallamiento por la superficie de los agregados, dado que los agregados son libres de volcarse en respuesta a la aplicación de una fuerza de cizallamiento. Se espera que una tensión de cizallamiento prolongada sea perjudicial para las células madre embrionarias adherentes y que el formato de agregado en suspensión se prefiera para una supervivencia y función celular óptimas. Por tanto, en función de una necesidad de un proceso de fabricación eficiente para la producción de células madre pluripotentes y/o células progenitoras multipotentes derivadas de células madre pluripotentes y en las mecánicas observadas en relación con la velocidad de cizallamiento y la tensión de cizallamiento, la presente invención proporciona por primera vez métodos de fabricación para la producción de células madre pluripotentes y/o células progenitoras multipotentes derivadas de células madre pluripotentes en formato de suspensión, en concreto, en formato de suspensión de agregado de células.

[0039] Tal como se utiliza en el presente documento, "suspensión de células individuales" o equivalentes del mismo se refiere a una suspensión de células individuales de células hES o a una suspensión de células individuales derivadas de hES por cualquier medio químico o mecánico. Existen varios métodos para disociar agrupamientos de células para formar suspensiones de células individuales a partir de tejidos primarios, células unidas en el cultivo, y agregados, por ejemplo, fuerzas físicas (disociación mecánica como con un raspador de células, trituración mediante una pipeta de diámetro reducido, aspiración con aguja fina, disgregación por vórtice y filtración forzada a través de una malla de acero inoxidable o nailon fino), enzimas (disociación enzimática como tripsina, colagenasa, Acutasa y similares), o una combinación de ambas. Además, las condiciones del medio de cultivo y los métodos capaces de soportar una disociación de células individuales de células hES son útiles para la expansión, la clasificación de células, y una siembra definida para ensayos en placas de múltiples pocillos y permitir la automatización de los procedimientos de cultivo y la expansión clonal. Por tanto, un modo de realización de la invención proporciona métodos para generar un sistema de cultivo de células derivadas de hES o de células hES de disociación enzimática de células individuales estables capaz de soportar un mantenimiento a largo plazo y una expansión eficiente de células hES pluripotentes no diferenciadas o de células hES no diferenciadas.

[0040] Como se usa en el presente documento, la expresión "poner en contacto" (es decir, poner en contacto una célula, por ejemplo, una célula diferenciable, con un compuesto) pretende incluir la incubación del compuesto y la célula juntos *in vitro* (por ejemplo, añadir el compuesto a células en cultivo). El término "poner en contacto" no pretende incluir la exposición de células *in vivo* a un medio de cultivo determinado que comprende un ligando ErbB3, y opcionalmente, un miembro de la familia TGF- β , que puede aparecer de manera natural en un sujeto (es decir, una exposición que puede aparecer como resultado de un proceso fisiológico natural. La etapa de poner en contacto la célula con un medio de cultivo definido que comprende un ligando ErbB3, y opcionalmente, un miembro de la familia TGF-p, se puede realizar de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, las células se pueden tratar en un cultivo adherente, o en un cultivo en suspensión. Se entiende que las células que se ponen en contacto con el medio definido pueden tratarse adicionalmente con un entorno de diferenciación celular para estabilizar las células o para diferenciar las células.

[0041] Como se usa en el presente documento, el término "diferenciar" se refiere a la producción de un tipo celular que está más diferenciado que el tipo celular del que se obtiene. Por lo tanto, el término abarca los tipos celulares que están parcial y definitivamente diferenciados. Normalmente las células diferenciadas derivadas de células hES se refieren a células derivadas de hES o a cultivos de agregados de células derivadas de hES, o a suspensiones de células individuales derivadas de hES, o a cultivos adherentes de células derivadas de hES y similares.

[0042] Tal como se entiende en el presente documento, el término "sustancialmente" hace referencia a en gran medida o en gran parte, por ejemplo, "sustancialmente similar" en el contexto se utilizaría para describir un método que es en gran medida o en gran parte similar o diferente a otro método. Sin embargo, tal como se entiende en el presente documento, el término "sustancialmente exento", por ejemplo "sustancialmente exento" o "sustancialmente exento de contaminantes", o "sustancialmente exento de suero" o "sustancialmente exento de insulina o de factor de crecimiento similar a insulina" o equivalentes de los mismos, significa que la solución,

medio, suplemento, excipiente y similares, está al menos en un 98 %, o al menos en un 98,5 %, o al menos en un 99 %, o al menos en un 99,5 %, o al menos en un 100 % exenta de suero, contaminantes o equivalentes de los mismos. En un modo de realización, se proporciona un medio de cultivo definido sin suero, o está exento de suero al 100 %, o está sustancialmente exento de suero. En cambio, tal como se entiende en el presente documento, el término "sustancialmente similar" o equivalentes del mismo significa que la composición, proceso, método, solución, medio, suplemento, excipiente y similares significa que el proceso, método, disolución, etc., es al menos en un 80 %, al menos en un 85 %, al menos en un 90 %, al menos en un 95 %, o al menos en un 99 % similar al descrito anteriormente en el presente documento, o en un proceso o método descrito anteriormente.

[0043] En determinadas realizaciones de la presente invención, el término "enriquecido" se refiere a un cultivo celular que contiene más de aproximadamente un 50 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % del linaje celular deseado.

[0044] Tal como se entiende en el presente documento, el término "cantidad eficaz" de un compuesto o equivalentes del mismo se refiere a la concentración del compuesto que es suficiente en la presencia del resto de los componentes del medio definido, para efectuar la estabilización de la célula diferenciable en cultivo durante más de un mes en ausencia de una célula alimentadora y en ausencia de suero o reemplazo de suero. Esta concentración se determina fácilmente por un experto habitual en la técnica.

[0045] Como se emplea en la presente memoria, el término "expresar" se refiere a la transcripción de un polipéptido o a la traducción de un polipéptido en una célula, tal que los niveles de la molécula son más cuantificables en la célula que expresa la molécula que en una célula que no expresa la molécula. Los métodos para medir la expresión de una molécula son bien conocidos por los expertos habituales en la técnica, e incluyen sin limitación, transferencia Northern, RT-PCR, hibridación *in situ*, transferencia Western, e inmunotinción.

[0046] Tal como se utiliza en el presente documento cuando se hace referencia a una célula, línea celular, cultivo celular o población celular o población de células, el término "aislado" se refiere a estar separado sustancialmente de la fuente natural de las células de manera que la célula, línea celular, cultivo celular, población celular o población de células sean capaces de cultivarse *in vitro*. Además, el término "aislar" se emplea para referirse a la selección física de una o más células de un grupo de dos o más células, en donde las células se seleccionan en función de la morfología y/o la expresión celular de varios marcadores.

[0047] La presente invención puede entenderse más fácilmente en referencia a la siguiente descripción detallada de los modos de realización preferentes de la invención y los Ejemplos incluidos en el presente documento. Sin embargo, antes de divulgar y describir las presentes composiciones y procedimientos, se ha de entender que la presente invención no se limita a ácidos nucleicos específicos, polipéptidos específicos, tipos celulares específicos, células hospedadoras específicas, condiciones o métodos específicos, etc., y por lo tanto pueden, obviamente, variar, y las numerosas modificaciones y variaciones en los mismos serán evidentes para los expertos en la materia.

[0048] Las técnicas estándar para la clonación, aislamiento de ADN, amplificación y multiplicación, para reacciones enzimáticas que implican ADN-ligasa, ADN-polimerasa, endonucleasas de restricción, y similares, y varias técnicas de separación son aquellas conocidas y empleadas normalmente por los expertos en la materia. Se describen varias técnicas estándar en Sambrook *et al.*, 1989 *Molecular Cloning*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, Nueva York; Maniatis *et al.*, 1982 *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, Nueva York; Wu (Ed.) 1993 *Meth. Enzymol.* 218, Part I; Wu (Ed.) 1979 *Meth. Enzymol.* 68; Wu *et al.*, (Eds.) 1983 *Meth. Enzymol.* 100 y 101; Grossman & Moldave (Eds.) 1980 *Meth. Enzymol.* 65; Miller (ed.) 1972 *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York; Old & Primrose, 1981 *Principles of Gene Manipulation*, University of California Press, Berkeley; Schleif & Wensink, 1982 *Practical Methods in Molecular Biology*; Glover (Ed.) 1985 *DNA Cloning Vol. I & II*, IRL Press, Oxford, Reino Unido; Hames & Higgins (Eds.) 1985 *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, Reino Unido; y Setlow & Hollaender 1979 *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Vols. 1-4, Plenum Press, Nueva York. Las abreviaciones y la nomenclatura, cuando se emplean, se consideran estándar en la materia y utilizadas normalmente en publicaciones especializadas como las citadas en el presente documento.

[0049] La exposición se refiere a composiciones y métodos que comprenden una solución de nutrientes salina basal y una cantidad efectiva de un ligando ErbB3, con las composiciones estando esencialmente exentas de suero. Estas composiciones y métodos dados a conocer de la son útiles para el cultivo de células, en particular, de células diferenciables. Se entiende que en distintos puntos durante el cultivo de células diferenciables, se pueden añadir diversos componentes al cultivo celular, de forma que el medio pueda contener componentes distintos de los descritos en el presente documento. No obstante, se contempla que al menos en un punto durante la preparación del cultivo, o durante el cultivo de las células diferenciables, el medio definido comprende una solución nutritiva salina basal y un medio para activar la tirosina quinasa dirigida por ErbB2.

[0050] Aunque se emplea una solución nutritiva salina basal tal como se describe en el presente documento para mantener el crecimiento y la viabilidad celular de células hES, en otros modos de realización de la invención, los medios de cultivo de células madre alternativos para mantener la pluripotencia o para la diferenciación de células pluripotentes funcionan de manera sustancialmente similar, incluyendo, pero sin carácter limitativo, KSR

(Invitrogen), o KSR exento de sustancias xenógenas (Invitrogen), StemPro® (Invitrogen), mTeSR™1 (StemCell Technologies) y HEScGRO (Millipore), medio basado en DMEM, y similares.

5 **[0051]** En otro modo de realización, las células hES se cultivan en el medio definido descrito en el presente documento en ausencia y/o presencia de proteínas de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), por ejemplo, MATRIGEL. Las células madre embrionarias humanas cultivadas en ausencia de ECM contienen aproximadamente de un 0,5 a un 10 % de suero humano (hS) o fracciones de retenido de hS de una columna de centrifugación de límite de 300 K y/o 100 K (Microcon). Las suspensiones de agregados de células hES pueden producirse al incubar directamente las células hES en el medio que contiene hS o fracciones de retenido de hS; o tras incubar los recipientes de cultivo con el hS o las fracciones de retenido de hS durante aproximadamente 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas y 24 horas a 37 °C. La eficiencia de la siembra para las células hES en el medio que contiene hS o fracción de retenido de hS podía compararse con lo que se observó en las células cultivadas en DC-HAIF tal como se describe en el documento de patente PCT/US2007/062755, o cultivadas en medio DC-HAIF utilizando MATRIGEL™ como ECM, u otras matrices similares. Se describen métodos para cultivar células hES en un medio definido sustancialmente exento de suero en la solicitud de patente estadounidense n.º 11/8875,057, presentada el 19 de octubre de 2007, titulada *Methods and compositions for feeder-free pluripotent stem cell media containing human serum*.

10 **[0052]** En otro modo de realización adicional, se cultivaron suspensiones de agregados de células hES en un medio sustancialmente exento de suero y adicionalmente en ausencia de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés) añadido de manera exógena. Esto se distingue del documento de patente estadounidense n.º 7,005,252 de Thomson, J., que requiere un cultivo de células hES en un medio sin suero pero que contiene factores de crecimiento añadidos de manera exógena, incluido FGF.

15 **[0053]** La regulación celular puede llevarse a cabo mediante la transducción de señales extracelulares a través de la membrana que, a su vez, modula las rutas bioquímicas dentro de la célula. La fosforilación de las proteínas representa un proceso por el que las señales intracelulares se propagan de molécula a molécula resultando finalmente en una respuesta celular. Estas cascadas de transducción de señales se regulan en gran medida y normalmente se solapan tal como se refleja en la existencia de muchas proteínas quinasas así como fosfatasa. Se ha señalado que en humanos, se sabe que las proteínas tirosina quinasas tienen un papel significativo en el desarrollo de muchos estados patológicos incluida la diabetes, cáncer y también se han relacionado con varios síndromes congénitos. Las serina treonina quinasas, por ejemplo, las Rho-quinasas, son una clase de enzimas que, si se inhiben, pueden ser relevantes para el tratamiento de enfermedades humanas, incluidas diabetes, cáncer, y varios trastornos cardiovasculares inflamatorios y sida. La mayoría de los inhibidores identificados/designados hasta la fecha actúan en el sitio de unión a ATP. Dichos inhibidores competitivos de ATP han demostrado una selectividad en virtud de su habilidad para dirigirse a las áreas conservadas de una manera más deficiente en el sitio de unión a ATP.

20 **[0054]** La familia de Rho quinasas de pequeñas proteínas de unión a GTP contiene al menos 10 miembros incluidos Rho A-E y G, Rac 1 y 2, Cdc42 y TC10. Al inhibidor se le suele hacer referencia como inhibidores ROCK o ROK, y en el presente documento se utilizan de manera intercambiable. Los dominios efectores de RhoA, RhoB, y RhoC tienen la misma secuencia de aminoácidos y parecen tener dianas intracelulares similares. La Rho quinasa funciona como un mediador en dirección 3' primario de Rho y existe como dos isoformas: α (ROCK2) y β (ROCK1). Las proteínas de la familia Rho quinasa tienen un dominio catalítico (quinasa) en su dominio N-terminal, un dominio de doble espiral en su parte media, y un dominio con homología a la Pleckstrina (PH) putativa en su dominio C-terminal. El dominio de unión a Rho del ROCK se localiza en la porción C-terminal del dominio de doble espiral y la unión de la forma unida a GTP de Rho da lugar a un aumento de la actividad de quinasa. La ruta mediada por Rho/Rho-quinasa desempeña una función importante en la transducción de señales iniciada por muchos antagonistas, incluidos angiotensina II, serotonina, trombina, endotelina-1, norepinefrina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, nucleótidos extracelulares y ATP/ADP, y urotensina II. Mediante la modulación de sus sustratos/efectores diana, la Rho quinasa desempeña una función importante en varias funciones celulares incluyendo la contracción de los músculos lisos, la organización del citoesqueleto de actina, la adhesión celular y la motilidad y la expresión de genes. En virtud de la labor que la proteína Rho quinasa desempeña en la mediación de un número de funciones celulares que se consideran asociadas con la patogénesis de la arteriosclerosis, los inhibidores de esta quinasa también pueden ser útiles para el tratamiento o prevención de varias enfermedades cardiovasculares arterioscleróticas y estar implicadas en la contracción endotelial y en la mejora de la permeabilidad endotelial que se cree que hace que progrese la arteriosclerosis. Por consiguiente, en otros modos de realización de la invención, se añaden agentes que estimulan y/o ayudan a la supervivencia celular a varios medios de cultivo celular, por ejemplo, inhibidores de Rho-quinasa Y-27632, fasudil, y H-1152P e ITS (insulina/transferrina/selenio; Gibco). Estos agentes de supervivencia celular funcionan, en parte, fomentando la reasociación de cultivos de células hES y células derivadas de hES disociadas; por ejemplo, endodermo del tracto digestivo, endodermo pancreático, epitelio pancreático, poblaciones progenitoras pancreáticas, y similares, en concreto endodermo pancreático disociado y poblaciones progenitoras pancreáticas. El aumento de la supervivencia de las células hES o derivadas de hES se consiguió independientemente de si las células se produjeron a partir de agregados de células en suspensión o a partir de cultivos de placas adherentes (con o sin matriz extracelular, con o sin suero, con o sin células alimentadoras). El

aumento de la supervivencia de estas poblaciones celulares facilita y mejora los sistemas de purificación utilizando un clasificador de células y, por tanto, permite una mejora de la recuperación de las células. La utilización de inhibidores de la Rho quinasa como Y27632 puede permitir la expansión de tipos de células derivadas de hES así como promover su supervivencia durante los pases en serie de células individuales disociadas o a partir de conservación criogénica. Aunque se han probado inhibidores de la Rho quinasa, como Y27632, en cultivos celulares de hES y derivados de hES, estos pueden aplicarse en otros tipos de células, por ejemplo, en general, células epiteliales que incluyen, pero sin carácter limitativo, tipos de células intestinales, pulmonares, tímicas, renales, así como neuronales, como el epitelio pigmentario retinal.

[0055] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "célula diferenciable" se usa para describir una célula o población de células que puede diferenciarse en células al menos parcialmente maduras, o que pueda participar en la diferenciación de las células, por ejemplo, fusionarse con otras células, que pueden diferenciarse en células al menos parcialmente maduras. Como se emplea en la presente memoria, "células maduras parcialmente", "células progenitoras", "células inmaduras", "células precursoras", "células multipotentes" o equivalentes de las mismas, y también incluyen a aquellas células que se diferencian de manera terminal, por ejemplo, células del endodermo definitivo, células del endodermo del intestino anterior negativas en PDX1, células del endodermo pancreático positivas en PDX1 que incluyen además células del endodermo prepancreático positivas en PDX1 y células del extremo del endodermo pancreático positivas en PDX1. Todas son células que muestran al menos una característica del fenotipo, tal como la morfología o la expresión proteica, de una célula madura a partir del mismo órgano o tejido pero pueden diferenciarse de manera adicional en al menos otro tipo de célula. Por ejemplo, un hepatocito normal, maduro expresa normalmente proteínas tales como albúmina, fibrinógeno, alfa-1-antitripsina, factores de coagulación de protrombina, transferrina, y enzimas de desintoxicación tal como el citocromo P-450s, entre otros. Por tanto, tal como se define en la presente invención, un "hepatocito maduro parcialmente" puede expresar albúmina u otra o más proteínas, o empezar a tomar la apariencia o función de un hepatocito maduro, normal.

[0056] Al contrario de lo que pasa con los agregados celulares producidos por métodos conocidos previamente, que pueden variar en forma y tamaño, los agregados de células y los métodos descritos en el presente documento presentan una distribución de tamaño y forma estrecha, es decir, los agregados de células son sustancialmente uniformes en forma y/o tamaño. La uniformidad del tamaño de los agregados de células es crucial para el rendimiento de la diferenciación y la homogeneidad del cultivo. Al aplicar un análisis básico de transporte de masa a los agregados, se espera que la difusión del oxígeno y los nutrientes en el centro de grandes agregados sea lenta en comparación con la difusión en agregados más pequeños, asumiendo una permeabilidad igual. Como la diferenciación de las células madre embrionarias agregadas en células de linaje pancreático depende de la aplicación temporal de factores de crecimiento específicos, un cultivo con una mezcla de agregados de distintos diámetros es más probable que estén desincronizados en comparación con un cultivo uniforme (forma y tamaño) de agregados de células. Esta mezcla de agregados de células da lugar a una heterogeneidad y puede dar como resultado un rendimiento pobre de la diferenciación y que en última instancia no se preste a estar dispuesto para la fabricación, el aumento de escala y la producción. Los agregados de células utilizados en el presente documento pueden ser de varias formas, como, por ejemplo, una esfera, un cilindro (preferiblemente con un diámetro y altura iguales), o similar a una vara, entre otros. Aunque pueden utilizarse agregados de otras formas, en un modo de realización de la invención, generalmente se prefiere que los agregados de células sean esféricos o cilíndricos. En otro modo de realización, los agregados de células son esféricos y sustancialmente uniformes en forma y tamaño. Por ejemplo, si los agregados celulares difieren en tamaño o no son uniformes, será difícil fabricar y llevar a cabo procesos a gran escala de las células de manera fiable. Por tanto, tal como se utiliza en el presente documento, la frase "sustancialmente uniforme" o "sustancialmente uniforme en forma y tamaño" o equivalentes de los mismos, hace referencia a la propagación en uniformidad de los agregados, y no es de más de aproximadamente un 20 %. En otro modo de realización, la propagación en uniformidad de los agregados no es de más de aproximadamente el 15 %, 10 % o 5 %.

[0057] Aunque el número exacto de células por agregado no es esencial, los expertos en la materia reconocerán que el tamaño de cada agregado (y por tanto el número de células por agregado) está limitado por la capacidad del oxígeno y los nutrientes para difundirse hasta las células centrales, y este número puede variar también dependiendo del tipo de célula y de las necesidades nutritivas de ese tipo de células. Los agregados de células pueden comprender un número mínimo de células (por ejemplo, dos o tres células) por agregado, o pueden comprender muchos cientos o miles de células por agregado. Normalmente, los agregados de células comprenden de cientos a miles de células por agregado. Para los fines de la presente invención, los agregados de células suelen tener un tamaño de aproximadamente 50 micras a 600 micras, aunque, dependiendo del tipo de célula, el tamaño puede ser menor o mayor que este intervalo. En un modo de realización, los agregados de células tienen un tamaño de aproximadamente 50 micras a 250 micras, o de aproximadamente 75 a 200 micras, y preferiblemente tienen un tamaño de aproximadamente 100 a 150 micras. Por el contrario, los agregados de células cilíndricos o no esféricos, que pueden producirse en la suspensión son aquellos agregados por los que el diámetro, en función de los ejes menor y mayor (por ejemplo, X, Y, y Z), no son iguales. Estos agregados de células no esféricos tienden a ser de mayor tamaño, de aproximadamente 500 a 600 micras de diámetro y altura. No obstante, en los métodos descritos en la presente memoria, estos agregados de células hES no esféricos se convierten en esféricos una vez que se inicia la diferenciación si estos aún no lo eran. Los agregados de células

no esféricos incluyen, pero sin carácter limitativo, agregados de células cilíndricos y cúbicos, pero siguen siendo uniformes en tamaño y forma.

[0058] Pueden utilizarse muchos tipos de células para formar los agregados de células descritos en la presente memoria. En general, la elección del tipo de células variará dependiendo del tipo de constructo tridimensional a modificar (por ejemplo, la estructura de varios órganos, entre los que se incluyen el páncreas, el hígado, el pulmón, el riñón, el corazón, la vejiga, los vasos sanguíneos, y similares). Por ejemplo, si la estructura tridimensional es un páncreas, los agregados de células comprenderán de manera ventajosa un tipo o tipos de células que normalmente se encuentran en un páncreas (por ejemplo, células endocrinas como células de tipo somatostatina, insulina, glucagón, grelina, así como células endoteliales, células musculares lisas, etc.). Un experto en la materia puede elegir un tipo(s) de células apropiado(s) para los agregados de células en función del tipo de órgano o tejido tridimensional que se desee. Entre los ejemplos no limitativos de tipos de células adecuadas se incluyen células madre (por ejemplo, adultas y embrionarias), células musculares o contráctiles (por ejemplo, células de músculo estriado y células de músculo liso), células neuronales (por ejemplo, gliales, dendríticas y neuronas), tejido conjuntivo (que incluye hueso, cartílago, células que se diferencian en células formadoras de hueso y condrocitos, y tejidos linfáticos), células parenquimatosas, células epiteliales (que incluyen células endoteliales que forman revestimientos en cavidades y vasos o canales, células epiteliales secretoras exocrinas, células de absorción epitelial, células epiteliales de queratinización (por ejemplo, queratinocitos y células epiteliales corneales), células epiteliales pulmonares, células epiteliales mamarias, y similares, y células no diferenciadas (como células embrionarias, células madre y otras células precursoras), entre otras.

[0059] Los agregados de células descritos en la presente memoria pueden ser agregados homocelulares o agregados heterocelulares. Tal como se utiliza en el presente documento, los agregados de células "homocelulares", "monocelulares" o equivalentes de los mismos hacen referencia a una pluralidad de agregados de células en suspensión, donde cada agregado de células comprende una pluralidad de células vivas de sustancialmente un único tipo de células, por ejemplo, los métodos para producir agregados de células hES descritos en el presente documento pueden ser sustancialmente homocelulares, consistiendo sustancialmente en células hES pluripotentes, consistiendo esencialmente en células del endodermo definitivo, células del endodermo del intestino anterior, consistiendo esencialmente en células del endodermo pancreático, que pueden incluir además células del endodermo prepancreático positivas en PDX1, células del endodermo pancreático positivas en PDX1, células del extremo del endodermo pancreático positivas en PDX1, células precursoras endocrinas pancreáticas, células endocrinas pancreáticas, etc.

[0060] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "esencialmente" o "sustancialmente" significa o bien una cantidad mínima o reducida de un componente o célula presente en cualquier tipo de suspensión de agregados de células, por ejemplo, los agregados de células en suspensión descritos en el presente documento son "esencialmente o sustancialmente homogéneos", "esencialmente o sustancialmente homocelulares", o se componen "esencialmente de células hES", "esencialmente o sustancialmente de células del endodermo definitivo", "esencialmente o sustancialmente de células del endodermo del intestino anterior", "esencialmente o sustancialmente de células del endodermo del intestino anterior negativas en PDX1", "esencialmente o sustancialmente de células del endodermo prepancreático positivas en PDX1", "esencialmente o sustancialmente de células progenitoras o de endodermo pancreático positivas en PDX1", "esencialmente o sustancialmente de células del extremo del endodermo pancreático positivas en PDX1", "esencialmente o sustancialmente de células precursoras endocrinas pancreáticas", "esencialmente o sustancialmente de células endocrinas pancreáticas", y similares.

[0061] Algunos de los cultivos en suspensión de agregados de células sustancialmente homocelulares son, por ejemplo, cultivos en suspensión de agregados de células derivadas de hES, que comprenden menos de aproximadamente un 50 % de hESC, menos de aproximadamente un 45 % de hESC, menos de aproximadamente un 40 % de hESC, menos de aproximadamente un 35 % de hESC, menos de aproximadamente un 30 % de hESC, menos de aproximadamente un 25 % de hESC, menos de aproximadamente un 20 % de hESC, menos de aproximadamente un 15 % de hESC, menos de aproximadamente un 10 % de hESC, menos de aproximadamente un 5 % de hESC, menos de aproximadamente un 4 % de hESC, menos de aproximadamente un 3 % de hESC, menos de aproximadamente un 2 % de hESC o menos de aproximadamente un 1 % de hESC del total de células derivadas de hES en el cultivo. Dicho de otro modo, los cultivos en suspensión de agregados de células derivadas de hES, por ejemplo, endodermo del intestino anterior negativo en PDX1, células del endodermo prepancreático positivas en PDX1, células progenitoras o del endodermo pancreático positivas en PDX1, células del extremo pancreático positivas en PDX1, células progenitoras endocrinas pancreáticas y células endocrinas pancreáticas, comprenden al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %,

[0062] Tal como se utiliza en el presente documento, "heterocelular", "multicelular" o equivalentes de los mismos hacen referencia a agregados de células por los que cada agregado de células individual comprende una pluralidad de células o al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis o más tipos de células, o al menos un tipo de células y un componente no celular, por ejemplo, material de matriz extracelular (ECM) (por ejemplo, colágeno,

fibronectina, laminina, elastina y/o proteoglicanos). Tales componentes de ECM pueden ser secretados naturalmente por las células, o de forma alternativa, las células pueden estar manipuladas genéticamente por cualquier método adecuado en la técnica para variar el nivel de expresión de material ECM y/o las moléculas de adhesión a la célula, como selectinas, integrinas, inmunoglobulinas y cadherinas, entre otras. En otro modo de realización, puede incorporarse material de ECM natural o cualquier componente sintético que imite el material de ECM en los agregados durante la formación de agregados. Por ejemplo, los métodos para la producción de agregados de células derivadas de hES como agregados de células epiteliales pancreáticas o de células del endodermo pancreático (o agregados de células de la etapa 4) descritos en el presente documento consisten sustancialmente en células del endodermo o epiteliales pancreáticas, pero también pueden consistir en pequeños números de células que no sean células de tipo epitelial no pancreático, u otras progenitoras del endodermo, e incluso células secretoras endocrinas pancreáticas (por ejemplo, células secretoras de insulina).

[0063] Para ser claros, los agregados homocelulares o heterocelulares descritos en el presente documento y producidos por los métodos de suspensión descritos en el presente documento, no son los mismos agregados de células descritos en la técnica y por otros y a los que se hace referencia como cuerpos embrioides (EB, por sus siglas en inglés). Los cuerpos embrioides se distinguen claramente de los agregados de células descritos en el presente documento porque los EB son agregados de células diferenciadas y no diferenciadas que aparecen cuando las células madre embrionarias crecen demasiado en cultivos monocapa, o se mantienen en cultivos de suspensión en medio no definido o se diferenciaron mediante protocolos no dirigidos (es decir, diferenciación aleatoria) hacia múltiples tejidos de estrato germinal. Por el contrario, la presente invención, analizada con más detalle en los Ejemplos 17 & 20, disocia de manera enzimática las células hES en cultivos de placa adherentes para hacer una suspensión de células individuales y luego juntar las células para formar agregados de células; luego utilizar estos cultivos en suspensión de agregados de células para la diferenciación esencialmente tal como se describe en in d'Amour 2005 & 2006, *supra*. Otras diferencias entre los EB y los agregados de células de esta invención se exponen a continuación de manera adicional.

[0064] Otros métodos adicionales describen la fabricación de cuerpos embrioides (EB). Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "cuerpos embrioides", "cuerpos agregados" o equivalentes de los mismos, hacen referencia a agregados de células diferenciadas y no diferenciadas que aparecen cuando las células madre embrionarias crecen demasiado en cultivos monocapa, o se mantienen en suspensión en medio no definido o se diferencian mediante protocolos no dirigidos hacia múltiples tejidos de estrato germinal. Esto es, los EB no están formados a partir de una suspensión de células individuales de células madre pluripotentes tal como se describe en el presente documento; ni están formados a partir de cultivos adherentes de células multipotentes derivadas de hES. Solamente estas características hacen que la presente invención se distinga claramente de un cuerpo embrioide.

[0065] Los cuerpos embrioides son una mezcla de distintos tipos de células, normalmente de varias capas germinales, distinguibles mediante criterios morfológicos. Los cuerpos embrioides normalmente hacen referencia a una estructura morfológica que comprende una población de células, la mayoría de las cuales se derivan de células madre embrionarias (ES, por sus siglas en inglés) que han experimentado una diferenciación no directa, es decir, como la que ocurre cuando se exponen células no diferenciadas a altas concentraciones de suero en ausencia de factores de crecimiento definidos. En condiciones de cultivo adecuadas para la formación de EB (por ejemplo, al retirar el factor inhibidor de leucemia para células madre embrionarias de ratón, u otros factores de bloqueo similares), las células madre embrionarias proliferan y forman pequeñas masas de células que comienzan a diferenciarse. Primero, correspondiéndose a aproximadamente los días 1-4 de la diferenciación para células madre embrionarias humanas, la pequeña masa de células forma una capa de células endodérmicas en la capa exterior, y se considera un "cuerpo embrioide simple". En segundo lugar, correspondiéndose a aproximadamente los días 3-20 tras la diferenciación para las células madre embrionarias humanas, se forman "cuerpos embrioides complejos", que se caracterizan por una diferenciación extensiva de células ectodérmicas y mesodérmicas y tejido derivado. Tal como se utiliza en la presente memoria, los EB incluyen EB simples y complejos a menos que se requiera lo contrario por el contexto. La determinación de cuándo se han formado los cuerpos embrioides en un cultivo de células madre embrionarias la hacen habitualmente los expertos en la materia, por ejemplo, por inspección visual de la morfología. Las masas flotantes de aproximadamente 20 células o más se considera que son EB dependiendo de las condiciones de cultivo. Véanse, p. ej., Schmitt *et al.* (1991) *Genes Dev.* 5, 728-740; Doetschman *et al.* (1985) *J. Embryol. Exp. Morph.* 87, 27-45. El término también hace referencia a estructuras equivalentes derivadas de células germinales primordiales, que son células primitivas extraídas de regiones gonadales embrionarias; véase, por ejemplo, Shablott, *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13726. Las células germinales primordiales, a las que a menudo se les hace referencia en la técnica como células EG, o células germinales embrionarias, cuando se tratan con factores apropiados de células madre embrionarias pluripotentes a partir de los cuales pueden derivarse cuerpos embrioides; véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5,670,372; y Shablott, *et al.*, *supra*.

[0066] Existen varios métodos para formar EB, por ejemplo, cuerpos embrioides formados por centrifugación, tal como se describe en Ng *et al.* (2008) *Nature Protocols* 3(5): 468-776 y EB formados a partir de suspensiones de células individuales que se sembraron sobre islas de matrices extracelulares con micropatrones tal como se

describe en Bauwens *et al.* (2008) *supra*. No obstante, estos métodos tienen un coste prohibitivo y son menos eficientes para la producción a gran escala (fabricación) de células hES y células derivadas de hES porque requieren demasiados pasos antes de poder comenzar un aumento de escala en la producción. Por ejemplo, Bauwens *et al.*, primero tienen que sembrar las células hES en un factor de crecimiento reducido MATRIGEL™ antes de que las células puedan seleccionarse para comenzar un cultivo en suspensión. El tiempo y el coste de este método lo hace engorroso porque se requieren placas de cultivo de tejidos con micropatrones personalizados. De manera adicional, el método empleado por Ng *et al.* tampoco es económico para una fabricación a gran escala de células hES y células derivadas de hES debido al uso de centrifugadores a fin de crear EB más uniformes. Finalmente, en todas estas metodologías, los agregados de células no están hechos a partir de suspensiones de células individuales de células madre pluripotentes como la presente invención.

[0067] Los cuerpos embrioides son agregados de células, a diferencia de los agregados de células descritos en esta invención, que están hechos de numerosos tipos de células de las tres capas germinales y se suelen crear al exponer agregados de células ES no diferenciadas a señales de diferenciación no dirigidas, como suero bovino fetal al 20 %. El resultado de esta metodología no dirigida es una mezcla de tipos celulares que pretende imitar el desarrollo normal del embrión *in vitro*. Aunque este enfoque es útil en el nivel básico de investigación para examinar el desarrollo de un embrión, no es apto para ningún proceso de fabricación de terapia celular a gran escala en el que la producción celular, la identidad de la población, la pureza de la población, la consistencia del lote, la seguridad, la función celular y el coste de los bienes son preocupaciones primarias. Además, independientemente de cualquier estrategia de enriquecimiento empleada para purificar un tipo de células determinado de un cuerpo embriode, el protocolo de diferenciación no proporciona un enfoque dirigido que genere una gran población de tipos de células individuales. Posteriormente, las poblaciones contaminantes siempre predominarán y obstaculizarán cualquier intento de purificar una población específica. Todo el trabajo previo sobre crear y diferenciar agregados de células madre embrionarias presenta uno o más de los siguientes componentes en su metodología: 1) utilización de células madre embrionarias de ratón en lugar de humanas, 2) protocolos de agregación forzados que se basan en la centrifugación para agregar células en lugar de en los procesos de adhesión celular normales, 3) agregación de trozos de células en condiciones estáticas, 4) disociación de células no individuales o raspado de células de superficies para crear agregados, 5) diferenciación no directa de agregados de células utilizando suero bovino fetal (FCS, por sus siglas en inglés) al 15-20 %, resultando en la formación de un cuerpo embriode y tipos celulares de todas las capas germinales. Por lo que sabemos, el único estudio que no utiliza FCS al 15-20 % para diferenciar cuerpos embrioides describe un protocolo en el que los agregados de células están formados mediante agregación forzada, luego los agregados se diferencian inmediatamente utilizando un medio apropiado para el mesodermo (Ng *et al.*, Blood. 2005 106(5):1601). No obstante, en este trabajo, los investigadores transfirieron los cuerpos embrioides a cultivos adherentes no agregados tras 10-12 días en un cultivo agregado estático, haciendo las comparaciones con la aplicación actual irrelevantes. A diferencia de todos los trabajos previos, la aplicación actual presenta un enfoque que 1) disocia células madre embrionarias humanas en células individuales y luego crea agregados mediante cultivo rotacional a velocidades de cizallamiento optimizadas para mejorar el control del diámetro de los agregados y la supervivencia celular, 2) diferencia directamente los agregados de células madre embrionarias en endodermo definitivo, luego en endodermo del intestino anterior, luego en endodermo del intestino anterior prepancreático, luego en endodermo pancreático y finalmente en células endocrinas pancreáticas. Este protocolo de diferenciación genera poblaciones de linaje pancreático y endodermo definitivo con una alta eficiencia y poblaciones contaminantes mínimas. Además, este enfoque a la diferenciación y agregación de células madre embrionarias no crea cuerpos embrioides, en contraste directo con el resto de investigaciones publicadas.

[0068] A diferencia de los cuerpos embrioides, que son una mezcla de células diferenciadas y no diferenciadas y que constan normalmente de células de varias capas germinales y se someten a una diferenciación aleatoria, los agregados de células descritos en el presente documento son esencialmente o sustancialmente homocelulares, existiendo como agregados de células de tipo unipotente, bipotente, multipotente, o pluripotente, por ejemplo, células embrionarias, de endodermo definitivo, de endodermo del intestino anterior, de endodermo pancreático positivo en PDX1, células endocrinas pancreáticas, etc.

[0069] La presente invención aborda los problemas anteriores proporcionando un proceso de fabricación económico o métodos capaces de producir de manera reproducible agregados de células que son sustancialmente uniformes en tamaño y forma utilizando un proceso que puede aplicarse fácilmente a la fabricación a gran escala. En un modo de realización concreto, las células diferenciables se expanden en un cultivo en suspensión, utilizando el medio celular tal como se da a conocer en el presente documento. En otro modo de realización concreto, las células diferenciables pueden mantenerse y expandirse en suspensión, es decir, se quedan sin diferenciar o se evita que se sigan diferenciando. El término "expandir" en el contexto de los cultivos celulares se utiliza tal como es en la técnica, y hace referencia a la proliferación celular y al aumento del número de células, preferiblemente al aumento del número de células viables. En un modo de realización específico, las células se expanden en una suspensión de cultivo al cultivarse durante más de aproximadamente un día, es decir, aproximadamente 24 horas. En un modo de realización más específico, las células se expanden en un cultivo en suspensión al cultivarse durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, o al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 semanas.

[0070] Las condiciones del cultivo de diferenciación y los tipos de células derivados de hES descritos en el presente documento son sustancialmente similares a los descritos en d'Amour *et al.* 2006, *supra*. D'Amour *et al.* (2006) describen un protocolo de diferenciación en cinco pasos: paso 1 (da como resultado esencialmente una producción de endodermo definitivo), paso 2 (da como resultado esencialmente una producción de endodermo de intestino anterior negativo en PDX1), paso 3 (da como resultado esencialmente una producción de endodermo de intestino anterior con PDX1 positivo), paso 4 (da como resultado esencialmente una producción de progenitores endocrinos pancreáticos o epiteliales o de endodermo pancreático) y paso 5 (da como resultado esencialmente una producción de células endocrinas de expresión de hormonas). Es importante destacar que, por primera vez, todos estos tipos de células pueden producirse por los métodos de suspensión descritos en el presente documento.

[0071] Como se emplea en la presente memoria, "endodermo definitivo (DE)" se refiere a una célula del linaje de endodermo multipotente que se puede diferenciar en células del tubo digestivo o en órganos derivados del tubo digestivo. De acuerdo con determinados modos de realización, las células del endodermo definitivo son células de mamífero, y en un modo de realización preferido, las células del endodermo definitivo son células humanas. En algunos modos de realización de la presente invención, las células del endodermo definitivo expresan o no expresan de manera significativa determinados marcadores. En algunos modos de realización, uno o más de los marcadores seleccionados de entre SOX17, CXCR4, MIXL1, GATA4, HNF3beta, GSC, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1, CRIP1 y CER se expresan en células del endodermo definitivo. En otros modos de realización, uno o más de los marcadores seleccionados de OCT4, alfa-fetoproteína (AFP), Trombomodulina (TM), SPARC, SOX7 y HNF4alfa no se expresan de manera significativa en las células del endodermo definitivo. Las poblaciones celulares de endodermo definitivo y los métodos de producción de las mismas se describen también en la solicitud de patente estadounidense n.º 11/021,618, titulada *Definitive Endoderm*, presentada el 23 de diciembre de 2004.

[0072] Otros modos de realización adicionales de la exposición se refieren a cultivos celulares y agregados de células denominados "células de endodermo de intestino anterior negativas en PDX1", "células de endodermo de intestino anterior", o equivalentes de los mismos. Las células de endodermo de intestino anterior negativas en PDX1 también son multipotentes y pueden dar lugar a varias células y tejidos, que incluyen, pero sin carácter limitativo, el timo, la tiroides, las paratiroides, los pulmones/bronquios, el hígado, la faringe, las bolsas faríngeas, partes del duodeno y la trompa de Eustaquio. En algunos modos de realización, las células del endodermo del intestino anterior expresan altos niveles de SOX17, HNF1B, HNF1 alfa y FOXA1 en comparación con las células del endodermo que no es del intestino anterior, por ejemplo, endodermo definitivo o endodermo positivo en PDX1, que no expresan de manera apreciable estos marcadores. Las células del endodermo del intestino anterior negativas en PDX1 también expresan niveles bajos o nulos de PDX1, AFP, SOX7 y SOX1. Se describen también poblaciones de células del endodermo del intestino anterior con PDX1 negativo y métodos de producción de los mismos en la solicitud de patente estadounidense N.º 11/588,693, titulada *PDX1-expressing dorsal and ventral foregut endoderm*, presentada el 27 de Octubre, 2006.

