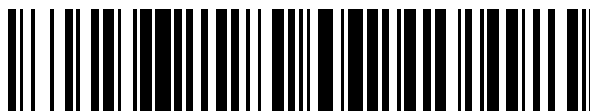


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 803**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

**C12N 5/0735** (2010.01)

**G01N 33/15** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.05.2011 PCT/US2011/037179**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11149762**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2011 E 11787151 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 2577318**

54 Título: **Método de diferenciación a nociceptores de células madre embrionarias humanas y sus usos**

30 Prioridad:

**25.05.2010 US 396257 P**

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

**11.03.2020**

73 Titular/es:

**MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER  
CENTER (100.0%)  
1275 York Avenue  
New York, NY 10065, US**

72 Inventor/es:

**STUDER, LORENZ y  
CHAMBERS, STUART, M.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 747 803 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

Método de diferenciación a nociceptores de células madre embrionarias humanas y sus usos

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere al campo de la biología de células madre, en particular a la diferenciación específica de linaje de células madre pluripotentes o multipotentes, que pueden incluir, pero sin limitación, células madre embrionarias humanas (hESC), células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC), células madre somáticas, células madre cancerosas o cualquier otra célula capaz de diferenciación específica de linaje. Se describen específicamente métodos para dirigir la diferenciación específica de linaje de hESC y/o hiPSC a nociceptores (es decir, células nociceptoras) usando nuevas condiciones de cultivo. Los nociceptores fabricados usando los métodos se contemplan adicionalmente para diversos usos que incluyen, pero sin limitación, el uso en ensayos de descubrimiento de fármacos *in vitro*, investigación del dolor y como un tratamiento terapéutico para revertir la enfermedad de, o el daño a, el sistema nervioso periférico (SNP). Además, se proporcionan composiciones y métodos para producir melanocitos a partir de células madre pluripotentes humanas para usar en la modelización de enfermedades.

**Antecedentes**

Las células madre embrionarias y somáticas tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula; por lo tanto, son especialmente adecuadas para las terapias de reemplazo celular para enfermedades que afectan, o dañan/perjudican a, una población celular definida. Más allá de su valor terapéutico directo, las células madre diferenciadas específicas del linaje también son herramientas de investigación valiosas para varios fines, incluidos los ensayos de cribado *in vitro* para identificar, confirmar, ensayar para especificación o administrar moléculas terapéuticas para tratar enfermedades específicas del linaje, elucidación adicional del complejo mecanismos de especificación y diferenciación del linaje celular, e identificación de diferencias bioquímicas críticas entre estados normales y enfermos o dañados que se pueden contemplar para su uso como marcadores de diagnóstico o pronóstico.

El poder de las células madre embrionarias y somáticas como agentes terapéuticos y modelo para enfermedades neurodegenerativas ha sido bien explorado. Sin embargo, gran parte de la investigación y los desarrollos tecnológicos relacionados con la diferenciación dirigida de células madre embrionarias y somáticas se han llevado a cabo en el campo de las enfermedades del sistema nervioso central (SNC), tales como enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple. Actualmente existe una falta de conocimiento relacionada con la diferenciación dirigida de células madre embrionarias y somáticas hacia los linajes del sistema nervioso periférico (SNP). El SNP está compuesto por el sistema nervioso somático, que coordina el control músculo-esquelético y la sensación de estímulos externos, y el sistema nervioso autónomo, que regula la función de los órganos internos, tales como los latidos cardíacos y la respiración. Existen múltiples enfermedades del SNP, incluida la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, el síndrome de Gillian Barre y la enfermedad de Hirschsprung. Las enfermedades de las neuronas sensoriales periféricas del SNP son una carga social particular porque provocan dolor intenso o falta de respuesta a los estímulos nocivos que causan lesiones e incluyen enfermedades como disautonomía familiar, insensibilidad congénita al dolor, neuropatías diabéticas y daño debido a infecciones de varicela o herpes zoster.

La comprensión de la patología de las enfermedades de las neuronas sensoriales periféricas, así como el desarrollo de modalidades de tratamiento, se ve obstaculizada por las dificultades para obtener neuronas sensoriales periféricas humanas; los métodos actuales se limitan al aislamiento manual de embriones humanos de 3-5 semanas de edad o procedimientos quirúrgicos raros. La diferenciación dirigida de células madre embrionarias o células madre somáticas en neuronas sensoriales periféricas especificadas, en particular nociceptores que son las neuronas sensoriales periféricas sensibles al dolor, sería una fuente reproducible ideal de dichas células para investigación y aplicación terapéutica. Se han realizado intentos recientes para producir neuronas sensoriales periféricas a partir de intermediarios neuronales derivados de células madre embrionarias. Sin embargo, estas técnicas están limitadas por la necesidad de un intermediario neuronal, cocultivo con células estromales murinas, periodo de tiempo para derivar dichas neuronas sensoriales periféricas, bajo rendimiento, poblaciones impuras de células que contienen tipos neuronales mixtos, supervivencia limitada y caracterización deficiente de neuronas generadas del SNP.

STUART M CHAMBERS ET AL: "Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signalling", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 27, n.º 3, 1 de marzo de 2009, páginas 275-280, desvela que la acción sinérgica de dos inhibidores de la señalización de SMAD, Nogina y SB431542, es suficiente para inducir una conversión neural rápida y completa del 480 % de las células hES en condiciones de cultivo adherentes. El análisis del destino temporal indica la aparición de una etapa transitoria de tipo epiblasto FGF5+ seguida de células neuronales PAX6+ competentes para formar rosetas. La densidad celular inicial determina la proporción del sistema nervioso central y la progenie de la cresta neural. Se dice que la diferenciación dirigida de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPS) en dopamina del mesencéfalo y motoneuronas medulares confirma la aplicabilidad general del protocolo de inducción.