[0073] Otros modos de realización de la exposición se refieren a cultivos celulares de "células del endodermo del intestino anterior pancreáticas positivas en PDX1", "endodermo prepancreático positivo en PDX1", o equivalentes de los mismos. Las células del endodermo prepancreático positivas en PDX1 son multipotentes y pueden dar lugar a varias células y/o tejidos que incluyen, pero sin carácter limitativo, estómago, intestino y páncreas. En algunos modos de realización, las células del endodermo prepancreático positivas en PDX1 expresan altos niveles de PDX1, HNF6, SOX9 y PROX1 en comparación con las células del endodermo no prepancreático que no expresan de manera apreciable estos marcadores. Las células del endodermo prepancreático positivas en PDX1 también expresan niveles bajos o nulos de NKX6.1, PTF1A, CPA, y cMYC.

[0074] En otros modos de realización de la exposición se refieren a cultivos celulares de "células del endodermo pancreático positivas en PDX1", "progenitor pancreático positivo en PDX1", "epitelio pancreático", "PE", o equivalentes de los mismos. Las células progenitoras pancreáticas positivas en PDX1 son multipotentes y pueden dar lugar a varias células en el páncreas que incluyen, pero sin carácter limitativo, células acinares, del conducto y endocrinas. En algunos modos de realización, las células progenitoras pancreáticas positivas en PDX1 expresan altos niveles de PDX1 y NKX6.1 en comparación con las células del endodermo no prepancreático que no expresan de manera apreciable estos marcadores. Las células progenitoras pancreáticas positivas en PDX1 expresan también niveles bajos o nulos de PTF1A, CPA, cMYC, NGN3, PAX4, ARX y NKX2.2, INS, GCG, GHRL, SST, y PP.

[0075] De manera alternativa, otros modos de realización de la exposición se refieren a cultivos celulares de "células del extremo del endodermo pancreático positivas en PDX1", o equivalentes de los mismos. En algunos modos de realización, las células del extremo del endodermo pancreático positivas en PDX1 expresan niveles aumentados de PDX1 y NKX6.1 similares a los de las células progenitoras pancreáticas positivas en PDX1, pero a diferencia de las células progenitoras pancreáticas positivas en PDX1, las células del extremo del endodermo pancreático positivas en PDX1 expresan de manera adicional altos niveles de PTF1A, CPA y cMYC. Las células del extremo del endodermo pancreático positivas en PDX1 expresan también niveles bajos o nulos de NGN3, PAX4, ARX y NKX2.2, INS, GCG, GHRL, SST, y PP.

[0076] Además, otros modos de realización de la exposición se refieren a cultivos celulares de "células precursoras endocrinas pancreáticas", "células progenitoras endocrinas pancreáticas" o equivalentes de los mismos. Las células progenitoras endocrinas pancreáticas son multipotentes y dan lugar a células endocrinas maduras que incluyen células alfa, beta, delta y PP. En algunos modos de realización, las células progenitoras endocrinas pancreáticas expresan altos niveles de NGN3, PAX4, ARX y NKX2.2 en comparación con otros tipos de células progenitoras no endocrinas. Las células progenitoras pancreáticas expresan también niveles bajos o nulos de INS, GCG, GHRL, SST, y PP.

[0077] Otros modos de realización adicionales de la descripción se refieren a cultivos celulares de "células endocrinas pancreáticas", "células que secretan hormonas pancreáticas", "células que expresan hormonas del islote pancreático", o equivalentes de los mismos referidos a una célula, que se han derivado de una célula pluripotente *in vitro*, por ejemplo, células alfa, beta, delta y/o células PP o combinaciones de las mismas. Las células endocrinas pueden ser polihormonales o monohormonales, por ejemplo que expresan insulina, glucagón, grelina, somatostatina y polipéptido pancreático o combinaciones de los mismos. Las células endocrinas pueden por tanto expresar una o más hormonas pancreáticas, que tienen al menos algunas de las funciones de una célula del islote pancreático. Las células que expresan hormonas del islote pancreático pueden ser maduras o inmaduras. Las células que expresan hormonas del islote pancreático inmaduras se pueden distinguir de las células que expresan hormonas del islote pancreático maduras en función de la expresión diferencial de determinados marcadores, o en función de sus capacidades funcionales, por ejemplo, la sensibilidad a la glucosa *in vitro* o *in vivo*. Las células endocrinas pancreáticas expresan también niveles bajos o nulos de NGN3, PAX 4, ARX y NKX2.2.

[0078] La mayoría de los tipos de celulares anteriores están epitelizadas en comparación con las células del endodermo definitivo mesenquimal. En algunos modos de realización, las células del endodermo pancreático expresan uno o más marcadores seleccionados de la Tabla 3 y/o uno o más marcadores seleccionados de la Tabla 4 en relación con la solicitud de patente estadounidense n.º 11/588,693 titulada *PDX1 expressing dorsal and ventral foregut endoderm*, presentada el 27 de Octubre, 2006, y también a la solicitud de patente estadounidense n.º 11/115,868, titulada *PDX1-expressing endoderm*, presentada el 26 de Abril, 2005.

[0079] La invención se refiere a métodos útiles para células diferenciables, independientemente de su fuente o su plasticidad. La "plasticidad" de una célula se utiliza en la presente memoria prácticamente tal como es en la técnica. En concreto, la plasticidad de una célula hace referencia a la habilidad de una célula para diferenciarse en un tipo de célula concreto encontrado en tejidos u órganos de un embrión, feto u organismo desarrollado. Cuanto más "plástica" sea una célula, en más tejidos podrá diferenciarse. Las "células pluripotentes" incluyen células y su progenie, que pueden ser capaces de diferenciarse en, o dar lugar a, células unipotentes, oligopotentes, multipotentes, pluripotentes y/o varios, si no todos, los tipos de células maduras o parcialmente maduras que se encuentran en un embrión, feto u organismo desarrollado. Las "células multipotentes" incluyen células, y su progenie, que pueden diferenciarse en, o dar lugar a, células multipotentes, oligopotentes y progenitoras unipotentes, y/o a uno o más tipos de células maduras o parcialmente maduras, excepto que los tipos de células maduras o parcialmente maduras obtenidas de células multipotentes se limiten a células de un tejido, órgano o sistema de órganos concreto. Por ejemplo, una célula hematopoyética progenitora multipotente y/o su progenie poseen la capacidad de diferenciarse en o dar lugar a uno o más tipos de células oligopotentes, tales como células progenitoras mieloides y células progenitoras linfoides, y también de dar lugar a otros componentes celulares maduros encontrados normalmente en la sangre. Las "células oligopotentes" incluyen células y su progenie cuya capacidad para diferenciarse en células maduras o parcialmente maduras está más restringida que en las células multipotentes. Las células oligopotentes pueden, sin embargo, poseer aún la capacidad de diferenciarse en células oligopotentes y unipotentes, y/o uno o más tipos celulares más maduros o parcialmente maduros de un tejido, órgano o sistema de órganos determinado. Un ejemplo de una célula oligopotente es una célula progenitora mielóide, que en última instancia puede dar lugar a eritrocitos, plaquetas, basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos maduros o parcialmente maduros. Las "células unipotentes" incluyen células y su progenie que poseen la capacidad de diferenciarse o de dar lugar a otras células unipotentes y/o un tipo celular maduro o parcialmente maduro.

[0080] Las células diferenciables, tal como se emplea en la presente memoria, pueden ser pluripotentes, multipotentes, oligopotentes, o incluso unipotentes. En determinados modos de realización de la presente invención, las células diferenciables son células diferenciables pluripotentes. En modos de realización más específicos, las células diferenciables pluripotentes se seleccionan del grupo que consiste en células madre embrionarias, células de MCI/epiblasto, células de ectodermo primitivo, células germinales primordiales y células de teratocarcinoma. En un modo de realización concreto, las células diferenciables son células madre embrionarias de mamífero. En un modo de realización más concreto, las células diferenciables son células madre embrionarias humanas, que se han obtenido sin la destrucción de un embrión.

[0081] La invención contempla también células diferenciables de cualquier fuente dentro de un animal, siempre que las células sean diferenciables tal como se define en la presente memoria. Por ejemplo, las células diferenciables se pueden recolectar de embriones, o de cualquier estrato germinal primigenio del mismo, a partir de un tejido placentario o del corion, o a partir de más tejidos maduros tales como células madre adultas que incluyen, pero no se limitan a, tejido adiposo, médula ósea, tejido nervioso, tejido mamario, tejido hepático, tejido

del páncreas, tejido epitelial, tejido respiratorio, tejido de las gónadas y tejido muscular. En modos de realización específicos, las células diferenciables son células madre embrionarias. En otros modos de realización específicos, las células diferenciables son células madre adultas. En otros modos de realización adicionales, las células madre son células madre obtenidas de placenta o del corion. En modos de realización en los que las células diferenciables provienen de células madre embrionarias, las células diferenciables se obtienen sin la destrucción del embrión.

[0082] Por supuesto, la invención contempla el empleo de células diferenciables de cualquier animal capaz de generar células diferenciables. Los animales de los que se recolectan las células diferenciables pueden ser vertebrados o invertebrados, mamíferos o no mamíferos, humanos o no humanos. Entre los ejemplos de fuentes animales se incluyen, pero sin carácter limitativo, primates, roedores, cánidos, felinos, équidos, bovinos y porcinos.

[0083] Las células diferenciables de la presente invención pueden obtenerse usando cualquier método conocido para los expertos en la materia. Por ejemplo, las células pluripotentes humanas pueden producirse empleando desdiferenciación. De manera adicional, la célula de ICM/epiblasto humana o la célula de ectodermo primitivo utilizada en la presente invención puede obtenerse *in vivo* o *in vitro*. Las células del ectodermo primitivo se pueden generar en un cultivo adherente o como agregados de células en un cultivo en suspensión, como se describe en el documento de patente WO 99/53021. Además, las células pluripotentes humanas se pueden cultivar empleando cualquier método conocido por los expertos en la materia, incluyendo métodos de pase manual, y métodos de pase masivo, tales como el pase enzimático o no enzimático.

[0084] En un determinado modo de realización, cuando se utilizan las células ES, las células madre embrionarias tienen un cariotipo normal, mientras que en otros modos de realización, las células madres embrionarias tienen un cariotipo anormal. En un modo de realización, una mayoría de las células madre embrionarias tienen un cariotipo normal. Se contempla que más del 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o más del 95 % de las metafases examinadas mostrarán un cariotipo normal.

[0085] En otro modo de realización, una mayoría de las células madre embrionarias tienen un cariotipo anormal. Se contempla que más del 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o más del 95 % de las metafases examinadas mostrarán un cariotipo anormal. En determinados modos de realización, el cariotipo anormal es evidente después de que las células se hayan cultivado durante más de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 20 pases. En un modo de realización específico, el cariotipo anormal comprende una trisomía de al menos un cromosoma autosómico, en el que el cromosoma autosómico se selecciona del grupo que consiste en los cromosomas 1, 7, 8, 12, 14, y 17. En otro modo de realización, el cariotipo anormal comprende una trisomía de más de un cromosoma autosómico, en el que al menos uno de los más de un cromosoma autosómico se selecciona del grupo que consiste en los cromosomas 1, 7, 8, 12, 14, y 17. En un modo de realización, el cromosoma autosómico es el cromosoma 12 o 17. En otro modo de realización, el cariotipo anormal comprende un cromosoma sexual adicional. En un modo de realización, el cariotipo comprende dos cromosomas X y uno Y. También se contempla que pueden ocurrir translocaciones de cromosomas, y tales translocaciones están comprendidas en el término "cariotipo anormal". Las combinaciones de las anomalías cromosómicas anteriores y otras anomalías cromosómicas también están comprendidas en la invención.

[0086] Las composiciones y métodos comprenden una solución nutritiva salina basal. Como se usa en el presente documento, una solución nutritiva salina basal se refiere a una mezcla de sales que proporcionan agua y determinados iones inorgánicos en bruto a las células, esenciales para un metabolismo celular normal, mantienen el equilibrio osmótico intra y extracelular, proporcionan un carbohidrato como fuente de energía y proporcionan un sistema de tamponador para mantener el medio dentro del intervalo de pH fisiológico. Entre los ejemplos de soluciones nutritivas salinas basales se incluyen, pero sin carácter limitativo, medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio Esencial mínimo (MEM), medio basal Eagle (BME), RPM1 1640, Hams F-10, de Ham F-12, medio esencial mínimo α (α MEM), Medio mínimo esencial de Glasgow (G-MEM) y medio de Dulbecco modificado de Iscove, y mezclas de los mismos. En un modo de realización concreto, la solución nutritiva salina basal es una mezcla de aproximadamente 50:50 de DMEM y F12 de Ham.

[0087] Se contempla que la composición puede comprender además oligoelementos. Los oligoelementos pueden adquirirse de manera comercial, por ejemplo, de Mediatech. Ejemplos no limitativos de oligoelementos incluyen, pero sin carácter limitativo, compuestos que comprenden aluminio, cloro, sulfato, hierro, cadmio, cobalto, cromo, germanio, sodio, potasio, calcio, fosfato y magnesio. Entre los ejemplos específicos de compuestos que contienen oligoelementos se incluyen, pero sin carácter limitativo, AlCl_3 , AgNO_3 , $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, CdCl_2 , CdSO_4 , CoCl_2 , CrCl_3 , $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, CuSO_4 , citrato férrico, GeO_2 , KI, KBr, LI, ácido molibdico, MnSO_4 , MnCl_2 , NaF, Na_2SiO_3 , NaVO_3 , NH_4VO_3 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, NiSO_4 , RbCl, selenio, Na_2SeO_3 , H_2SeO_3 , selenita-2Na, selenometionina, SnCl_2 , ZnSO_4 , ZrOCl_2 , y mezclas y sales de los mismos. Si hay selenio, selenita o selenometionina, es a una concentración de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 0,02 mg/L. Además, también puede haber hidroxilapatita.

[0088] Se contempla que pueden añadirse aminoácidos al medio definido. Ejemplos no limitativos de tales aminoácidos son Glicina, L-Alanina, L-Alanil-L-glutamina, L-Glutamina/Glutamax, clorhidrato de L-Arginina, L-Asparagina- H_2O , ácido L-Aspártico, clorhidrato de L-Cistina- H_2O , L-Cisteína 2HCl, Ácido L-Glutámico, clorhidrato

de L-Histidina-H₂O, L-Isoleucina, L-Leucina, clorhidrato de L-Lisina, L-Metionina, L-Fenilalanina, L-Prolina, L-Hidroxiprolina, L-Serina, L-Treonina, L-Triptófano, dihidrato de sal disódica de L-Tirosina, y L-Valina. En determinados modos de realización, el aminoácido es L-Isoleucina, L-Fenilalanina, L-Prolina, L-Hidroxiprolina, L-Valina, y mezclas de los mismos.

- 5 **[0089]** También se contempla que el medio definido pueda comprender ácido ascórbico. Preferiblemente, el ácido ascórbico está presente en una concentración inicial de aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 1000 mg/L, o de aproximadamente 2 mg/L a aproximadamente 500 mg/L, o de aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 100 mg/L, o de aproximadamente 10 mg/L a aproximadamente 100 mg/L, o aproximadamente 50 mg/L.
- 10 **[0090]** Además, las composiciones y métodos también pueden comprender otros componentes como seroalbúmina, transferrina, L-glutamina, lípidos, antibióticos, β-mercaptoetanol, vitaminas, minerales, ATP, y componentes similares pueden estar presentes. Algunos ejemplos de vitaminas que pueden estar presentes incluyen, pero sin carácter limitativo, vitaminas A, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉, B₁₂, C, D₁, D₂, D₃, D₄, D₅, E, tocotrienoles, K₁ y K₂. Un experto en la materia puede determinar la concentración óptima de minerales, vitaminas, ATP, lípidos, ácidos grasos esenciales, etc., para su utilización en un cultivo determinado. La concentración de suplementos puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 μM a aproximadamente 1 mM o más. Algunos ejemplos de concentraciones a las que pueden proporcionarse los suplementos incluyen, pero sin carácter limitativo, 0,005 μM, 0,01 μM, 0,05 μM, 0,1 μM, 0,5 μM, 1,0 μM, 2,0 μM, 2,5 μM, 3,0 μM, 4,0 μM, 5,0 μM, 10 μM, 20 μM, 100 μM, etc. En un modo de realización específico, las composiciones y métodos pueden comprender vitamina B₆ y glutamina. En otro modo de realización específico, las composiciones y los métodos comprenden vitamina C y un suplemento de hierro. En otro modo de realización específico, las composiciones y métodos comprenden vitamina K₁ y vitamina A. En otro modo de realización específico, las composiciones y los métodos comprenden vitamina D₃ y ATP. En otro modo de realización específico, las composiciones y los métodos comprenden vitamina B₁₂ y transferrina. En otro modo de realización específico, las composiciones y los métodos comprenden tocotrienoles y β-Mercaptoetanol. En otro modo de realización específico, las composiciones y los métodos comprenden glutamina y ATP. En otro modo de realización específico, las composiciones y los métodos comprenden un ácido graso omega-3 y glutamina. En otro modo de realización específico, las composiciones y los métodos comprenden un ácido graso omega-6 y vitamina B₁. En otro modo de realización específico, las composiciones y los métodos comprenden un ácido α-linoleico y B₂.
- 20 **[0091]** Las composiciones dadas a conocer en el presente documento están esencialmente exentas de suero. Tal como se utiliza en la presente memoria, "esencialmente exento de suero" hace referencia a la ausencia de suero en las soluciones. El suero no es un ingrediente esencial para los métodos de la presente invención. Por tanto, la presencia de suero en cualquiera de las composiciones solo debería atribuirse a impurezas, por ejemplo, de los materiales de partida o suero residual del cultivo celular primario. Por ejemplo, un entorno o
- 25 medio esencialmente exento de suero puede contener menos de un 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 % de suero en el que aún se observa la capacidad de mantenimiento bioactivo mejorada actualmente del medio o entorno. En un modo de realización específico, la composición esencialmente exenta de suero no contiene suero o reemplazo de suero, o solo contiene trazas de suero o reemplazo de suero del aislamiento de los componentes del suero o reemplazo de suero que se añaden al medio definido.
- 30 **[0092]** Las composiciones y métodos dados a conocer en el presente documento también comprenden un medio para estimular la actividad de la tirosina quinasa ErbB2 en células diferenciables. Las composiciones y los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden comprender la presencia de al menos un ligando ErbB2. Normalmente, un ligando ErbB2 unirá el receptor ErbB3 y formará dímeros con el receptor ErbB2. El receptor ErbB2 es, a su vez, generalmente responsable de la actividad de la tirosina quinasa intracelular dentro
- 35 de la célula diferenciable.
- [0093]** Tal como se utiliza en el presente documento, el "ligando ErbB2" hace referencia a un ligando que se une al ErbB3, que a su vez forma dímeros con ErbB2, activando por tanto la actividad de la tirosina quinasa de la porción ErbB2 del receptor heterodimérico ErbB2/ErbB3. Ejemplos no limitativos de ligandos ErbB3 incluyen Neuregulina-1; variantes de corte y empalme e isoformas de la Neuregulina-1, que incluyen, pero sin carácter limitativo, HRG-β, HRG-α, Factor de diferenciación NEU (NDF), Actividad inductora del receptor de acetilcolina (ARIA), Factor de crecimiento glial 2 (GGF2), y Factor derivado de neuronas motrices y sensoriales (SMDF); Neuregulina-2; variantes de corte y empalme e isoformas de Neuregulina-2, incluyendo, pero sin carácter limitativo, NRG2-β; Epiregulina; y Biregulina.
- 40 **[0094]** En un modo de realización, los medios para estimular la actividad de la tirosina quinasa dirigida por ErbB2, comprenden al menos un ligando ErbB3 que se selecciona del grupo que consiste en Neuregulina-1, Heregulina-β (HRG-β), Heregulina-α (HRG-α), factor de diferenciación NEU (NDF), actividad inductora del receptor de la acetilcolina (ARIA), factor de crecimiento glial 2 (GGF2), factor derivado de neuronas motoras (SMDF), neuregulina-2, neuregulina-2p, (NRG2-β), Epiregulina, Biregulina, y variantes y fragmentos funcionales de los mismos. Las composiciones y los métodos dados a conocer en el presente documento pueden comprender uno o más medios para estimular la actividad de la tirosina quinasa dirigida por ErbB2, como por
- 45 ejemplo, pero sin carácter limitativo, utilizar más de un ligando ErbB3.

[0095] En un modo de realización más específico, el ligando ErbB3 es HRG- β o una variante o fragmento funcional de la misma. En un modo de realización, la especie de la que se deriva la proteína de adición al cultivo, polipéptido o variante o fragmento funcional del mismo es la misma que la especie de células que se cultivan. Por ejemplo, si se cultivan células madre embrionarias de ratón, una HRG- β con una secuencia de aminoácidos que sea idéntica a la secuencia de HRG- β del *mus musculus* puede utilizarse como un aditivo en el cultivo y se considera que es "de la misma especie". En otros modos de realización, la especie de la que se deriva el aditivo biológico es diferente de las células que se cultivarán. Por ejemplo, si se cultivan células madre embrionarias de ratón, una HRG- β con una secuencia de aminoácidos que sea idéntica a la forma de la secuencia de HRG- β humana puede utilizarse como un aditivo en el cultivo y se considera que es "de especies diferentes".

[0096] Tal como se utiliza en el presente documento, un "fragmento funcional" es un fragmento o variante de corte y empalme de un polipéptido de longitud completa que ejerce un efecto celular o fisiológico similar al polipéptido de longitud completa. El efecto biológico del fragmento funcional no necesita ser idéntico en el alcance o fuerza que el polipéptido de longitud completa, siempre que se vea un efecto celular o fisiológico similar. Por ejemplo, un fragmento funcional de HRG- β puede estimular de manera detectable una tirosina quinasa dirigida por ErbB2.

[0097] Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "variante" incluye polipéptidos de fusión o quiméricos, homólogos, análogos, ortólogos y parálogos. Además, una variante de un polipéptido o proteína de referencia es una proteína o polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos un 80 % a la proteína o polipéptido de referencia. En modos de realización específicos, la variante es idéntica en al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso en un 100 % al polipéptido o proteína de referencia. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "se corresponde(n) con", "correspondiente a", "correspondiendo a" y "que corresponde(n) a", cuando hacen referencia al alineamiento de secuencias, pretenden referirse a posiciones enumeradas dentro de la proteína o polipéptido de referencia, por ejemplo, neuregulina-1 de ratón o humana de tipo natural, y a aquellas posiciones en el polipéptido o proteína modificada que se alinean con las posiciones en la proteína o polipéptido de referencia. Por consiguiente, cuando la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o una proteína objeto se alinea con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o proteína de referencia, la secuencia que "se corresponde con" determinadas posiciones enumeradas de la secuencia de la proteína o polipéptido de referencia son aquellas que se alinean con estas posiciones de la secuencia de referencia, pero no están necesariamente en estas posiciones numéricas exactas de la secuencia de referencia. A continuación se describen los métodos para alinear las secuencias para determinar los aminoácidos correspondientes entre secuencias.

[0098] Un polipéptido que presente una secuencia de aminoácidos idéntica al menos, por ejemplo, en aproximadamente un 95 % a una secuencia de aminoácidos de referencia que codifica, por ejemplo, TGF- β , se entiende que se refiere a que la secuencia de aminoácidos del polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia de aminoácidos puede incluir hasta aproximadamente cinco modificaciones por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia que codifica el TGF- β de referencia. Dicho de otro modo, para obtener un polipéptido que presente una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos aproximadamente un 95 % a una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta aproximadamente un 5 % de los residuos de aminoácidos de la secuencia de referencia pueden estar delecionados o sustituidos con otro aminoácido o un número de aminoácidos de hasta el 5 % del total de los aminoácidos de la secuencia de referencia pueden insertarse en la secuencia de referencia. Estas modificaciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones N-terminal o C-terminal de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier sitio entre esas posiciones terminales, intercaladas o bien individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

[0099] Tal como se utiliza en la presente memoria, "identidad" es una medida de la identidad de las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos en comparación con una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de referencia. En general, las secuencias se alinean de manera que se obtenga un emparejamiento del más alto nivel. "Identidad", *per se*, tiene un significado reconocido en la materia y puede calcularse utilizando técnicas publicadas. (Véase, por ejemplo, *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York (1988); *Biocomputing: Informatics And Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data*, Part I, Griffin, A. M., & Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey (1994); von Heinje, G., *Sequence Analysis In Molecular Biology*, Academic Press (1987); y *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. & Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York (1991)). Aunque existan varios métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polipéptidos o de polinucleótidos, el término "identidad" es bien conocido por los expertos en la materia (Carillo, H. & Lipton, D., *Siam J Applied Math* 48:1073 (1988)). Entre los métodos empleados de manera más frecuente para determinar la identidad o similitud entre dos secuencias se incluyen, pero sin carácter limitativo, los que se dan a conocer en *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego (1994) y Carillo, H. & Lipton, D., *Siam J Applied Math* 48:1073 (1988). Los programas informáticos también pueden contener métodos y algoritmos que calculen la identidad y la similitud. Algunos ejemplos de métodos de programas informáticos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero sin carácter limitativo, el paquete de programa GCG (Devereux,

J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(i):387 (1984)), BLASTP, ExpASy, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F., et al., *J Molec Biol* 215:403 (1990)) y FASTDB. En Michaels, G. & Garian, R., *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc. (2000) se analizan ejemplos de métodos para determinar la identidad y la similitud. En un modo de realización de la presente invención, el algoritmo utilizado para determinar la identidad entre dos o más polipéptidos es BLASTP.

[0100] En otro modo de realización de la presente invención, el algoritmo utilizado para determinar la identidad entre dos o más polipéptidos es FASTDB, que está basado en el algoritmo de Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)). En un alineamiento de secuencias en FASTDB, la secuencia objeto y de consulta son secuencias de aminos. El resultado del alineamiento de secuencias se da en porcentaje de identidad. Entre los parámetros que pueden utilizarse en un alineamiento por FASTDB de secuencias de aminoácidos para calcular el porcentaje de identidad se incluyen, pero sin carácter limitativo: Matriz=PAM, k-tupla = 2, Penalización por desemparejamiento = 1, Penalización de unión = 20, Longitud del grupo de aleatorización = 0, Puntuación de corte = 1, Penalización por huecos = 5, Penalización por tamaño de huecos 0,05, Tamaño de ventana = 500 o la longitud de la secuencia de aminoácidos objeto, la que sea más corta.

[0101] Si la secuencia objeto es más corta o más larga que la secuencia de consulta debido a adiciones o eliminaciones en el extremo N-terminal o C-terminal, no debido a adiciones o eliminaciones internas, se puede realizar una corrección manual, dado que el programa FASTDB no tiene en cuenta las adiciones o truncamientos de los extremos N-terminal y C-terminal de la secuencia objeto al calcular el porcentaje de identidad. Para secuencias objeto truncadas en los extremos 5' o 3', con respecto a la secuencia de consulta, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de bases de la secuencia de consulta que son extremos N y C-terminal para la secuencia de referencia que no está emparejada/alienada, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia de consulta. Los resultados del alineamiento de secuencias por FASTDB determinan el emparejamiento/alineamiento. El porcentaje de alineamiento se resta después del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB mencionado anteriormente utilizando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación corregida puede utilizarse a fin de determinar cómo "se corresponden" los alineamientos entre sí, así como el porcentaje de identidad. Los residuos de las secuencias de consulta (objeto) o las secuencias de referencia que se extiendan más allá de los extremos N o C-terminales de la secuencia objeto o de referencia, respectivamente, pueden tenerse en cuenta para los propósitos de ajustar manualmente la puntuación del porcentaje de identidad. Esto es, los residuos que no estén emparejados/alineados con los extremos N y C-terminales de la secuencia de comparación pueden contarse cuando se ajuste de forma manual la puntuación del porcentaje de identidad o la numeración del alineamiento.

[0102] Por ejemplo, una secuencia objeto con un residuo de 90 aminoácidos se alinea con una secuencia de referencia con 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad. La delección ocurre en el extremo N-terminal de la secuencia objeto y por tanto, el alineamiento con FASTDB no muestra un emparejamiento/alineamiento de los primeros 10 residuos en el extremo N-terminal. Los 10 residuos desaparejados representan el 10 % de la secuencia (número de residuos en los extremos N y C-terminales sin emparejamiento/número total de residuos en la secuencia de consulta) de manera que se sustrae un 10 % de la puntuación del porcentaje de identidad calculado por el programa FASTDB. Si los 90 residuos restantes estuvieran perfectamente emparejados, el porcentaje de identidad final sería un 90 %. En otro ejemplo, una secuencia objeto de 90 residuos se compara con una secuencia de referencia de 100. Esta vez las delecciones son delecciones internas de manera que no hay residuos en los extremos N o C-terminales de la secuencia sujeto que no están emparejados/alineados con la consulta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige de manera manual.

[0103] También se dan a conocer polipéptidos quiméricos o de fusión. Tal como se utiliza en el presente documento, un "polipéptido quimérico" o "polipéptido de fusión" comprende al menos una porción de un miembro del polipéptido de referencia unido de manera operativa a un segundo polipéptido diferente. El segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que se corresponde con un polipéptido que no es sustancialmente idéntico al polipéptido de referencia, y que se deriva de un organismo igual o diferente. En relación con el polipéptido de fusión, el término "unido de manera operativa" pretende indicar que el polipéptido de referencia y el segundo polipéptido están unidos entre sí de manera que ambas secuencias realizan la función propuesta atribuida a la secuencia utilizada. El segundo polipéptido puede estar unido al N-terminal o al C-terminal del polipéptido de referencia. Por ejemplo, el polipéptido de fusión puede ser un polipéptido de fusión GST-IGF1 en el que una secuencia IGF-1 está unida al C-terminal de las secuencias GST. Dichos polipéptidos de fusión pueden facilitar la purificación de polipéptidos recombinantes. El polipéptido de fusión puede contener una secuencia señal heteróloga a su N-terminal. En determinadas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamíferos), la expresión y/o secreción de un polipéptido puede aumentarse mediante el uso de una secuencia señal heteróloga.

[0104] Además de polipéptidos de fusión y fragmentos, también se dan a conocer los homólogos y análogos de polipéptidos de origen natural. Los "homólogos" se definen en la presente memoria como dos ácidos nucleicos o polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos o nucleótidos "idénticas" o similares, respectivamente. Los homólogos incluyen variantes alélicas, ortólogos, parálogos, agonistas, y antagonistas tal como se definirá a continuación. El término "homólogo" abarca además moléculas de ácido nucleico que difieren de una secuencia

nucleotídica de referencia debido a la degeneración del código genético y por tanto codifican el mismo polipéptido que el que codifica la secuencia nucleotídica de referencia. Tal como se utiliza en el presente documento, "de origen natural" se refiere a una secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos que ocurre en la naturaleza.

5 **[0105]** Un agonista de un polipéptido puede conservar sustancialmente las mismas, o un subconjunto de las actividades biológicas del polipéptido. Un antagonista de un polipéptido puede inhibir una o más de las actividades de la forma de origen natural del polipéptido.

10 **[0106]** El ligando ErbB3 puede ser HRG- β o una variante o un fragmento funcional del mismo. En los documentos de patente estadounidenses n.º 6,136,558, 6,387,638, y 7,063,961 se dan a conocer ejemplos adicionales no limitativos de ligandos ErbB3.

15 **[0107]** Las heregulinas se clasifican por lo general en dos tipos principales, alfa y beta, en función de dos variantes de dominios similares a EGF que difieren en sus porciones C-terminales. No obstante, estos dominios similares a EGF son idénticos en la separación de seis residuos de cisteína contenidos en los mismos. En función de una comparación de secuencias de aminoácidos, Holmes et al. observaron que entre las primeras y sextas cisteínas en el dominio similar a EGF, las HRG eran similares en un 45 % al factor de crecimiento similar al EGF de unión a heparina, idénticas en un 35 % a la anfiregulina (AR), idénticas en un 32 % al TGF- α , e idénticas en un 27 % a EGF.

20 **[0108]** El factor de diferenciación NEU (NDF) de 44 kDa es el equivalente de rata de la HRG humana. Al igual que los polipéptidos de HRG, el NDF tiene un dominio de homología de inmunoglobulina (Ig) seguido de un dominio similar a EGF y le falta un péptido señal N-terminal. En la actualidad, hay al menos seis pro-NDF fibroblásticos distintos, clasificados como polipéptidos alfa o beta, en función de las secuencias de los dominios similares a EGF. Las isoformas 1 a 4 se caracterizan en función de una elasticidad variable entre el dominio similar a EGF y el dominio de transmembrana. Por tanto, parece que se generan isoformas de NDF diferentes por un corte y empalme alternativo y pueden realizar distintas funciones específicas de los tejidos. Véanse los documentos de patente EP 505 148; WO 93/22424; y WO 94/28133.

25 **[0109]** Las composiciones y métodos dados a conocer pueden estar exentos de insulina exógena y de sustitutos de insulina. La expresión "insulina exógena o sustitutos de insulina" se utiliza en el presente documento para indicar la insulina o sustitutos de insulina que no se añade(n) de manera intencional a las composiciones o métodos dados a conocer en el presente documento. Por tanto, los métodos y composiciones pueden estar exentos de insulina o de sustitutos de insulina que se suministren de manera intencionada. Las composiciones y métodos pueden, sin embargo, no carecer necesariamente de insulina endógena. Como se usa en el presente documento, "insulina endógena" indica que las células cultivadas pueden estar produciendo insulina por sí mismas cuando se cultivan de acuerdo con los métodos de la presente invención. La insulina endógena también puede usarse para indicar impurezas residuales del cultivo celular primario o impurezas de los materiales de partida. En modos de realización específicos, las composiciones y métodos de la presente invención contienen menos de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 $\mu\text{g/ml}$ de IGF-1.

30 **[0110]** Según se utiliza en el presente documento, el término "insulina" se refiere a la proteína, o variante o fragmento de la misma, que se une al receptor de insulina en concentraciones fisiológicas normales y puede inducir la señalización a través del receptor de insulina. El término "insulina" abarca una proteína que tiene la secuencia polipeptídica de la insulina humana nativa, o de otra insulina de mamífero, o de cualquiera de los homólogos o variantes de estas secuencias. De manera adicional, el término insulina abarca fragmentos polipeptídicos que tienen la capacidad de unirse al receptor de insulina para inducir la señalización a través del receptor de insulina. La expresión "sustituto de insulina" se refiere a cualquier compuesto que contiene zinc que pueda usarse en lugar de la insulina, para proporcionar resultados sustancialmente similares a los de la insulina. 45 Algunos ejemplos de sustitutos de insulina incluyen, pero sin carácter limitativo, cloruro de zinc, nitrato de zinc, bromuro de zinc y sulfato de zinc.

50 **[0111]** Para ser claros, los factores de crecimiento insulínicos no son sustitutos de la insulina u homólogos de la insulina, como se contempla en la presente invención. Por consiguiente, en otro modo de realización específico, las composiciones y métodos dados a conocer en el presente documento comprenden el uso de al menos un factor de crecimiento insulínico (IGF) o una variante o un fragmento funcional del mismo. En otro modo de realización, las composiciones y métodos dados a conocer en el presente documento carecen de cualquier factor de crecimiento insulínico (IGF) exógeno. En modos de realización específicos, las composiciones y métodos dados a conocer en el presente documento contienen menos de 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 ng/ml de IGF-1.

55 **[0112]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "activador de IGF-1R" se refiere a mitógenos que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la diferenciación, apoptosis y proliferación celular. Los efectos de un activador de IGF-1R están mediados normalmente a través del IGF-1, aunque pueden estar mediados a través de otros receptores. El IGF-1R también está implicado en la transformación celular inducida por proteínas de virus tumoral y productos oncogénicos, y la interacción se regula mediante un grupo de 60 proteínas de unión específicas (IGFBP, por sus siglas en inglés). Además, un gran grupo de proteasas IGFBP

hidrolizan las IGFBP, dando como resultado la liberación de IGF unidas que luego reanudan su habilidad para interactuar con IGF-IR. Para los fines de la presente invención, los ligandos, los receptores, las proteínas de unión, y las proteasas se consideran todos activadores del IGF-1R. En un modo de realización, el activador de IGF-1R es IGF-1 o IGF-2. En un modo de realización adicional, el activador de IGF-1R es un análogo de IGF-1.

5 Algunos ejemplos no limitativos de análogos de IGF-1 incluyen LongR3-IGF1, Des(1-3)IGF-1, [Arg³]IGF-1, [Ala³¹]IGF-1, Des(2,3)[Ala³¹]IGF-1, [Leu²⁴]IGF1, Des(2,3)[Leu²⁴]IGF-1, [Leu⁶⁰]IGF-1, [Ala³¹][Leu⁶⁰]IGF-1, [Leu²⁴][Ala³¹]IGF-1, y combinaciones de los mismos. En un modo de realización adicional, el análogo del IGF-1 es LongR3-IGF1, que es un análogo recombinante del factor de crecimiento insulínico 1 humano. Se contempla que el LongR3-IGF1 está presente inicialmente a una concentración de aproximadamente 1 ng/ml a
10 aproximadamente 1000 ng/ml, más preferiblemente de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, más preferiblemente de aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, más preferiblemente de aproximadamente 100 ng/ml a aproximadamente 300 ng/ml, o a una concentración de aproximadamente 100 ng/ml.

[0113] En determinados modos de realización, las composiciones y métodos dados a conocer en el presente documento comprenden transformar el factor de crecimiento beta (TGF- β) o un miembro de la familia del TGF- β o variantes o fragmentos funcionales del mismo. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "elemento de la familia del TGF- β " o similares hace referencia a factores de crecimiento que un experto en la materia caracteriza como que pertenece a la familia del TGF- β , o bien debido a una homología con miembros conocidos de la familia del TGF- β , o bien por la similitud en la función con miembros conocidos de la familia del TGF- β . En modos de realización concretos, si el elemento de la familia del TGF- β está presente, el elemento de la familia del TGF- β de la variante o fragmento funcional del mismo activa la SMAD 2 o 3. En determinados modos de realización, el elemento de la familia TGF- β se selecciona del grupo que consiste en Nodal, Activina A, Activina B, TGF- β , proteína morfogénica ósea 2 (BMP2, por sus siglas en inglés) y proteína morfogénica ósea 4 (BMP4). En un modo de realización, el elemento de la familia TGF- β es Activina A.

25 **[0114]** Se contempla que si el Nodal está presente, está presente inicialmente a una concentración de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 2000 ng/ml, más preferiblemente de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 1000 ng/ml, más preferiblemente de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 750 ng/ml, o más preferiblemente de aproximadamente 25 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml. Se contempla que si se utiliza, la Activina A está presente inicialmente a una concentración de aproximadamente 0,01 ng/ml a
30 aproximadamente 1000 ng/ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 25 ng/ml, o más preferiblemente de aproximadamente 10 ng/ml. Se contempla que si está presente, el TGF- β está presente inicialmente a una concentración de aproximadamente 0,01 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml, o más preferiblemente de aproximadamente 0,1 ng/ml a
35 aproximadamente 20 ng/ml.

[0115] Las composiciones y métodos expuestos en el presente documento pueden estar exentos de activadores de receptores de FGF. Actualmente, hay al menos 22 miembros conocidos de la familia de los factores de crecimiento de fibroblastos, con estos factores uniéndose a uno de al menos uno de los cuatro receptores de FGF. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "activador de un receptor de FGF" hace referencia a factores de crecimiento que por lo general un experto en la materia caracteriza como que pertenecen a la familia del FGF, o bien debido a una homología con miembros conocidos de la familia del FGF, o bien por la similitud en la función con miembros conocidos de la familia del FGF. En determinados modos de realización, el activador de un receptor de FGF es un FGF, como por ejemplo, pero sin carácter limitativo, α -FGF y FGF2. En modos de realización concretos, las composiciones y métodos están exentos de FGF2 exógeno. La expresión "FGF2 exógeno" se utiliza en el presente documento para indicar el factor de crecimiento de fibroblastos 2, es decir, un FGF básico que no está añadido de manera intencional a las composiciones o métodos dados a conocer en el presente documento. Por tanto, en determinados modos de realización, los métodos y composiciones pueden estar exentos de FGF2 suministrado de manera intencional. Las composiciones o métodos pueden, sin embargo, no estar necesariamente exentas de FGF2 endógeno. Como se usa en el presente documento, "FGF2 endógeno" indica que las células cultivadas pueden estar produciendo FGF2 por sí mismas cuando se cultivan de acuerdo con los métodos de la presente invención. "FGF2 endógeno" también puede usarse para indicar impurezas residuales del cultivo celular primario o impurezas de los materiales de partida. En ejemplos específicos, las composiciones y métodos de la presente invención contienen menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 ng/ml de FGF2.

55 **[0116]** No obstante, se contempla que las composiciones y los métodos dados a conocer en el presente documento pueden incluir al menos un activador de un receptor de FGF, incluyendo cualquiera de los polipéptidos FGF, fragmentos funcionales de los mismos o variantes de los mismos. Se contempla que si el FGF2 está presente, está presente inicialmente a una concentración de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml,
60 más preferiblemente de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 25 ng/ml, más preferiblemente de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 12 ng/ml, o más preferiblemente a una concentración de aproximadamente 8 ng/ml. En otro modo de realización específico, las composiciones y métodos dados a

conocer en el presente documento pueden incluir al menos un activador del receptor de FGF, distinto al FGF2. Por ejemplo, las composiciones y métodos dados a conocer en la presente memoria pueden comprender al menos uno de entre FGF-7, FGF-10 o FGF-22 o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. En modos de realización específicos, está presente una combinación de al menos dos de entre FGF-7, FGF-10 y FGF-22, o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. En otro modo de realización, están presentes los tres, FGF-7, FGF-10 y FGF-22, o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. Se contempla que si cualquiera de entre FGF-7, FGF-10 o FGF-22 está presente, está presente inicialmente a una concentración de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml, más preferiblemente de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 25 ng/ml, más preferiblemente de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 12 ng/ml, o más preferiblemente a una concentración de aproximadamente 8 ng/ml.

[0117] En determinados modos de realización adicionales, las composiciones y métodos dados a conocer en la presente memoria comprenden seroalbúmina (SA). En modos de realización específicos, la SA es o bien SA bovina (BSA) o SA humana (HAS). En modos de realización más específicos, la concentración de SA es de más de aproximadamente un 0,2 %, volumen a volumen (v/v), pero menos de aproximadamente un 10 % v/v. En modos de realización aún más específicos, la concentración de SA es de más de aproximadamente un 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1,0 %, 1,2 %, 1,4 %, 1,6 %, 1,8 %, 2,0 %, 2,2 %, 2,4 %, 2,6 %, 2,8 %, 3,0 %, 3,2 %, 3,4 %, 3,6 %, 3,8 %, 4,0 %, 4,2 %, 4,4 %, 4,6 %, 4,8 %, 5,0 %, 5,2 %, 5,4 %, 5,6 %, 5,8 %, 6,0 %, 6,2 %, 6,4 %, 6,6 %, 6,8 %, 7,0 %, 7,2 %, 7,4 %, 7,6 %, 7,8 %, 8,0 %, 8,2 %, 8,4 %, 8,6 %, 8,8 %, 9,0 %, 9,2 %, 9,4 %, 9,6 % y 9,8 % (v/v).

[0118] En modos de realización adicionales, las composiciones y métodos comprenden al menos un sustrato insoluble. Por ejemplo, las células diferenciables se pueden colocar en una superficie de cultivo celular que comprende tales compuestos como, pero sin carácter limitativo, poliestireno y polipropileno. La superficie, a su vez, puede estar recubierta de un sustrato insoluble. En modos de realización específicos, el sustrato insoluble se selecciona del grupo que consiste en un colágeno, una fibronectina, y fragmentos o variantes de los mismos. Otros ejemplos de sustratos insolubles incluyen, pero sin carácter limitativo, fibrina, elastina, fibronectinas, lamininas y nidógenos.

[0119] En consecuencia, los entornos de cultivo celular y los métodos de la presente invención comprenden sembrar las células en un cultivo adherente. Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "sembrado/a" y "sembrar" se refieren a cualquier procedimiento que permita cultivar una célula en un cultivo adherente. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "cultivo adherente" se refiere a un sistema de cultivo celular mediante el cual las células se cultivan sobre una superficie sólida, que a su vez puede estar recubierta con un sustrato insoluble que a su vez puede estar recubierto con otra capa superficial de un sustrato, como los enumerados a continuación, o cualquier otro material químico o biológico que permita a las células proliferar o estabilizarse en cultivo. Las células pueden adherirse o no firmemente a la superficie sólida o al sustrato. El sustrato para el cultivo adherente puede comprender uno cualquiera o una combinación de poliornitina, laminina, polilisina, colágeno purificado, gelatina, fibronectina, tenascina, vitronectina, entactina, proteoglicanos de sulfatos de heparina, ácido poliglucólico (PGA), ácido poliláctico (PLA) y poli(ácido láctico-glucólico) (PLGA). Además, el sustrato para el cultivo adherente puede comprender la matriz depositada por una capa alimentadora, o depositada por la célula humana pluripotente o cultivo celular. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "matriz extracelular" abarca sustratos sólidos como por ejemplo, pero sin carácter limitativo, los descritos anteriormente, así como la matriz depositada por una capa de célula alimentadora o por la célula humana pluripotente o cultivo celular. En un modo de realización, las células se siembran en placas recubiertas con MATRIGEL™. En otro modo de realización, las células se siembran en placas recubiertas con fibronectina. En determinados modos de realización, si las células se siembran en fibronectina, las placas se preparan recubriendo con 10 µg/ml de fibronectina de plasma humano (Invitrogen, #33016-015), diluida en agua de grado tisular, durante 2-3 horas a temperatura ambiente. En otro modo de realización, puede colocarse suero en el medio durante hasta 24 horas para permitir que las células se siembren en el plástico. Si se utiliza suero para estimular la adhesión de las células, el medio se retira después y las composiciones, que están esencialmente exentas de suero, se añaden a las células sembradas.

[0120] Las composiciones y métodos dados a conocer en el presente documento, contemplan que las células diferenciables se cultivan en condiciones que están esencialmente exentas de células alimentadoras o de una capa de células alimentadoras. Tal como se utiliza en el presente documento, una "célula alimentadora" es una célula que crece *in vitro*, que está cocultivada con una célula diana y estabiliza la célula diana en su estado actual de diferenciación. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "capa de células alimentadoras" puede utilizarse de manera intercambiable con el término "célula alimentadora". Tal como se utiliza en el presente documento, el término "esencialmente exento de células alimentadoras" se refiere a condiciones de cultivo de tejidos que no contienen células alimentadoras o que contienen un número mínimo de células alimentadoras. Por "mínimo", se entiende el número de células alimentadoras que se transfiere a las condiciones de cultivo presentes a partir de las condiciones de cultivo previas, en las que las células diferenciables pueden haberse cultivado en células alimentadoras. En un modo de realización del método anterior, el medio condicionado se obtiene a partir de una célula alimentadora que estabiliza la célula diana en su estado actual de diferenciación.

En otro modo de realización, el medio definido es un medio no condicionado, que es un medio que no se obtiene de una célula alimentadora.

5 **[0121]** Como se usa en el presente documento, el término "estabilizar", cuando se usa en referencia al estado de diferenciación de una célula o cultivo celular, indica que las células continuarán proliferando a lo largo de
 10 múltiples pases en cultivo, y preferentemente de manera indefinida en cultivo, donde la mayoría, si no todas, las células en el cultivo tienen el mismo estado de diferenciación. Además, cuando las células estabilizadas se dividen, la división normalmente produce células del mismo tipo de célula o produce células del mismo estado de diferenciación. En general, una célula o población celular estabilizada no se diferencia o desdiferencia
 15 adicionalmente si las condiciones del cultivo celular no se modifican, y las células continúan pasándose y no crecen excesivamente. En un modo de realización, la célula que está estabilizada tiene la capacidad de proliferar en el estado estable de forma indefinida, o durante al menos más de 2 pases. En un modo de realización específico, las células son estables durante más de 3 pases, 4 pases, 5 pases, 6 pases, 7 pases, 8 pases, 9 pases, más de 10 pases, más de 15 pases, más de 20 pases, más de 25 pases o más de 30 pases. En un modo de realización, la célula es estable durante más de aproximadamente 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5
 20 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses u 11 meses de realizar pases de forma continua. En otro modo de realización, la célula es estable durante más de aproximadamente 1 año de pases continuos. En un modo de realización, las células madre se mantienen en cultivo en un estado pluripotente por el pase de rutina en el medio definido, hasta que se desee que se diferencien. Como se usa en el presente documento, el término "proliferar" se refiere a un aumento del número de células en un cultivo celular.

20 **[0122]** En determinados modos de realización, las composiciones y métodos comprenden un inactivador de señalización de BMP. Tal como se utiliza en el presente documento, un "inactivador de la señalización de BMP" hace referencia a un agente que actúa como antagonista en la actividad de una o más proteínas BMP o cualquiera de sus componentes de señalización anteriores o posteriores a través de cualquiera de sus posibles
 25 rutas de señalización. El compuesto(s) utilizado(s) para inactivar la señalización de BMP puede(n) ser cualquier compuesto conocido en la técnica, o descubierto posteriormente. Algunos ejemplos no limitativos de inactivadores de la señalización de BMP incluyen receptores de BMP truncados dominantes negativos, receptores de BMP solubles, quimeras Fc-receptor BMP, nogina, folistatina, cordina, grelina, proteínas de la familia DAN/Cerberus, ventropina, activina a dosis altas, y amnionless.

30 **[0123]** En determinados modos de realización, las composiciones y métodos pueden comprender al menos una hormona, citoquina, adipoquina, hormona de crecimiento o variante o fragmento funcional de las mismas. En la actualidad se contempla que en determinados modos de realización, la hormona de crecimiento presente en el medio definido será de la misma especie que las células diferenciables que se cultivan con el medio definido. Por lo tanto, por ejemplo, si se cultiva una célula humana, la hormona de crecimiento es hormona de crecimiento humana. El uso de hormona de crecimiento que es de una especie distinta a la de las células cultivadas también
 35 se contempla. Preferiblemente, la hormona, citoquina, adipoquina y/u hormona de crecimiento está presente a una concentración inicial de aproximadamente 0,001 ng/ml a aproximadamente 1000 ng/ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,001 ng/ml a aproximadamente 250 ng/ml, o más preferiblemente de aproximadamente 0,01 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml.

40 **[0124]** Entre los ejemplos de citoquinas y adipoquinas que pueden incluirse en las composiciones y métodos dados a conocer en la presente memoria se incluyen, pero sin carácter limitativo, la familia de cuatro haces de hélice alfa de las citoquinas, la familia de interleuquina-1 (IL-1) de las citoquinas, la familia IL-17 de las citoquinas y la familia de quimiocinas de las citoquinas. Por supuesto, la invención contempla miembros y subclases de cada una de estas familias de citoquinas, como por ejemplo, pero sin carácter limitativo, quimiocinas CC, quimiocinas CXC, quimiocinas C y quimiocinas CX₃C, interferones, interleuquinas, limfotoxinas, ligando c-kit,
 45 factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), leptina, adiponectina, resistina, inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), factor de necrosis tumoral beta (TNF β), factor inhibidor de la leucemia, visfatina, proteína de unión al retinol 4 (RBP4), eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (THPO). Por supuesto, un experto en la materia entenderá que la invención
 50 contempla variantes de fragmentos funcionales de los factores enumerados anteriormente.

[0125] La presente invención hace referencia a métodos de cultivo de células diferenciables, comprendiendo los métodos sembrar células diferenciables en una superficie de cultivo celular, proporcionar una solución salina nutritiva basal a las células y proporcionar un medio para estimular la actividad de la tirosina quinasa dirigida a ErbB2 en las células.

55 **[0126]** En un modo de realización, las células diferenciables se ponen en contacto con al menos una de las composiciones de la invención en ausencia de suero o reemplazo de suero, y en ausencia de una capa de células alimentadoras, de manera que las células se mantienen en un estado no diferenciado durante al menos un mes. La pluripotencia se puede determinar mediante la caracterización de las células con respecto a marcadores de superficie, marcadores transcripcionales, el cariotipo y la capacidad de diferenciarse a células de
 60 las tres capas germinales. Estas características son bien conocidas para los expertos en la materia.

[0127] Los agregados de células descritos en el presente documento pueden suspenderse en cualquier medio fisiológicamente aceptable, normalmente elegido según el tipo(s) de célula(s) involucrado(s). El medio de cultivo puede comprender, por ejemplo, nutrientes básicos como azúcares y aminoácidos, factores de crecimiento, antibióticos (para minimizar la contaminación) y similares. En otro modo de realización, las células diferenciables se cultivan en suspensión, utilizando el medio celular tal como se describe en el presente documento. El término "suspensión" tal como se utiliza en el contexto del cultivo celular se utiliza tal como es en la técnica. Esto es, las suspensiones de cultivos celulares son entornos de cultivo celular donde las células o agregados de células no se adhieren a una superficie. Un experto en la materia estará familiarizado con las técnicas de cultivo en suspensión, que incluyen, pero sin carácter limitativo, el uso de equipo como campanas de flujo, incubadoras, y/o equipo utilizado para mantener las células en movimiento constante, como plataformas giratorias, agitadoras, etc., si fuese necesario. Tal como se utiliza en la presente memoria, las células están "en movimiento" si se están moviendo, o si su entorno inmediato se está moviendo en relación con las células. Si las células se mantienen "en movimiento", el movimiento será, en un modo de realización, un "movimiento suave" o "agitación suave" que está diseñado para evitar o impedir que las células se expongan a una tensión de cizallamiento.

[0128] En la técnica se conocen varios métodos para hacer agregados de células, como, por ejemplo, el método de "gota colgante" en el que las células en una gota invertida de medio de cultivo tisular se hunden hasta el fondo de la gota donde se agregan; agitar suspensiones de células en un matraz de laboratorio; y varias modificaciones de estas técnicas. Véanse, por ejemplo, N. E. Timmins, *et al.* (2004) *Angiogenesis* 7, 97-103; W. Dai, *et al.*, (1996) *Biotechnology and Bioengineering* 50, 349-356; R. A. Foty, *et al.* (1996) *Development* 122, 1611-1620; G. Forgacs, *et al.* (2001) *J. Biophys.* 74, 2227-2234 (1998); K. S. Furukawa, *et al.*, *Cell Transplantation* 10,441-445; R. Glicklis, *et al.* (2004) *Biotechnology and Bioengineering* 86, 672-680; Carpenedo *et al.*, (2007) *Stem Cells* 25, 2224-2234; y T. Korff, *et al.*, (2001) *FASEB J.* 15, 447-457. Más recientemente, los agregados de células se han formado al raspar colonias con micropatrones en suspensión, al centrifugar colonias fuera de placas de microtitulación y en suspensión o utilizando pipetas para desprender y suspender colonias cultivadas en micropocillos con patrones (Ungrin *et al.*, (2008) *PLoS ONE* 3(2), 1-12; Bauwens *et al.* (2008) *Stem Cells*, publicado en línea el 26 de junio de 2008). Aunque pueden utilizarse dichos métodos para producir agregados de células descritos en el presente documento, los agregados de células producidos en el presente documento se optimizan para una diferenciación dirigida sincrona tal como se describe en d'Amour *et al.* 2006, *supra.* Además, a diferencia de estos otros métodos, los métodos para producir los agregados de células en suspensión descritos en el presente documento son susceptibles de una fabricación a gran escala.

[0129] En general, las composiciones del medio celular dadas a conocer en la presente memoria se refrescan al menos una vez al día, pero el medio puede cambiarse con más o menos frecuencia, dependiendo de las necesidades específicas y circunstancias del cultivo en suspensión. *In vitro*, las células se suelen cultivar en un medio de cultivo en un modo por lotes y se exponen a las condiciones de varios medios. Tal como se describe en la presente memoria, las células existen en un cultivo en placa o bien como cultivos adherentes o bien como agregados de células en suspensión, y se mantienen en contacto con un medio de cultivo circundante; y el medio de desecho se sustituye con regularidad. En general, el medio de cultivo puede refrescarse aproximadamente cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas, o cualquier fracción de las mismas. En ejemplos adicionales, el medio puede refrescarse con menos frecuencia, como por ejemplo, pero sin carácter limitativo, cada 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o cada 2 o más días, o cualquier margen de tiempo intermedio.

[0130] Además, en otro modo de realización, se emplean métodos de perfusión para evitar la degradación de factores de crecimiento y otros agentes que han de reemplazarse con frecuencia; o la perfusión como un medio para reducir los productos de desecho del medio de cultivo durante un periodo de tiempo. Por ejemplo, el documento de patente estadounidense n.º 5,320,963 describe un biorreactor para un cultivo de perfusión de células en suspensión. La patente estadounidense con n.º 5,605,822 describe un sistema de biorreactor, que emplea células estromales para proporcionar factores de crecimiento, para el cultivo de células HSC en un cultivo por perfusión. La patente estadounidense con n.º 5,646,043 describe el cultivo de células HSC por perfusión periódica y continua que incluye composiciones de medios para el cultivo de células HSC. La patente estadounidense con n.º 5,155,035 describe un biorreactor para el cultivo de células en suspensión por rotación en medio fluido.

[0131] En general, las células que se cultivan en suspensión en las composiciones del medio celular dadas a conocer en la presente memoria se "dividen" o se "pasan" aproximadamente cada semana, pero las células pueden dividirse con más o menos frecuencia, dependiendo de las necesidades específicas y circunstancias del cultivo en suspensión. Por ejemplo, las células pueden dividirse cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días, o en cualquier margen de tiempo intermedio. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dividir" o "pasar", en el contexto del cultivo celular se utiliza tal como es en la técnica. Esto es, la división o pase de cultivos celulares es la recogida de células de un cultivo anterior y posteriormente transferir un número reducido de células recogidas (recolectadas) a un nuevo recipiente de cultivo. En general, los pases de células permiten que las células sigan creciendo en un entorno de cultivo celular sano. Un experto en la materia estará familiarizado con el proceso y los métodos para pasar un cultivo celular, que pueden conllevar, pero no

necesariamente, el uso de métodos enzimáticos o no enzimáticos que pueden utilizarse para disgregar células que se han agrupado durante su expansión al crecer.

[0132] En algunos ejemplos, puede ocurrir cierto grado de muerte celular en las células cultivadas (suspendidas y adherentes) de manera inmediata tras el pase. En un modo de realización, las células diferenciables pueden "recuperarse" del pase, al retrasar el cambio del medio celular durante más de 24 horas. Después, el medio celular podría cambiarse con más frecuencia. En otro modo de realización, el medio de cultivo celular puede comprender además un inhibidor de la muerte celular. Por ejemplo, Wantanabe *et al.*, dieron a conocer recientemente el uso de un inhibidor de Rho-quinasa, Y27632, para proteger las células madre embrionarias después de la disociación. Véase Wantanabe, K., *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 25(6):681-686 (2007). En modos de realización adicionales, el medio de cultivo celular puede comprender inhibidores de caspasa, factores de crecimiento u otros factores tróficos para evitar o atenuar la muerte celular inmediatamente tras el pase. Entre los ejemplos específicos de compuestos que pueden utilizarse se incluyen, pero sin carácter limitativo, HA 1077, diclorhidrato, hidroxifasudil, inhibidor de Rho-quinasa, inhibidor de Rho-quinasa II, inhibidor de Rho-quinasa III, inhibidor de quinasa IV y Y27632, que están todos disponibles en el mercado. En otro modo de realización adicional, los compuestos o factores utilizados para evitar o atenuar la muerte celular durante o inmediatamente después de pasar las células pueden retirarse del cultivo celular después de que las células se hayan recuperado del proceso de pase. En un modo de realización adicional, los agregados de células madre embrionarias no diferenciadas se agregan de manera efectiva en un medio base estándar y no necesitan Y27632 ni otras intervenciones para mantener la viabilidad durante la disociación y agregación.

[0133] En modos de realización adicionales, las composiciones y los métodos dados a conocer en la presente memoria también pueden comprender la presencia o uso de tensioactivos. En un modo de realización concreto, las composiciones y métodos comprenden al menos un tensioactivo en el contexto de un cultivo en suspensión. Los tensioactivos se conocen bien en la técnica y, en líneas generales, son de naturaleza anfifílica. En modos de realización específicos, la presente invención comprende el uso de al menos un tensioactivo que es o bien aniónico, catiónico, no iónico o zwitteriónico. La concentración del tensioactivo utilizado en las composiciones y métodos de la presente invención es cuestión de una optimización y cribado rutinario. Por ejemplo, Owen *et al.*, informaron del uso de tensioactivos en técnicas de cultivo celular para células HeLa y células amnióticas humanas. Véase Owen *et al.*, *J. Cell. Sci.*, 32:363-376 (1978). Entre los ejemplos de tensioactivos que pueden utilizarse se incluyen, pero sin carácter limitativo, dodecilsulfato de sodio (SDS), laurilsulfato de amonio, y otras sales de alquilsulfato, lauril éter sulfato de sodio (SLES), sulfonato de alquilbenceno, jabones o sales de ácidos grasos, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (bromuro de hexadeciltrimetilamonio), y otras sales de alquiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio (CPC), amina de sebo polietoxilada (POEA), cloruro de benzalconio (BAC), cloruro de bencetonio (BZT), dodecil betaína, óxido de dodecildimetilamina, cocamidopropil betaína, coco amfo glicinato, alquil poli(óxido de etileno), copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) como Pluronic F68, alquil poliglucósidos, como por ejemplo, pero sin carácter limitativo, octilglucósido, decilmaltósido, alcoholes grasos, alcohol cetílico, alcohol oleílico, MEA de Cocamida, DEA de Cocamida y TEA de Cocamida y/o monolaurato de polioxiethylensorbitano (Tween).

[0134] Los modos de realización descritos en la presente memoria proporcionan métodos para la fabricación a gran escala de células hES de diferenciación y proliferación al mantener un entorno de bajo cizallamiento, manteniendo por tanto una densidad celular operativa en el sistema y minimizando las tensiones de cizallamiento en el fluido. En particular, la presente invención proporciona métodos para mantener un entorno de bajo cizallamiento en un sistema de aumento de escala para la fabricación de células eucariotas al cultivar una suspensión de células en una placa de 60 mm, una placa de 6 pocillos, una botella giratoria, un biorreactor (por ejemplo, matraces giratorios), un recipiente, y similares. De forma alternativa, los sistemas de perfusión continua para cultivar células requieren agitación o movimiento en el biorreactor o recipiente para producir una suspensión de las células, oxigenación y un suministro de nutrientes frescos, por ejemplo, para el crecimiento y/o diferenciación. Para obtener una suspensión de células, los recipientes del biorreactor normalmente utilizan uno o más dispositivos de agitación mecánica móviles que también son una fuente potencial de tensión de cizallamiento.

[0135] Es importante establecer y mantener una velocidad de cizallamiento constante, optimizada y de agitación para mantener el crecimiento y la viabilidad celular. Por ejemplo, un aumento de la velocidad de cizallamiento es perjudicial en los siguientes aspectos: (1) un cizallamiento excesivo aumenta el consumo de energía, (2) un cizallamiento excesivo interfiere con la difusión en la superficie de la membrana, (3) un cizallamiento excesivo puede privar a determinados compuestos de sus bioactividades, y (4) un cizallamiento excesivo puede deformar las membranas celulares más allá del umbral de tensión de explosión que provocaría una lisis celular. Por tanto, es deseable mantener el cizallamiento en un intervalo óptimo de 5 a 500 s⁻¹, dependiendo del diámetro de los agregados de células y la sensibilidad de la línea celular concreta para la disociación de células individuales y el cizallamiento. En el Ejemplo 17 se muestran velocidades de cizallamiento de ejemplo producidas por configuraciones útiles en los métodos de la invención para diámetros de agregados de entre 100-200 µm y velocidades de rotación de entre 60-140 rpm para una placa de 6 pocillos. Esos valores estiman la tensión de cizallamiento promediada en cuanto al tiempo que ocurre en el fluido a granel durante la rotación. No obstante, se espera que la tensión de cizallamiento en la pared del recipiente sea más alta debido a los efectos de límite.

Utilizando el método de Ley *et al. supra*, se calculó la tensión de cizallamiento para velocidades de rotación que varían entre 60 rpm a 140 rpm y se muestran en los Ejemplos 17-19.

5 **[0136]** Además, existen otros ejemplos de medios o dispositivos para generar una suspensión de células agitada suavemente y son bien conocidos por los expertos en la materia, incluyendo impulsores, como propulsores u otros medios mecánicos, cámaras de aire, medios basados en flujos de fluidos o de gas, generadores de ondas estacionarias ultrasónicas, plataformas oscilantes o giratorias, o combinaciones de los mismos que produzcan una suspensión de células. En los métodos de la invención, una plataforma giratoria es un medio de ejemplo para suspender las células en el medio cuando las células están en placas de 6 pocillos, generando una velocidad de cizallamiento de menos de 400 s⁻¹. Independientemente del tipo de rotor o mecanismo para generar suspensiones de fluido mezcladas y agitadas, la tensión de cizallamiento y la velocidad de cizallamiento promediada en cuanto al tiempo en el fluido a granel proporciona un factor de normalización por el que todos los dispositivos de mezclas fluidas pueden relacionarse. Aunque el régimen de flujo entre los dispositivos puede variar en su perfil y alcance de flujo laminar o turbulento, los cálculos de cizallamiento proporcionan una base para igualar el flujo en dispositivos que produzcan un mezclado por diferentes mecanismos. Por ejemplo, para un matraz giratorio de 125 ml con un diámetro de impulsor de 4 cm, una anchura de recipiente de 6,4 cm, un ángulo de impulsor de 90 grados, y una anchura de impulsor de 0,1 cm, una velocidad de rotación de impulsor de 135 rpm generará la misma tensión de cizallamiento y velocidad de cizallamiento promediada en cuanto al tiempo en el fluido en bruto que una placa de 5 pocillos con 5 ml de medio girando a 100 rpm para agregados de 100 µm de diámetro.

20 **[0137]** El método de la presente invención también puede utilizarse para mantener un entorno de bajo cizallamiento en un sistema de aumento de escala durante periodos de tiempo que oscilan desde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 días, hasta más de 40 días, hasta más de 50 días. Un tiempo de funcionamiento de ejemplo es de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 días hasta más de 40 días, hasta más de 50 días.

30 **[0138]** Se contempla que las células diferenciables puedan pasarse utilizando métodos de disociación enzimáticos, no enzimáticos o manuales, antes y/o después del contacto con el medio definido tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos no limitativos de métodos de disociación enzimáticos incluyen el uso de proteasas, tales como tripsina, colagenasa, dispasa y ACCUTASE™. En un modo de realización, se utiliza ACCUTASE™ para pasar las células puestas en contacto. Cuando se usan métodos enzimáticos de realización de pases, el cultivo resultante puede comprender una mezcla de singletes, dobletes, tripletes y grupos de células que varían en tamaño, dependiendo de la enzima utilizada. Un ejemplo no limitativo de un método de disociación no enzimático es un tampón de dispersión celular. Las técnicas manuales de realización de pases se han descrito bien en la técnica, tal como en Schulz *et al.*, 2004 Stem Cells, 22(7):1218-38. La elección del método de pases está influida por la elección de la matriz extracelular, si hubiese alguna, y se determina fácilmente por un experto en la materia.

40 **[0139]** En un modo de realización específico, los métodos para cultivar células diferenciables comprenden proporcionar una solución de disociación a una capa de células diferenciables que estén contenidas en una cámara de cultivo antes de la disociación, donde la disociación rompe la capa de células en células individuales. Tras la disociación, las células individuales se colocan en una nueva cámara de cultivo tisular con una solución de cultivo de células madre, donde la solución de cultivo de células madre comprende una solución nutritiva salina basal y un ligando ErbB3. Una vez cultivadas, las células madre individuales se sitúan en condiciones que permiten el crecimiento y la división de células individuales. En otro modo de realización específico, los métodos para cultivar células diferenciables comprenden proporcionar una solución de disociación a una capa de células diferenciables que estén contenidas antes en una cámara de cultivo, donde la disociación rompe los agregados de células en células individuales o agregados de células más pequeños

50 **[0140]** La solución de disgregación utilizada en los métodos de la presente invención puede ser cualquier solución de disgregación que tenga la capacidad de separar o disgregar las células en células individuales, sin provocar una toxicidad considerable para las células. Algunos ejemplos de soluciones de disgregación incluyen, pero sin carácter limitativo, tripsina, ACCUTASE™, tripsina/EDTA al 0,25 %, TrypLE o VERSENE™ (EDTA) y tripsina. Los métodos de la presente invención no necesitan dar como resultado que cada célula de la capa confluyente o suspensión se disgregue en células individuales, siempre que al menos unas pocas células individuales estén disgregadas y puedan volver a cultivarse.

55 **[0141]** Al principio del cultivo, o tras los pases, las células diferenciables pueden sembrarse a cualquier densidad, incluida una célula individual en una cámara de cultivo. La densidad celular de las células sembradas puede ajustarse dependiendo de una variedad de factores, incluyendo, pero sin carácter limitativo, el uso de cultivos en suspensión o adherentes, la receta específica del medio de cultivo utilizado, las condiciones de crecimiento y el uso contemplado de las células cultivadas. Entre los ejemplos de las densidades de cultivos celulares se incluyen, pero sin carácter limitativo, 0,01 x 10⁵ células/ml, 0,05 x 10⁵ células/ml, 0,1 x 10⁵ células/ml, 0,5 x 10⁵ células/ml, 1,0 x 10⁵ células/ml, 1,2 x 10⁵ células/ml, 1,4 x 10⁵ células/ml, 1,6 x 10⁵ células/ml, 1,8 x 10⁵ células/ml, 2,0 x 10⁵ células/ml, 3,0 x 10⁵ células/ml, 4,0 x 10⁵ células/ml, 5,0 x 10⁵

células/ml, $6,0 \times 10^5$ células/ml, $7,0 \times 10^5$ células/ml, $8,0 \times 10^5$ células/ml, $9,0 \times 10^5$ células/ml, o $10,0 \times 10^5$ células/ml, o más, por ejemplo, hasta 5×10^7 células/ml se han cultivado con una buena supervivencia celular, o cualquier valor intermedio.

5 **[0142]** Además de lo anterior, tal como se utiliza en la presente memoria, el término "densidad celular operativa" o "densidad celular operacional" o equivalentes de los mismos se refiere a aquella densidad celular a la que un sistema o proceso de fabricación se pondrá en funcionamiento para obtener la producción de un cultivo de células hES de diferenciación o proliferación. Dichas densidades celulares son aquellas en las que los nutrientes como vitaminas, minerales, aminoácidos o metabolitos, así como las condiciones ambientales como la tensión de oxígeno, que se suministran al sistema son suficientes para mantener la viabilidad celular. De manera alternativa, 10 dichas densidades celulares son aquellas en las que los productos de desecho pueden eliminarse del sistema a un ritmo suficiente para mantener la viabilidad celular. Tales densidades celulares pueden determinarse fácilmente por un experto habitual en la materia.

15 **[0143]** Las densidades celulares operativas que pueden mantenerse son aquellas de al menos aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/ml. En un sistema de aumento de escala habitual, las densidades celulares operativas pueden estar entre aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente 25×10^6 células/ml. Las densidades de ejemplo pueden estar entre aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células/ml, 22×10^6 células/ml y hasta 5×10^7 células/ml. En el método de la invención, la viabilidad celular es de al menos aproximadamente un 40 %, 45 %, 20 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % y hasta aproximadamente un 100 %. Otro sistema de aumento de escala con densidades celulares operativas y niveles de viabilidad celular aceptables podrá ser reconocido por los expertos en la materia y puede determinarse mediante técnicas bien conocidas para los expertos en la materia. Por ejemplo, en configuraciones de alimentación continua, por lotes y por lote alimentado, las densidades celulares pueden estar entre aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/ml y 15×10^6 células/ml.

25 **[0144]** También pueden utilizarse células diferenciables para cribar moléculas o factores que influyen en su plasticidad u otras características. Por ejemplo, las células diferenciables podrían utilizarse para identificar agentes que inducen la apoptosis, diferenciación o proliferación, así como efectos similares en linajes diferenciados que se han generado a partir de células diferenciables.

30 **[0145]** Como las composiciones y métodos dados a conocer en la presente memoria permiten un pase de células individuales, se han cultivado células diferenciables con éxito en condiciones de alto rendimiento, como por ejemplo, pero sin carácter limitativo, placas de 96 pocillos y placas de 384 pocillos. La figura 16 muestra la morfología y tinción de fosfatasa alcalina de células BG02 que se cultivaron en DC-HAIF en placas de 96 y 384 pocillos, utilizando los métodos descritos en el presente documento. En resumen, las células hESC que se dividieron, utilizando ACCUTASE™, y que se sembraron y se cultivaron en placas de 96 y 384 pocillos mostraron una eficiencia de sembrado similar a la observada utilizando otras placas de cultivo. Además, las células formaron colonias, y se expandieron de manera satisfactorias durante más de 5 días en entornos más pequeños. 35 Estos cultivos más pequeños se mantuvieron morfológicamente no diferenciados, y se tiñeron de manera uniforme para observar la actividad de fosfatasa alcalina, un marcador de células no diferenciadas. Asimismo, las células hES también podían cultivarse en dispositivos de cultivo de 96 pocillos (no se muestran) que proporcionan mediciones en tiempo real de la impedancia, que puede utilizarse para medir la viabilidad y la proliferación celular utilizando los métodos RT-CES™ de ACEA Biosciences, Inc. (www.aceabio.com). Dicho enfoque permitiría una cuantificación e identificación sin marcar de los efectos inmediatos o sutiles sobre las células diferenciables, así como mediciones de la proliferación, apoptosis y cambios en la morfología, en tiempo real.

45 **[0146]** Las composiciones y métodos dados a conocer en la presente memoria pueden contener virtualmente cualquier combinación de los componentes expuestos anteriormente o descritos en otro lugar de este documento, siempre que las composiciones y métodos comprendan una solución nutritiva basal salina y un medio para estimular la actividad de la tirosina quinasa dirigida por ErbB2. Como reconocería un experto en la materia, los componentes de las composiciones y métodos dados a conocer en el presente documento variarán de acuerdo con el diseño del protocolo. En consecuencia, un modo de realización de la presente invención hace referencia a cultivar células diferenciables en placas de 96 pocillos y/o en placas de 384 pocillos. De hecho, al 50 utilizar los métodos y composiciones dadas a conocer en la presente memoria, la cámara de cultivo celular, es decir, la placa de cultivo, ya no está limitada a dimensiones específicas. Por tanto, los métodos descritos en el presente documento no están limitados de ninguna manera a dimensiones de cámara de cultivo específicas, y/o medios y dispositivos para generar el agregado de células.

55 **[0147]** Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento tienen varias características útiles. Por ejemplo, las composiciones y métodos descritos en la presente memoria son útiles para modelar las etapas tempranas del desarrollo humano. Asimismo, las composiciones y métodos descritos en la presente memoria también sirven para una intervención terapéutica en estados patológicos, como trastornos neurodegenerativos, diabetes mellitus, o insuficiencia renal, como por el desarrollo de tipos de células o tejidos puros.

60 **[0148]** Los tipos celulares que se diferencian a partir de las células diferenciables tienen varios usos en diversos campos de investigación y desarrollo incluyendo, pero sin carácter limitativo, el descubrimiento de fármacos, el desarrollo y análisis de fármacos, la toxicología, la producción de células con fines terapéuticos, así como

investigación científica básica. Estos tipos celulares expresan moléculas que son de interés en una amplia diversidad de campos de investigación. Estas incluyen las moléculas conocidas como necesarias para el funcionamiento de los diversos tipos celulares, tal como se describe en los textos de referencia habituales. Estas moléculas incluyen, pero sin carácter limitativo, citoquinas, factores de crecimiento, receptores de citoquinas, la matriz extracelular, factores de transcripción, polipéptidos secretados y otras moléculas, y receptores de factores de crecimiento.

[0149] Se contempla que las células diferenciadas dadas a conocer en la presente memoria se puedan diferenciar a través de la puesta en contacto con un entorno de diferenciación celular. Como se emplea en la presente memoria, el término “entorno de diferenciación celular” se refiere a una condición de cultivo celular en donde las células diferenciadas se inducen a diferenciarse, o se inducen a convertirse en células diferenciadas en un cultivo celular humano enriquecido. Preferiblemente, el linaje celular diferenciado inducido mediante el factor de crecimiento será de naturaleza homogénea. El término “homogéneo”, se refiere a una población que contiene más de aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de la línea celular deseada.

[0150] Se puede utilizar un medio o entorno de diferenciación celular para diferenciar de manera parcial, total, o reversible las células diferenciadas de la presente invención. De acuerdo con la invención, el medio del entorno de diferenciación celular puede contener una variedad de componentes que incluyen, por ejemplo, medio KODMEM (Medio de Eagle Modificado de Dulbecco KnockOut™), DMEM, medio F12 de Ham, FBS (suero bovino fetal), FGF2 (factor 2 de crecimiento de fibroblastos), KSR o hLIF (factor inhibitorio de la leucemia humana). El entorno de diferenciación celular también puede contener suplementos tales como L- Glutamina, NEAA (aminoácidos no esenciales), P/S (penicilina/estreptomicina), N2, B27 y β -mercaptoetanol (β -ME). Se contempla que se puedan añadir factores adicionales al entorno de diferenciación celular, incluyendo, pero no limitado a, fibronectina, laminina, heparina, sulfato de heparina, ácido retinoico, miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) incluyendo FGF2, FGF7, FGF8, y/o FGF10, miembros de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), antagonistas de la familia del factor de crecimiento de transformación (TGF)/ proteína morfogenética ósea (BMP)/ factor de crecimiento y diferenciación (GDF) que incluyen, pero sin carácter limitativo, nogina, folistatina, cordina, gremlina, proteínas de la familia DAN/Cerberus, ventropina, activina a dosis altas, y amnionless o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. También se podrían añadir antagonistas TGF/BMP/GDF en forma de quimeras Fc-receptor TGF/BMP/GDF. Otros factores que se pueden añadir incluyen moléculas que pueden activar o inactivar la señalización a través de la familia del receptor Notch, que incluyen, pero sin carácter limitativo, proteínas de las familias similares a Delta y Jagged, así como inhibidores del procesamiento o escisión de Notch, o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. Otros factores de crecimiento pueden incluir miembros de la familia del factor de crecimiento insulínico (IGF), insulina, la familia del factor relacionado Wingless (WNT) y la familia del factor hedgehog, o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. Pueden añadirse factores adicionales para estimular la proliferación y supervivencia de células madre/progenitoras del mesodermo, madre/progenitoras de endodermo, madre/progenitoras del mesodermo o madre/progenitoras del endodermo definitivo, así como la supervivencia y diferenciación de derivados de estas progenitoras.

[0151] Las composiciones descritas en el presente documento son útiles para el cribado de compuestos de ensayo para determinar si un compuesto de ensayo modula la pluripotencia, proliferación, y/o la diferenciación de células diferenciadas. La pluripotencia, proliferación y/o diferenciación de células diferenciadas puede determinarse fácilmente por un experto en la materia. Entre los métodos no limitativos se incluyen examinar la morfología de la célula, la expresión de varios marcadores, la formación de teratomas, conteos de células y mediciones de la impedancia.

[0152] La progresión de las células diferenciadas hacia la línea celular deseada, o su mantenimiento en un estado no diferenciado se puede monitorizar mediante la cuantificación de la expresión de genes marcadores característicos del linaje celular deseado, así como la falta de expresión de genes marcadores de los tipos de células diferenciadas. Un método de cuantificación de la expresión genética de tales genes marcadores es a través del empleo del PCR cuantitativo (Q-PCR). Los métodos de realización de Q-PCR son bien conocidos en la técnica. Se pueden emplear también otros métodos que son bien conocidos en la técnica para cuantificar la expresión de genes marcadores. La expresión de genes marcadores se puede detectar mediante el empleo de anticuerpos específicos para el gen marcador de interés.

[0153] En determinados modos de realización, el método de cribado abarca métodos para identificar un compuesto capaz de modular la pluripotencia, proliferación y/o diferenciación de una célula diferenciada, comprendiendo (a) proporcionar una célula diferenciada; (b) cultivar la célula en una composición que comprende una solución nutritiva salina basal y un ligando ErbB3, donde la composición está esencialmente exenta de suero; (c) poner en contacto la célula con un compuesto de ensayo; y determinar si ha habido un aumento o una disminución en la pluripotencia, proliferación y/o diferenciación en la célula que se ha puesto en contacto con el compuesto, siendo dicho aumento un indicio de que el compuesto modula la pluripotencia, proliferación y/o diferenciación. En determinados modos de realización, el ligando ErbB3 es HRG- β . En otros modos de realización, el ligando ErbB3 puede sustituirse con un compuesto de ensayo, para determinar los

efectos del compuesto de ensayo. Por ejemplo, los efectos de la pluripotencia, proliferación y/o diferenciación que ocurren con el compuesto de ensayo pueden compararse con los efectos en la pluripotencia, proliferación y/o diferenciación que ocurren con el ligando ErbB3 para determinar los efectos del compuesto de ensayo en las células diferenciadas. Se contempla que cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria puede utilizarse en los métodos de cribado de la presente invención.

[0154] En otro modo de realización, las células pueden cultivarse en ausencia de un ligando ErbB3 (actividad de la tirosina quinasa dirigida por ErbB2) para determinar los efectos de la ausencia de un ligando ErbB3 (actividad de la tirosina quinasa dirigida por ErbB2) en las células.

[0155] Utilizando los métodos descritos en este documento, se pueden producir composiciones que comprenden el linaje celular deseado sustancialmente exento de otros tipos de células. De forma alternativa, pueden producirse composiciones que comprenden mezclas de células diferenciadas y los linajes celulares deseados.