El documento WO2011/159726 desvela métodos y composiciones para la transdiferenciación de una célula animal a

partir de un primer destino celular no pluripotente a un segundo destino celular no pluripotente. También se describen métodos y composiciones para la transdiferenciación de una célula animal a partir de un destino celular mesodérmico, endodérmico o ectodérmico no pluripotente a un destino celular mesodérmico, endodérmico o ectodérmico no pluripotente diferente.

5 CHEN WEIRAN ET AL: "Immortalization and characterization of a nociceptive dorsal root ganglion sensory neuronal line", JOURNAL OF THE PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM, vol. 12, n.º 2, junio de 2007, páginas 121-130, desvela la generación de líneas neuronales DRG inmortalizadas a partir de ratas de 14,5 días embrionarias. Se informa de que una de las líneas neuronales DRG inmortalizadas, 50B11, tiene las propiedades de una neurona nociceptiva. Cuando se diferencian en presencia de forskolina, estas células extienden neuritas largas, expresan marcadores neuronales y generan potenciales de acción. Expresan receptores y marcadores de neuronas sensoriales de pequeño diámetro y regulan positivamente las poblaciones de receptores apropiadas cuando crecen en presencia de factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales o factor de crecimiento nervioso. Además, expresan el receptor de capsaicina de la familia-1 de receptor vaniloide de potencial transitorio (TRPV-1) y responden a la capsaicina con aumentos en el calcio intracelular. En un formato de placa de 96 pocillos, estas neuronas muestran una disminución en los niveles de ATP cuando se exponen a didesoxicitosina (ddC) de una manera adecuada en función del tiempo y la dosis. Esta reducción inducida por ddC en los niveles de ATP se correlaciona con la degeneración axonal.

20 El documento WO2006/113534 desvela métodos para inmortalizar células, líneas celulares inmortalizadas, por ejemplo, líneas celulares neuronales, y métodos para usar estas líneas celulares en ensayos de cribado.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de un método para producir neuronas sensoriales periféricas, en particular nociceptores, directamente a partir de células madre embrionarias o somáticas sin el uso de células estromales murinas contaminantes con mayor pureza y rendimiento.

## 25 Sumario

La presente divulgación se refiere al campo de la biología de células madre, en particular a la diferenciación específica de linaje de células madre pluripotentes o multipotentes, que pueden incluir, pero sin limitación, células madre embrionarias humanas (hESC), células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC), células madre somáticas, células madre cancerosas o cualquier otra célula capaz de diferenciación específica de linaje. Se describen específicamente métodos para dirigir la diferenciación específica de linaje de hESC y/o hiPSC a nociceptores (es decir, células nociceptoras) usando nuevas condiciones de cultivo. Los nociceptores fabricados usando los métodos se contemplan adicionalmente para diversos usos que incluyen, pero sin limitación, el uso en ensayos de descubrimiento de fármacos *in vitro*, investigación del dolor y como un tratamiento terapéutico para revertir la enfermedad de, o el daño a, el sistema nervioso periférico (SNP). Además, se proporcionan composiciones y métodos para producir melanocitos a partir de células madre pluripotentes humanas para usar en la modelización de enfermedades.

Es un objetivo superar las limitaciones y/o mitigar las deficiencias en el campo. En una realización, la presente divulgación proporciona un método de producción de nociceptores que comprende i) obtener células madre (por ejemplo, hESC, hiPSC, células madre somáticas, células madre cancerosas, células pluripotentes humanas o de mamífero, etc.); ii) cultivar dicha célula madre en condiciones que inhiben la señalización doble de SMAD; y iii) cultivar adicionalmente dichas células en condiciones que inhiben la señalización de FGF y Notch y activan la señalización Wnt. Como se usa en el presente documento, el término "inhibir" o "bloquear" significa una reducción en el nivel de actividad de una ruta de señalización particular de una célula tras el tratamiento con un compuesto (es decir, un inhibidor) en comparación con la actividad de dicha ruta de señalización de una célula que no se trata con dicho compuesto o se trata con un control. Como se usa en el presente documento, el término "activar" significa un aumento en el nivel de actividad de una ruta de señalización particular de una célula tras el tratamiento con un compuesto (es decir, un activador) en comparación con la actividad de dicha ruta de señalización de una célula que no se trata con dicho compuesto o se trata con un control. Cualquier nivel de inhibición o activación de una ruta de señalización particular se considera una realización si dicha inhibición o activación da como resultado la diferenciación dirigida de una célula madre. En una realización, los métodos para el cultivo incluyen condiciones para un sistema sin alimentador. En una realización, las células madre se cultivan en una monocapa. En una realización preferida, el método para cultivo contempla el uso de medios que contienen los compuestos SB431542, LDN1933189, SU5402, CHIR99021 y DAPT. En una realización, la célula diferenciada es al menos del 10 % hasta el 100 % de la población de las células cultivadas. En una realización, la célula diferenciada expresa uno o más marcadores del grupo que comprende ISL1, BRN3A, RET, RUNX1 y NTRK1. En una realización, la expresión de dicho o dichos marcadores se expresa en al menos del 10 % hasta el 100 % de la población de las células cultivadas. En una realización preferida, la célula diferenciada es un nociceptor. En una realización preferida, la célula madre es una hESC o una hiPSC.

60 En una realización, la presente divulgación proporciona un kit que comprende i) un primer inhibidor, o combinación de inhibidores, que bloquea tanto la señalización de SMAD como la señalización de TGFβ/Activina-Nodal; ii) un segundo inhibidor que bloquea la señalización de FGF; iii) un tercer inhibidor que bloquea la señalización de Notch; y iv) un activador de la señalización Wnt. En una realización, el o los primeros inhibidores se seleccionan del grupo que comprende LDN193189 y SB431542, una combinación de los mismos y una mezcla de los mismos. En una realización, el segundo inhibidor comprende SU5402 y derivados del mismo. En una realización, el tercer inhibidor comprende

DAPT y derivados del mismo. En una realización, un activador comprende CHIR99021 y derivados del mismo. En una realización, el kit comprende además una célula madre humana. En una realización, el kit proporciona además instrucciones.

5 En una realización, la divulgación proporciona un kit que comprende i) un primer inhibidor, o combinación de inhibidores, que bloquea tanto la señalización de SMAD como la señalización de TGFβ/Activina-Nodal; ii) un segundo inhibidor que bloquea la señalización de FGF; iii) un tercer inhibidor que bloquea la señalización de Notch; y iv) un activador de la señalización Wnt. En una realización, dichos primer o primeros inhibidores se seleccionan del grupo que comprende SB431542, LDN193 189, combinación de los mismos y mezcla de los mismos. En una realización,  
10 dicho segundo inhibidor comprende SU5402 y derivados del mismo. En una realización, dicho tercer inhibidor comprende DAPT y derivados del mismo. En una realización, dicho activador comprende CHIR99021 y derivados del mismo. En una realización, dicho kit comprende además instrucciones. En una realización, dicho kit comprende además una célula madre humana. En una realización, dicha célula madre humana es una célula madre embrionaria humana. En una realización, dicha célula madre humana es una célula madre pluripotente inducida humana.

15 La presente divulgación contempla además métodos para evaluar el subtipo neuronal sensorial periférico de las células madre diferenciadas. Determinadas realizaciones de este método pueden utilizar análisis microscópico, ensayos funcionales, medición de expresión o regulación negativa de marcadores asociados con linajes particulares. En una realización preferida, el método comprende medir marcadores asociados con la especificación de nociceptor seleccionados del grupo que comprende ISL1, BRN3A, RET, RUNX1 y NTRK1.  
20

En una realización, es un método para inducir la diferenciación dirigida de una célula madre, que comprende a) proporcionar: i) un cultivo celular que comprende células madre humanas ii) un primer inhibidor, o combinación de inhibidores, que bloquea tanto la señalización de SMAD como la señalización de TGFβ/Activina-Nodal; iii) un segundo  
25 inhibidor que bloquea la señalización de FGF; iv) un tercer inhibidor que bloquea la señalización de Notch; y v) un activador de la señalización Wnt, b) poner en contacto dicha célula madre con dicho primer inhibidor, o combinación de inhibidores, que bloquea tanto la señalización de SMAD como la señalización de TGFβ/Activina-Nodal durante 0-48 h (más normalmente 1-48 horas ) *in vitro*, y c) poner en contacto además dicha célula madre con un segundo inhibidor que bloquea la señalización de FGF; un tercer inhibidor que bloquea la señalización de Notch; y un activador de la señalización Wnt durante hasta 192 horas adicionales (o incluso hasta 240 horas). En una realización, dichos primer o primeros inhibidores se seleccionan del grupo que comprende SB431542, LDN193189, combinación de los mismos y mezcla de los mismos. En una realización, dicho segundo inhibidor comprende SU5402 y derivados del mismo. En una realización, dicho tercer inhibidor comprende DAPT y derivados del mismo. En una realización, dicho activador comprende CHIR99021 y derivados del mismo. En una realización, dicha célula madre es una célula madre embrionaria humana. En una realización, dicha célula madre es una célula madre pluripotente inducida humana. En una realización, dicha célula diferenciada es una célula neuronal. En una realización, dicha célula neuronal es un nociceptor. En una realización, dicha célula diferenciada expresa uno o varios marcadores del grupo que comprende ISL1, BRN3A, RET, RUNX1 y NTRK1. En una realización, dicha célula diferenciada responde a estímulos externos.  
30  
35

40 La presente divulgación contempla además usos de los nociceptores generados por un método. En una realización, los nociceptores se usan en ensayos *in vitro* para identificar compuestos que pueden usarse como agentes terapéuticos contra el dolor. En una realización, los nociceptores se usan para estudiar la función de los nociceptores. En una realización, los nociceptores se usan como una terapia de reemplazo celular *in vivo* en un animal que padece, o está en riesgo de, daño o enfermedad del SNP.  
45

En una realización, la divulgación proporciona un método de cribado de agentes biológicos, que comprende, a) proporcionar: i) un nociceptor, y ii) un compuesto de ensayo b) poner en contacto dicho nociceptor con dicho compuesto de ensayo y medir la activación o inhibición de la función del nociceptor. En una realización, dicho nociceptor se deriva de una célula madre humana.  
50