[0156] En algunos modos de realización de la presente invención, pueden aislarse células del linaje celular deseado utilizando un marcador de afinidad que sea específico para dichas células. Un ejemplo de un marcador de afinidad específico para una célula diana es un anticuerpo que es específico para un polipéptido marcador que está presente en la superficie celular de la célula diana pero que no está presente sustancialmente en otros tipos de células que se encontrarían en un cultivo producido por los métodos descritos en el presente documento.

[0157] La presente exposición también se refiere a kits, en donde el kit comprende una solución nutritiva salina basal y al menos un compuesto que tiene la capacidad de estimular la actividad de la tirosina quinasa dirigida por ErbB2. En un modo de realización, los kits comprenden al menos un ligando de ErbB3, tal como se describe en el presente documento. En otro modo de realización, los kits comprenden más de un ligando de ErbB3. En otro modo de realización, los kits comprenden al menos un TGF- β o un miembro de la familia TGF- β , o una variante o fragmento funcional del mismo como se describe en este documento. En otro modo de realización adicional, los kits comprenden más de un TGF- β o de un miembro de la familia TGF- β , o una variante o fragmento funcional de los mismos. En otro modo de realización adicional, los kits comprenden al menos un factor de crecimiento de fibroblastos o una variante o fragmento funcional del mismo. En otro modo de realización adicional, los kits comprenden más de un factor de crecimiento de fibroblastos o una variante o fragmento funcional del mismo. En un modo de realización específico, los kits pueden comprender al menos uno de FGF-7, FGF-8, FGF-10, FGF-22 o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. En otro modo de realización, los kits comprenden seroalbúmina. En otro modo de realización adicional, los kits pueden comprender suero y/o al menos un sustrato insoluble, como se describe en el presente documento, y/o al menos una solución de disgregación.

[0158] Los kits pueden contener virtualmente cualquier combinación de los componentes expuestos o descritos en otra parte del presente documento. Como reconocería un experto en la materia, los componentes suministrados con kits variarán con el uso previsto para los kits. Por lo tanto, los kits pueden diseñarse para realizar diversas funciones establecidas en la presente solicitud y los componentes de tales kits variarán en consecuencia.

EJEMPLOS DE REFERENCIA

[0159] La línea celular de células madre embrionarias humanas BGOlv (BresaGen, Inc., Athens, Georgia, EE.UU.) se utilizó en algunos de los experimentos descritos en la presente memoria. La línea celular hESC BGOlv es una línea celular con una variante en el cariotipo, que exhibe un cariotipo estable que contiene trisomías específicas (cariotipo: 49, XXY,+12,+17). Los cultivos originales se mantuvieron tal como se ha descrito previamente (Schulz *et al.*, 2003, *BMC Neurosci.*, 4:27; Schulz *et al.*, 2004, *Stem Cells*, 22(7):1218-38; Rosler *et al.*, 2004, *Dev. Dynamics*, 229:259-274; Brimble *et al.*, 2004 *Stem Cells Dev.*, 13:585-596). Las células se cultivaron brevemente en placas recubiertas con MATRIGEL™ o fibronectina, en medio condicionado de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, por sus siglas en inglés) (MEF-CM) comprendiendo DMEM:F12 con KSR al 20 %, 8 ng/ml de FGF2, 2 mM de L-Glutamina, 1x de aminoácidos no esenciales, 0,5 U/ml de penicilina, 0,5 U/ml de estreptomina, 0,1 mM de β -mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, Misuri, EE.UU.), con pases de colagenasa.

[0160] El medio de cultivo definido (DC) analizado en el presente documento comprendía DMEM/F12, 2 mM de Glutamax, 1x de aminoácidos no esenciales, 0,5 U/ml de penicilina, 0,5 U/ml de estreptomina, 10 μ g/ml de transferrina (todo de Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) 0,1 mM de β -mercaptoetanol (Sigma), Fracción V de Cohn de BSA exenta de ácidos grasos (Serologicals) al 0,2 %, 1x de mezclas de oligoelementos A, B y C (Cellgro) y 50 μ g/ml de ácido ascórbico (Sigma). Se utilizaron niveles variables de factores de crecimiento recombinantes, que incluían FGF2 (Sigma), LongR3-IGFI (JRH Biosciences), dominio EGF de Heregulina- β (HRG β , Peprotech), TGF β (R&D systems), nodal (R&D systems), LIF (R&D systems), EGF (R&D systems), TGF α (R&D systems), HRG α (R&D systems), BMP4 (R&D systems), y Activina A (R&D Systems). LongR3-IGFI es una versión modificada del IGF1 que tiene una afinidad reducida para las proteínas de unión a IGF1, algunas de las cuales se expresan en hESC. DC-HAIF es el medio de cultivo definido como se ha indicado anteriormente, que contiene 10 ng/ml de HRG- β , 10 ng/ml de Activina A, 200 ng/ml de LR-IGF1 y 8 ng/ml de FGF2. DC-HAI es un medio de cultivo definido como se ha indicado anteriormente, que contiene 10 ng/ml de HRG- β , 10 ng/ml de

Activina A y 200 ng/ml de LR-IGF1. Por supuesto, en DC-HAIF y DC-HAI, el componente LR-IGF1 puede reemplazarse con IGF1.

5 **[0161]** Se prepararon placas recubiertas con MATRIGEL™ diluyendo matriz BD MATRIGEL™ con factor de crecimiento reducido (BD Biosciences, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE.UU.) hasta un intervalo de concentración final de aproximadamente 1:30 a aproximadamente 1:1000 en DMEM/F-12 frío. En un modo de realización, la concentración de MATRIGEL™ es de aproximadamente 1:200. Se utilizó una placa de 1 ml/35 mm para recubrir placas durante 1-2 horas a temperatura ambiente o al menos durante la noche a 4 °C. Las placas se almacenaron hasta una semana a 4 °C. La solución de MATRIGEL™ se retiró inmediatamente después del uso.

10 **[0162]** Para las condiciones analizadas, se sembraron cultivos originales en placas de 6 pocillos para la comparación de múltiples condiciones. Los cultivos se sembraban normalmente directamente en las condiciones de ensayo. Los cultivos se evaluaban cada día y se catalogaban en función de los criterios morfológicos de 4 a 5 días tras sembrarlos. La escala de clasificación del 1 al 5 implicaba examinar todo el cultivo y evaluar la proporción general de colonias no diferenciadas, su tamaño relativo, y la proporción de colonias o partes de colonias que exhiben una diferenciación obvia. El grado 5 indica cultivos "ideales", con grandes colonias no diferenciadas y una diferenciación mínima. El grado 4 indica un cultivo muy bueno, pero con una diferenciación obvia. El grado 3 indica un cultivo aceptable, pero con alrededor de la mitad de la colonia exhibiendo una diferenciación obvia. Los cultivos de grado 2 están diferenciados de manera predominante con células supuestamente no diferenciadas ocasionales. Los cultivos de grado 1 contienen colonias diferenciadas o los cultivos no se adhirieron o no sobrevivieron. Los cultivos que exhibieron una buena expansión de células no diferenciadas se pasaron para evaluar el cultivo a largo plazo en esas condiciones.

Ejemplo de referencia 1 – Expresión de ErbB1-3, Nrg1 y ADAM19 en células BGOlv

25 **[0163]** Se utilizó una RT-PCR en tiempo real para mostrar la expresión de ErbB1-3, Neuregulina y ADAM-19 en células BGOlv (Figura 1). Las células BGOlv cultivadas en medio DC tal como se ha descrito anteriormente, conteniendo 100 ng/ml de LongR3-IGFI (LR-IGF1), 8 ng/ml de FGF2 y 1 ng/ml de Activina A, se recolectaron y se preparó ARN utilizando el mini kit RNeasy (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. La primera cadena de ADNc se preparó utilizando el kit iSript (Biorad) y se llevó a cabo una PRC en tiempo real utilizando un termociclador de MJ Research Opticon.

30 **[0164]** Se utilizaron ensayos TaqMan a la carta (Applied Biosystems) para ADAM19 (Hs00224960_m1), EGFR (Hs00193306_m1), ErbB2 (Hs00170433_m1), ErbB3 (Hs00176538_m1), NRG1 (Hs00247620_m1), OCT4 (Hs00742896_s1) y una GAPDH de control con una PRC universal TaqMan (Applied Biosystems). Las gráficas de amplificación a tiempo real se muestran en la Figura 1, mostrando la expresión de estas transcripciones en células BGOlv no diferenciadas.

Ejemplo de referencia 2 – La inhibición de ErbB2 ralentiza la proliferación de células BGOlv

35 **[0165]** La familia del dominio EGF de ligandos se unen a la familia de ErbB de tirosinas quinasas receptoras. Para examinar el efecto de los inhibidores conocidos de las tirosinas quinasas ErbB en hESC, se sembraron células BGOlv en bandejas de 6 pocillos en MATRIGEL™ diluido a 1:1000, en un medio de cultivo definido (DC) que contiene de 100 ng/ml de LongR3-IGFI, 8 ng/ml de FGF2 y 1 ng/ml de Activina A. Al día siguiente, se añadió DMSO (control de portador), 50 nM-20 μM de AG1478 (un inhibidor de ErbB1), o 100 nM-20 μM de AG879 (un inhibidor de ErbB2) con medio nuevo. Las células se cultivaron durante 5 días adicionales, con un cambio de medio diario. Los cultivos se fijaron y se tiñeron para observar su actividad de fosfatasa alcalina.

40 **[0166]** Se observaron colonias subconfluentes de células AP+ BG01v (Figuras 2A y B) en el control y células cultivadas AG1478, indicando que ni el DMSO ni el AG1478 (50 nM-20 μM) tenían un efecto aparente en la proliferación celular. No obstante, el AG879 inhibió sustancialmente el crecimiento celular a los 5 μM (Figura 2C) y provocó muerte celular a los 20 μM (no se muestra). Los cultivos sembrados en AG879 no parecieron diferenciarse y parecían mantener una morfología pluripotente y una actividad de fosfatasa alcalina, lo que indica que el AG879 parecía inhibir la proliferación sin inducir a la diferenciación, sugiriendo que las células BG01v dependen de la señalización de ErbB2 para la supervivencia celular. En cambio, las células BG01v cultivadas en condiciones similares a las anteriores no parecían depender de la señal de ErbB1 para la proliferación.

50 **Ejemplo de referencia 3 – Se mantienen células BGOlv en un medio definido que contiene Heregulina**

[0167] La expresión de ErbB2 y ErbB3 y la inhibición de la proliferación con AG879 sugirió que las células BG01v tienen una señalización de ErbB endógeno activa y también que pueden responder a la HRG-β. Las células BG01v se cultivaron en medio DC que contiene 10 ng/ml de HRG-β, 200 ng/ml de LongR3-IGF1, 8 ng/ml de FGF2 y 10 ng/ml de Activina A, en MATRIGEL™ diluido en 1:1000 (Figuras 3A y B). Estas células se cultivaron durante 4 pases, o >20 días, exhibieron una morfología no diferenciada y no mostraron una diferenciación espontánea elevada.

[0168] Asimismo, las células BG01v también se mantuvieron durante 2 pases, o >13 días, en medio DC comprendiendo 10 ng/ml de HRGβ, 200 ng/ml de LongR3-IGF1, y 10 ng/ml de Activina A. Estos cultivos

proliferaron en condiciones normales y exhibieron una diferenciación espontánea muy baja, demostrando que las células BG01v podían mantenerse en condiciones definidas con HRG β en ausencia de FGF2.

Ejemplo de referencia 4 – Función de la tirosina quinasa dirigida por ErbB2 en células madre embrionarias

5 [0169] La RT-PCR demostró que las células madre embrionarias de ratón (mESC, por sus siglas en inglés) expresan ADAM19, Neuregulina1 (Nrg1), y ErbB1-4 (Figuras 4A). En las mESC, el ErbB2 y 3 parecían expresarse a niveles más altos que el ErbB1, con bajos niveles de ErbB4 siendo detectados. Estos datos sugieren que la HRG- β endógena podría estar involucrada en provocar la autorrenovación de las mESC.

10 [0170] También se examinó la expresión de las transcripciones del receptor de ErbB en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, por sus siglas en inglés). Los MEF son una población heterogénea de células derivadas de vísceras en E12.5-13.5 que se han utilizado tradicionalmente para mantener células de carcinoma embrionario y células madre embrionarias humanas y de ratón. La expresión de Nrg1 y Adam19 en esta población sugiere que el ectodominio de la HRG- β también está presente en medio condicionado con MEF y puede ejercer efectos significativos sobre la pluripotencia.

15 [0171] Se utilizó AG1478 y AG879 para examinar el papel de la señalización con HRG/ErbB en células madre embrionarias de ratón. Se mantuvieron células madre embrionarias de ratón R1 en condiciones estándar en DMEM, FBS al 10 %, KSR al 10 %, 0,5 U/ml de penicilina, 0,5 U/ml de estreptomycin, 1xNEAA, 1 mM de piruvato de sodio, 1000 U/ml de LIF (ESGRO), 0,1 mM de β -ME, y se pasaron con tripsina/EDTA al 0,5 % . Se sembraron 2×10^5 células/pocillo en bandejas de 6 pocillos en MATRIGEL™ diluido a 1:1000. Al día siguiente, se
20 añadió DMSO (control de portador), 1-50 μ M de AG1478, o 1-50 μ M de AG879 con medio nuevo. Las células se cultivaron durante 8 días adicionales, con un cambio de medio diario. Después, los cultivos se fijaron en el día 8, y se tiñeron para observar su actividad de fosfatasa alcalina.

[0172] El DMSO y 1-50 μ M de AG1478 no tuvieron un efecto aparente en la proliferación celular, con colonias subconfluentes de mESC positivas en fosfatasa alcalina observadas (Figuras 5A-C). No obstante, el AG879
25 inhibió sustancialmente el crecimiento celular a 50 μ M (compárese la Figura 5D y 5F) y pueden haber ralentizado la proliferación a 20 μ M (Figura 5E). Las mESC cultivadas en AG879 no parecieron diferenciarse y mantuvieron una morfología pluripotente y una actividad de fosfatasa alcalina.

[0173] Los resultados indican que el AG879 parecía inhibir la proliferación, sin inducir la diferenciación, de las mESC, sugiriendo que las mESC necesitaban la señalización de ErbB2 para la proliferación. En cambio, las
30 mESC no parecen depender de una señal de ErbB1 para su proliferación. La concentración de AG879 requerida para inhibir la proliferación era ~ 10 veces mayor para mESC que para células BG01v cultivadas en condiciones definidas, indicando que o bien el suero utilizado en las condiciones de mESC puede haber interferido con la actividad del fármaco, que AG879 presenta una afinidad más baja por la tirosina quinasa ErbB2 de ratón que por la de humano, o que el ErbB2 puede desempeñar papeles distintos con distintas especies de células madre
35 embrionarias.

[0174] Otro inhibidor altamente selectivo de la tirosina quinasa ErbB2, tirfostina AG825 (Murillo, *et al.* 2001
Cancer Res 61, 7408-7412), se utilizó para investigar el papel del ErbB2 en células madre embrionarias humanas. El AG825 inhibió de manera significativa la proliferación de hESC cultivadas en un medio condicionado
40 (CM) (Fig. 6A). El AG825 inhibió la proliferación sin diseminar la muerte celular, y las hESC viables podrían mantenerse durante >5 días (no se muestra). La transferencia de Western mostró que el AG825 inhibió la autofosforilación del ErbB2 a tirosina-1248 en hESC pulsadas con heregulina (HGR)/en ausencia de alimento cultivadas en DC-HAIF (Fig. 6B). Por consiguiente, la alteración de la señalización de ErbB2 inhibió gravemente la proliferación de hESC. Para establecer hESC en condiciones de cultivo definidas, los cultivos podían pasarse directamente de condiciones de CM a DC-HAIF, y exhibieron una diferenciación espontánea mínima (Fig. 6C).
45 Los ensayos de conteo de células y de colonia confirmaron que el LongR3-IGFI y la HRG desempeñaron los papeles principales en la autorrenovación y proliferación en el contexto de uno de los modos de realización de la presente invención (Fig. 6D, 6E). La fosforilación del IGF1R, IR, FGF2 α , ErbB2 y ErbB3 también se observó en ambos cultivos en DC-HAIF en estado estable, y en cultivos en ausencia de alimento que se pulsaron con DC-HAIF (Fig. 6F).

50 **Ejemplo de referencia 5 - Cultivo de células madre embrionarias de ratón en condiciones definidas**

[0175] Para examinar el papel de la señalización de HRG/ErbB2 de manera adicional en células madre embrionarias de ratón, se examinó la proliferación de células madre embrionarias R1 en medio DC utilizando una combinación de factores de crecimiento. Se sembraron 1×10^5 células/pocillo en bandejas de 6 pocillos, recubiertas con gelatina al 0,2 %, en combinaciones que contienen DC de 10 ng/ml de HRG- β , 100 ng/ml de LongR3-IGFI, 1 ng/ml de Activina A, 1000 U/ml de LIF de ratón o 10 ng/ml de BMP4 (Tabla 1, abajo). Se observó la proliferación durante 8 días.

[0176] Las colonias viables solo crecieron en condiciones que contenían al menos LIF/HRG- β o LIF/BMP4 (Tabla 1). No se observó ningún beneficio adicional cuando se añadió LongR3-IGFI o Activina a estas combinaciones.

Se observó una proliferación normal en un cultivo parental de control, y no se observaron colonias viables en un medio definido sin factores de crecimiento.

Tabla 1

HRG	IGF	Activina	LIF	BMP4	Crecimiento
+					No
+			+		Sí
+	+				No
+	+		+		Sí
+	+	+			No
+	+	+	+		Sí
+		+			No
+		+	+		Sí
			+	+	Sí
+			+	+	Sí

- 5 **[0177]** Se llevó a cabo un ensayo cuantitativo al sembrar 2×10^5 células/pocillo en bandejas de 6 pocillos en MATRIGEL™ a 1:1000, en combinaciones seleccionadas de 10 o 50 ng/ml de HRG- β , 10 ng/ml de EGF, 1000 U/ml de LIF o 10 ng/ml de BMP4. Los cultivos se cultivaron durante 8 días, se fijaron y se contó el número de colonias de fosfatasa alcalina (Figura 7A). No se observaron colonias en condiciones definidas sin factores de crecimiento y se observaron <45 colonias con combinaciones de HRG- β , HRG- β /EGF y HRG- β /BMP. Aunque se observaron 1358 colonias en LIF solo, se observaron 4114 y 3734 colonias en las combinaciones de 10 ng/ml de HRG- β /LIF y 50 ng/ml de HRG- β /LIF, respectivamente. Esto indicó que en condiciones definidas, el LIF por sí solo proporcionó una señal de pluripotencia sustancial y la HRG- β exhibió un gran efecto sinérgico con LIF, más del doble de colonias mESC en proliferación en este ensayo. Las imágenes con un bajo aumento de este ensayo también indican este efecto proliferativo sinérgico (Figuras 7B-G).

15 **Ejemplo de referencia 6 - Caracterización de la pluripotencia de células madre embrionarias humanas (hESC) mantenidas en DC-HAIF**

- 20 **[0178]** Se utilizaron múltiples enfoques para confirmar la capacidad de mantenimiento de la plasticidad de las hESC en DC-HAIF. Las células BG02 cultivadas en DC-HAIF durante 6 meses (25 pases) mantuvieron el potencial de formar teratomas complejos (Fig. 8A) y representantes de las tres capas germinales *in vitro* (Fig. 8B). Se utilizaron análisis transcripcionales para comparar la expresión global en células hESC (Liu et al 2006, BMC Dev Biol 6, 20) mantenidos en CM y DC-HAIF. Se detectaron más de 11 600 transcripciones en células BG02 cultivadas en DC-HAIF durante 10 y 32 pases, y en células BG02 cultivadas en CM durante 64 pases. Había aproximadamente 10 364 transcripciones comunes a todas las poblaciones (Fig. 8C), incluyendo marcadores de hESC conocidos como CD9, DNMT3, NANOG, OCT4, TERT y UTF1 (no se muestran). Se observaron coeficientes de correlación altos en comparaciones de cultivos en CM y DC-HAIF (selección de $R^2=0.928$), así como en células de primeros y últimos pasajes (selección de $R^2=0.959$) (Fig. 8D). El análisis del agrupamiento jerárquico mostró que las células BG02 mantenidas en DC-HAIF se agruparon estrechamente y retuvieron una similitud próxima a células BG02 y BG03 mantenidas en CM (Fig. 8E). Estos datos están en consonancia con análisis previos que muestran que las hESC no diferenciadas se agrupan firmemente en comparación con cuerpos embrioides o fibroblastos (Liu et al 2006, BMC Dev Biol 6, 20). Por tanto, las células mantenidas en las composiciones de la presente invención son capaces de mantener marcadores clave de pluripotencia. En consecuencia, las composiciones dadas a conocer en la presente memoria también pueden utilizarse como un simple medio para respaldar la autorrenovación de células diferenciadas.

35 **Ejemplo de referencia 7 - Mantenimiento de células madre embrionarias humanas (hESC) sobre matrices extracelulares humanizadas (ECM) en DC-HAIF**

- 40 **[0179]** Para investigar el papel de la señalización de ErbB2 y desarrollar un medio definido para hESC, se expandieron los cultivos de DC-HAIF inicialmente en placas de cultivo recubiertas con MATRIGEL™ con factor de crecimiento reducido a 1:30, pero también podrían mantenerse de manera satisfactoria a largo plazo en este sustrato diluido a 1:200 (Fig. 9A) o 1:1000. Las hESC BG02 y CyT49 también pueden mantenerse durante >5 pases en placas de cultivo tisular recubiertas con suero humano (Fig. 9B); fibronectina humana (Fig. 9C); o VITROGRO™ (Fig. 9D), que es una ECM humanizada patentada.

Ejemplo de referencia 8 - Pases de células individuales de células madre embrionarias humanas (hESC)

[0180] Múltiples grupos de investigación han demostrado que determinados triploides, principalmente de los hChr 12 y 17, se acumulan en hESC bajo determinadas condiciones de cultivo subóptimas (Baker et al., 2007 Nat. Biotech.25(2):207-215). La aparición de triploides parece estar relacionada más directamente con una supervivencia celular pobre cuando los cultivos se dividen en células individuales en los pases, proporcionando una supuesta ventaja de crecimiento selectivo fuerte para las células que alberguen estas aneuploidías. En cambio, las hESC cultivadas en un modo de realización de la presente invención, DC-HAIF, mantuvieron una alta viabilidad al sembrarlas tras ser divididas en células individuales (Fig. 10A-D). Las células BG01 y BG02 mantuvieron un cariotipo normal (Fig. 10E) tras pasarse con ACCUTASE™ durante > 18 y 19 pases, respectivamente. El mantenimiento de un cariotipo normal en células mostró que la disgregación de cultivos de hESC en células individuales no desemboca por naturaleza en la acumulación de estas trisomías en hESC mantenidas en DC-HAIF. Los cultivos de BG01 y BG02 también se pasaron por disgregación en células individuales con múltiples agentes de pases (Fig. 11). Los cultivos se dividieron con ACCUTASE™, Tripsina/EDTA al 0,25 %, TrypLE, o VERSENE™ (EDTA) durante 5 pases y se realizó un cariotipado. Los datos muestran que al cultivar y pasar hESC en las composiciones dadas a conocer en la presente memoria se mantuvo un cariotipo normal en al menos dos líneas celulares embrionarias humanas, utilizando varios reagentes de disgregación celular.

[0181] La expansión a gran escala de hESC no diferenciadas también es posible, utilizando las composiciones dadas a conocer en la presente memoria. Un cultivo confluyente de partida de células BG02 en una placa de 60 mm se expandió en DC-HAIF a través de 4 pases para generar >1,12 x 10¹⁰ células en 20 días en un único experimento. Los cultivos se mantuvieron sin diferenciar, tal como demostraron el >85 % de las células del lote, manteniendo la expresión de marcadores de pluripotencia como OCT4, CD9, SSEA-4, TRA-1-81 cuando se examinaron mediante citometría de flujo (Fig. 12A). La expresión de otros marcadores de pluripotencia también se observó mediante un análisis de RT-PCR, mientras que los marcadores de linajes diferenciados, α -fetoproteína, MSX-1 y HAND1 no se detectaron (Fig. 12B). El análisis de la hibridación fluorescente *in situ* mostró que las células cultivadas y pasadas en DC-HAIF mantuvieron un número de copias esperado para el hChr12 (el 98 % 2 copias), hChr17 (el 98 % 2 copias), hChrX (el 95 % 1 copia) y hChrY (el 98 % 1 copia) (Fig. 12C). El análisis del cariotipado también demostró que se mantuvo un perfil de bandeado y un contenido de cromosomas euploides normal en estas células.

Ejemplo de referencia 9 - La insulina y el IGF1 ejercen distintos efectos en las hESC cuando se aplican en concentraciones fisiológicas

[0182] En esencia, todas las condiciones de cultivo señaladas para hESC hasta la fecha incluyen niveles supra fisiológicos de insulina, que pueden estimular el IR y el IGF1R. Para distinguir las actividades que ejercen la insulina y los sustitutos de la insulina, en comparación con el IGF1, las hESC se cultivan en condiciones de medio definido en niveles fisiológicos de estos factores de crecimientos. Las concentraciones de insulina e IGF1 se ajustan de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 200 ng/ml y la proliferación celular se monitoriza al contar las células tras 5 días. Los cultivos se expanden con éxito y se pasan en serie 5 veces. Los niveles fisiológicos de IGF1 soportan la expansión de cultivos hESC, mientras que los niveles fisiológicos de insulina no, lo que indica que la actividad de la insulina o los sustitutos de insulina no pueden sustituir al IGF1, y que el IGF1 y la insulina (o los sustitutos de insulina) representan clases separadas de actividades biológicas con respecto a la acción sobre las hESC.

Ejemplo de referencia 10 - Métodos para cribar los efectos de los suplementos

[0183] Para examinar inicialmente los efectos de la Vitamina B₁₂ y la Vitamina B₆ sobre el crecimiento o diferenciación de hESC cultivadas a una densidad intermedia, las células BG02 se dividen utilizando ACCUTASE™ y se siembran 1 x 10⁵ células/pocillo en bandejas de 6 pocillos en medio de cultivo definido (DC, por sus siglas en inglés). El medio de cultivo definido contiene 10 ng/ml de HRG- β , 200 ng/ml de LongR3-IGF1, y 10 ng/ml de FGF10. Se añade Vitamina B₆ (0,5 μ M) y/o Vitamina B₁₂ (0,5 μ M) a pocillos experimentales. Los números celulares en cada condición se cuentan tras 7 días. El conteo de células y de colonias de pocillos experimentales y de control proporcionarán una visión de los efectos de la Vitamina B₆ y Vitamina B₁₂ sobre el crecimiento celular.

[0184] Además, los marcadores de diferenciación, como el OCT4, pueden analizarse en el pocillo experimental para determinar los efectos de los aditivos y suplementos en el estado de diferenciación de las células diferenciables.

Ejemplo de referencia 11 - Cultivo de hESC en ausencia de FGF2

[0185] Se mantuvieron células BG02 a largo plazo en DC-HAI durante 20 pases (Fig. 13A), y también se pasaron células BG01 en serie en DC-HAI, ambas en ausencia de FGF2. Los cultivos no se deterioraron o exhibieron una diferenciación evidente, y exhibieron una expansión normal de colonias no diferenciadas a lo largo del periodo de cultivo. El mantenimiento de un cariotipo masculino normal en un cultivo de BG02 se mostró tras 6 pases en DC-HAI (Fig. 13B, 20/20 difusiones de metafase normales).

[0186] Se utilizaron análisis transcripcionales para comparar la expresión global en células madre embrionarias humanas mantenidas en DC-HAIF y DC-HAI. Se aisló ARN celular total de hESC utilizando Trizol (Invitrogen) y se trató con DNasa I (Invitrogen) de conformidad con el protocolo aconsejado por el fabricante. Se llevó a cabo una amplificación de la muestra con 100 ng de ARN total utilizando el kit de Amplificación de ARN de Illumina y se consiguió un marcaje al incorporar biotina-16-UTP (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences) en una proporción de 1:1 con UTP sin marcar. El material amplificado y marcado (700 mg por serie) se hibridó con Beadchips Sentrix Human-6 Expression de Illumina que contienen 47 296 sondas de transcripción según las instrucciones del fabricante (Illumina, Inc.). Se escanearon las series con un escáner confocal BeadArray Reader de Illumina y se llevó a cabo un análisis de datos, una sustracción de fondo, y un procesamiento de datos primarios utilizando el software Illumina BeadStudio según las instrucciones del fabricante. Se utilizó una puntuación de confianza de detección mínima de 0,99 (un corte calculado indicando la señal de la secuencia diana podía distinguirse de los controles negativos) para discriminar la presencia o ausencia de la expresión de la transcripción. Se llevó a cabo un análisis de los datos utilizando enfoques paralelos descritos para otras muestras de hESC (Liu et al 2006, BMC Dev Biol 6:20). Se llevó a cabo un agrupamiento jerárquico tal como se ha descrito previamente (Liu et al 2005, BMC Dev Biol 6:20), y se basó en un enlace promedio y en distancias euclidianas como la medida de la similitud utilizando genes expresados de manera diferente identificados por el ANOVA ($p < 0,05$). Las descripciones detalladas de la sensibilidad y los test de control de calidad utilizados en la fabricación de matrices y los algoritmos utilizados en el *software* Bead studio están disponibles en Illumina, Inc. (San Diego, California). La mayoría de las transcripciones detectadas se expresaron en cultivos de BG02 en DC-HAIF y DC-HAI, incluidos marcadores de hESC conocidos como CD9, DNMT3, NANOG, OCT4, TERT y UTF1 (no se muestran). Se observaron coeficientes de correlación altos en comparaciones de cultivos en DC-HAIF y DC-HAI (selección de $R^2=0,961$) (Fig. 14). El análisis del agrupamiento jerárquico mostró que las células BG02 mantenidas en DC-HAI se agruparon estrechamente y retuvieron una similitud próxima a las células mantenidas en DC-HAIF, así como las BG02 y otras líneas de hESC en múltiples formatos de cultivo (Fig. 15). Estos datos están en consonancia con análisis previos que muestran que las hESC no diferenciadas se agrupan firmemente en comparación con cuerpos embrioides o fibroblastos (Liu et al 2006, BMC Dev Biol 6:20).

[0187] Asimismo, las células BG02 mantenidas en DC-HAI se diferenciaron en representantes del mesodermo, endodermo, y ectodermo en teratomas complejos formados en ratones SCID-*beiges* (no se muestran), demostrando formalmente el mantenimiento de la pluripotencia en cultivos cultivados en ausencia de FGF2 exógeno.

[0188] Para examinar si se requería FGF2 exógeno en el contexto de un pase de células individuales, se pasaron células BG02 con ACCUTASE™ y se cultivaron en condiciones definidas que contenían solo 10 ng/ml de HRGβ y 200 ng/ml de LongR3-IGFI (DC-HI). Estos cultivos en DC-HI se mantuvieron durante 10 pases, y no exhibieron una diferenciación evidente o una ralentización de la proliferación.

[0189] Estos estudios mostraron claramente que la provisión de FGF2 exógeno no se requiere cuando las hESC se mantienen en un medio definido que contiene mínimamente heregulina e IGF1. Además, los cultivos con ausencia de FGF2 mantuvieron propiedades clave de pluripotencia, incluyendo un perfil transcripcional y una diferenciación a mesodermo, endodermo y ectodermo *in vivo*.

Ejemplo de referencia 12 - Cultivos en suspensión

[0190] Se mantuvieron cultivos de partida de células BG02 en medio DC-HAIF sobre placas recubiertas con Matrigel a 1:200, tal como se describe en el presente documento, y se dividieron al pasarlos con ACCUTASE™. Para iniciar un cultivo en suspensión, se disgregaron las células BG02 con ACCUTASE™ y se colocaron en bandejas de 6 pocillos de baja adhesión a una densidad de 1,6, 3, o 6×10^5 células/ml (0,5, 1, o 2×10^6 células en volúmenes de 3 ml) en medio DC-HAIF. Las bandejas se colocaron en una plataforma giratoria a 80-100 rpm en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%. En estas condiciones, las hESC se aglutinaron en pequeñas esferas de células viables morfológicamente tras 24 horas.

[0191] El medio de los pocillos se cambió al segundo día, y posteriormente, cada día. Los agregados en suspensión continuaron proliferando, creciendo cada vez más con el tiempo sin signos obvios de diferenciación (Figura 17). Algunas esferas siguieron agregándose durante el transcurso del cultivo, ya que algunos agregados se hacían mucho mayores que la mayoría. Además, podían observarse agregados no esféricos en el proceso de unión durante los primeros días del cultivo. Para limitar esta agregación continua, se incluyeron 28 μg/ml de DNasa en algunos cultivos en suspensión durante las primeras 24 horas. Este enfoque pareció conducir a la agregación inicial, con agregados relativamente mayores, pero más escasos, formados en presencia de la DNasa. No obstante, no está claro si el tratamiento con DNasa redujo la unión posterior de esferas y la exposición a la DNasa hizo de manera consistente que estos agregados fuesen más difíciles de romper al dividirlos.

[0192] Los cultivos en suspensión se disgregaron con ACCUTASE™ aproximadamente cada 7 días, y se establecieron nuevas esferas. Aunque las densidades variaron en distintos experimentos, las esferas establecidas en este intervalo de densidades ($1,6-6 \times 10^5$ células/ml) podían mantenerse en el cultivo durante más de 12 pases, o >80 días, sin signos morfológicos de diferenciación. Los análisis por FISH de hESC en suspensión pasadas en series también se llevaron a cabo para evaluar el número de cromosomas para

aneuploidías comunes. Las células BG02 que se habían cultivado en suspensión durante 6 pases exhibieron conteos normales para el hChr 12 (el 96 % dos copias, n=788), hChr 17 (el 97 % dos copias, n=587), hChr X (el 97 % una copia, n=724) y hChr Y (el 98 % una copia, n=689).

Ejemplo de referencia 13 - Expansión de células diferenciables en un cultivo en suspensión

5 **[0193]** A diferencia del cultivo de cuerpos embrioides en presencia de suero o inductores de la diferenciación, los agregados de hESC en suspensión en DC-HAIF no parecieron diferenciarse. No se observó endodermo visceral evidente, ni la formación de estructuras que se parecieran a cavidades proamnióticas, los cuales son signos clásicos de la diferenciación de cuerpos embrioides. Para examinar la falta de diferenciación con más detalle, los cultivos se volvieron a colocar en condiciones adherentes sobre MATRIGEL™ diluido a 1:200, y se cultivaron en DC-HAIF. Estos cultivos principalmente tampoco estaban diferenciados, y no exhibieron signos morfológicos obvios de un aumento de la diferenciación como la presencia de células aplanadas más grandes, o regiones estructuradas.

10 **[0194]** Se utilizó un conteo de células para evaluar el índice de crecimiento relativo de las células en suspensión en comparación con el cultivo adherente. En este experimento, se pasó un cultivo adherente de células BG02 con ACCUTASE™, y se colocaron aproximadamente 1×10^6 células en pocillos de cultivo adherente o en suspensión paralelos. Las células individuales se contaron en los días 1-6 y se representaron en una escala logarítmica (Figura 18). Aunque una proporción inicial más alta de hESC era viable tras 24 horas en un cultivo adherente (~90 % vs. ~14 %), en adelante los índices de crecimiento eran comparables. Esto indicaba que las hESC podían proliferar igual rápido en un cultivo en suspensión que en un cultivo adherente tradicional. Los conteos de células llevados a cabo durante los pases permitieron estimar la cantidad de expansión posible en este sistema de suspensión simple. En varios cultivos sembrados con 5×10^5 células, se generaron aproximadamente 10^7 células o más tras 7 días. La expansión tras 7 días en un cultivo en suspensión equivale a una expansión de aproximadamente 20 veces o más, con la expansión más grande observada siendo ~24 veces el número de células de entrada.

25 **Ejemplo de referencia 14 - Características de las células diferenciables expandidas en un cultivo en suspensión**

30 **[0195]** Se utilizó una RT-PCR cuantitativa (qPCR) para comparar la expresión de genes en hESC cultivadas en suspensión y en un cultivo adherente en DC-HAIF. Se observaron niveles comparables de OCT4, un marcador de células pluripotentes, en ambos formatos de cultivo, confirmando que los cultivos mantenidos en suspensión principalmente no estaban diferenciados. SOX17, un marcador de endodermo definitivo, no se expresó en ninguna población de hESC. El análisis por qPCR también examinó el potencial de la suspensión de hESC de diferenciarse en endodermo definitivo, como agregados en suspensión. Las hESC en suspensión y adherentes se diferenciaron utilizando condiciones paralelas. Los cultivos de hESC se trataron con RPMI que contenía BSA al 2 %, 100 ng/ml de Activina A, 8 ng/ml de FGF2, y 25 ng/ml de Wnt3A durante 24 horas, seguido de 2 días en el mismo medio sin Wnt3A. La expresión de OCT4 se reguló por disminución, y la expresión de SOX17 se reguló por incremento de manera similar en ambas muestras de endodermo definitivo en comparación con hESC no diferenciadas. Este análisis de la diferenciación confirmó que las hESC cultivadas en suspensión en DC-HAIF mantuvieron su potencial de diferenciación, tal como se demostró por la formación probable de endodermo definitivo.

40 **Ejemplo de referencia 15 - Adición de un inhibidor de apoptosis en un cultivo en suspensión**

[0196] Para atenuar la pérdida de células tras los pases iniciales en suspensión, se añadió un inhibidor de apoptosis al medio. Las células se pasaron como en el Ejemplo 12, excepto que se añadió Y-27632, un inhibidor de la quinasa de doble espiral asociada a p160-Rho (ROCK), al medio.

45 **[0197]** Se formaron agregados en suspensión de células BG02 sembrando 2×10^6 células individuales en placas de 6 pocillos en 3 ml de medio DC-HAIF, a 100 rpm sobre una plataforma giratoria en una incubadora (Tabla 2, Experimento A). Se añadió 10 μ M de inhibidor de ROCK Y27632 a los pocillos de ensayo durante el transcurso del experimento y los cultivos se observaron a diario y se contaron tras 24 horas (día 1) y tras 4 o 5 días. Tal como se muestra en la figura 20, la adición de Y27632 afectó profundamente a la fase de agregación inicial del cultivo en suspensión. En comparación con las células agregadas en un medio sin inhibidor, se formaron agregados mucho mayores en presencia de Y27632 (Figura 20). El conteo de células confirmó que había más células viables en presencia del inhibidor (Tabla 2, Experimento A). Esta diferencia en el número celular se mantuvo durante el transcurso del periodo de cultivo, observándose también más células en el día 4, en comparación con los cultivos sin inhibidor. En cuanto a los experimentos de cultivos en suspensión anteriores, las células expuestas a Y27632 también podrían pasarse en serie, y mantenerse en un estado no diferenciado (no se muestra). Cuando los agregados se volvieron a dividir, se observó casi el doble de células con el tratamiento de Y27632 (Tabla 2, Experimento A). El análisis por RT-PCR demostró que las células BG02 cultivadas en suspensión en presencia de Y27632 se mantuvieron sin diferenciar (Figura 21).

55 **[0198]** Como algunos experimentos anteriores habían mostrado que los índices de crecimiento de células en suspensión y en un cultivo adherente eran similares tras las primeras 24 horas, se llevó a cabo un experimento en el que se eliminó Y27632 tras este periodo inicial (Tabla 2, Experimento B). En consonancia con estas

observaciones anteriores, el Y27632 potenció la supervivencia inicial y la agregación de hESC tras el pase inicial, pero la retirada del inhibidor tras 24 horas no afectó de manera negativa al número y al conteo de viabilidad de las células analizadas en el día 5. Se generaron $1,4 \times 10^7$ (+Y27632) y $1,8 \times 10^7$ (+/-Y27632) células viables cuando el inhibidor estaba presente, en comparación con las $3,9 \times 10^6$ células en cultivos sin tratamiento. Este análisis confirmó que el Y27632 tenía un mayor impacto durante las primeras 24 horas del cultivo de hESC en suspensión.

[0199] Debido a la mejora de la supervivencia y la agregación observada en la presencia de Y27632, se llevó a cabo un experimento para examinar si era posible reducir el número de células utilizadas para sembrar cultivos en suspensión (Tabla 2, Experimento C). Experimentos anteriores habían indicado que sembrar células madre embrionarias a una densidad baja de aproximadamente 5×10^5 células por 3ml de DC-HAIF, o menos, no funcionaba bien. Para determinar si la adición de un inhibidor de ROCK permitiría sembrar células a densidades más bajas, se utilizó un intervalo de concentraciones celulares (de aproximadamente 2×10^6 células totales hasta aproximadamente 1×10^5 células totales para sembrar cultivos en suspensión de células en bandejas de 6 pocillos en 3 ml de DC-HAIF. Se añadieron 10 μ M de Y27632 a todas las condiciones, y el número celular y la viabilidad se evaluaron en el día 5. Se observó una agregación y una expansión satisfactorias incluso en bajas densidades de siembra. Se observó una expansión multiplicada aproximadamente por 13 de células viables incluso en cultivos en los que solo se sembraron 1×10^5 células. Por tanto, la inhibición de ROCK con Y27632 facilitó la supervivencia inicial de hESC en densidades mucho más bajas en este sistema en suspensión.

Tabla 2 – Cultivos en suspensión con y sin un inhibidor de apoptosis

Expt.	Tratamiento	Siembra	Conteo de células: total (viable, %)		
			p0, día 1	p0, día 4	p1, día 4
A	HAIF	2×10^6	$1,9 \times 10^6$ (3,5x10 ⁵ , 19 %)	$1,8 \times 10^6$ (1,3x10 ⁶ , 75 %)	$2,5 \times 10^6$ (2,2x10 ⁶ , 88 %)
	+Y27632	2×10^6	$1,6 \times 10^6$ (1,2x10 ⁶ , 74 %)	$7,8 \times 10^6$ (7,1x10 ⁶ , 91 %)	$4,6 \times 10^6$ (4,2x10 ⁶ , 91 %)
				p0, día 5	
B	HAIF	2×10^6	$2,9 \times 10^6$ (5,5x10 ⁵ , 26 %)	$4,8 \times 10^6$ (3,9x10 ⁶ , 81,3 %)	
	+Y27632	2×10^6	$1,9 \times 10^6$ (1,4x10 ⁶ , 73 %)	$1,5 \times 10^7$ (1,4x10 ⁷ , 92 %)	
	+/-Y27632	2×10^6	N/A	$1,9 \times 10^7$ (1,8x10 ⁷ , 96 %)	
				p0, día 5	
C	+Y27632	2×10^6	$1,9 \times 10^6$ (1,6x10 ⁶ , 84 %)	$1,4 \times 10^7$ (1,2x10 ⁷ , 90 %)	
		1×10^6	$8,7 \times 10^5$ (6,6x10 ⁵ , 76 %)	$8,6 \times 10^6$ (7,8x10 ⁶ , 91 %)	
		5×10^5	$4,6 \times 10^5$ (3,5x10 ⁵ , 75 %)	$5,7 \times 10^6$ (5,3x10 ⁶ , 93 %)	
		$2,5 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$ (2,3x10 ⁵ , 91 %)	$2,7 \times 10^6$ (2,5x10 ⁶ , 91 %)	
		10^5	$6,8 \times 10^4$ (5,4x10 ⁴ , 79 %)	$1,4 \times 10^6$ (1,3x10 ⁶ , 92 %)	
Expt.=Experimento; p0=pase 0; p1=pase 1; N/A= No disponible; El conteo de células y los porcentajes se redondean en 0 y 1 cifra decimal, respectivamente.					

Ejemplo de referencia 16 - Cultivos en suspensión en varios medios

[0200] Para determinar si las suspensiones de células madre embrionarias podían cultivarse en ausencia de FGF2 y/o Activina A, las células madre embrionarias se cultivaron en varios tipos de medios, con y sin estos factores. La tabla 3 muestra resultados de conteo de células de cultivos en suspensión e indicadores de que los cultivos en suspensión podrían expandirse con éxito en ausencia de FGF2 exógeno (condiciones HAI), así como sin FGF2 exógeno o Activina A (condiciones HI). La adición de Y27632 aumentó la producción de células generadas hacia el día 5 en todas las condiciones. Además, las células de cada medio se pasaron con éxito sin signos morfológicos de diferenciación.

Tabla 3 - Cultivos en suspensión en varios medios

Tratamiento	Siembra	Conteo de células: total (viable, %)	Expansión (x veces)
		p0, día 5	
HAIF	2×10^6	$7,7 \times 10^6$ (6,5x10 ⁶ , 83 %)	3,25
HAI	2×10^6	$7,0 \times 10^6$ (6,3x10 ⁶ , 91 %)	3,15
HI	2×10^6	$6,4 \times 10^6$ (5,3x10 ⁶ , 83 %)	2,65
HAIF+Y27632	2×10^6	$1,5 \times 10^7$ (1,3x10 ⁷ , 90 %)	6,5

HAI+Y27632	2x10 ⁶	1,5x10 ⁷ (1,3x10 ⁷ , 91 %)	6,5
HI+Y27632	2x10 ⁶	1,9x10 ⁷ (9,2x10 ⁶ , 49 %)	4,6

Ejemplo de referencia 17 - Resultados de la velocidad de cizallamiento optimizada en el aumento de la supervivencia, la uniformidad de la densidad y el tamaño de los agregados de células en suspensión

5 [0201] Se contempla que cualquier línea celular que pueda mantenerse en un cultivo celular en suspensión se beneficiará de y puede utilizarse según los sistemas, métodos y aparatos dados a conocer en la presente memoria. Las células incluyen, pero sin carácter limitativo, células de mamíferos, incluyendo, pero sin carácter limitativo, las líneas celulares humanas CyT49, CyT203, Cyt25, BG01 y BG02, líneas de células madre de ratón, perro y primates no humanos, así como de otro tipo.

10 [0202] Los resultados proporcionados en la presente memoria indican que la proliferación celular y la diferenciación pueden mantenerse en niveles de control o atenuarse, dependiendo de los parámetros de funcionamiento del aparato reactor, en concreto la velocidad de flujo de cultivo y la fuerza de cizallamiento proporcionada. La fuerza de cizallamiento ejercida en el cultivo celular puede tener efectos significativos en la proliferación celular. Un sistema simétrico, como una plataforma giratoria empleada en la presente memoria, proporciona una tensión de cizallamiento principalmente laminar y uniforme alrededor del recipiente, mientras que un sistema asimétrico y de montaje, como un biorreactor con un depósito de agitación, presenta regiones de flujo turbulento que se caracterizan por una tensión de cizallamiento localmente alta. Por tanto, si el biorreactor o el aparato de cultivo celular no es un sistema simétrico, la dirección del flujo del cultivo afecta a la naturaleza y al grado de una tensión de cizallamiento que resulta de la rotación.

20 [0203] Por supuesto, las velocidades de rotación óptimas son específicas del cultivo, y pueden variar dependiendo del conteo de células en el cultivo celular, la viscosidad del medio de cultivo, el tipo de medio, la robustez de las células particulares en suspensión (algunas células son capaces de soportar un nivel más alto de fuerzas de cizallamiento que otras), etc. Las velocidades de rotación óptimas se determinan fácilmente para el conjunto concreto de condiciones en cuestión. En concreto, las velocidades de rotación descritas y contempladas en el presente documento son útiles a fin de mantener condiciones de flujo laminar. Por tanto, los experimentos descritos en la presente memoria estaban en condiciones en las que: 1) la proliferación celular y la diferenciación se mantuvo en o cerca de los niveles de control, y 2) en condiciones en las que la proliferación celular y la diferenciación se atenúan. Lo que sigue es un método general que funciona bien para mantener cultivos de agregados de células madre embrionarias o cultivos de agregados de células madre embrionarias diferenciadas. Un experto en la materia puede optimizar el tamaño y la forma de los agregados de células en función de la descripción proporcionada en el presente documento.

35 [0204] A continuación, la tabla 4 describe una tensión y velocidad de cizallamiento tal como se relaciona con el diámetro (μm) de los agregados de células. Las células madre embrionarias humanas se agregaron durante 1, 2, 3 y/o 4 días a varias velocidades de rotación utilizando un rotor orbital (Barnstead LabLine Multipurpose Rotator): 60 rpm, 80 rpm, 100 rpm, 120 rpm, 130 rpm, 140 rpm, 150 rpm y 160 rpm. La tabla 4 también demuestra que la velocidad de cizallamiento efectiva experimentada por los agregados de células depende del diámetro de ese agregado celular.

Tabla 4 – El tamaño de los agregados de células depende de la velocidad de cizallamiento y la tensión de cizallamiento

Diámetro del agregado (μm)	Velocidad de rotación (rpm)	Tensión adimensional	Tensión de cizallamiento (dyn/cm^2)	Velocidad de rotación (1/seg)
200	140	0,94	3,16	322,24
	120	0,76	2,06	210,12
	100	0,59	1,24	126,82
	80	0,43	0,66	67,05
	60	0,29	0,30	30,17
175	140	0,72	2,42	246,72
	120	0,58	1,58	160,87
	100	0,45	0,95	97,10
	80	0,33	0,50	51,33
	60	0,22	0,23	23,10
150	140	0,53	1,78	181,26
	120	0,43	1,16	118,19
	100	0,33	0,70	71,34
	80	0,24	0,37	37,71
	60	0,16	0,17	16,97

Diámetro del agregado (µm)	Velocidad de rotación (rpm)	Tensión adimensional	Tensión de cizallamiento (dyn/cm ²)	Velocidad de rotación (1/seg)
125	140	0,37	1,23	125,88
	120	0,30	0,80	82,08
	100	0,23	0,49	49,54
	80	0,17	0,26	26,19
	60	0,11	0,12	11,79
100	140	0,24	0,79	80,56
	120	0,19	0,51	52,53
	100	0,15	0,31	31,71
	80	0,11	0,16	16,76
	60	0,07	0,07	7,54

[0205] Para determinar como la velocidad de rotación controla el diámetro de los agregados de células ES, generamos agregados de ES por rotación a 100rpm, 120rpm o 140rpm. Los diámetros de los agregados se cuantificaron a partir de imágenes de contraste de fase con un aumento de 5X tomadas después de 2 días en un cultivo en rotación. Para el cultivo a 100 rpm, el diámetro medio +/- SD era de 198µm +/- 21µm. Para el cultivo a 120 rpm, el diámetro medio +/- SD era de 225µm +/- 28µm. Para el cultivo a 140 rpm, el diámetro medio +/- SD era de 85µm +/- 15µm. Cada distribución de diámetros es significativa de forma estadística (p<001) al utilizar un ANOVA y el ensayo posterior de comparación múltiple de Tukey. Tal como se muestra en la Tabla 4, la velocidad de cizallamiento aumenta de manera exponencial de 60 a 90 rpm, por ejemplo, la velocidad de cizallamiento para un agregado de 100 µm era de aproximadamente 30 s⁻¹ a 100 rpm y aproximadamente 80 s⁻¹ a 140 rpm, que es un aumento de aproximadamente el triple. Normalmente, las velocidades de rotación de más de 140 rpm dieron como resultado agregados de células hES mayores y menos uniformes. Los cultivos de agregados celulares también pueden cultivarse de manera inicial a velocidades de rotación reducidas, por ejemplo, de 60 rpm a 80 rpm durante aproximadamente 1 día, y posteriormente cultivarse a una velocidad de rotación mayor (por ejemplo, a 100 rpm-140 rpm o más) sin ningún efecto perjudicial para el tamaño y/o la forma de los agregados de células.

[0206] Es importante destacar que, aunque los diámetros de los agregados de células variaron en consecuencia con la velocidad de cizallamiento, no había ningún efecto profundo en la expresión de genes entre las varias condiciones, es decir, en las distintas velocidades de rotación y/o los agregados de células con distinto tamaño y forma. Esto es, los marcadores distintivos observados para las células ES pluripotentes o los tipos de células derivadas de hESC (por ejemplo, endodermo definitivo, endodermo del intestino anterior, endodermo PDX1, endodermo pancreático, y células endocrinas) eran coherentes con lo descrito en d'Amour et al., *supra* y en solicitudes relacionadas.

[0207] Para determinar el efecto de la velocidad de rotación, la velocidad de cizallamiento y la tensión de cizallamiento en la supervivencia celular o la viabilidad celular, se demostró que se mejoró la supervivencia por un único día a velocidades reducidas (por ejemplo, de 60 rpm a 80 rpm). Por ejemplo, el intervalo de supervivencia celular era de al menos un 60 % o más a velocidades de rotación de entre 60 rpm y 140 rpm. Además, el número de agregados celulares era mayor en el d1, d2 y d3 en los cultivos con una velocidad de rotación reducida en comparación con velocidades de rotación más altas (por ejemplo, de 100 rpm o más). También había una disgregación y alteración significativa cuando los agregados celulares se cultivaron a las velocidades de rotación más altas (por ejemplo a 140 rpm o más). Tomados conjuntamente, estos datos indican que la supervivencia celular se aumenta cuando los agregados de células se cultivaron por primera vez durante al menos un único día a una velocidad de rotación reducida; no obstante, no hubo ninguna caída significativa en la supervivencia celular cuando las velocidades de rotación se aumentaron de 100 rpm a 140 rpm; aunque se prefiere una diferenciación a velocidades de rotación de menos de 140 rpm.

[0208] También, el volumen del cultivo afecta a la velocidad de cizallamiento y a la tensión de cizallamiento que a su vez, tal como se ha expuesto anteriormente, afecta a la uniformidad del tamaño y la forma de los agregados celulares. Por ejemplo, cuando se inician cultivos en suspensión de células individuales para formar agregados de células en 6 ml en comparación con los que se inician en 4 ml dieron como resultado agregados de células con una forma y tamaño más uniformes. Véase la figura 23, en la que los diámetros de los agregados de células variaron de menos de 50 micras a más de 250 micras cuando se cultivaron utilizando 4 ml, mientras que cuando se cultivaron en 6 ml, los diámetros tuvieron un intervalo más estrecho y variaron de más de 50 micras a menos de 200 micras. Aunque los agregados de células descritos se iniciaron a partir de cultivos en suspensión de células individuales hechos a partir de cultivos de hESC adherentes, podría esperarse que los cultivos en suspensión de agregados de células iniciados a partir de cultivos en placas adherentes derivados de hES se comportaran de manera similar. Por tanto, es posible que el volumen del medio no dependa de la etapa en la que se iniciaron los cultivos en suspensión de agregados de células.

[0209] Asimismo, los agregados de hESC pueden cultivarse en varias condiciones con distintos medios. Por ejemplo, los cultivos de agregados de hESC pueden mantenerse en medio que contiene StemPro®, en medio

que contiene DMEM/F12; o en medio DMEM/F12 que contiene reemplazo de suero KnockOut (KSR, Invitrogen) al 20 %; o bien en medio DMEM/F12 y StemPro® que contiene además 20 ng/ml de FGF (R&D Systems) y 20 ng/ml de Activina A (R&D Systems); o medio DMEM/F12 y StemPro® que contiene además 10 ng/ml de Heregulina B. De forma alternativa, puede utilizarse cualquiera de los medios mencionados en el presente documento y los que están disponibles en el mercado también complementados con KSR exento de sustancias xenógenas (Invitrogen). Por último, los agregados de células también se produjeron y se cultivaron en cualquiera de los medios anteriores y además que no contuvieran FGF exógeno.

Ejemplo de referencia 18 - Los agregados de células hES en suspensión pueden diferenciarse en células de tipo linaje endodérmico

10 **[0210]** Se mantuvieron células madre embrionarias humanas (células hES) y se diferenciaron *in vitro* en endodermo definitivo (etapa 1), en endodermo del intestino anterior y en endodermo PDX1 sustancialmente tal como se describe en d'Amour et al. (2006) *supra*, y en las solicitudes de patente estadounidense n.º 2005/0266554, 2005/0158853, 2006/0003313, 2006/0148081, 2007/0122905 y 2007/0259421.

15 **[0211]** En resumen, se mantuvieron células (placas) adherentes de hESC pluripotentes no diferenciadas en capas de alimentación de fibroblasto de embrión de ratón (Millipore, anteriormente Chemicon o Specialty Media) o en placas de 60 mm recubiertas con suero humano (concentración final de un 0,1 a un 20 %; Valley Biomedical) en DMEM/F12 (Mediatech) complementado con reemplazo de suero KnockOut (Invitrogen/Gibco) al 20 %, 1mM de aminoácidos no esenciales (Invitrogen/Gibco), Glutamax (Invitrogen/Gibco), penicilina/estreptomina (Invitrogen/Gibco), 0,55 mM de 2-mercaptoetanol (Invitrogen/Gibco) y de 4 ng/ml a 20 ng/ml de FGF2 humano recombinante (R&D Systems). De manera alternativa, los medios anteriores pueden complementarse con KSR exento de sustancias xenógenas (Gibco) y suero humano. Además, se ha añadido suero humano al cultivo después de que las células hES se hayan sembrado en placas de cultivo sin revestir. Se añadieron dosis bajas de Activina A (2-25 ng/ml, R&D Systems) al medio de cultivo de crecimiento para ayudar a mantener un crecimiento no diferenciado. Las células hES pluripotentes adherentes en el día 0 (d0) expresan altos niveles de marcador de proteína pluripotente, OCT 4. Véase la FIG.1, panel A, controles de placa en d0.

25 **[0212]** Las células se pasaron manual o enzimáticamente de nuevo sustancialmente tal como se describe en d'Amour et al., *supra*. Los cultivos en suspensión se disociaron y se transfirieron a un tubo cónico y se centrifugaron a 1000 rpm durante aproximadamente 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se llevó a cabo un conteo de células estándar utilizando un analizador celular ViCell. El número de células normal de una placa de 60mm varía de 3×10^6 a 12×10^6 células, dependiendo de la línea celular, y el número de días en el cultivo antes de los pases. Una vez que se determina el número de células en la suspensión de células primaria, la suspensión se diluyó de manera adicional con StemPro® o medio que contiene KSR exento de sustancias xenógenas tal como se ha descrito anteriormente para un volumen final de 1×10^6 células/ml. Este volumen puede incrementarse hasta $>4 \times 10^6$ células/ml pero puede requerir una alimentación más frecuente. Se añadió inhibidor de ROCK Y27632 (Axxora) a la suspensión de células a una concentración final de aproximadamente 1-15 μ M, normalmente 10 μ M, y el tubo se mezcló mediante inversión suave. En algunos casos, no se añadió Y27632 a la suspensión para controlar el ritmo de formación de agregados. Las células resuspendidas se distribuyeron después del mismo modo en cada pocillo de una placa de 6 pocillos de baja unión (aproximadamente 5 ml de suspensión de células por pocillo) y se situó en la plataforma giratoria de 100 rpm a 140 rpm durante aproximadamente 1-4 días antes de la diferenciación.

30 **[0213]** Durante este periodo de cultivo, los cultivos y los agregados de células hES formados se alimentaron al menos 1-2 veces al día sustituyendo 4 ml de medio con 4 ml de medio StemPro® fresco sin Y27632, o cualquiera de los medios descritos complementados con KSR exento de sustancias xenógenas. Los cambios de medio ("alimentación") deberían llevarse a cabo lo más rápido posible para interrumpir o evitar cualquier aglomeración y para romper la tensión superficial que pueda hacer que los agregados floten durante la rotación. Además, para optimizar el crecimiento y la uniformidad del tamaño y la forma de los agregados de células, los agregados de células no deberían retirarse del aparato o plataforma giratoria durante ningún largo periodo de tiempo. Por tanto, pueden producirse agregados de células hES a partir de cultivos adherentes de células hES que se han establecido bien en la técnica.

35 **[0214]** Los agregados de células hES pueden diferenciarse ahora directamente como agregados en suspensión y sustancialmente tal como se describe en D'Amour et al. (2006) *supra*. En resumen, el medio StemPro® (sin Y27632) o cualquiera de los medios descritos complementados con KSR exento de sustancias xenógenas se retiró de los pocillos (por ejemplo, aspirándolo) y los agregados de células hES se lavaron con 5 ml de RMPI sin suero (Cat. 15-040-CV; Mediatech), Penicilina/Estreptomina (Invitrogen) y Glutamax (Invitrogen) (al que también se le hace referencia como medio RMPI, Pen/Strep y Glutamax), FBS al 0 %, PenStrep al 1 %, Glutamax al 1 %. Después, la placa de 6 pocillos se volvió a situar en la plataforma giratoria durante 1-2 minutos antes de que se retirara el medio de lavado. Esto se repitió al menos dos veces o hasta que la insulina y/o el IGF-I se haya eliminado lo suficiente, porque aunque sea necesario para mantener la pluripotencia y la autorrenovación de las hESC, los mismos factores son perjudiciales para la diferenciación controlada, síncrona, dirigida al linaje. La diferenciación en todos los linajes de endodermo añadiendo y retirando varios mitógenos

exógenos se llevó a cabo a 100 rpm sustancialmente tal como se describe en d'Amour et al. (2006), *supra*, y tal como se describirá con más detalle a continuación.

Diferenciación en endodermo definitivo (etapa 1)

5 **[0215]** Se diferenciaron agregados de células madre embrionarias humanas en RPMI, 100 ng/ml de Activina A, y concentraciones variables de FBS (FBS definido (EE.UU.), HyClone, n.º de catálogo SH30070.03), y 25 ng/ml - 75 ng/ml de Wnt3a durante el primer día, y en medio de RMPI, Pen/Strep y Glutamax, conteniendo además 100 ng/ml de Activina A y concentraciones variables de FBS (HyClone) durante el segundo y tercer día (d0 a d2). En la mayoría de experimentos de diferenciación las concentraciones de FBS eran del 0 % durante las primeras 24 horas (d1), del 0,2 % durante las segundas 24 horas (d2) y del 0,2 % durante las terceras 24 horas (d3), si se utilizase o desease un protocolo de etapa 1 de tres días. Preferiblemente se lleva a cabo un protocolo de etapa 1 de dos días.

15 **[0216]** El análisis por QPCR de agregados de células derivadas de hESC en cultivos en suspensión al final de un protocolo de etapa 1 de 2 días indica una diferenciación dirigida altamente eficiente de agregados de hESC en endodermo definitivo en comparación con los controles en placas adherentes. Se formaron agregados de células a 100 rpm, 120 rpm y 140 rpm. En algunos experimentos, los agregados derivados de hESC se transfirieron a biorreactores (matraces giratorias) antes de la diferenciación. Los cultivos de células hES adherentes así como los cultivos de células hES que se diferenciaron en células de endodermo definitivo se utilizaron como controles. Se observó un aumento de los niveles de expresión de SOX17 y FOXA2 en los agregados de células en suspensión y el cultivo adherente, y en comparación con los agregados de células hES no diferenciadas y los controles en placas adherentes. Véase la FIG. 22, paneles C (SOX17) y D (FOXA2) en la etapa 1 (d2). Asimismo, los niveles de expresión de SOX7, un gen asociado con la contaminación de endodermo visceral y extraembrionario, se redujo de manera significativa en los agregados de células de endodermo definitivo, en comparación con los controles en placas adherentes de endodermo definitivo. Véase la FIG. 22, panel L en la etapa 1 (d2).

25 **[0217]** Los análisis por citometría de flujo utilizando CXCR4 y proteína HNF3beta (FoxA2) indicaron que la diferenciación dirigida de agregados de células derivadas de ES dieron como resultado agregados que eran positivos en CXCR4 en al menos un 97 %, positivos en HNF3beta en al menos un 97 % y copositivos en CXCR4/HNF3beta en al menos un 95 %.

30 **[0218]** Para evaluar de manera adicional la eficiencia de la diferenciación de agregados de células hES, se examinó la expresión de SOX17 y HNF3beta en criosecciones de agregados de células derivadas de hES utilizando inmunocitoquímica y microscopía confocal. El análisis de las imágenes de criosecciones teñidas demostró que más de ~90 % de todas las células al final de la etapa 1 (células de endodermo definitivo) expresaron HNF3beta y/o SOX17.

35 **[0219]** Estos datos indican que puede conseguirse una diferenciación altamente eficiente de células madre embrionarias como agregados de células, y en función de los niveles de expresión de los marcadores de endodermo definitivo distintivos, los métodos para producir endodermo definitivo tal como se describen en el presente documento son más eficientes en comparación con la diferenciación de cultivos de placas adherentes.

Diferenciación en células de endodermo de intestino anterior negativas en PDX1 (etapa 2)

40 **[0220]** Los agregados de células de endodermo definitivo humano de la etapa 1 se lavaron brevemente en PBS +/- y luego se diferenciaron en medio de RMPI, Pen/Strep y Glutamax, conteniendo además FBS al 2 %, y 25 ng/ml - 50 ng/ml de KGF (R&D Systems) durante 2 o 3 días más. En algunos experimentos se añadieron 5 µM de SB431542 (Sigma Aldrich, Inc.) o 2,5 µM de inhibidor de TGF-beta IV (Calbiochem) durante el primer día de la etapa 2; y de forma alternativa con medio de RMPI, Pen/Strep y Glutamax media/FBS/ITS (insulina/transferrina/selenio) al 0,2 %.

45 **[0221]** Se llevó a cabo un análisis por QPCR sustancialmente tal como se ha expuesto anteriormente. Se observó un aumento de los niveles de expresión de HNF1beta y HNF4alfa en los cultivos de agregados de células en comparación con los controles en placas adherentes. Véase la FIG. 22, paneles E (HNF1B) y panel O (HNF4alfa) en la etapa 2 (d5). Los métodos para producir los agregados de hESC o de células derivadas de hESC en las etapas específicas, 0, 1, 2 y 5 (o "dAggs" para agregados diferenciadas) se modificaron ligeramente en el panel O. Los agregados de células diferenciadas en este contexto hacen referencia a cultivos de agregados de hESC o de células derivadas de hESC diferenciadas que se iniciaron a partir de cultivos de control en placas adherentes, de la etapa correspondiente, a partir del cual se derivaron. Por ejemplo, en la etapa 1, los cultivos en suspensión de agregados de células diferenciadas ("dAggs") se iniciaron desde una placa adherente en la etapa 0 y se incubaron en cualquiera de los medios descritos en la presente memoria durante aproximadamente 24 horas en una plataforma giratoria de 100 rpm a 140 rpm. Estos agregados de células diferenciadas se diferenciaron después de manera adicional en células de endodermo definitivo de la etapa 1 con los correspondientes controles en placas adherentes. En la figura 22, panel O se muestra que no hay una expresión de HNF4alfa (HNF4A) significativa ni en los agregados de células diferenciadas de la etapa 1 ni en los controles en placas adherentes. Por el contrario, se llevó a cabo un método similar para las muestras de etapa 2 y produjo

un aumento del nivel de expresión en HNF4A. La expresión HNF4A también es fuerte para las muestras en la etapa 5.

5 **[0222]** Además, los niveles de expresión de genes asociados con el endodermo extraembrionario (SOX7) se redujeron significativamente en los cultivos de agregados de células derivadas de hES en comparación con los controles de placas. Véase la FIG. 22, panel L en la etapa 2 (d5). Por tanto, demostrando que la diferenciación dirigida de células de endodermo de intestino anterior negativas en PDX1 mediante el cultivo en suspensión de agregados de células elimina los contaminantes de endodermo extraembrionario.

10 **[0223]** Tomados conjuntamente, estos datos indican que la diferenciación dirigida de agregados de células hES es altamente eficiente, y en función de los niveles de expresión de los marcadores de endodermo de intestino anterior negativo en PDX1 distintivos, los métodos para producir células de endodermo de intestino anterior se mejoran en comparación con la diferenciación con cultivos de placa adherente.

Diferenciación en células de endodermo de intestino anterior positivas en PDX-1 (etapa 3)

15 **[0224]** Las células de endodermo de intestino anterior de la etapa 2 se diferenciaron de manera adicional en RMPI sin suero, Glutamax (Invitrogen) y penicilina/estreptomicina (Invitrogen), más suplemento B27 0,5X (Invitrogen/Gibco), y o bien de 1 μ M a 2 μ M de ácido retinoico (RA, Sigma) y 0,25 nM de KAAD-ciclopamina (Toronto Research Chemicals) durante de 1 a 3 días; o bien de 1 μ M a 2 μ M de ácido retinoico, 0,25 nM de KAAD-ciclopamina más 50 ng/ml de nogina (R&D systems). De manera alternativa, se añadió de 0,2 μ M a 0,5 μ M de RA y 0,25 nM de KAAD-ciclopamina al medio durante un día. Además, en algunos experimentos, no se añadió RA ni KAAD-ciclopamina al cultivo de agregados de células. En algunos modos de realización
20 adicionales, se añadieron concentraciones efectivas de BSA al 0,1 - 0,2 %.

[0225] Se observó un aumento de los niveles de expresión de PDX1 en agregados de células derivadas de hES en comparación con los controles en placas adherentes. Véase la FIG. 22, panel F (PDX1) en la etapa 3 (d8). Además, los niveles de expresión de genes asociados con el endodermo extraembrionario (SOX7) y el endodermo visceral (AFP) se redujeron de manera significativa en los cultivos de agregados de células derivadas
25 de hES en comparación con los controles de placas. Véase la FIG. 22, panel L (SOX7) y el panel N (AFP) en la etapa 3 (d8). Por tanto, demostrando que la diferenciación dirigida para producir células de endodermo de intestino anterior positivas en PDX1 mediante el cultivo en suspensión de agregados de células elimina los contaminantes de endodermo extraembrionario.

30 **[0226]** Tomados conjuntamente, estos datos indican que la diferenciación dirigida de agregados de células hES es altamente eficiente, y en función de los niveles de expresión de los marcadores de endodermo de intestino anterior positivo en PDX1 distintivos, los métodos para producir endodermo positivo en PDX1 se mejoran en comparación con los controles de cultivos adherentes en comparación con los controles en placas adherentes.

Diferenciación en células del endodermo pancreático o células progenitoras endocrinas pancreáticas (etapa 4)

35 **[0227]** En la etapa 4, el RA se retira de los cultivos de la etapa 3, los cultivos se lavaron una vez con DMEM más B27 (1:100 Gibco), y después el lavado se reemplaza o bien solo con suplemento DMEM+1XB27 o bien con cualquiera o cualquier combinación o todos los siguientes factores: Nogina (50 ng/ml), FGF10 (50 ng/ml), KGF (25-50 ng/ml), EGF (25-50 ng/ml), FBS al 1-5 % durante 4-8 días. En los casos en los que no se añadió RA, se añadió nogina a 30-100 ng/ml (R&D systems) al medio durante 1-9 días. Además, en algunos experimentos se añadió FGF10 a 25 ng/ml.

40 **[0228]** Se observó un aumento de los niveles de expresión de NKX6.1 y PDX-1 y PTF1A en los agregados de células derivadas de ES y los correspondientes controles en placas adherentes. Véase la FIG. 22, panel F (PDX1), panel G (NKX6.1) y panel P (PTF1A) en la etapa 4 (d11). En la FIG. 22, panel P, el gráfico de barras representa los resultados de los métodos para determinar si los agregados de células hES y células derivadas de hES en suspensión se vieron afectados por el número de células en un cultivo en placa adherente a partir del
45 cual se derivan. Aunque el panel P solo muestra resultados para 1×10^7 células, se iniciaron cultivos en suspensión de agregados de células a partir de varios recuentos de células, por ejemplo, 1×10^6 a 2×10^7 células. Todos eran sustancialmente similares y produjeron cultivos de agregados de células que tenían una buena viabilidad y una baja muerte celular. Por ejemplo, en la etapa 4, los cultivos en suspensión de agregados de células diferenciadas ("dAggs") se iniciaron desde una placa adherente de d5 (etapa 2) y se incubaron de nuevo en cualquiera de los medios descritos en la presente memoria durante aproximadamente 24 horas en una
50 plataforma giratoria de 100 rpm a 140 rpm. Estos agregados de células diferenciadas se diferenciaron de manera adicional en células de tipo endodermo pancreático de etapa 4 que expresan PTF1A (panel P). En comparación con los controles en placas adherentes de etapa 4 correspondientes, hay un aumento de la expresión de PTF1A.

55 **[0229]** Además, los niveles de expresión de AFP se redujeron de manera significativa en los agregados de células derivadas de hES en comparación con los controles en placas adherentes. Véase la figura 22, panel N en la etapa 4 (d11). Por tanto, demostrando que la diferenciación dirigida para producir células de endodermo pancreático positivas en PDX1 mediante el cultivo en suspensión de agregados de células elimina los contaminantes del endodermo visceral.

[0230] Los análisis por citometría de flujo utilizando las proteínas NKX6.1, HNF3beta y cromogranina (CHG) indicaron que la diferenciación dirigida de agregados de células derivadas de hES dieron como resultado agregados de células que eran positivos en CHG en al menos un 53 %, y copositivos en CHG y NKX6.1 en al menos un 40 %, y una pequeña cantidad de HNF3beta y otros tipos de células.

5 **[0231]** Se examinó la expresión de NKX6.1, PDX1 y NKX2.2 en criosecciones de agregados derivados de hES utilizando inmunocitoquímica y microscopia confocal al final de la etapa 4. El análisis de las imágenes indicó una diferenciación altamente eficiente de células agregadas en endodermo pancreático (o endodermo pancreático positivo en PDX1) con casi todas las células expresando PDX1 y grandes poblaciones de células expresando NKX6.1 (aproximadamente el 40 % de las células) y/o NKX2.2 (aproximadamente el 40 % de las células).

10 Diferenciación en células endocrinas de expresión de hormonas (etapa 5)

[0232] Para la diferenciación en la etapa 5, los agregados de células diferenciadas de la etapa 4 se continuaron en medio CMRL (Invitrogen/Gibco) o medio Pen/Strep y Glutamax, y en suplemento B27 0.5X. En algunos experimentos, también se complementó el medio con suero humano (Valley Biomedical) o suero bovino fetal en concentraciones que varían de 0,5 al 5 % durante la etapa 5.

15 **[0233]** De nuevo, de manera similar a los tipos de células de las etapas 2-4, se observó un aumento de la expresión de los genes asociada con el tipo de célula específico en comparación con los controles en placas adherentes. Por ejemplo, se observó un aumento de los niveles de expresión de las hormonas insulina (INS), glucagón (GCG) y somatostatina (SST). Véase la FIG. 22, panel I (INS), panel J (GCG) y panel K (SST) en la etapa 5 (d15). Además, los niveles de expresión de AFP y ZIC1, un gen asociado con el ectodermo, se redujeron de manera significativa en los agregados de células derivadas de hES en comparación con los controles en placas adherentes. Véase la figura 22, panel M (ZIC1) y el panel N (AFP) en la etapa 5 (d15). Por tanto, demostrando que la diferenciación dirigida para producir células endocrinas pancreáticas mediante el cultivo en suspensión de agregados de células elimina los contaminantes del ectodermo y el endodermo visceral.

25 **[0234]** La producción de células agregadas endocrinas de expresión de hormonas derivadas de hES se confirmó mediante análisis por citometría de flujo en el Día 23 del protocolo descrito. Los agregados se formaron inicialmente a 140 rpm en 5ml de DMEM/F12, comprendiendo de manera alternativa reemplazo de suero KnockOut (KSR, Gibco/Invitrogen compara 0063 para consistencia) o KSR exento de sustancias xenógenas (Invitrogen) y luego se diferenciaron a 100 rpm. El análisis de la expresión de las proteínas NKX6.1, cromogranina A, insulina, glucagón y somatostatina indica que los agregados derivados de células ES están compuestos por un ~20 % de epitelio pancreático con NKX6.1+/cromogranina A- y un ~74 % de tejido endocrino con cromogranina A+. Además, el 11 % de las células expresa insulina, el 14 % expresa glucagón y el 11 % expresa somatostatina. De estas, el 68 % de las células con insulina+ son positivas únicas, el 70 % de las células con glucagón+ son positivas únicas, y el 52 % de las células positivas en somatostatina son positivas únicas. Este grado de positividad en una única hormona supera los valores descritos para cultivos adherentes que eran mayormente células polihormonales.

35 **[0235]** Para evaluar de manera adicional la eficiencia de la diferenciación de agregados en células endocrinas que expresan hormonas, se examinó la expresión de glucagón, insulina y somatostatina en criosecciones de agregados derivados de ES utilizando inmunocitoquímica y microscopia confocal durante la etapa 5. El análisis de imágenes de criosecciones a 20X indica una diferenciación altamente eficiente de células agregadas en positividad hormonal, con casi todas las células expresando glucagón, somatostatina o insulina. También, a diferencia de experimentos de cultivos adherentes anteriores, una mayoría de las células del agregado parece expresar una única hormona, tal como ocurre *in vivo* durante el desarrollo.

Ejemplo de referencia 19 - Cultivos adherentes de varias etapas pueden formar agregados de células y diferenciarse en células de tipo endodermo pancreático

45 **[0236]** Lo siguiente demuestra que la producción de agregados de células derivadas de hES puede iniciarse no solo a partir de células hES pluripotentes, sino que los agregados de células pueden iniciarse directamente en un medio de diferenciación (agregados de células del día 0) así como a partir de células diferenciadas o derivadas de hES, por ejemplo, pueden producirse agregados de células a partir de células derivadas de hES en las etapas 1, 2, 4 y 5.

50 Agregados de células en el día 0

[0237] Agregados de células producidos en el primer día (d0) de la etapa 1: Se cultivaron células hES pluripotentes adherentes, se pasaron de manera manual o enzimática, se disociaron, se contaron, se sedimentaron y el pellet se volvió a suspender hasta un volumen final de aproximadamente 1×10^6 células/ml a 4×10^6 células/ml en una base de medio de diferenciación que contiene medio RMPI, Pen/Strep y Glutamax, y que contiene además 100 ng/ml de activina A, y 25 ng/ml-75 ng/ml de Wnt3a, y un 0,2 % de FBS (HyClone). Este volumen puede incrementarse hasta $>4 \times 10^6$ células/ml pero puede requerir una alimentación más frecuente. A veces se incluye DNasa a una concentración de 10-50 ng/ml En algunos casos, el inhibidor de ROCK Y27632 (Axxora) se añadió a la suspensión de células a una concentración final de 1-15 μ M, normalmente 10 μ M. En otros casos adicionales, se añadió ITS (insulina/transferrina/selenio, Gibco) a aproximadamente de 1:2000 a

1:5000. Se añadió el inhibidor de Rho-quinasa y de ITS para respaldar la supervivencia celular. Se distribuyeron células resuspendidas por igual en cada pocillo de una placa de 6 pocillos de baja unión sustancialmente tal como se ha descrito anteriormente, y se situó en la plataforma rotatoria a 100 rpm-140 rpm durante toda la noche. Durante este periodo de cultivo, se formaron agregados de células de forma y tamaño uniformes. En consecuencia, los cultivos con una densidad más alta se enriquecieron de manera efectiva o se enriquecieron de manera sustancial para células de tipo endodermo pancreático positivas en PDX-1 o de tipo progenitoras pancreáticas positivas en PDX. En el ejemplo 21 se proporcionarán más detalles.

[0238] Los agregados de células producidas en el d0 de la etapa 1 se alimentaron después hasta 1-2 veces al día con más medio de diferenciación que contiene medio RMPI, Pen/Strep y Glutamax, y que contiene además 100 ng/ml de activina A y un 0,2 % de FBS (HyClone) durante los 2-3 días siguientes. Las siguientes etapas (etapas 2-5) del protocolo son sustancialmente tal como se han descrito anteriormente para los agregados de ES.

Etapa 1 - día 2 a día 3

[0239] Agregados de células producidos en el d2-d3 de la etapa 1: Se cultivaron células hES adherentes y se pasaron sustancialmente tal como se ha descrito anteriormente y luego se diferenciaron en la etapa 1 sustancialmente como se describió en d'Amour et al. (2006), *supra*.

[0240] Los cultivos adherentes al final de la etapa 1 (aproximadamente en el d2 o d3 en el protocolo de diferenciación; células de tipo endodermo definitivo) se lavaron 1x con PBS-/- y se disociaron en células individuales con 2 ml de Accutasa precalentada durante aproximadamente 2-5 minutos a 37 °C utilizando una pipeta de 1 ml o 5 ml. Después, se añadieron 4ml de FBS al 10 % en medio RMPI, Pen/Strep y Glutamax y la suspensión de células individuales se filtró a través de un filtro azul de 40 micras (BD biosciences) en un tubo cónico de 50 ml. La células se contaron y se sedimentaron (centrifugado) sustancialmente tal como se ha descrito anteriormente.

[0241] El pellet celular se volvió a suspender en medio RMPI, Pen/Strep y Glutamax, conteniendo además FBS al 2 %, más DNasa (50-100 µg/ml, Roche Diagnostics) y 100 ng/ml de Activina A. De manera alternativa, el pellet celular se volvió a suspender en medio RMPI, Pen/Strep y Glutamax, más FBS al 2 % y DNasa (50-100 µg/ml), 25ng - 50 ng/ml de KGF (R&D Systems). En algunos experimentos, se incluyó 5 µM de SB431542 (Sigma Aldrich, Inc.) o 2,5 µM de Inhibidor de TGF-beta IV (Calbiochem) con el KGF). En algunos experimentos, se incluyó Y27332 (10 µM). Se distribuyeron células resuspendidas por igual en cada pocillo de una placa de 6 pocillos de baja unión sustancialmente tal como se ha descrito anteriormente, y se situó en la plataforma giratoria a 100 rpm-140 rpm durante toda la noche; en ese tiempo se formaron agregados de células de forma y tamaño uniformes.

[0242] Los agregados de células producidos al final de la etapa 1 se diferenciaron después de manera adicional. Las siguientes etapas (etapas 2-5) del protocolo son sustancialmente tal como se han descrito anteriormente para los agregados de ES en los Ejemplos 17 y 18.