En una realización, es un kit que comprende un primer inhibidor de señalización, un segundo inhibidor de señalización y un tercer inhibidor de señalización, en el que dicho primer inhibidor es capaz de disminuir la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ)/Activina-Nodal, dicho segundo inhibidor es capaz de disminuir la señalización de Small Mothers Against Decapentaplegic (SMAD) y dicho tercer inhibidor es capaz de disminuir la glucógeno sintasa cinasa 3β (GSK3β) para la activación de la señalización Wingless (Wnt). En una realización, dicho primer inhibidor es una molécula pequeña seleccionada del grupo que consiste en SB431542, derivados del mismo y mezclas de los mismos. En una realización, dicho segundo inhibidor es una molécula pequeña seleccionada del grupo que consiste en LDN193189, derivados del mismo y mezclas de los mismos. En una realización, dicho tercer inhibidor se selecciona del grupo que consiste en CHIR99021 y derivados del mismo. En una realización, dicho kit comprende además un cuarto inhibidor que reduce la señalización de la familia del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), en el que dicha señalización de la familia del receptor de FGF comprende receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y receptores de tirosina cinasa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). En una realización, dicho cuarto inhibidor se selecciona del grupo que consiste en SU5402 y derivados del mismo. En una realización, dicho kit comprende además  
55 un quinto inhibidor capaz de disminuir la señalización de Notch. En una realización, dicho quinto inhibidor se selecciona del grupo que consiste en N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster (DAPT) y sus derivados. En  
60  
65

- una realización, dicho kit comprende además anticuerpos usados para la detección de la expresión de una o más proteínas, seleccionados del grupo que consiste en nestina, OCT4, PAX6, TUJ1, SOX10, NTRK1, ISL1, POU4F1 (BRN3A), NEUROG2, NEUROG1, MAP2, OTX2, DLK1, DKK1, CUZD1, MSX1, ID2, AP2B, ETS1, FOXD3, NGN1, DCX, TUBB3, SYT4, STMN2, INA, GAP43, TAC1, VGLUT2, SLC15A3 y TRPV1. En una realización, dicho kit comprende además cebadores de PCR para la detección de la expresión de ARNm de genes seleccionados del grupo que consiste en nestina, OCT4, PAX6, TUJ1, SOX10, NTRK1, ISL1, POU4F1 (BRN3A), NEUROG2, NEUROG1, MAP2, OTX2, DLK1, DKK1, CUZD1, MSX1, ID2, AP2B, ETS1, FOXD3, NGN1, DCX, TUBB3, SYT4, STMN2, INA, GAP43, TAC1, VGLUT2, SLC15A3 y TRPV1. En una realización, dicho kit comprende además anticuerpos usados para la detección de la expresión de una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en protaquicínina-1 (TAC1), transportador de glutamato vesicular 2 (VGLUT2) y familia de portadores de solutos 15, miembro 3 (SLC15A3). En una realización, dicho kit comprende además instrucciones que comprenden etapas para añadir el primer y segundo inhibidor dos días antes de añadir el tercer inhibidor. En una realización, dicho kit comprende además instrucciones que comprenden etapas para añadir el primer y segundo inhibidor dos días antes de añadir una combinación de dicho tercer inhibidor, dicho cuarto inhibidor y dicho quinto inhibidor. En una realización, dicho kit comprende además instrucciones que comprenden etapas para la alimentación diaria de dichos inhibidores en orden en los días 0-10. En una realización, dicho kit comprende además instrucciones que comprenden etapas para fabricar precursores de células madre neurales y fabricar células nociceptoras. En una realización, dicho kit comprende además una célula madre humana. En una realización, dicha célula madre humana es una célula madre embrionaria humana. En una realización, dicha célula madre humana es una célula madre pluripotente inducida humana. En una realización, dicha célula madre humana es una célula madre pluripotente humana (hPSC) con cromosoma artificial bacteriano (BAC) *SOX10::GFP* transgénico.
- En una realización, la divulgación proporciona un método para inducir la diferenciación dirigida de una célula madre, que comprende a) proporcionar: i) un cultivo celular que comprende células madre humanas; y ii) un primer inhibidor de señalización, un segundo inhibidor de señalización y un tercer inhibidor de señalización, en el que dicho primer inhibidor es capaz de disminuir la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ )/Activina-Nodal, dicho segundo inhibidor es capaz de disminuir la señalización de Small Mothers Against Decapentaplegic (SMAD) y dicho tercer inhibidor es capaz de disminuir la glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) para la activación de la señalización Wingless (Wnt); b) poner en contacto dicha célula madre con dicho segundo inhibidores durante hasta 48 (o incluso hasta 96 horas) *in vitro*; y c) poner en contacto además dicha célula madre inhibida con dicho tercer inhibidor durante hasta 192 horas adicionales (o incluso hasta 240 horas) para inducir la diferenciación dirigida de una célula madre, en el que dicha célula madre diferenciada se selecciona del grupo que consiste en una célula madre de la cresta neural, una célula del linaje de la cresta neural y una célula del linaje neuronal. En una realización, dicho primer inhibidor es una molécula pequeña seleccionada del grupo que consiste en SB431542, derivados del mismo y mezclas de los mismos. En una realización, dicho segundo inhibidor es una molécula pequeña seleccionada del grupo que consiste en LDN193189, derivados del mismo y mezclas de los mismos. En una realización, dicho tercer inhibidor se selecciona del grupo que consiste en CHIR99021 y derivados del mismo. En una realización, dicho kit comprende además un cuarto inhibidor que reduce la señalización de la familia del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), en el que dicha señalización de la familia del receptor de FGF comprende receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y receptores de tirosina cinasa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). En una realización, dicho cuarto inhibidor se selecciona del grupo que consiste en SU5402 y derivados del mismo. En una realización, dicho kit comprende además un quinto inhibidor capaz de disminuir la señalización de Notch. En una realización, dicho quinto inhibidor se selecciona del grupo que consiste en N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster (DAPT) y sus derivados. En una realización, dicho kit comprende además un cuarto inhibidor y un quinto inhibidor, en el que dicho cuarto inhibidor se selecciona del grupo que consiste en SU5402 y derivados del mismo, en el que dicho quinto inhibidor se selecciona del grupo que consiste en N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster (DAPT) y derivados del mismo para la diferenciación dirigida de una célula de linaje neuronal en una célula nociceptora peptidérgica. En una realización, dicha célula nociceptora peptidérgica expresa un marcador seleccionado del grupo que consiste en OCT4, DLK1, PAX6, SOX10, POU4F1 (BRN3A), ISL1, NEUROG2, NEUROG1, NTRK1, RET, RUNX1, VGLUT2, TAC1 y TRPV1. En una realización, dicha célula nociceptora peptidérgica expresa un marcador seleccionado del grupo que consiste en ISL1, POU4F1 (BRN3A), RET, RUNX1 y NTRK1. En una realización, dicho marcador se selecciona del grupo que consiste en una proteína y un ácido nucleico. En una realización, dicha célula nociceptora peptidérgica coexpresa la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP). En una realización, dicha célula nociceptora peptidérgica produce un potencial de acción en respuesta a estímulos externos, en el que dichos estímulos externos son una corriente eléctrica. En una realización, dicha célula nociceptora peptidérgica diferenciada está presente dentro de una población altamente enriquecida de neuronas dentro de 8 a 18 días y más normalmente 10-15 días después de poner en contacto dicha célula madre con dicho primer y dicho segundo inhibidor. En una realización, dicha célula madre es una célula madre embrionaria humana. En una realización, dicha célula madre es una célula madre pluripotente inducida humana.
- En una realización, la divulgación proporciona un método de cribado de un agente biológico *in vitro*, que comprende, a) proporcionar: i) una célula nociceptora derivada *in vitro* de la diferenciación dirigida de una célula madre; y ii) un compuesto de ensayo; y b) poner en contacto dicha célula nociceptora con dicho compuesto de ensayo y medir la