Etapa 2 - día 5 a día 6

[0243] Agregados de células producidos en el d5-d6 de la etapa 2: Se cultivaron células hES adherentes y se pasaron sustancialmente tal como se ha descrito anteriormente y luego se diferenciaron en la etapa 2 sustancialmente como se describió en d'Amour et al. (2006), *supra*. Durante la etapa 2, se lavaron brevemente las células adherentes de la etapa 1 en PBS+/+ y luego se diferenciación de manera adicional en RPMI complementado con FBS al 2 %, Glutamax, penicilina/estreptomocina, y 25 ng-50 ng/ml de KGF (R&D Systems) durante 3 días. En algunos experimentos, se añadió 5 µM de SB431542 (Sigma Aldrich, Inc.) o 2,5 µM de Inhibidor de TGF-beta IV (Calbiochem) durante el primer día de la etapa 2.

[0244] Los cultivos adherentes al final de la etapa 2 (aproximadamente en el d5 o d6 en el protocolo de diferenciación; células de tipo intestino anterior) se disociaron en células individuales, se contaron y se sedimentaron sustancialmente tal como se ha descrito anteriormente. El pellet de células se volvió a suspender en medio de diferenciación que contiene medio DMEM, Pen/Strep y Glutamax, conteniendo además suplemento B27 IX y DNasa (50-100 µg/ml, Roche Diagnostics) y sin FBS o con FBS al 1-2 % o suero humano (hS) al 0,5-10 % y o bien de 1 µM a 2 µM de ácido retinoico (RA, Sigma), y 0,25 nM de KAAD-ciclopamina (Toronto Research Chemicals); o bien de 1 µM a 2 µM de ácido retinoico, 0,25 nM de KAAD-ciclopamina más 50 ng/ml de nogina (R&D Systems); o 0,25 nM de KAAD-ciclopamina más 100 ng/ml de nogina; o 100 ng/ml de nogina; o de 0,2 mM a 0,5 mM de RA y 0,25 nM de KAAD- ciclopamina; o de 0,2 µM a 0,5 µM de RA y 0,25 nM de KAAD-ciclopamina más 50 ng/ml de nogina. En algunos experimentos, se incluyó Y27332 (10 µM).

[0245] Se distribuyeron células resuspendidas por igual en cada pocillo, y se situaron en la plataforma rotatoria de 100 rpm a 140 rpm durante toda la noche; en ese tiempo se formaron agregados de células de forma y tamaño uniformes.

[0246] Los agregados de células producidos al final de la etapa 2 se diferenciaron de manera adicional en la plataforma giratoria y se alimentaron 1-2 veces diarias durante 0-2 días adicionales con medio DMEM, Pen/Strep

y Glutamax, conteniendo además suplemento B27 IX o bien de 1 μM a 2 μM de ácido retinoico (RA, Sigma), y 0,25 nM de KAAD-ciclopamina (Toronto Research Chemicals); o bien de 1 μM a 2 μM de ácido retinoico, 0,25 nM de KAAD-ciclopamina más 50 ng/ml de nogina (R&D Systems); o 0,25 nM de KAAD-ciclopamina más 100 ng/ml de nogina; o 100 ng/ml de nogina; o de 0,2 mM a 0,5 mM de RA y 0,25 nM de KAAD-ciclopamina; o de 0,2 μM a 0,5 μM de RA y 0,25 nM de KAAD-ciclopamina más 50 ng/ml de nogina.

[0247] Los agregados de células producidos al final de la etapa 2 se diferenciaron después de manera adicional en las etapas 3, 4 y 5 sustancialmente tal como se ha descrito anteriormente.

Etapas 4 y 5 - día 10 a día 30

[0248] Agregados de células producidos en el d10-d14 de la etapa 4: De nuevo, se cultivaron células hES adherentes y se pasaron sustancialmente tal como se ha descrito anteriormente y luego se diferenciaron en la etapa 2 sustancialmente como se ha descrito anteriormente y en d'Amour et al. (2006), *supra*.

[0249] Para la etapa 3, las células adherentes de la etapa 2 se diferenciaron de manera adicional en medio DMEM, Pen/Strep, y Glutamax, conteniendo además suplemento B27 IX, y o bien de 1 μM a 2 μM de RA y 0,25 nM de KAAD-ciclopamina durante de 1 a 3 días. En otros casos, se añadió 50 ng/ml de nogina junto con el RA y la KAAD-ciclopamina. De manera alternativa, se añadió de 0,2 μM a 0,5 μM de RA y 0,25 nM de KAAD-ciclopamina al medio solo durante un día. Además, en otros experimentos, no se añadió RA ni KAAD-ciclopamina en ningún día. En la etapa 4, las células se alimentaron 1-2 veces al día con DMEM complementado con Glutamax, penicilina/estreptomicina, y suplemento B27 1X. Las células de la etapa 4 pueden diferenciarse de manera adicional en células de la etapa 5 tal como ya se ha descrito en los Ejemplos 17 y 18.

[0250] Se disociaron cultivos adherentes en la etapa 4 (aproximadamente en el d10-d14 del protocolo de diferenciación; células de tipo endocrino y epitelial pancreático) o en la etapa 5 (aproximadamente del día 16 al día 30 del protocolo de diferenciación; células endocrinas y precursoras endocrinas) de manera similar en células individuales, se contaron y se sedimentaron. El pellet celular se volvió a suspender después en DMEM, Pen/Strep complementado con CMRL y Glutamax, y suplemento B27 IX y DNasa (50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Roche Diagnostics) y FBS al 0-2 %. En algunos experimentos, se incluyó Y27332 (10 μM), que respaldaba la supervivencia celular. Las células se distribuyeron de manera equitativa en placas de 6 pocillos y se colocaron en una plataforma giratoria de 100 a 140 rpm desde 4 horas hasta durante toda la noche sustancialmente tal como se ha descrito anteriormente.

[0251] Asimismo, los agregados de células producidos en la etapa 2 y en la etapa 5 como en los Ejemplos 17-19 se enriquecieron de manera efectiva para los tipos de células pancreáticas en comparación con cultivos de placas adherentes a partir de los cuales se derivaron. Por ejemplo, en un experimento habitual los agregados de células producidos en la etapa 2 y analizados mediante citometría de flujo en la etapa 4 consistían en al menos un 98 % de tipos de células pancreáticas (un 73 % de células endocrinas positivas en cromogranina A y un 25 % de endodermo pancreático (PE) positivo en Nkx6.1) y un 2 % de tipos de células no pancreáticas; mientras que los cultivos de placas adherentes a partir de los cuales se derivaron los agregados de células consistían aproximadamente de un 73 % de tipos de células pancreáticas (un 33 % de células endocrinas positivas en cromogranina A y un 40 % de PE positivo en Nkx6.1) y un 27 % de células de tipo no pancreático. Por tanto, la agregación en la etapa 2 puede enriquecer de manera efectiva los progenitores que dan lugar a tipos de células pancreáticas, y reducir los tipos de células no pancreáticos. De manera similar, en un experimento habitual, los agregados de células producidos en la etapa 5 y analizados mediante citometría de flujo consistían en al menos un 75 % de tipos de células endocrinas positivas en cromogranina A, mientras que el cultivo en placas adherentes a partir del cual se derivaron los agregados de células consistía en aproximadamente un 25 % de tipos de células endocrinas positivas en cromogranina A. Por consiguiente, la agregación en la etapa 5 puede enriquecer de manera efectiva las células endocrinas pancreáticas.

[0252] Los métodos descritos en el presente documento, por tanto, proporcionan métodos para mejorar no solo la eficiencia de la diferenciación dirigida de células hES en suspensiones de agregados de células, sino que también proporciona métodos para reducir los tipos de células (o agregados) pancreáticas derivadas de hES que presentan poblaciones contaminantes (por ejemplo, ectodermo, trofotodermo, endodermo visceral, y endodermo extraembrionario) y al mismo tiempo proporciona un enriquecimiento de tipos de células pancreáticas (por ejemplo, células endocrinas y del endodermo pancreático).

Ejemplo de referencia 20 - La densidad celular efectúa el resultado de la diferenciación de células hES

[0253] Lo siguiente demuestra que las variaciones en densidades celulares efectúan los resultados de diferenciación dentro de un medio y una condición de factor de crecimiento determinados. Los resultados de la eficiencia de diferenciación que son resultado de los ajustes en la densidad celular reflejan concentraciones variables de moléculas de señalización producidas de manera endógena y la concentración dependiente afecta a estas moléculas a la hora de influir en la diferenciación celular.

[0254] Los agregados de células ES humanas y agregados de células derivadas de hES, incluidos agregados de células de d0 producidos directamente en el medio de diferenciación, se generaron sustancialmente como se ha descrito anteriormente. Después de cinco (5) días de diferenciación a través de las etapas 1 y 2, los agregados

de células de diferenciación se acumularon y se volvieron a alicuotar en pocillos individuales a distintas densidades de siembra, por ejemplo, se sembró una suspensión de 28 ml de agregados de células de la etapa del endodermo del intestino anterior o se volvieron a alicuotar a 4, 6, 8, o 10 ml por pocillo (un intervalo de densidades celulares de 2,5 veces). Esta distribución celular se llevó a cabo por duplicado y un conjunto de pocillos se alimentó con un medio de etapa 3 (DMEM/PenStrep/Glutamax + suplemento B27 al 1 % (vol/vol) + 0,25 uM de KAAD-ciclopamina + 3 nM de TTNPB) conteniendo nogina a 50 ng/ml y el otro conjunto de pocillos contenía nogina a 25 ng/ml. La etapa 3 se desarrolló durante 3 días con un intercambio de medio diario. Se tomaron muestras de células por duplicado para un análisis por QPCR en tiempo real al final de los tres días de la etapa 3 (o aproximadamente en el día 8) y de nuevo tras la etapa 4 (o aproximadamente en el día 14).

5 [0255] La densidad celular y la concentración de nogina utilizadas durante la etapa 3 tuvieron distintos efectos en la expresión de aquellos genes que eran indicativos de progenitores de endodermo pancreático y/o precursores o progenitores endocrinos. En resumen, hay una relación lineal entre el aumento de la densidad celular y un aumento correspondiente en los tipos de células progenitoras pancreáticas (por ejemplo, endodermo pancreático, epitelio pancreático, endodermo pancreático positivo en PDX1). Por ejemplo, tras la etapa 3 (o día 8), un aumento en la densidad celular tenía un aumento correspondiente en el número de células de progenitores pancreáticos tal como indica la expresión de genes aumentada de PDX1 y NKX6-1. Véase la figura 24A y 24B. Por el contrario, había una relación inversa entre el aumento de la densidad celular y una reducción correspondiente de los tipos de células progenitoras endocrinas tras la etapa 4 (o el día 14). Por ejemplo, según se reducía la densidad celular, había una expresión reducida de al menos NGN3 y NKX2-2 tras la etapa 3 (o el día 8). Véanse las FIG. 24C & 24D.

10 [0256] Sin embargo, las concentraciones de nogina más bajas (por ejemplo 25 ng/ml) a cualquier densidad celular determinada dieron como resultado una reducción de los tipos de células progenitoras endocrinas tal como indica la reducción de la expresión de NGN3 y NKX2-2. Véanse las figuras 24C y 24D. Este efecto independiente de la densidad celular de la nogina en los cultivos celulares sugiere que las señales de BMP producidas de manera exógena a partir de las células se antagonizan mediante la nogina añadida de manera exógena. El impacto de las señales producidas de manera endógena sobre el resultado de la diferenciación probablemente no esté limitado a la BMP, sino que otros factores de crecimiento y/o agentes secretados por las células en el medio pueden tener efectos de contraste o similares, por sí solos o en combinación con agentes y/o factores de crecimiento exógenos.

15 **Ejemplo de referencia 21 - Optimización de los cultivos en suspensión de agregados de células para generar tipos de células endocrinas o endodermo pancreático enriquecido**

20 [0257] La composición celular de poblaciones de agregados de células derivados de hES se optimiza para determinados tipos celulares al controlar la concentración de varios agentes y/o factores de crecimiento. Las composiciones celulares pancreáticas descritas en el presente documento eran suspensiones de agregados de células derivadas de hES que se hicieron a partir de cultivos en suspensión de células individuales, derivados de cultivos adherentes de células hES, agregados de células de d0 (agregados de células iniciados a partir de cultivos adherentes de hES pero directamente en un medio de diferenciación y no en un medio de células madre pluripotentes), o a partir de cultivos adherentes de células derivadas de hES en varias etapas de la diferenciación sustancialmente tal como se ha descrito en los ejemplos anteriores. Durante la etapa 4, los agregados de células se expusieron a diferentes concentraciones de los factores: NOGGIN (N), KGF (K), FGF10 (F), y EGF (E). La composición celular de los agregados de células hES diferenciadas se evaluó mediante un análisis por citometría de flujo utilizando un panel de marcadores que incluyen CHGA, NKX6.1, y PDX1. En la tabla 4 se muestra el porcentaje total de células endocrinas, células del endodermo pancreático, células del endodermo positivas en PDX1, y células no pancreáticas en cualquier población celular.

25 [0258] Los datos de la Tabla 4 demuestran que al controlar la concentración y proporciones de determinados factores de crecimiento, la composición resultante puede optimizarse para determinados tipos de células. Por ejemplo, el porcentaje de células del tipo endodermo pancreático se aumentó en comparación con células del tipo endocrino al disminuir la concentración de KGF y EGF (por ejemplo, K(25)E(10) y el 71 % vs. el 22,1 %). Por el contrario, concentraciones altas de KGF y EGF y la inclusión de nogina y FGF10 (por ejemplo, N(50)F(50)K(50)E(50)) disminuyeron el número de células de tipo de endodermo pancreático, siendo comparable el número total con el de células de tipo endocrino (por ejemplo, el 39 % vs. el 40,1 %). La nogina y el KGF en concentraciones más altas (por ejemplo, N(50)K(50)) o no añadir factor de crecimiento aumentó la población de células de tipo endocrino en la población resultante en comparación con tipos de células de tipo del endodermo pancreático. Además, el porcentaje de tipos de células no pancreáticas (es decir, células que no sean del tipo PDX1-positivo) puede reducirse de forma significativa al reducir los niveles de KGF y EGF (por ejemplo, K(25)E(10); 1,51 %) o no añadiendo ningún factor de crecimiento (1,53 %).

30 [0259] Por tanto, la Tabla 4 demuestra claramente que al menos variar las concentraciones de distintos factores de crecimiento en el medio de cultivo en determinadas etapas de la diferenciación (por ejemplo, la etapa 4) aumenta y/o disminuye de manera significativa determinadas poblaciones de tipos de células de endodermo pancreático, endocrinas, endodermo positivo en PDX1, o no pancreáticas.

Tabla 4 – Efectos de los factores de crecimiento en la composición celular

		Endocrinas	Endodermo pancreático	Endodermo PDX1+	No pancreáticas	
Etapa de agregación	Factores en el medio de la Etapa 4 (ng/ml)	CHGA+	CHGA-NKX6.1+ PDX1 +	CHGA-NKX6.1- PDX1+	CHGA-NKX6.1+/- PDX1-	Total
ESC	K(25)E(10)	22,1	71,0	3,0	4,0	100,1
ESC	K(25)E(10)	29,0	67,1	2,37	1,61	100,0
Etapa 1 Día 0	K(25)E(10)	25,4	68,9	2,87	2,01	99,2
Etapa 1 Día 0	N(50)K(50)F(50)E(50)	40,1	39,6	13,30	6,85	99,9
Etapa 1 Día 0	No se añade nada	69,4	27,4	1,46	1,53	99,8
Etapa 1 Día 0	N(50)K(50)	52,2	30,4	13,9	3,48	99,9
Etapa 1 Día 0	K(25)E(10)	38,8	50,8	2,17	8,22	100,0
Etapa 2 Día 5	N(50)K(50)	42,3	42,3	12,2	3,20	99,9
Etapa 2 Día 5	K(25)E(10)	28,3	59,4	7,36	4,97	100,0

[0260] Existen otros métodos adicionales para enriquecer o purificar células derivadas de hES concretas, tal como se describe en la solicitud de patente estadounidense n.º 12/107,020, titulada *Methods for purifying endoderm and pancreatic endoderm cells derived from hES cells*, presentada el 6 de abril de 2008. Esta solicitud describe métodos para enriquecer varios tipos de células hES incluyendo todos los tipos de células resultantes en cada una de las etapas 1, 2, 3, 4 y 5 tal como se describe en d'Amour et al. 2005 y 2006, *supra*. La solicitud utiliza varios anticuerpos incluyendo, pero sin carácter limitativo, CD30, CD49a, CD49e, CD55, CD98, CD99, CD142, CD165, CD200, CD318, CD334 y CD340.

[0261] Los métodos para enriquecer los agregados de células o las células derivadas de hES no están limitados a los métodos que emplean medios de afinidad a anticuerpos, pero pueden incluir cualquier método que esté disponible y sea bien conocido por los expertos en la materia que permita un enriquecimiento de un tipo celular determinado. El enriquecimiento puede conseguirse al disminuir o separar un tipo de células del otro cultivo o tipo de células.

Ejemplo de referencia 22 – Suspensiones de agregados de células de endodermo pancreático maduras *in vivo* y que responden a la insulina

[0262] Para demostrar que los métodos para hacer y fabricar suspensiones de agregados de células tal como se describe en el presente documento proporcionan células progenitoras pancreáticas que funcionan *in vivo*, los agregados de células derivadas de hES anteriores de los Ejemplos 17-21 (por ejemplo, endodermo positivo en PDX1, endodermo pancreático, epitelio pancreático, precursores endocrinos, células endocrinas y similares) se han trasplantado en animales. Los métodos de trasplante en animales normales y a los que se les ha inducido la diabetes, la determinación *in vivo* de la sensibilidad a la glucosa de los animales y en consecuencia la producción de insulina de las células maduras trasplantadas *in vivo*, se llevó a cabo sustancialmente tal como se describe en Kroon et al. (2008) *Nature Biotechnology* 26(4): 443-452 y en la solicitud de patente estadounidense n.º 11/773,944, titulada *Methods of producing pancreatic hormones* y presentada el 5 de julio de 2007. Se observaron niveles sustancialmente similares de péptido-C humano en los sueros de estos animales en periodos de tiempo similares según se indica en Kroon et al. y en la solicitud de patente estadounidense n.º 11/773,944, *supra*.

[0263] Los métodos, composiciones, y dispositivos descritos en la presente memoria son representativos de modos de realización preferidos en la actualidad y son ejemplares y no pretenden limitar el alcance de la invención.

[0264] Se considera que determinadas características de la invención, que, para mayor claridad, se describen en el contexto de los diferentes modos de realización, también pueden proporcionarse combinadas en un único modo de realización. Por ejemplo, los métodos para hacer agregados de células derivadas de hES en suspensión pueden generarse y optimizarse para producir cualquier tipo de célula de linaje endodérmico, por ejemplo, una célula de tipo linaje pancreático, una célula de tipo linaje hepático, una célula de tipo linaje epitelial, una célula de tipo linaje tiroideo y una célula de tipo linaje tímico, y por tanto no se limita a los tipos de células

derivados de hES, en concreto descritos en el presente documento. Por el contrario, varias características de la invención, que, para mayor concisión, se describen en el contexto de un único modo de realización, también pueden proporcionarse de manera separada o en cualquier subcombinación adecuada. Por ejemplo, es evidente para un experto en la materia que los métodos descritos para generar agregados de células hES y derivadas de hES a partir de cultivos en placas adherentes o a partir de una suspensión, a partir de cultivos en placas adherentes o de suspensiones no diferenciadas, y a partir de cultivos en placas adherentes o de agregados de células en suspensión diferenciados se incluyen solo a modo de ejemplo, pero que también puede emplearse una combinación de estos métodos.

5

[0265] Como se utiliza a continuación en las reivindicaciones y a lo largo de esta descripción, la frase "que consiste esencialmente en" significa que incluye cualquiera de los elementos enumerados después de la frase, y limita otros elementos que no interfieren con, o contribuyen en la actividad o acción especificada en la exposición para los elementos enumerados. Por tanto, la frase "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados se requieren o son obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden presentarse o no dependiendo de si afectan o no a la actividad o acción de los elementos enumerados.

10

15

REIVINDICACIONES

1. Método para generar agregados de células derivadas de células pluripotentes humanas en suspensión a partir de una suspensión de células individuales de células pluripotentes, comprendiendo:
 - 5 (a) cultivar una célula pluripotente humana en una condición de cultivo de crecimiento adherente que permita una expansión en un estado no diferenciado;
 - (b) disociar las células pluripotentes adherentes del paso (a) en un cultivo en suspensión de células individuales de células pluripotentes;
 - 10 (c) agitar el cultivo en suspensión de células individuales de células pluripotentes a un bajo cizallamiento, en el que las células individuales de células pluripotentes en la suspensión forman agregados de células derivadas de células pluripotentes sustancialmente uniformes en suspensión.
 - (d) poner en contacto el cultivo en suspensión de células individuales de agregados de células pluripotentes con una condición de cultivo de diferenciación que permita la formación de agregados de células derivadas de células pluripotentes; y

por tanto, generar agregados de células derivadas de células pluripotentes en suspensión.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que el cultivo en suspensión de células individuales de células pluripotentes se agita durante al menos 30 minutos.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el cultivo en suspensión de células individuales de células pluripotentes se agita mediante rotación orbital del cultivo en suspensión de células individuales de células pluripotentes de 80 rpm a 160 rpm, y preferiblemente de 100 rpm a 140 rpm.
- 20 4. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que una pluralidad de agregados de células derivadas de células pluripotentes se producen en suspensión y los diámetros del agregado de células derivadas de células pluripotentes en suspensión son en esencia uniformes en tamaño y forma.
5. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que los agregados de células derivadas de células pluripotentes son agregados de células endocrinas pancreáticas o son agregados de células específicas de linaje endodérmico seleccionados preferiblemente de entre el grupo que consiste en agregados de células de tipo linaje pancreático que son preferiblemente agregados de células progenitoras pancreáticas multipotentes, agregados de células de tipo linaje hepático, agregados de células de tipo linaje epitelial, agregados de células de linaje tiroideo, y agregados de células de linaje tímico.
- 25 6. Método según cualquier reivindicación anterior, comprendiendo además tras el paso de poner en contacto con la condición de cultivo de diferenciación, un paso adicional de selección o purificación del agregado de células derivadas de hES de células pluripotentes deseadas mediante el uso de uno o más marcadores de selección o agentes seleccionados preferiblemente de entre el grupo que consiste en CD30, CD49a, CD49e, CD55, CD98, CD99, CD142, CD165, CD200, CD318, CD334 y CD340; donde el paso adicional de selección o purificación utiliza preferiblemente una clasificación de células.
- 30 7. Método según cualquier reivindicación anterior, comprendiendo además tras el paso de poner en contacto con la condición de cultivo de diferenciación, un paso adicional de:
 - i. poner en contacto el cultivo con bajas concentraciones de factores de crecimiento seleccionados de entre el grupo que consiste en FGF10, EGF, KGF, nogina y ácido retinoico, enriqueciendo por tanto las células del endodermo pancreático; o
 - 40 ii. poner en contacto el cultivo con altas concentraciones de factores de crecimiento seleccionadas de entre el grupo que consiste en FGF10, EGF, KGF, nogina y ácido retinoico, enriqueciendo por tanto las células endocrinas pancreáticas.
8. Método según cualquier reivindicación anterior, comprendiendo además añadir al cultivo en suspensión de células individuales de células pluripotentes un agente que es capaz de fomentar la supervivencia celular, donde el agente se selecciona del grupo que consiste en Y-27632, fasudil, H-1152P, y una mezcla que comprende insulina/transferrina/selenio (ITS).
- 45 9. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el cultivo de células pluripotentes adherentes no diferenciadas está desprovisto de sustrato o matriz seleccionada de entre el grupo que consiste en una matriz extracelular, una proteína de matriz extracelular y una capa de células alimentadoras de ratón o humanas, y está preferiblemente exento de matrices, de células alimentadoras, y de sustancias xenógenas.
- 50 10. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la condición de cultivo de diferenciación comprende un elemento de la familia TGFbeta que activa un receptor de un elemento de la familia TGFbeta, donde el elemento de la familia TGFbeta se selecciona del grupo que consiste en Activina A, Activina B, Nodal, GDF-8 y GDF-11.

- 5
11. Método según la reivindicación 10, comprendiendo además tras el paso de poner el contacto con la condición de cultivo de diferenciación, un paso adicional de poner en contacto el cultivo con al menos un factor de crecimiento seleccionado del grupo de FGF10, EGF, KGF, nogina y ácido retinoico, inhibidores apoptóticos, inhibidores de Rho-quinasa, y similares, por tanto, enriqueciendo o variando la composición del cultivo celular resultante y/o la población de un agregado de células derivadas de células pluripotentes.
- 10
12. Método según cualquier reivindicación anterior, comprendiendo además tras el paso de poner en contacto con la condición de cultivo de diferenciación, un paso adicional de enriquecer o variar la composición del cultivo celular resultante y/o la población de un agregado de células derivadas de células pluripotentes, donde la densidad celular del cultivo de células pluripotentes es de entre aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/ml y 15×10^6 células/ml.

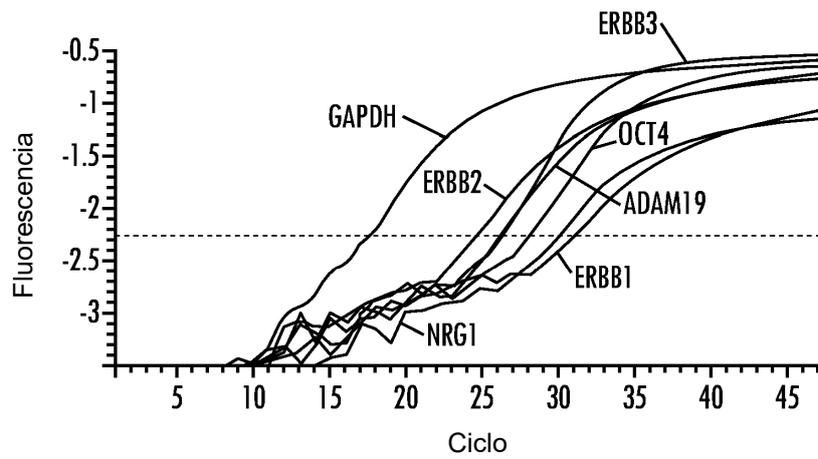


Fig. 1

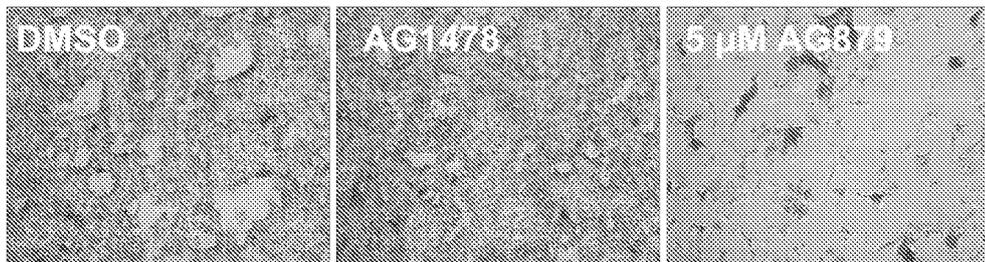


Fig. 2A

Fig. 2B

Fig. 2C

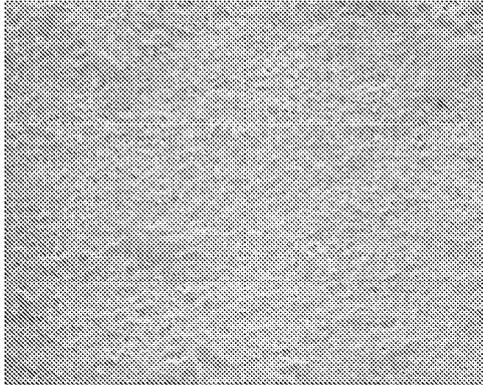


Fig. 3A

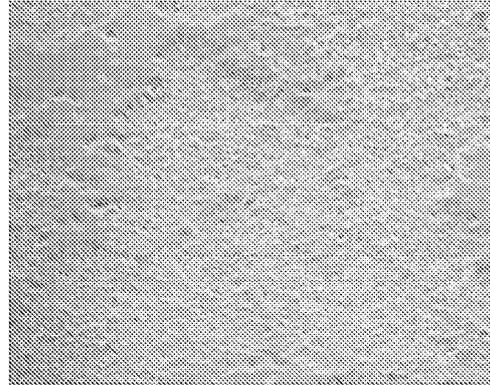


Fig. 3B

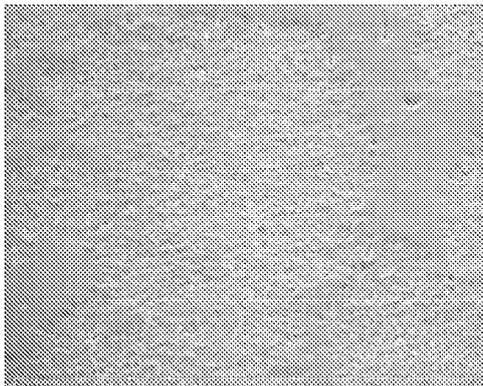


Fig. 3C

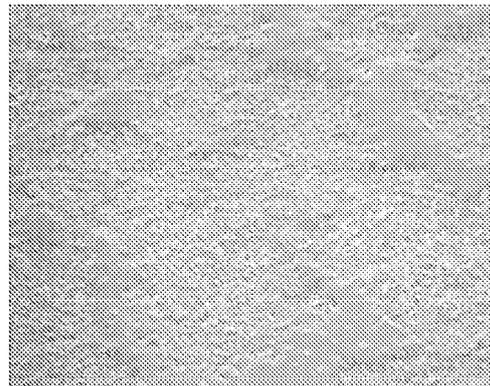
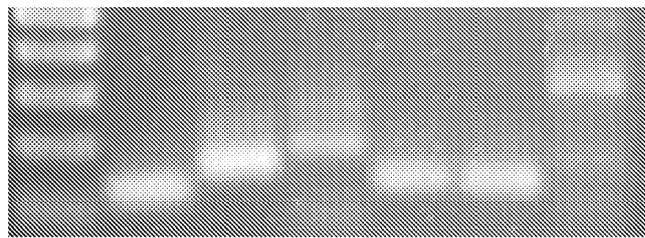