función nociceptora, en el que dicha función es la medición de un potencial de acción. En una realización, dicha célula nociceptora se deriva de una célula madre humana.

En una realización, la divulgación proporciona un kit para la diferenciación dirigida de un melanocito.

5

En una realización, la divulgación proporciona un método para la diferenciación dirigida de un melanocito.

En una realización, la divulgación proporciona un método para proporcionar poblaciones celulares del linaje de melanocitos.

10

En una realización, la divulgación proporciona un método para proporcionar poblaciones celulares de melanocitos maduros.

## DEFINICIONES

15

Como se usa en el presente documento, el término "kit" se refiere a cualquier sistema de suministro para suministrar materiales. En el contexto de la diferenciación celular, un kit puede referirse a una combinación de materiales para poner en contacto células madre, dichos sistemas de suministro incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, transporte o suministro de reactivos de reacción (por ejemplo, compuestos, proteínas, agentes de detección (tales como anticuerpos PAX6), etc., en los recipientes apropiados (tales como tubos, etc.) y/o materiales de soporte (por ejemplo, tampones, instrucciones escritas para realizar la diferenciación celular, etc.) de una ubicación a otra. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más recintos (por ejemplo, cajas o bolsas, tubos de ensayo, tubos Eppendorf, tubos capilares, placas de pocillos múltiples y similares) que contienen reactivos de reacción relevantes para inhibir las rutas de señalización, por ejemplo, un inhibidor para disminuir la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ /Activina-Nodal, tal como SB431542 (o un reemplazo de SB431542) y similares, un inhibidor para disminuir la señalización de SMAD, LDN-193189 (o un reemplazo de LDN-193189) y similares, un inhibidor para disminuir la glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), como un ejemplo, para la señalización reprimida de  $\beta$ -catenina, para la activación de la señalización Wingless (Wnt o Wnts), también conocida como activador de la señalización WNT (agonista de WNT), tal como CHIR99021 (o un reemplazo de CHIR99021), etc.), y similares, un inhibidor de la señalización del receptor de la familia FGF, que incluye la disminución de la señalización de la familia del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), en el que dicha señalización de la familia del receptor de FGF comprende señalización de receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptores de factor de crecimiento de fibroblastos ( FGF) y de receptor de tirosina cinasa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), tal como SU5402 (o un reemplazo de SU5402) y similares, un inhibidor de la señalización de Notch, tal como DAPT (o un reemplazo de DAPT), y similares, y/o materiales de soporte. Los reactivos en el kit en una realización pueden estar en solución, pueden estar congelados o pueden estar liofilizados. Los reactivos en el kit en una realización pueden estar en recipientes individuales o proporcionarse como combinaciones específicas, tales como una combinación de reactivos LSB3i, CHIR, Mel y similares.

20

25

30

35

40

Como se usa en el presente documento, el término "señalización" en referencia a una "proteína de transducción de señales" se refiere a proteínas que se activan o se ven afectadas por la unión del ligando a una proteína receptora de membrana o algún otro estímulo. Los ejemplos de la proteína de transducción de señales incluyen una proteína SMAD, una proteína compleja WNT, que incluye proteínas beta-catenina, NOTCH, factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ), Activina, Nodal y glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Para muchos receptores de la superficie celular o proteínas receptoras internas, las interacciones ligando-receptor no están directamente vinculadas a la respuesta de la célula. El receptor activado por ligando debe interactuar primero con otras proteínas dentro de la célula antes de que se produzca el efecto fisiológico final del ligando sobre el comportamiento de la célula. A menudo, el comportamiento de una cadena de varias proteínas celulares que interactúan se altera después de la activación o inhibición del receptor. El conjunto completo de cambios celulares inducidos por la activación del receptor se denomina mecanismo de transducción de señal o ruta de señalización.

45

50

Como se usa en el presente documento, el término "NOTCH" se refiere a una ruta de señalización representada por al menos cinco ligandos, (por ejemplo, denominados Jagged-1, -2 y de tipo Delta (D11) -1, -3 y -4) que se unen a uno o más de al menos cuatro receptores Notch (denominados Notch-1, -2, -3 y -4). La señalización de Notch se inicia por una interacción receptor-ligando que da como resultado al menos una escisión proteolítica por TACE (enzima convertidora de TNF-*alfa*) y/o un complejo gamma-secretasa/presenilina. Esta escisión proteolítica da como resultado la liberación de una proteína de dominio intracelular (N<sup>IC</sup>, la forma funcionalmente activa de Notch), que se transloca al núcleo y se une a CBF-1 (también denominado CSL o RBP-Jkappa), una proteína de unión al ADN. La unión de N<sup>IC</sup> a CBF-1 desplaza el complejo represor y recluta coactivadores nucleares tales como MAML1 e histona acetiltransferasas que convierten CBF-1 en un activador transcripcional. Las interacciones CBF-1/Notch dan como resultado la expresión de diversos genes diana, incluyendo las familias Hes (Hairy/Enhancer of Split), Hey (Hairy/Enhancer of Split relacionado con YRPW (también conocido como HesR, HRT, HERP, CHF y embotellamiento)), NF-kappaB y PPAR de factores de transcripción, y reguladores del ciclo celular tales como p21<sup>CIP1/WAF1</sup> y ciclina D, como un ejemplo. Los miembros de la familia Hes (incluyendo Hes-1) y Hey (incluyendo Hey1 y Hey2) son ejemplos de factores de transcripción que son dianas directas cadena abajo de la activación de Notch. Dada la complejidad de la ruta de señalización de Notch, es comprensiblemente difícil predecir el resultado de la activación o inhibición de Notch. No

55

60

65

solo hay múltiples receptores y ligandos de Notch (cada uno con un patrón de expresión único), sino que la gran cantidad de genes diana y la posible diafonía entre Notch y otras cascadas de señalización complican aún más el sistema.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "señales" se refiere a factores internos y externos que controlan los cambios en la estructura y función de la célula. Son de naturaleza química o física.

10 Como se usa en el presente documento, el término "ligando" se refiere a moléculas y proteínas que se unen a receptores (R), los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a, factor de crecimiento transformante beta, activinas, nodal, proteínas morfógenas óseas (BMP), etc.

15 Como se usa en el presente documento, el término "inhibidor" en referencia a la inhibición de una molécula de señalización o la ruta de una molécula de señalización, un "inhibidor de señalización", tal como un inhibidor de la señalización de SMAD, se refiere a un compuesto o molécula (por ejemplo, una molécula pequeña, péptido, peptidomimético, compuesto natural, ARNip, ácido nucleico antisentido, aptámero o anticuerpo) que interfiere en (es decir, reduce o suprime o elimina o bloquea) la función de señalización de la molécula o ruta. En otras palabras, un inhibidor es cualquier compuesto o molécula que cambia cualquier actividad de una proteína nombrada (molécula de señalización, cualquier molécula involucrada con la molécula de señalización nombrada, una molécula asociada nombrada, tal como una glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )) (por ejemplo, incluyendo, pero sin limitación, las moléculas de señalización descritas en el presente documento), como un ejemplo, contactando directamente con la señalización de SMAD, contactando con el ARNm de SMAD, causando cambios conformacionales de SMAD, disminuyendo los niveles de proteína de SMAD o interfiriendo en las interacciones de SMAD con los socios de señalización (por ejemplo, incluyendo los descritos en el presente documento), y que afectan a la expresión de genes diana de SMAD (por ejemplo, los descritos en el presente documento). Los inhibidores también incluyen moléculas que regulan indirectamente la actividad biológica de SMAD al interceptar moléculas de señalización cadena arriba (por ejemplo, dentro del dominio extracelular, los ejemplos de una molécula de señalización y un efecto incluyen: Nogina que secuestra proteínas morfógenas óseas, inhibiendo la activación de los receptores ALK 1,2,3, y 6, evitando así la activación SMAD cadena abajo. De forma análoga, Cordina, Cerberus, Follistatina, secuestran de forma similar los activadores extracelulares de señalización de SMAD. Bambi, una proteína transmembrana, también actúa como un pseudo-receptor para secuestrar moléculas de señalización TGF $\beta$  extracelulares. Anticuerpos que bloquean activinas, nodal, TGF $\beta$  y BMP se contemplan para neutralizar activadores extracelulares de señalización SMAD y similares). Así, en una realización, un inhibidor induce (cambia) o altera la diferenciación de un tipo de célula predeterminado a uno no predeterminado, por ejemplo, uno de los métodos que comprende al menos 3 inhibidores que producen una célula progenitora neural no predeterminada. En una realización preferida, un inhibidor "altera" o "disminuye" o "bloquea" la señalización predeterminada para dirigir la diferenciación celular hacia un tipo celular no predeterminado, tal como se describe en el presente documento para producir células nociceptoras. Por lo tanto, un inhibidor es un compuesto natural o molécula pequeña para aumentar o disminuir la actividad de la molécula de señal que ayuda a producir células nociceptoras. Los inhibidores se describen en términos de inhibición competitiva (se une al sitio activo de manera que excluye o reduce la unión de otro compuesto de unión conocido) y la inhibición alostérica (se une a una proteína de una manera que cambia la conformación de la proteína de una manera que interfiere en la unión de un compuesto al sitio activo de esa proteína) además de la inhibición inducida por la unión y afecta a una molécula cadena arriba de la molécula de señalización nombrada que a su vez provoca la inhibición de la molécula nombrada. En algunos casos, un inhibidor se conoce como un "inhibidor directo" que se refiere a la inhibición de un objetivo de señalización o una ruta de diana de señalización contactando realmente con la diana de señalización; por ejemplo, un inhibidor directo de una gamma secretasa es una molécula DAPT que se une a la proteína gamma secretasa. Los inhibidores directos a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación: lidocaína, micricitrina, capsaicina crónica, alcanfor, amilorida, capsazepina, linopirdina y la mayoría de los anestésicos locales que bloquean la función nerviosa general.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "influencias de señalización extracelular" se refiere al efecto que tienen las moléculas de señalización extracelular (por ejemplo, agentes de ensayo tales como moléculas pequeñas descritas en el presente documento, agentes farmacéuticos, ligandos a un receptor, citocinas, quimiocinas, factores solubles, moléculas de adhesión u otras moléculas de señalización) tienen sobre una célula (por ejemplo, una célula eucariota). En algunas realizaciones, la señalización extracelular reduce la actividad de señalización, tal como la actividad de SMAD, altera la cinética de activación de SMAD o altera el patrón de expresión de genes diana de SMAD.