Fig. 3D

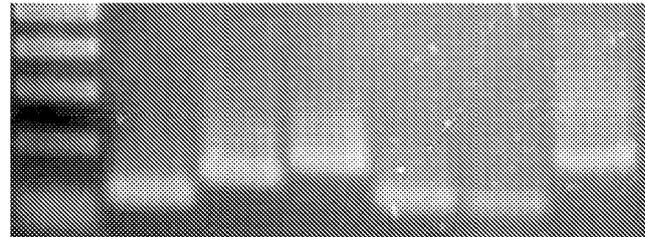
ES de ratón

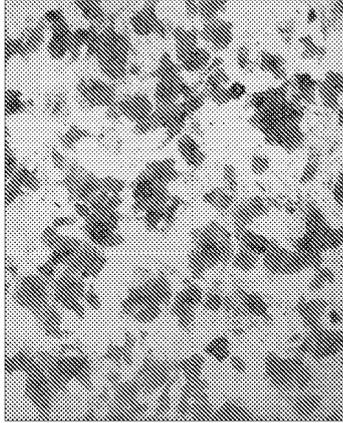
Fig. 4A



MEF

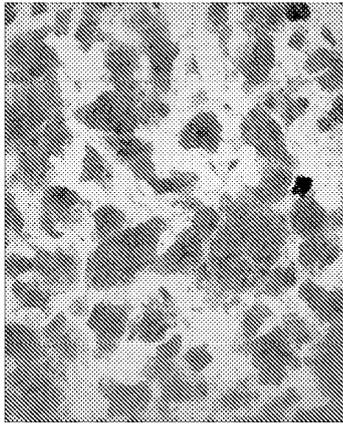
Fig. 4B





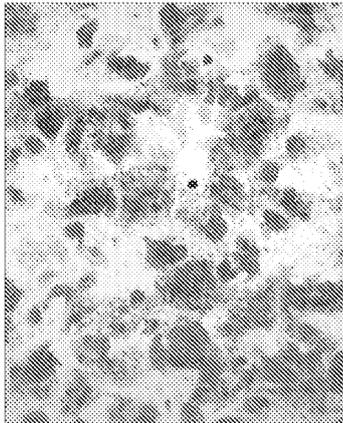
50 μ M AG1478

Fig. 5C



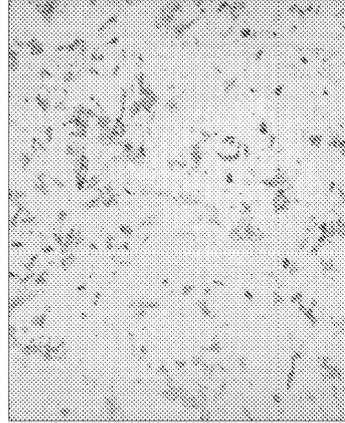
20 μ M AG1478

Fig. 5B



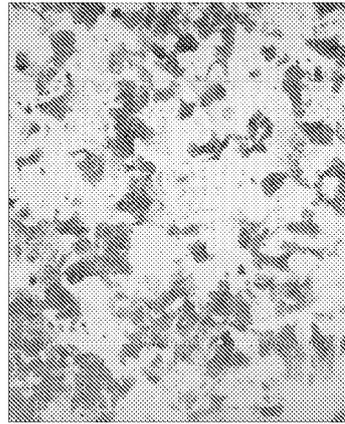
DMSO

Fig. 5A



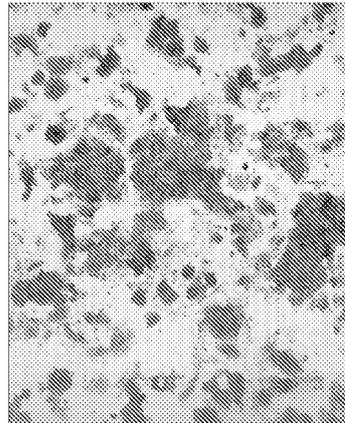
50 μ M AG879

Fig. 5F



20 μ M AG879

Fig. 5E



10 μ M AG879

Fig. 5D

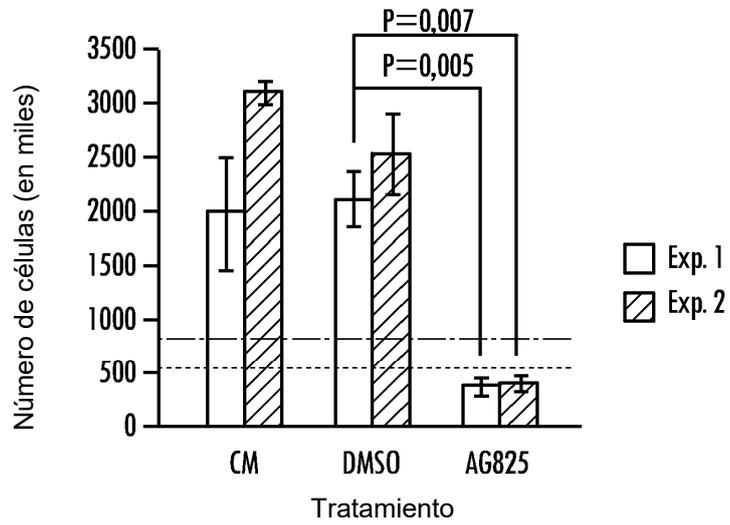


Fig. 6A

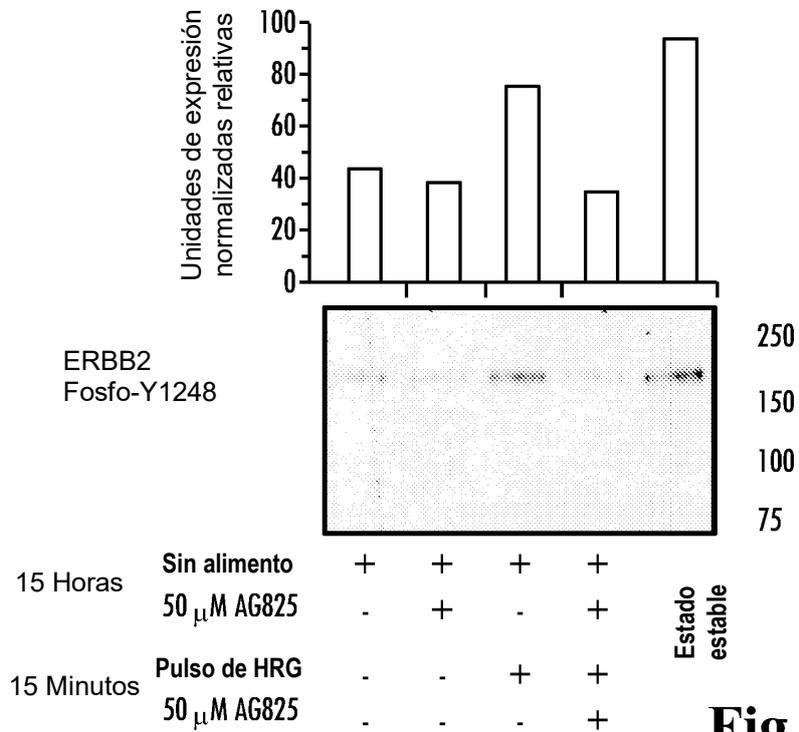


Fig. 6B

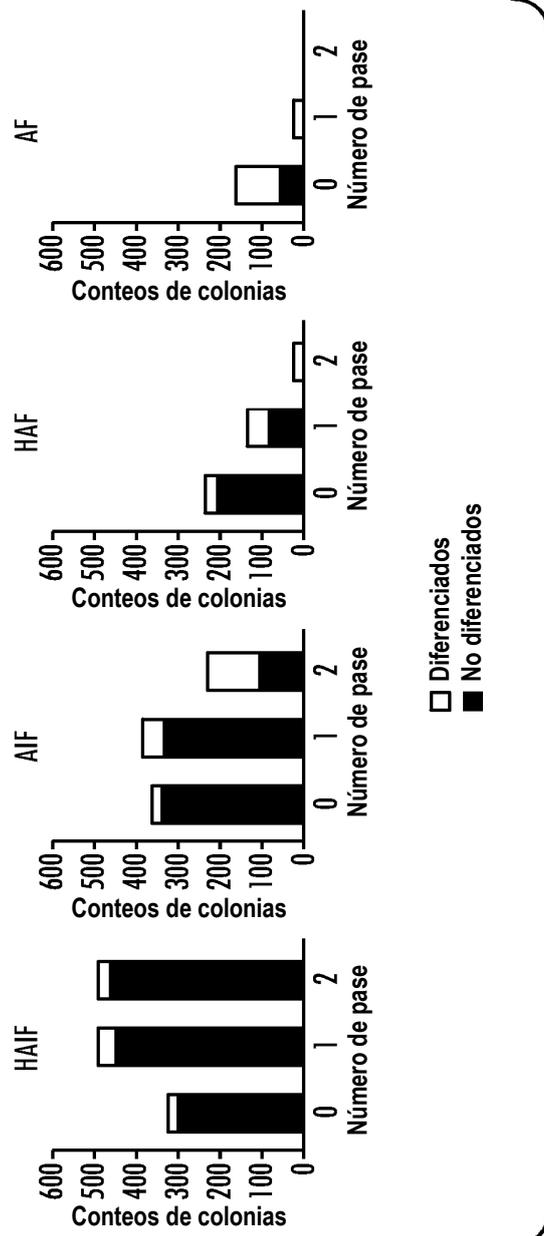


Fig. 6

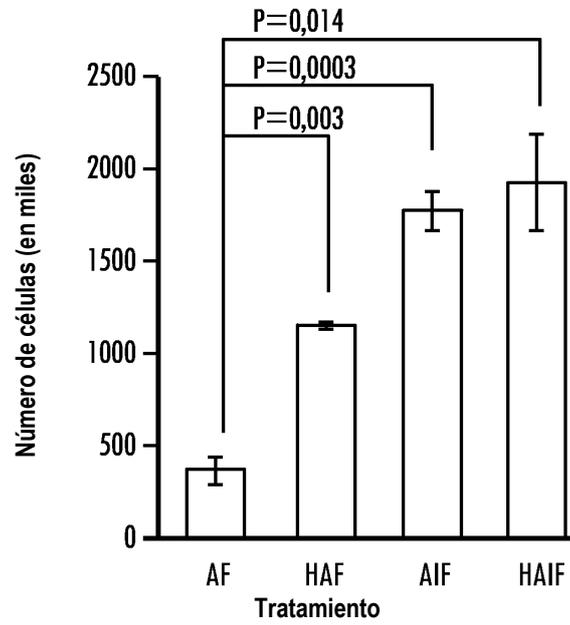


Fig. 6D

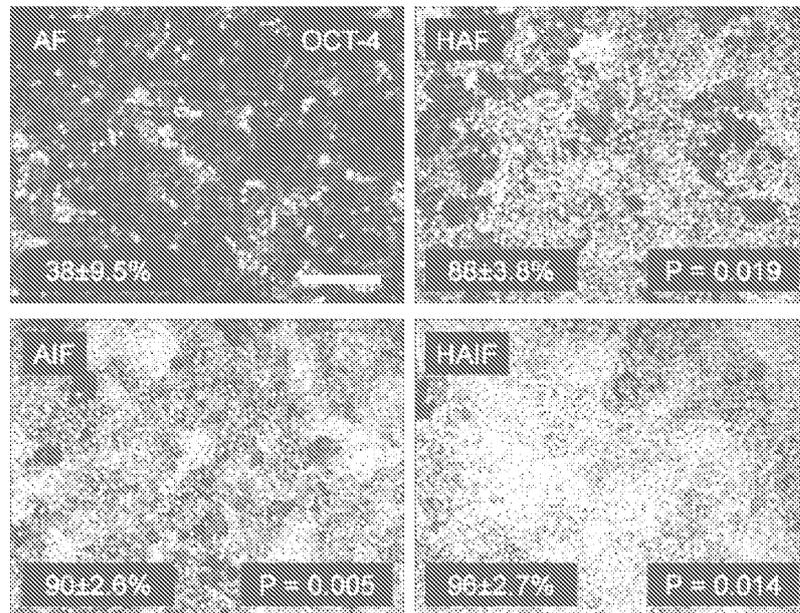


Fig. 6E

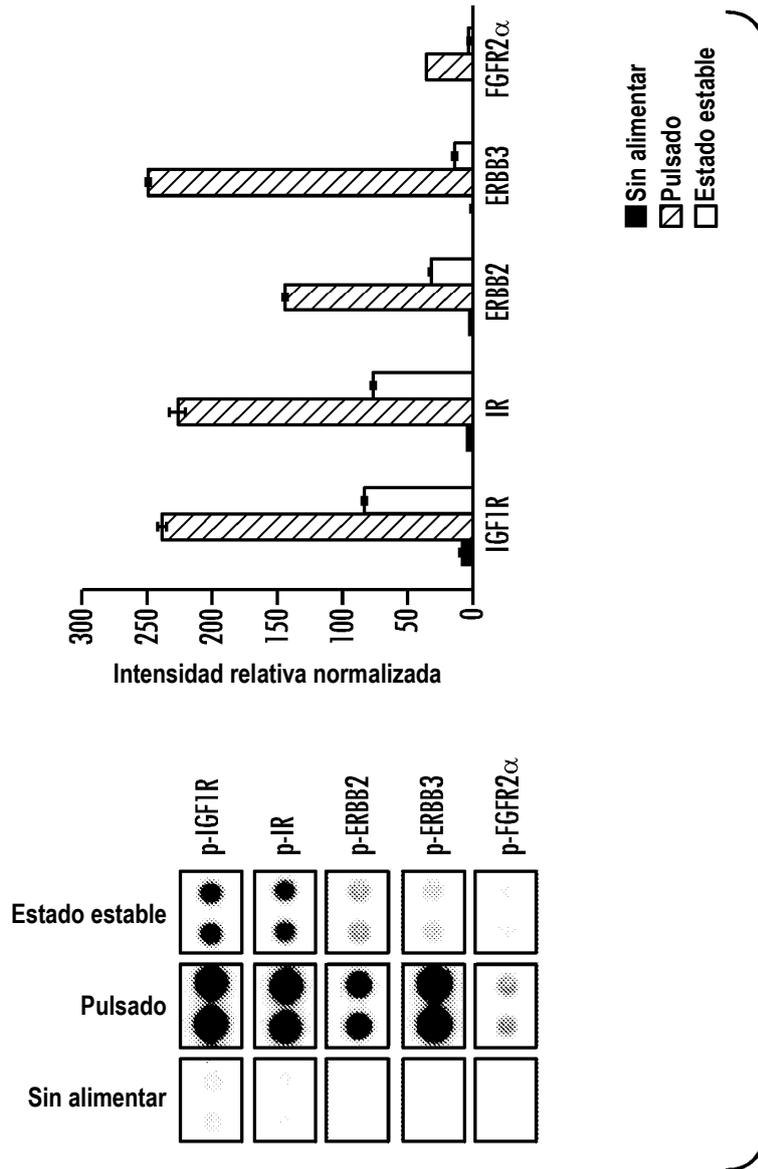


Fig. 6F

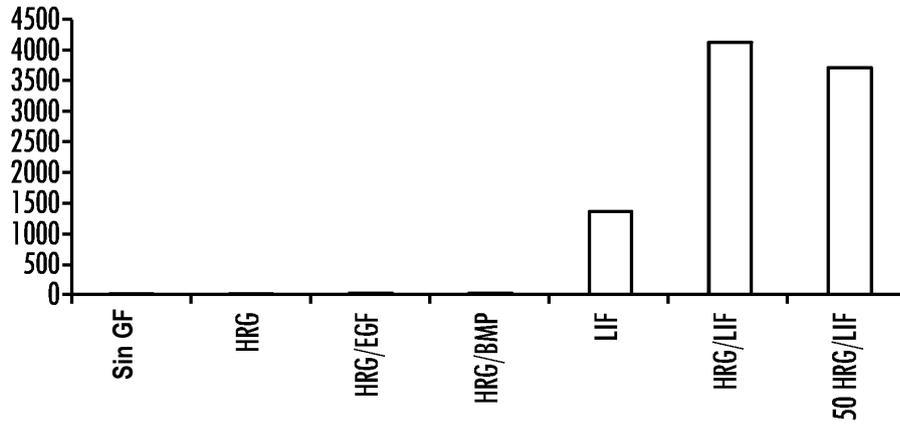


Fig. 7A



Fig. 7B

Fig. 7C

Fig. 7D



Fig. 7E

Fig. 7F

Fig. 7G

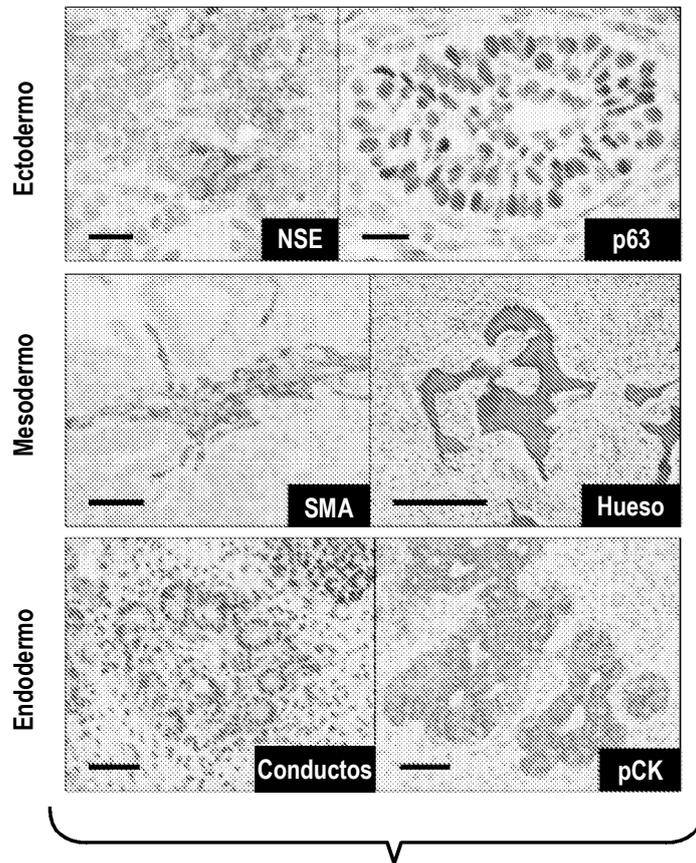


Fig. 8A

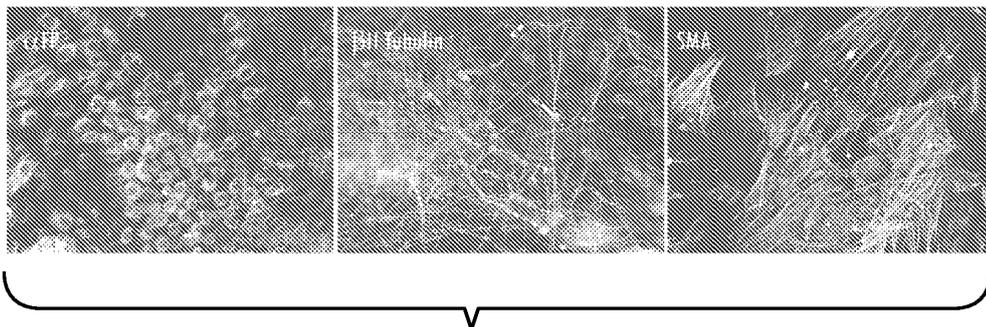


Fig. 8B

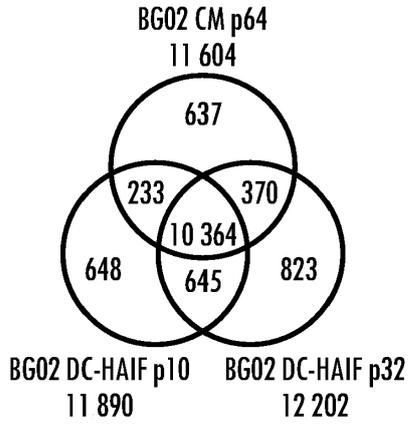


Fig. 8C

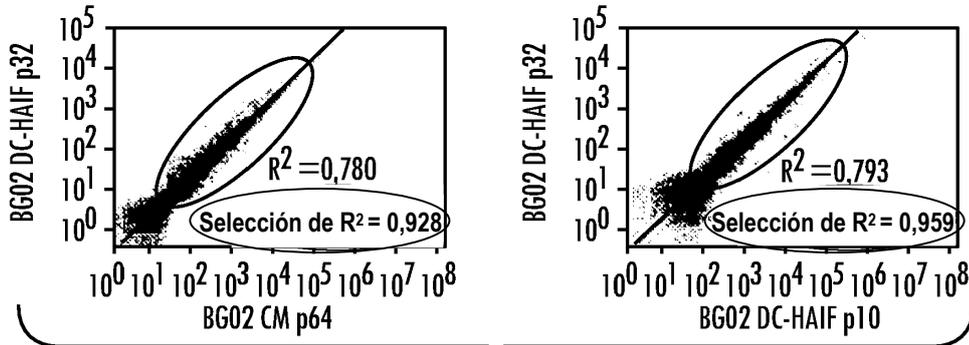


Fig. 8E

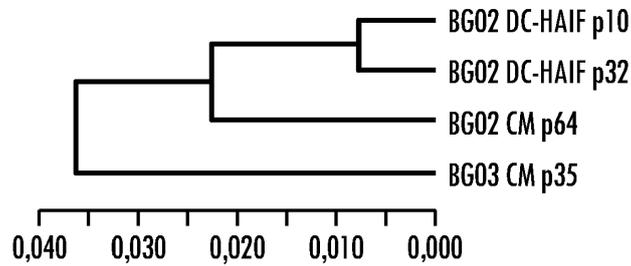


Fig. 8E

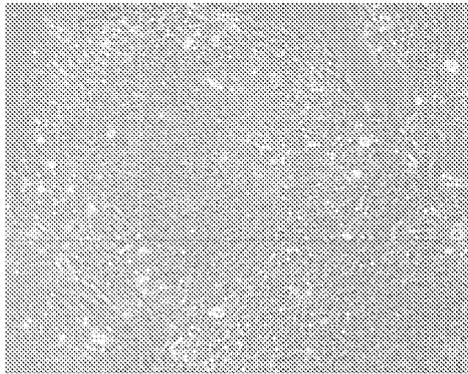


Fig. 9A

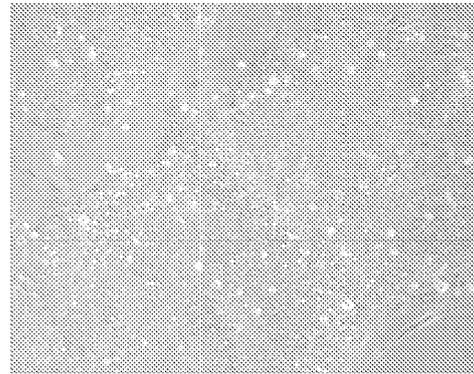


Fig. 9B

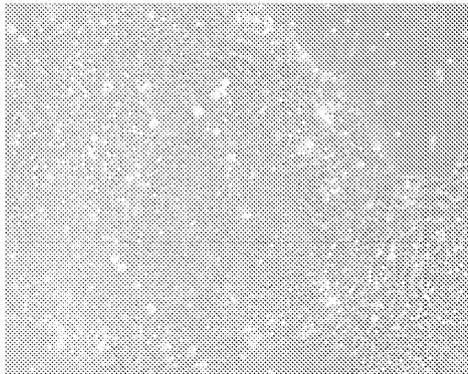


Fig. 9C

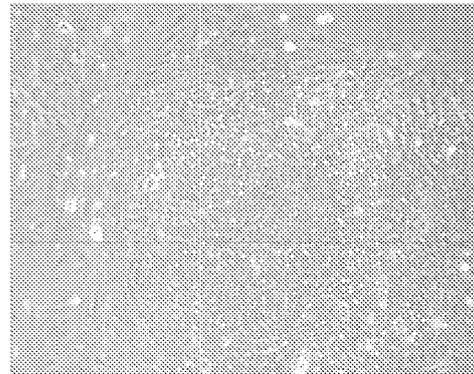


Fig. 9D

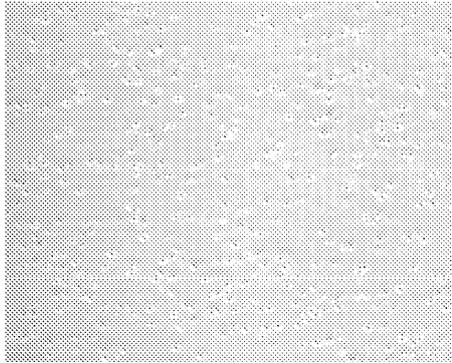


Fig. 10A

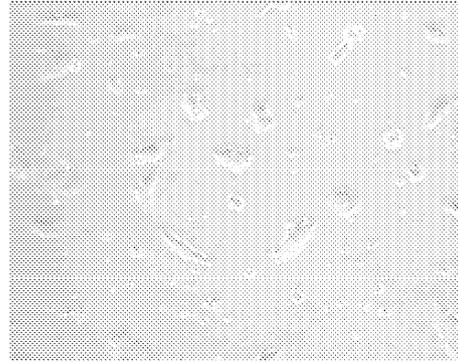


Fig. 10B

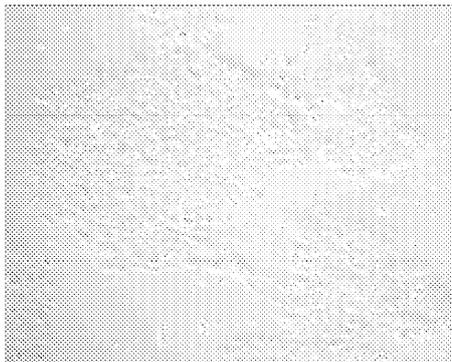


Fig. 10C

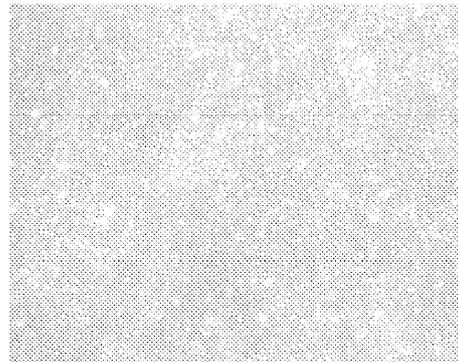


Fig. 10D

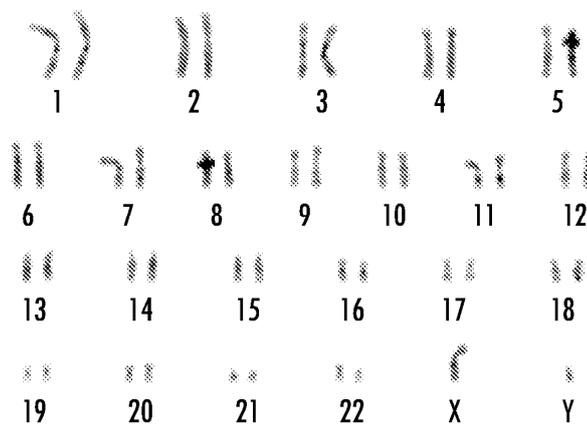


Fig. 10E

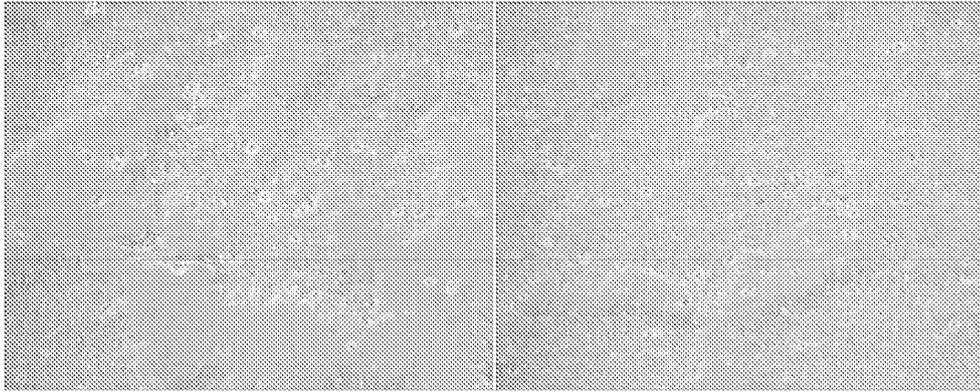


Fig. 11A

Fig. 11B

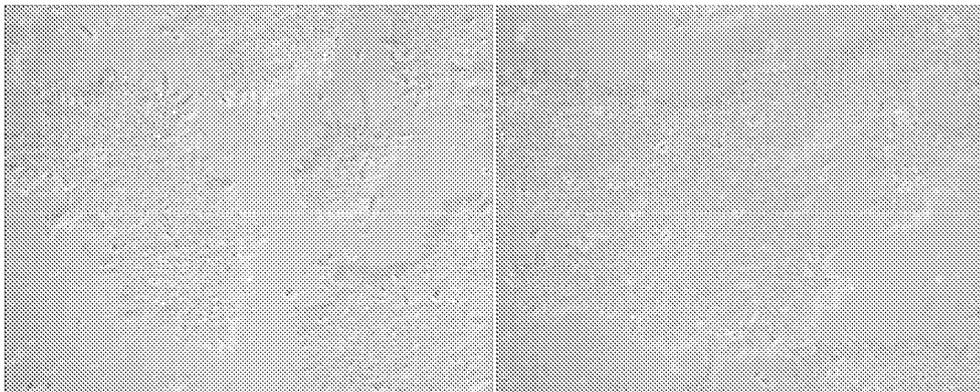


Fig. 11C

Fig. 11D

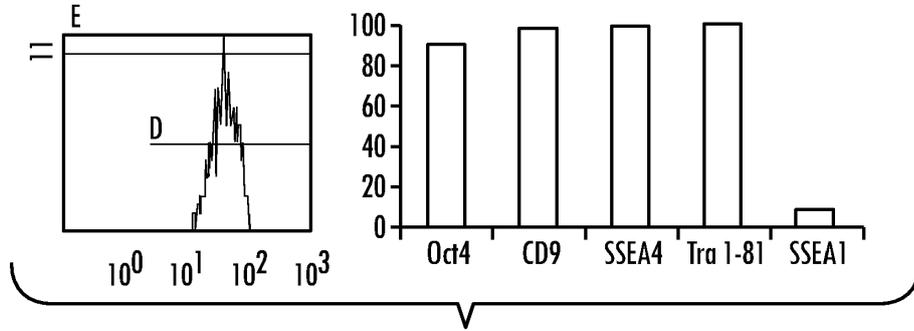


Fig. 12A

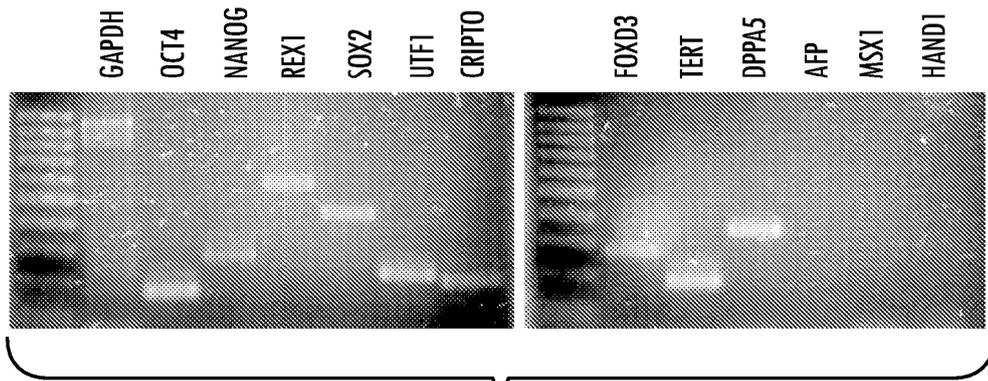


Fig. 12B

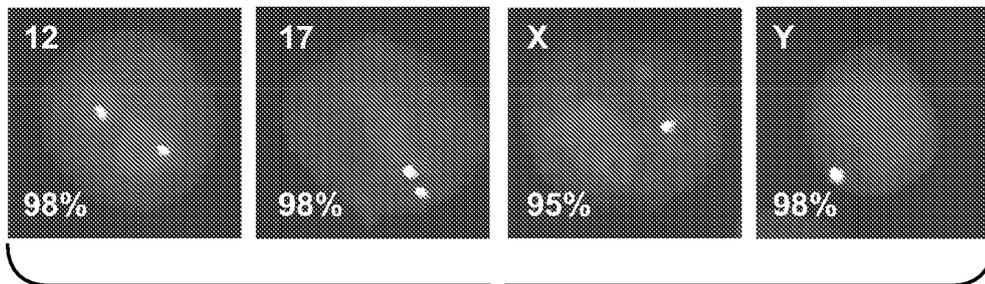


Fig. 12C

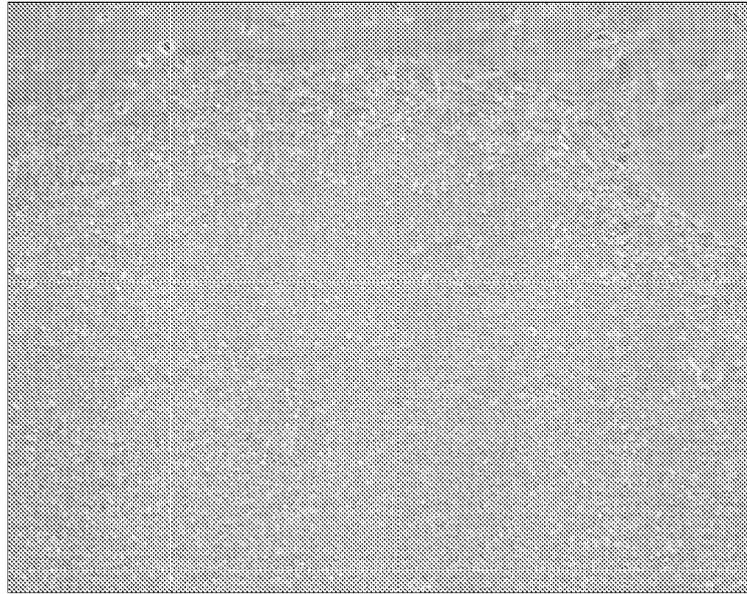


Fig. 13A

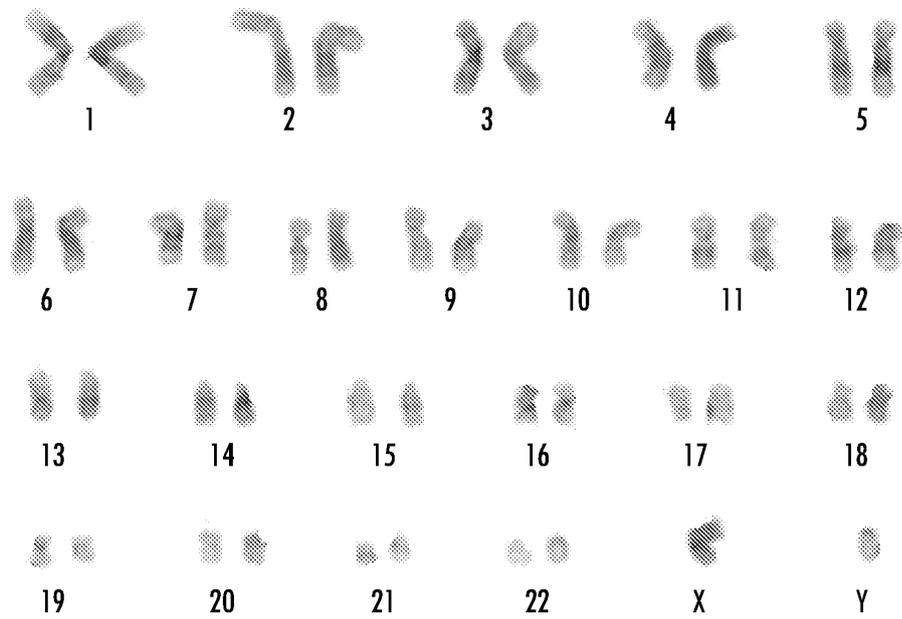


Fig. 13B

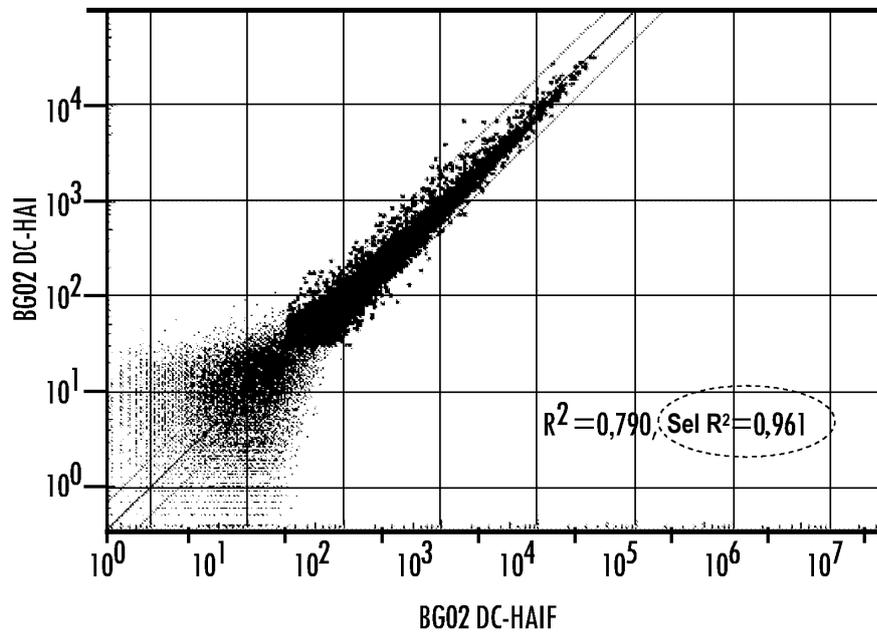


Fig. 14

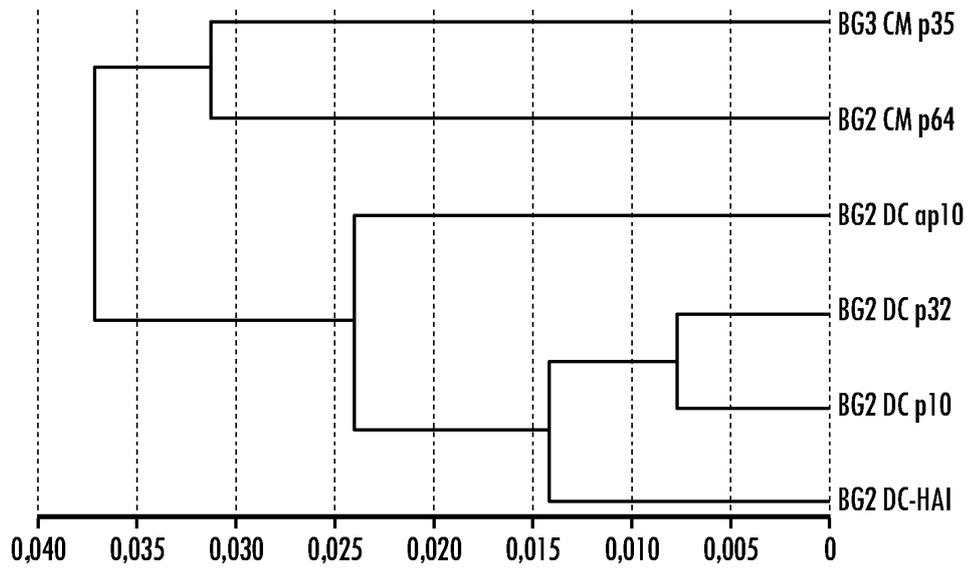


Fig. 15

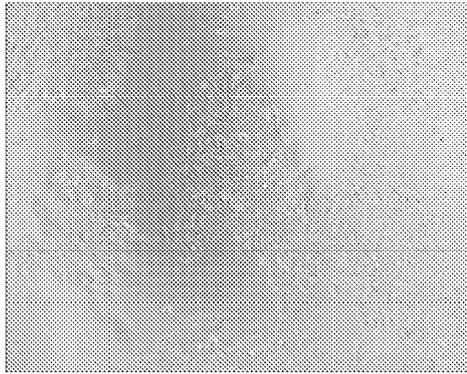


Fig. 16A

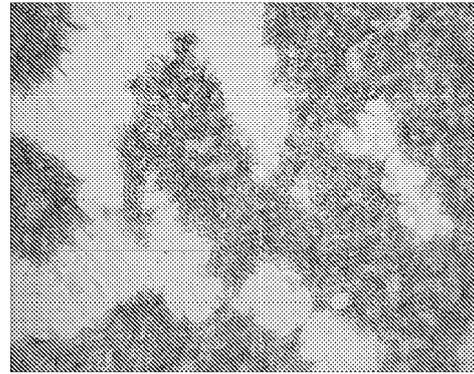


Fig. 16B

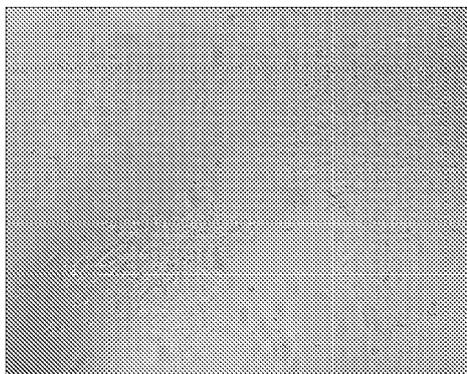


Fig. 16C

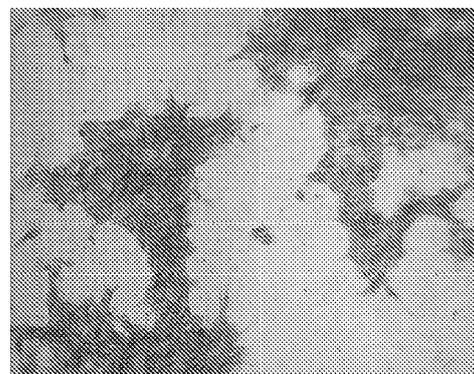
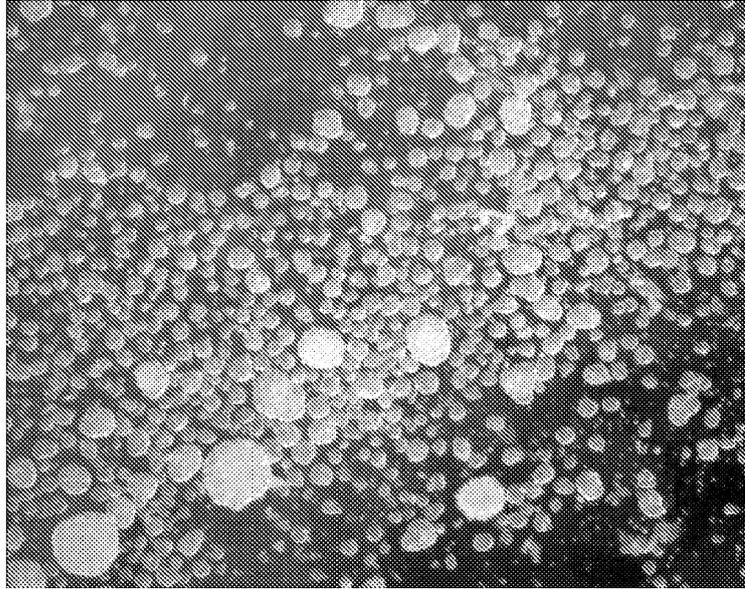