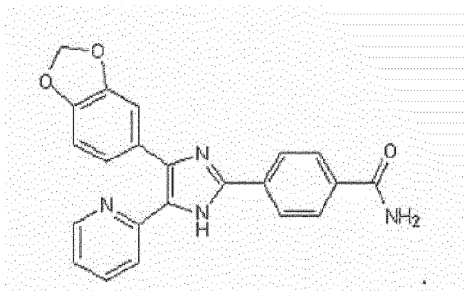
Como se usa en el presente documento, el término "Sma Mothers Against Decapentaplegic" o "Small Mothers Against Decapentaplegic" o "SMAD" se refiere a una molécula de señalización.

60 Como se usa en el presente documento, el término "activador" "que activa" se refiere a compuestos para activar moléculas que dan como resultado la diferenciación dirigida de células. Los activadores a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación: calor/frío nocivo, estimulación mecánica, estímulos químicos (mentol, piperina, capsaicina aguda, cinamaldehído, bradiquinina, ATP, prostaglandinas, citocinas inflamatorias, solución salina ácida, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), etc.).

65 Como se usa en el presente documento, el término "LSB" se refiere a una combinación de dos compuestos  $\underline{L}$ DN-

193189 y SB431542 capaces de reducir o bloquear la señalización que consiste en la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ)/Activina-Nodal y la señalización de Small Mothers Against Decapentaplegic (SMAD) en una célula.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "SB431542" se refiere a una molécula capaz de disminuir o bloquear el factor de crecimiento transformante beta (señalización de TGFβ/Activina-Nodal con un número CAS 301836-41-9, una fórmula molecular, de C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>, y un nombre de 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]-benzamida, por ejemplo, véase la estructura a continuación:

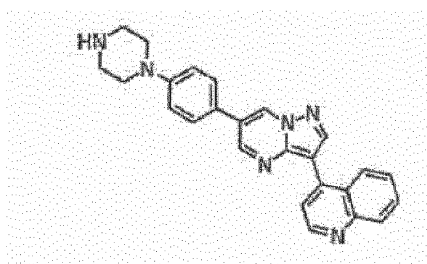


10

Como se usa en el presente documento, el término "LDN193189" se refiere a una molécula pequeña DM-3189, nombre IUPAC 4-(6-(4-(piperazin-1-il)fenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)quinolina, con una fórmula química de C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>, LDN193189 es capaz de funcionar como un inhibidor de señalización de SMAD. LDN193189 también es un inhibidor

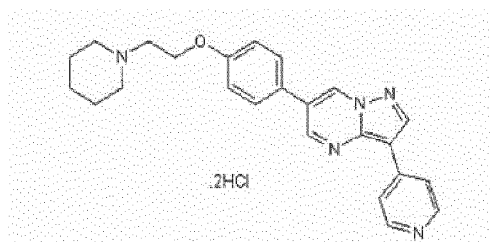
15

20



25

Como se usa en el presente documento, el término "dorsomorfina" se refiere a una molécula con un número CAS 866405-64-3, una fórmula molecular C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O y un nombre de diclorhidrato de 6-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]fenil]-3-(4-piridinil)-pirazolo[1,5-a]pirimidina, por ejemplo, véase la estructura a continuación.



30

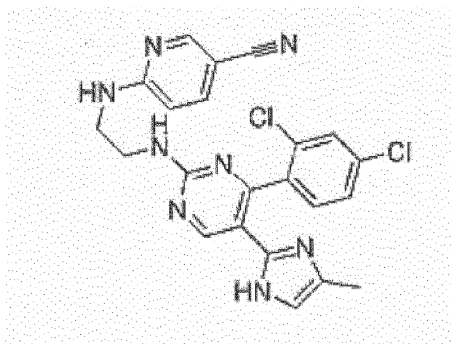
Como se usa en el presente documento, el término "LSB/C" o "LSB-C" se refiere a una combinación de dos compuestos, tales como LDN-193189 y SB431542, que son capaces de reducir o bloquear la señalización de manera consistente que consiste en la señalización de factor de crecimiento transformante beta (TGFβ/Activina-Nodal y señalización de Small Mothers Against Decapentaplegic (SMAD) de una célula, además de un inhibidor de la glucógeno sintasa cinasa 3β que actúa como un agonista de WNT, por ejemplo, CHIR99021.