Fig. 16D

d1



d6

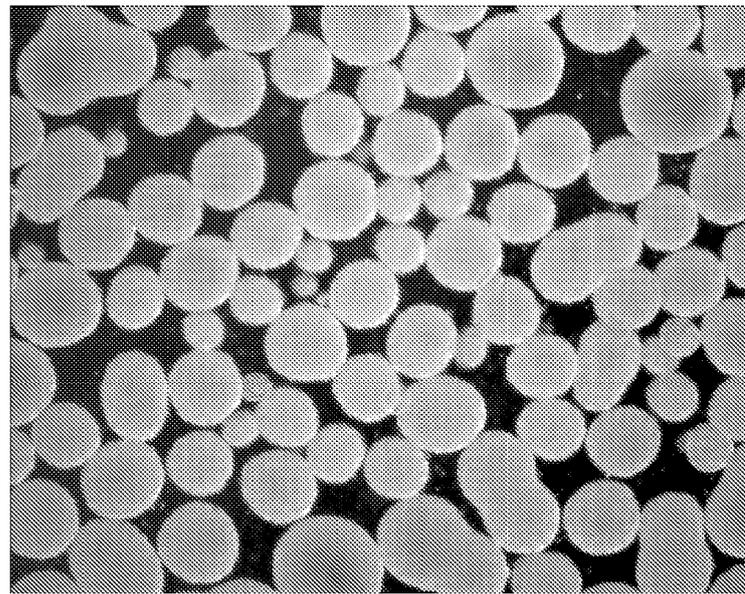


Fig. 17

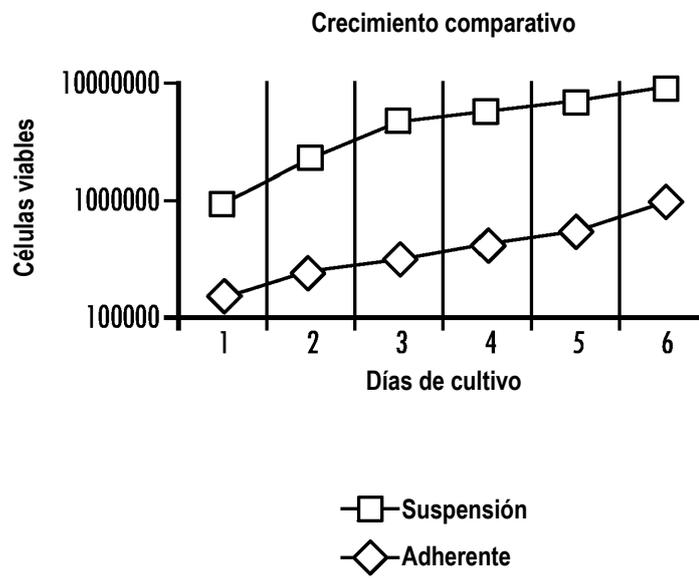


Fig. 18

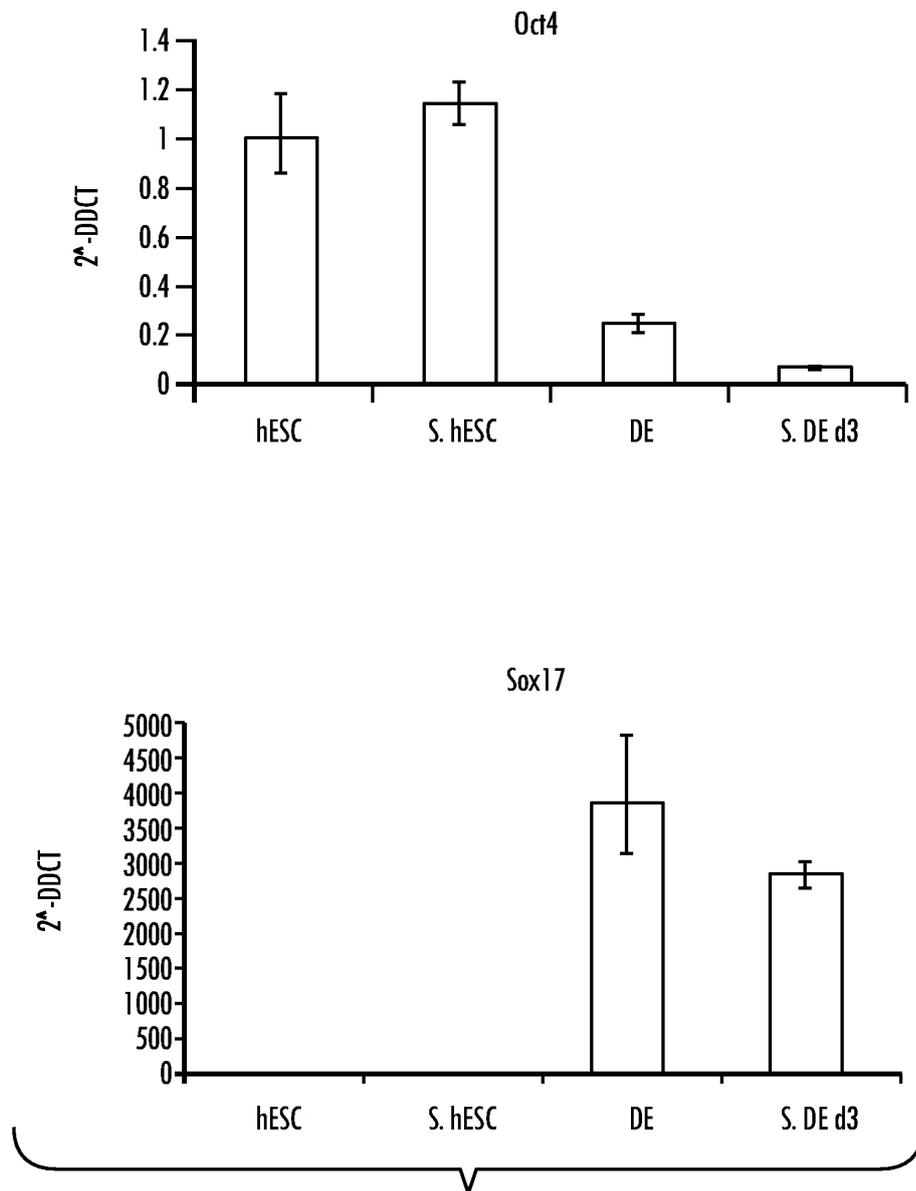


Fig. 19

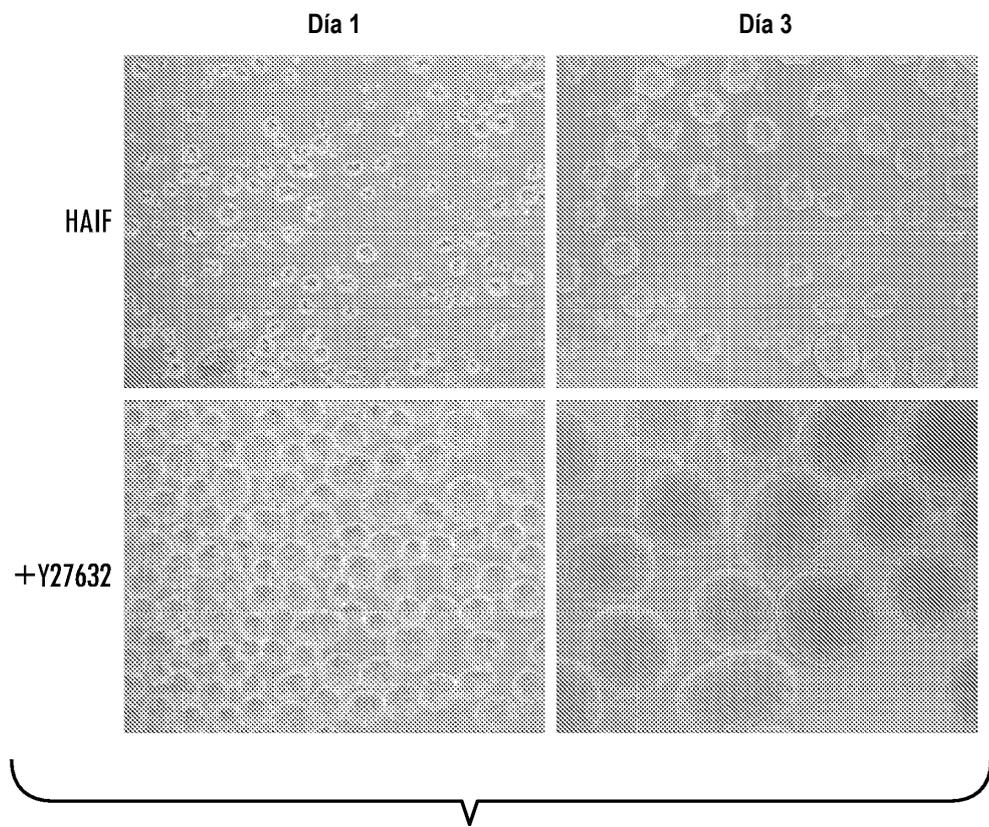


Fig. 20

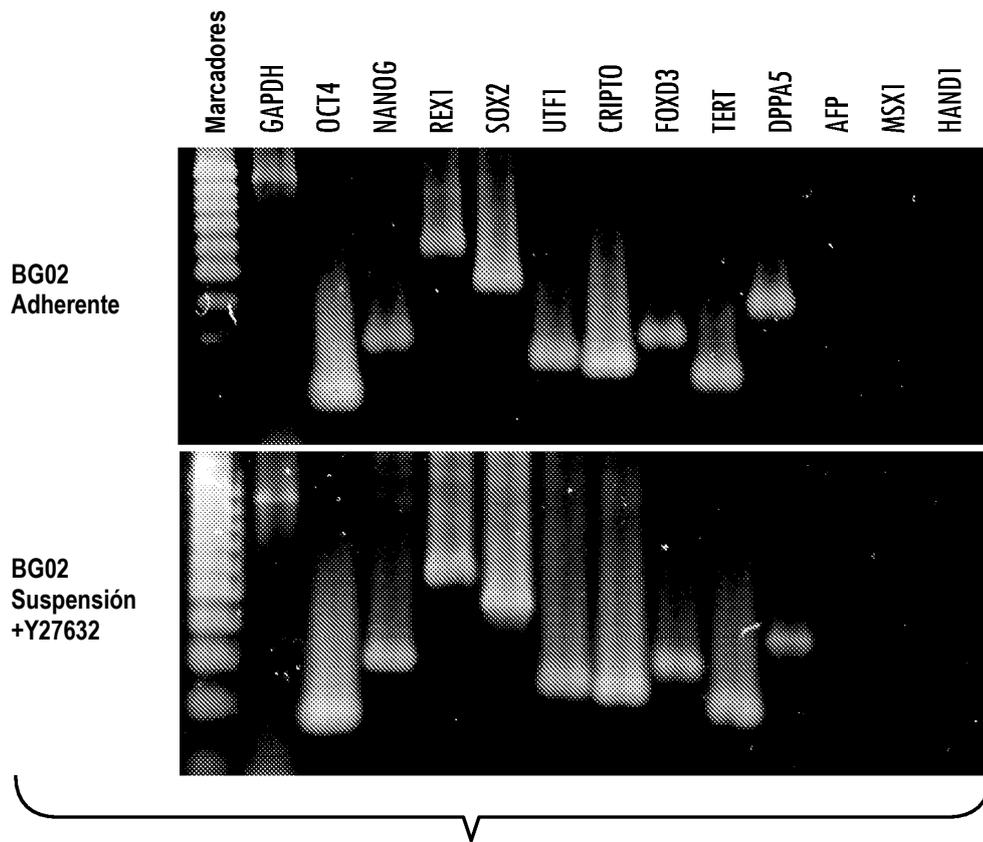


Fig. 21

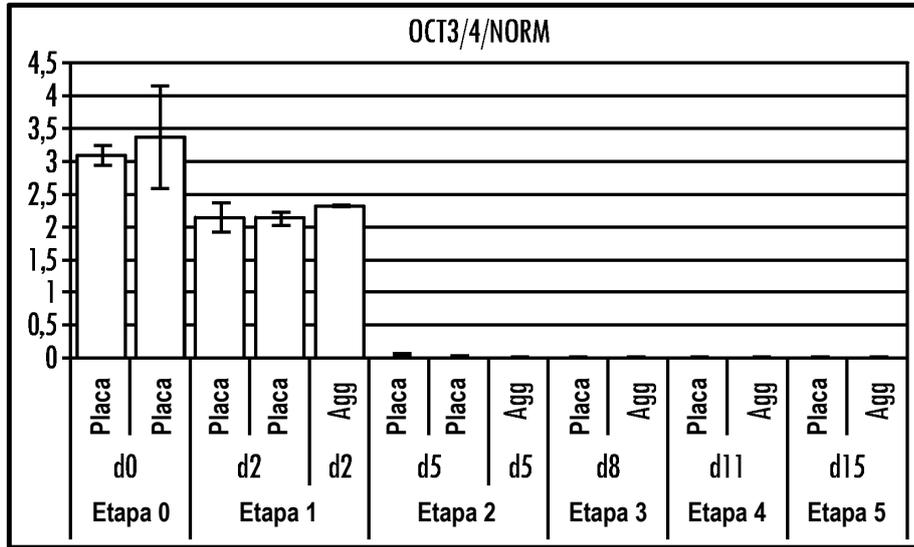


Fig. 22A

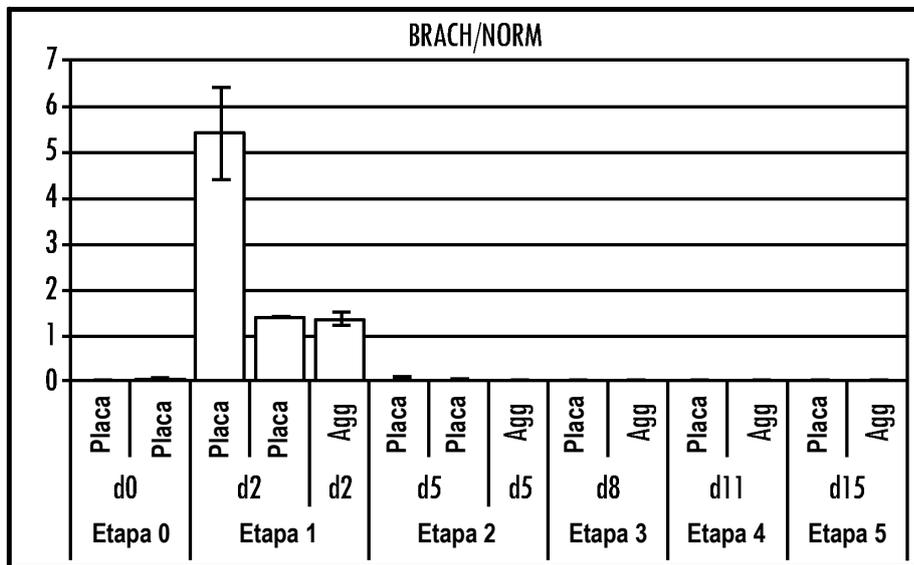


Fig. 22B

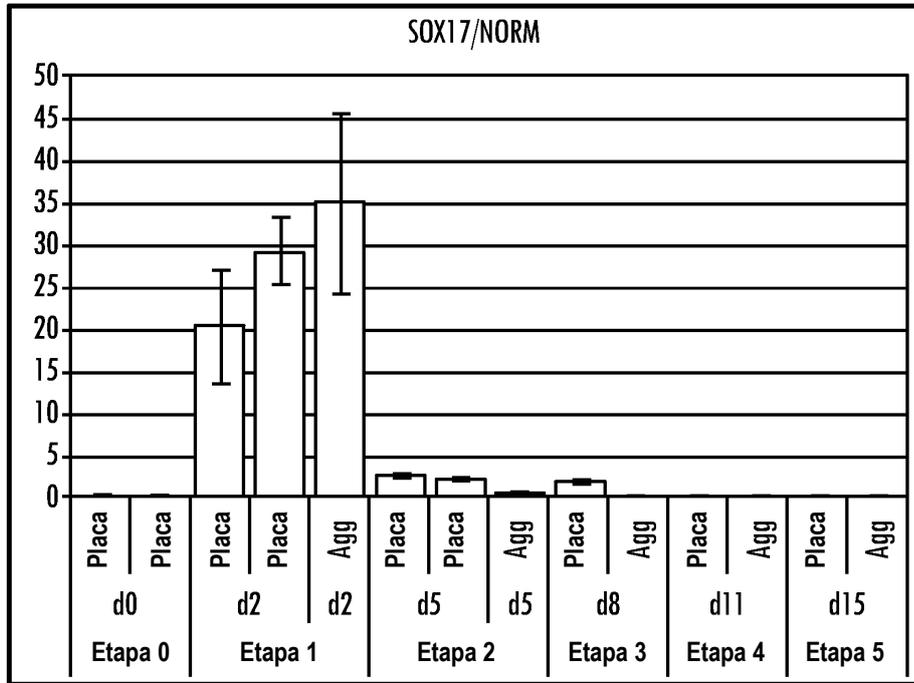


Fig. 22C

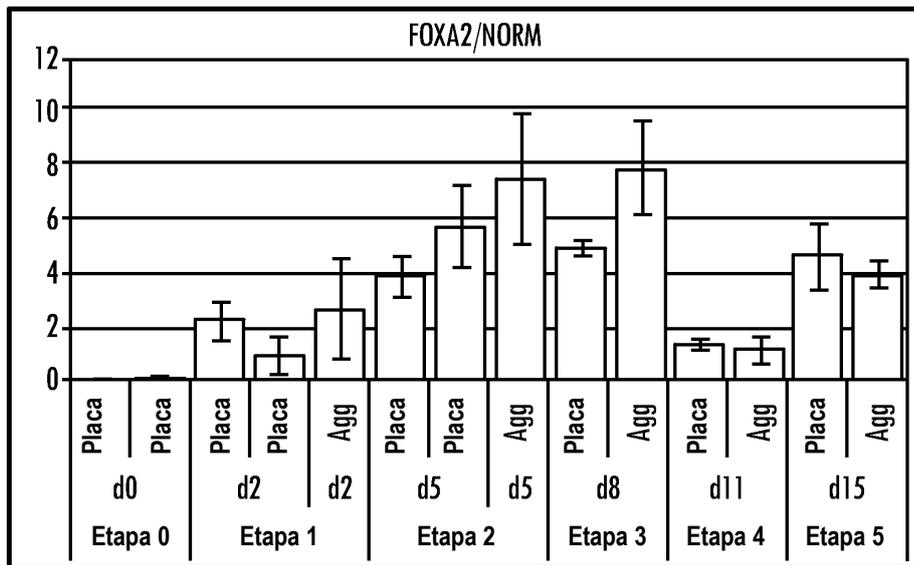


Fig. 22D

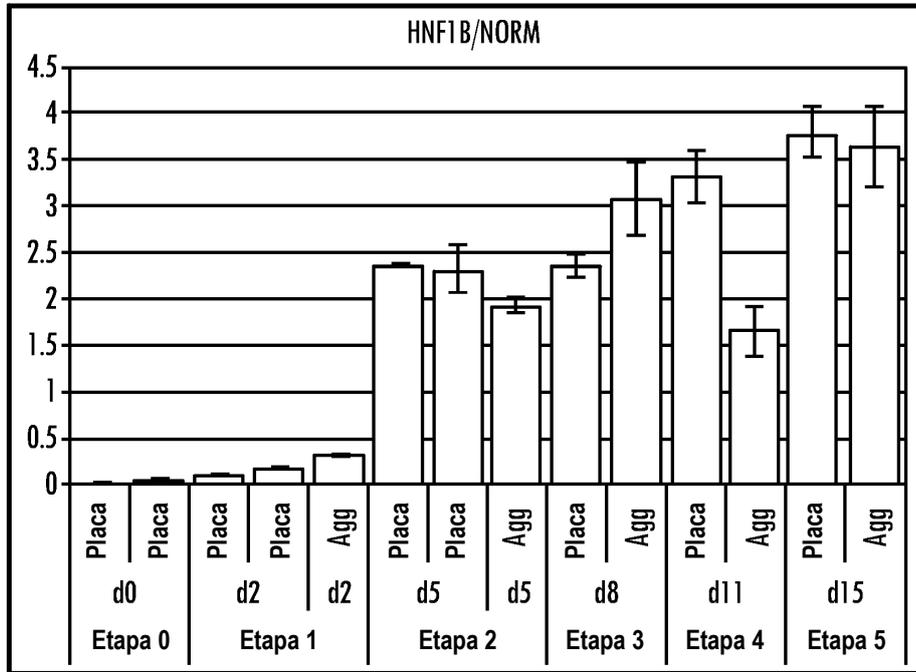


Fig. 22E

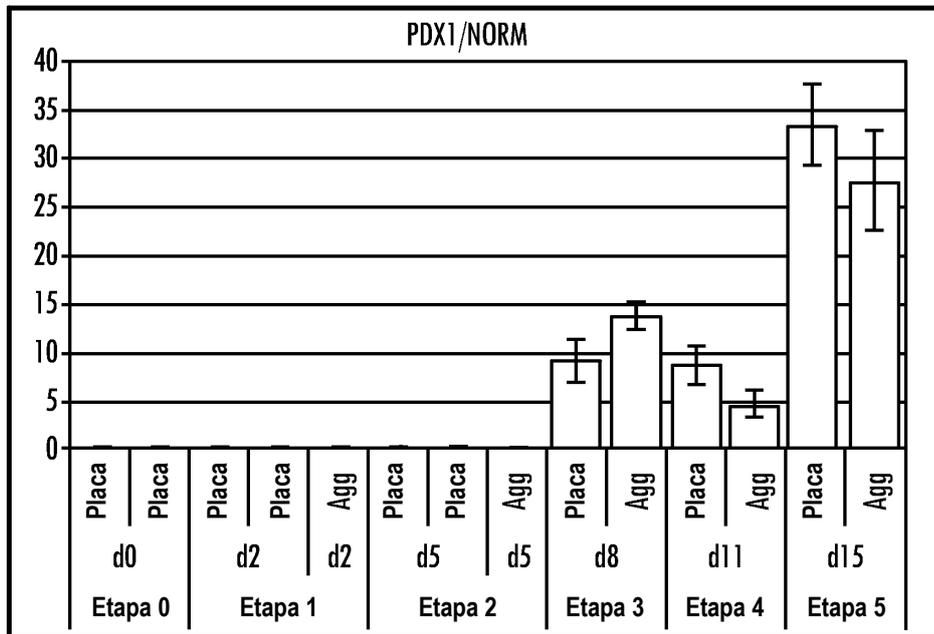


Fig. 22F

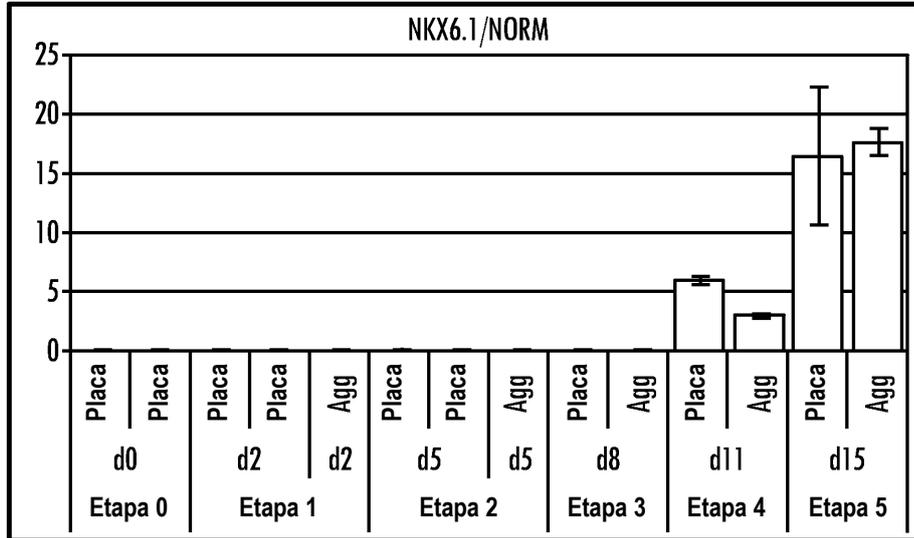


Fig. 22G

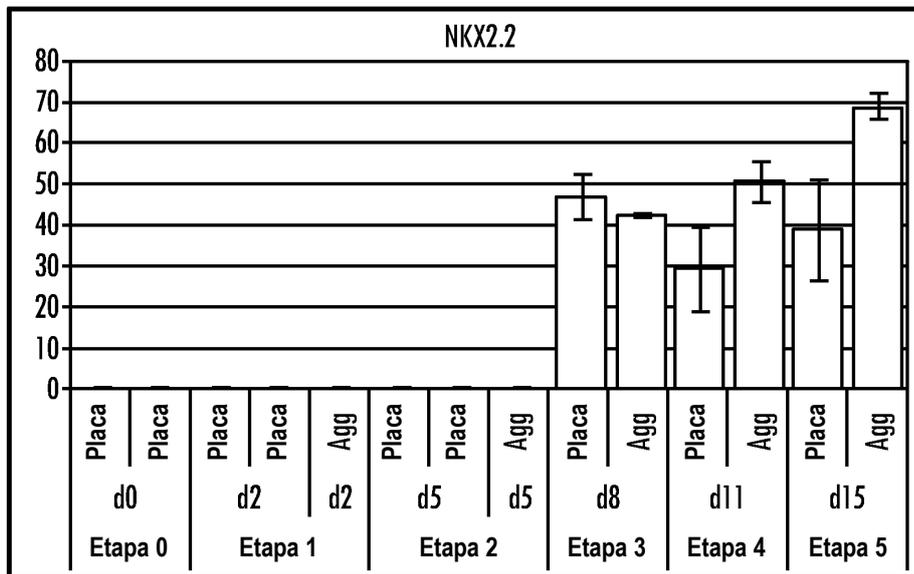


Fig. 22H

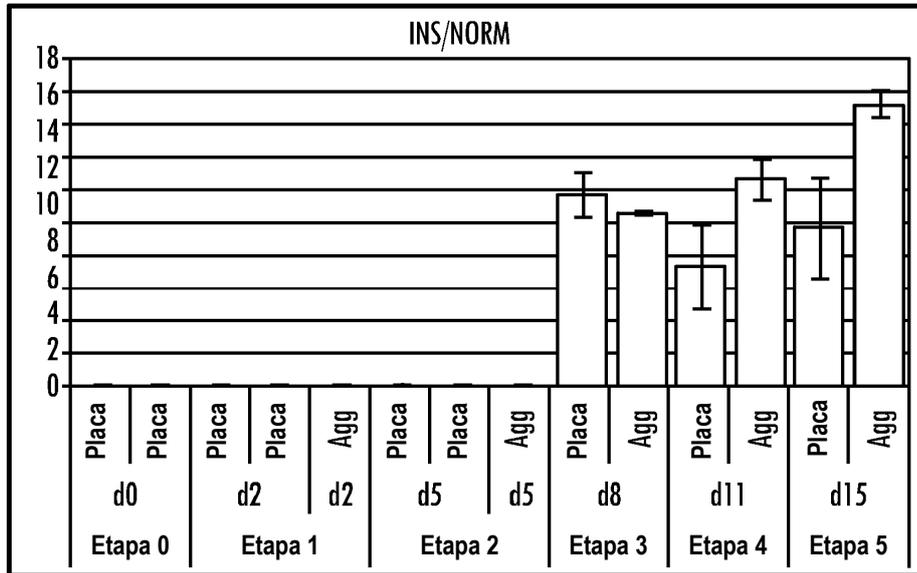


Fig. 22I

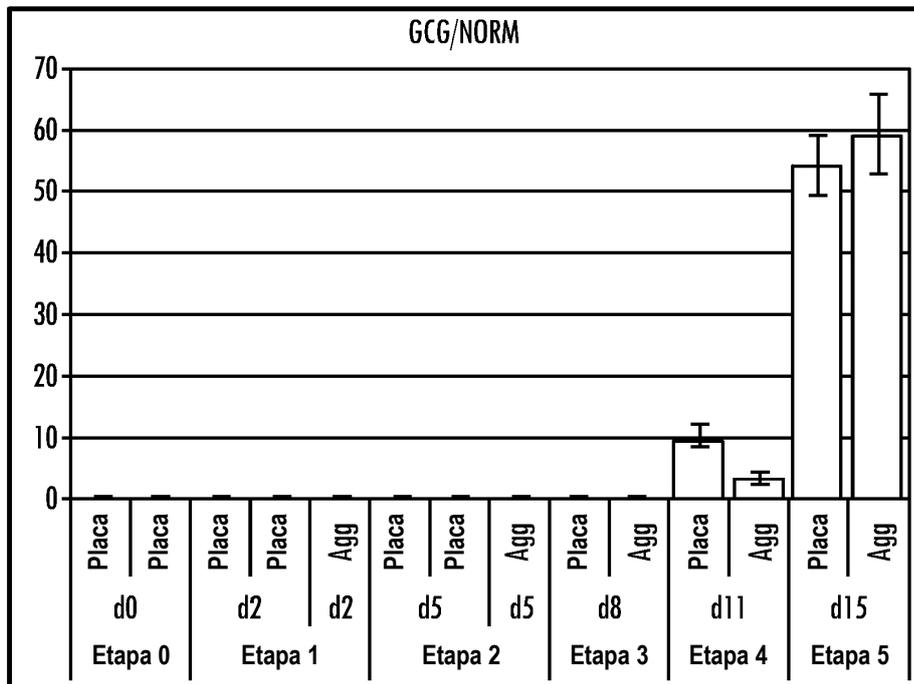


Fig. 22J

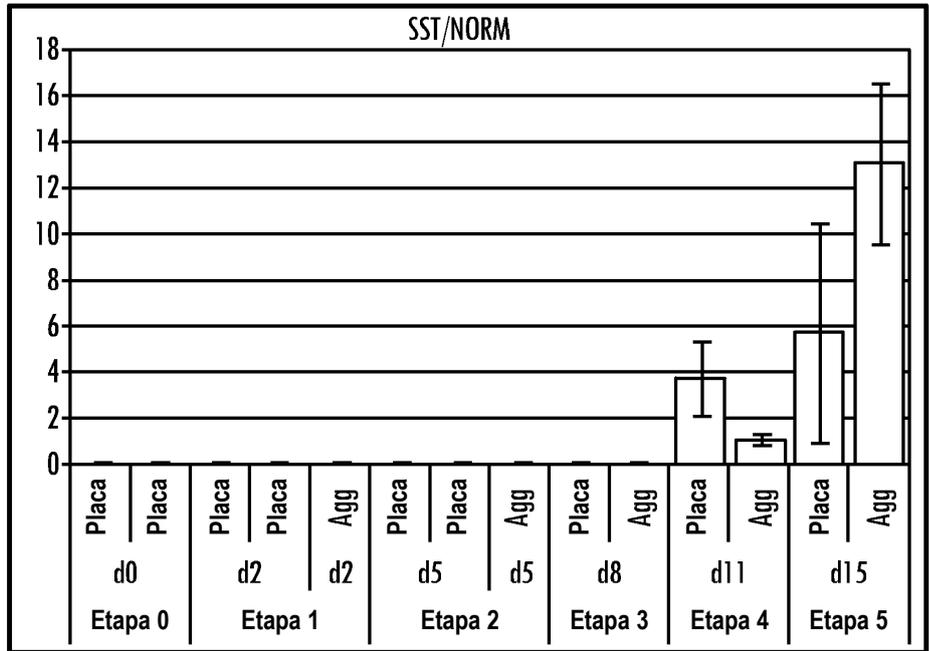


Fig. 22K

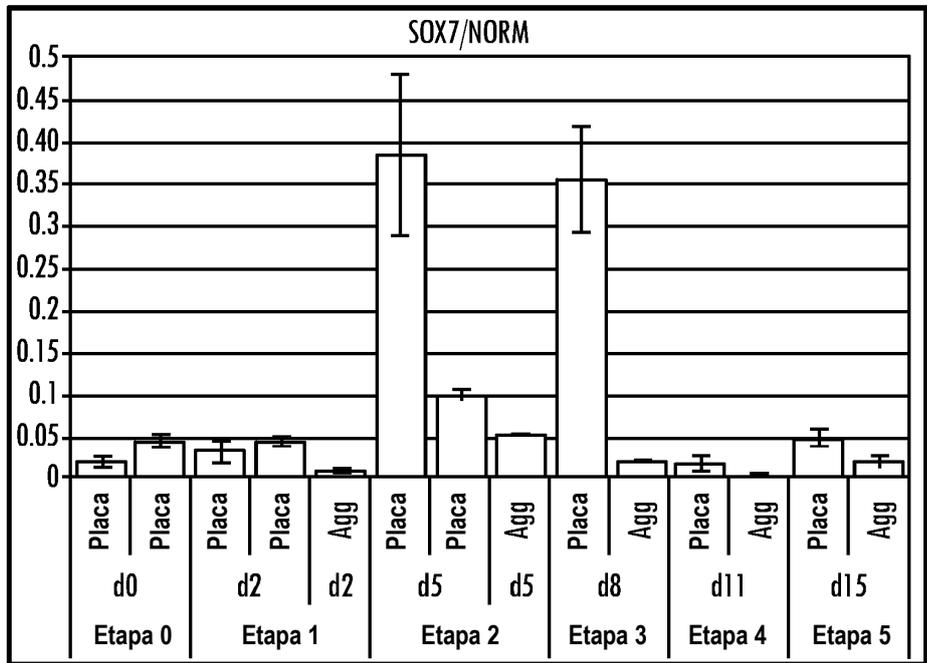


Fig. 22L

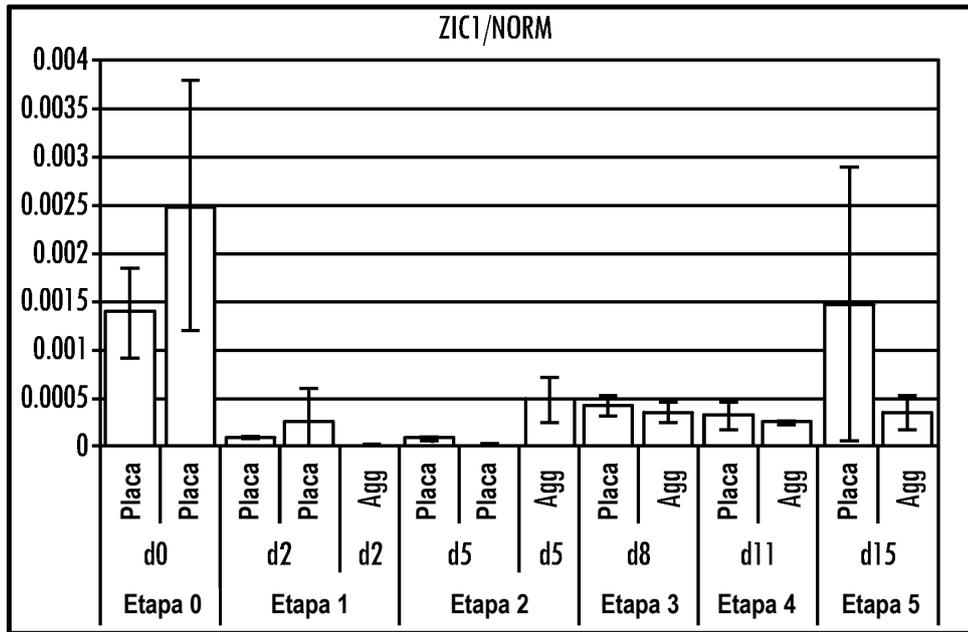


Fig. 22M

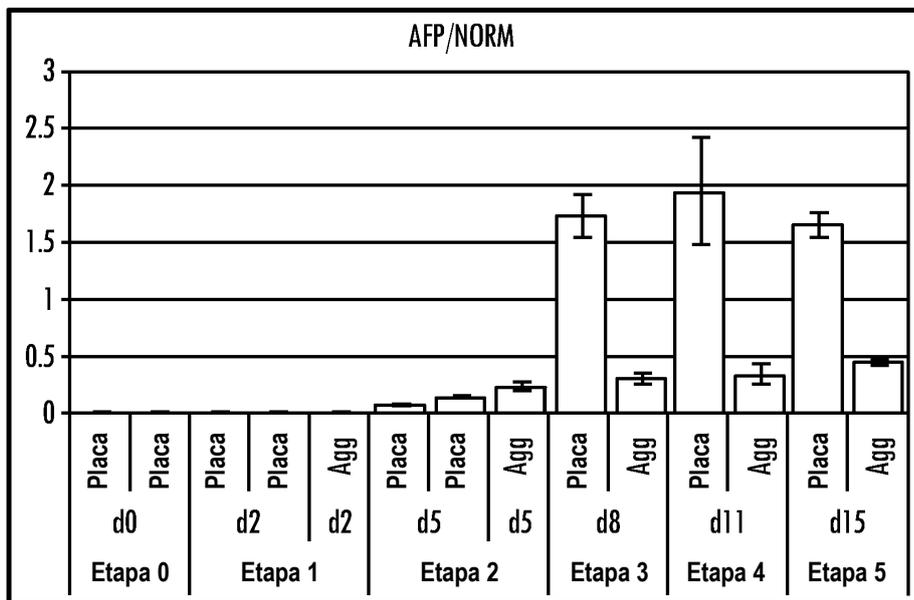


Fig. 22N

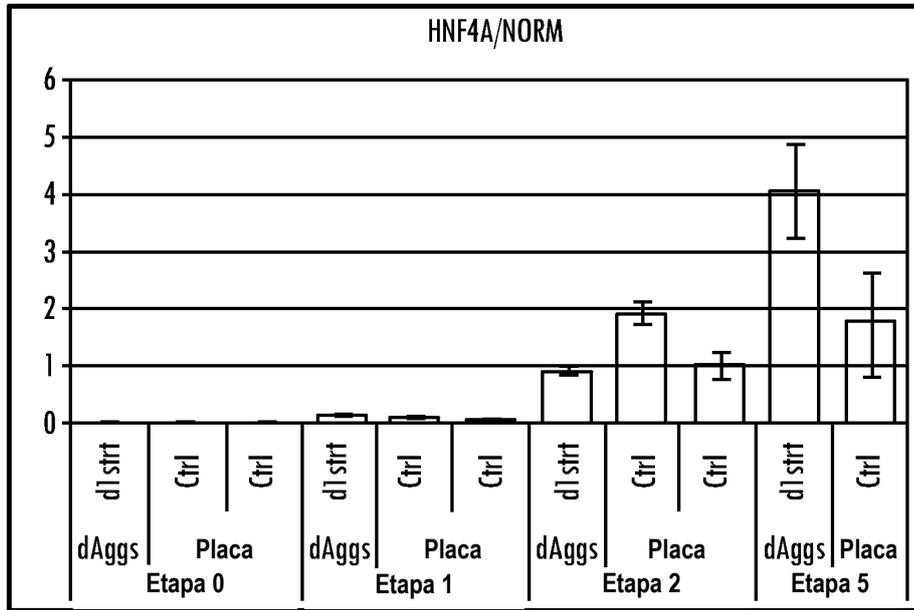


Fig. 22O

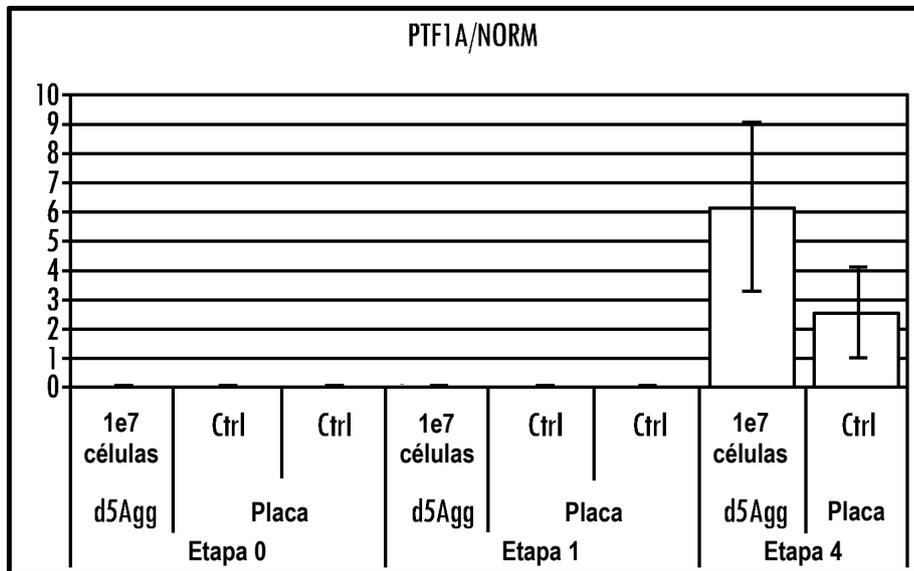


Fig. 22P

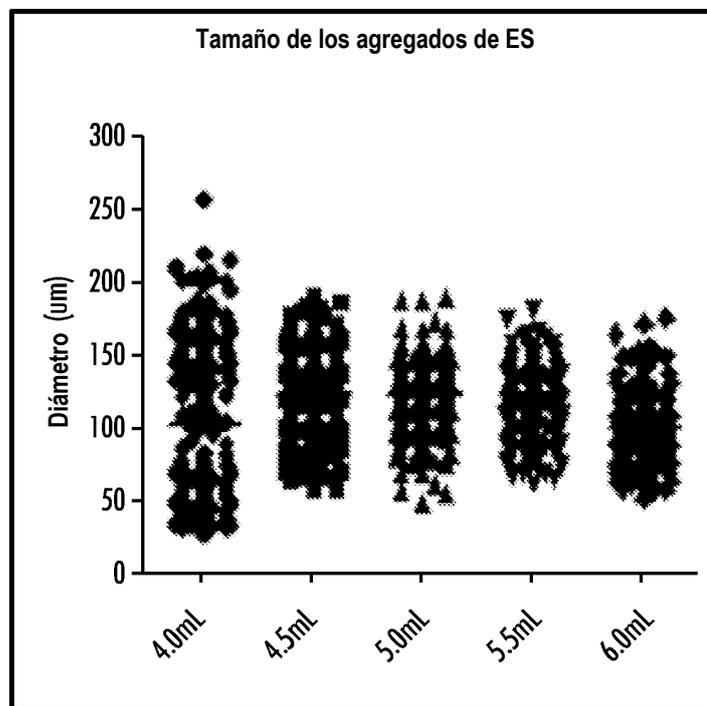


Fig. 23

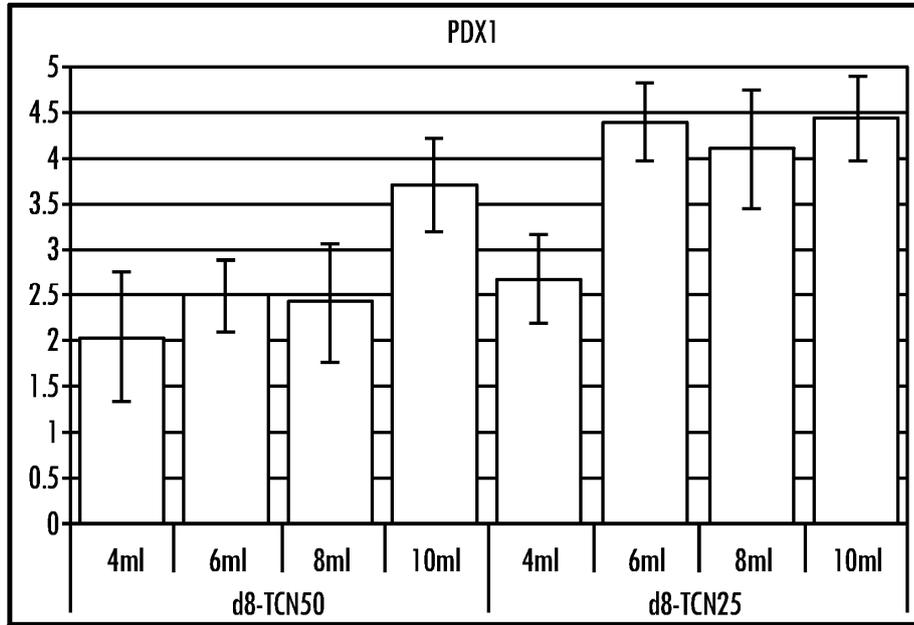


Fig. 24A

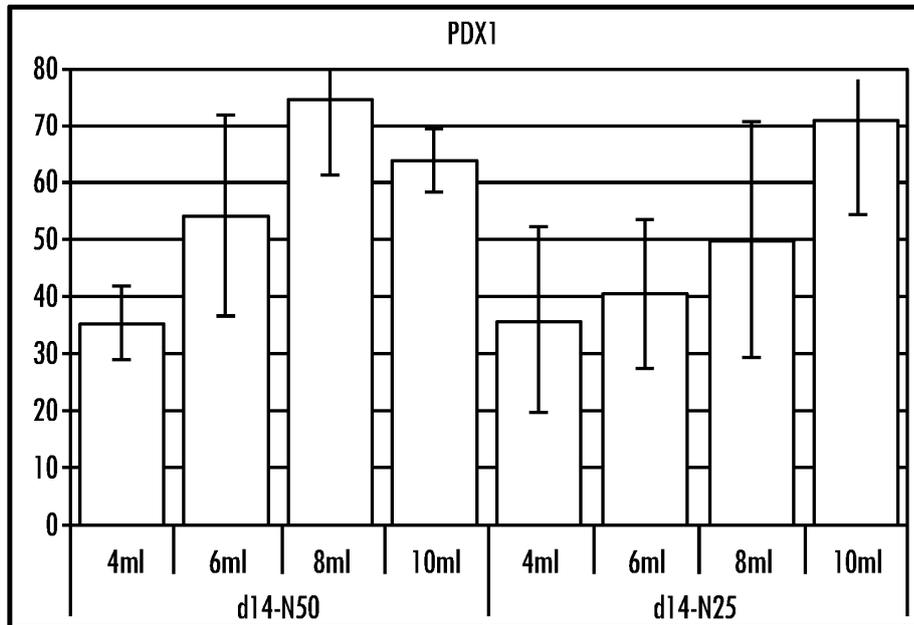


Fig. 24B

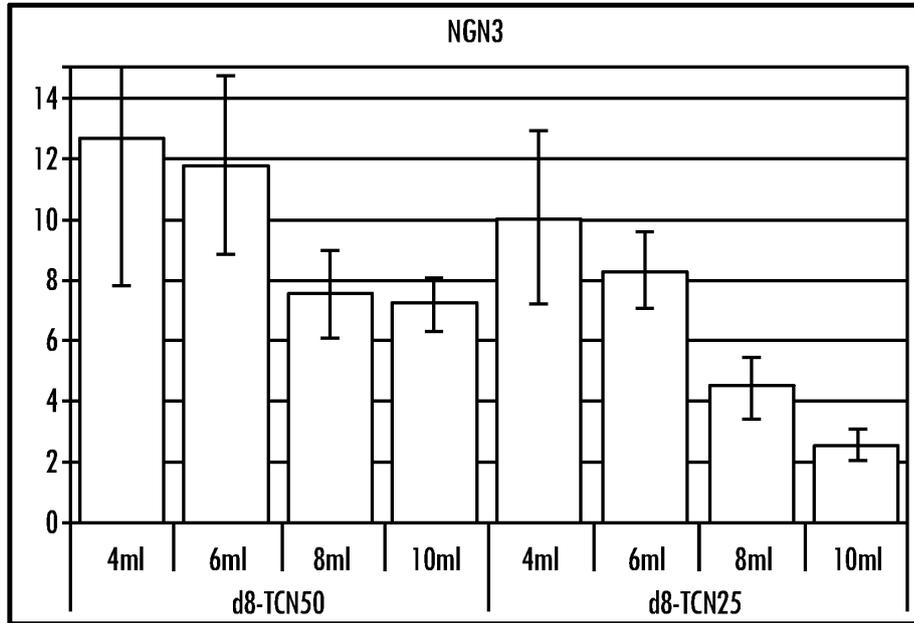


Fig. 24C

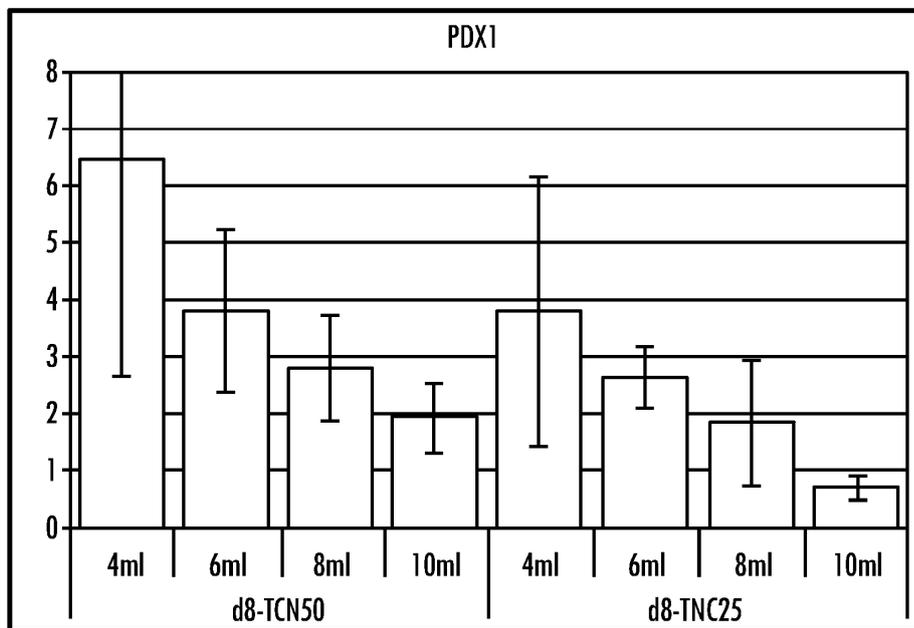


Fig. 24D