35

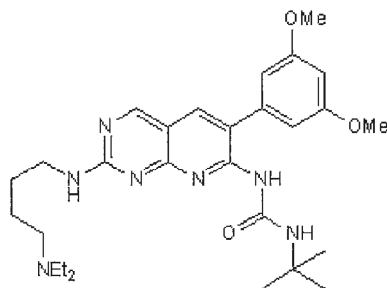
Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibidor de la glucógeno sintasa cinasa 3β" o "inhibidor de GSK3β" se refiere a un compuesto que inhibe una enzima glucógeno sintasa cinasa 3β, por ejemplo, véase, Doble, et al., J Cell Sci. 2003; 116: 1175-1186. Un inhibidor de GSK3β es capaz de activar una ruta de señalización WNT, véase, por ejemplo, Cadigan, et al., J Cell Sci. 2006; 119: 395-402; Kikuchi, et al., Cell Signaling. 2007; 19: 659-671.



Como se usa en el presente documento, el término "CHIR99021" o "aminopirimidina" o "3-[3-(2-carboxietil)-4-metilpirrol-2-metilidenil]-2-indolinona" se refiere al nombre de la IUPAC 6-(2-(4-(2,4-diclorofenil)-5-(4-metil-1H-imidazol-2-il)pirimidin-2-ilamino)etilamino)nicotinonitrilo, CT99021 es un ejemplo de un inhibidor químico de molécula pequeña de glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )/que activa una ruta de señalización WNT, y es altamente selectivo, mostrando una selectividad de casi mil veces contra un panel de cinasas relacionadas y no relacionadas, con una CI<sub>50</sub> = 6,7 nM contra GSK3 $\beta$  humano y valores de CI<sub>50</sub> nanomolares contra homólogos de roedores GSK3 $\beta$ .



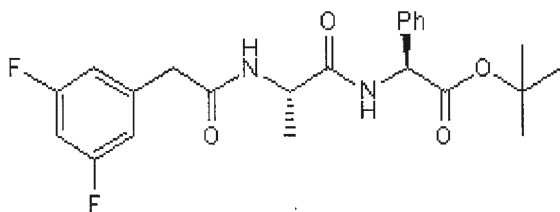
- 10 Como se usa en el presente documento, la expresión "los tres inhibidores" o "3i" se refiere a una combinación de tres moléculas pequeñas CHIR99021, SU5402 y DAPT. En otras realizaciones, los tres inhibidores se refieren a una combinación de tres compuestos (es decir, moléculas pequeñas) capaces de inhibición combinada de glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )/activador de señalización WNT (es decir, agonista de WNT), un inhibidor de señalización NOTCH, es decir, un inhibidor de  $\gamma$ -secretasa capaz de disminuir la señalización NOTCH y el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (es decir, un derivado de indolinona es un ejemplo de un inhibidor del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos).



- 20 Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibidor de Notch" o "inhibidor de señalización Notch" se refiere a cualquier compuesto que tenga la capacidad de inhibir la activación de Notch, tal como DAPT, un inhibidor de  $\gamma$ -secretasa (GSI), por ejemplo, un inhibidor de aldehído tripéptido, un inhibidor de  $\gamma$ -secretasa XII y un inhibidor peptidomimético (LY-411.575).
- 25 Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibidor de gamma secretasa" o "GSI" se refiere a una nueva clase de agentes que evitan la generación del dominio activo de una molécula de Notch que da como resultado la supresión de la señalización Notch cadena abajo.

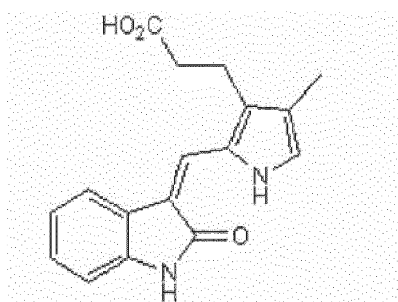
30 Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibidor de  $\gamma$ -secretasa" se refiere a un compuesto que tiene la capacidad de inhibir  $\gamma$ -secretasa, una proteasa transmembrana de múltiples subunidades. Un ejemplo de una diana (es decir, sustrato) para una  $\gamma$ -secretasa, por ejemplo, es la señalización Notch, otros sustratos de  $\gamma$ -secretasa incluyen proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL), E-cadherina y ErbB-4. Por lo tanto, un inhibidor de  $\gamma$ -secretasa, tal como DAPT, inhibidor de  $\gamma$ -secretasa XII, bloqueará la proteólisis de dichos sustratos de  $\gamma$ -secretasa incluyendo NOTCH.

35 Como se usa en el presente documento, el término "DAPT" se refiere a un ejemplo de un inhibidor de  $\gamma$ -secretasa que inhibe NOTCH, que se describe como un inhibidor dipeptídico específico de  $\gamma$ -secretasa, también conocido como N-[(3,5-difluorofenil)acetil]-L-alanil-2-fenil]glicina-1,1-dimetiletil éter; LY-374973, N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster; N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster; con una fórmula química de C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.



Un ejemplo de un derivado de DAPT es DAP-BpB (N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina-4-(4-(8-biotinamido)octilamino)benzoil)bencil)metilamida), un derivado de DAPT fotoactivable.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibidor del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos" o "inhibidor de FGFR" se refiere a una molécula pequeña tal como SU5402, PD 173074 y similares. Un ejemplo de un inhibidor de FGFR es el derivado de indolinona SU5402, estructura a modo de ejemplo que se muestra a continuación.

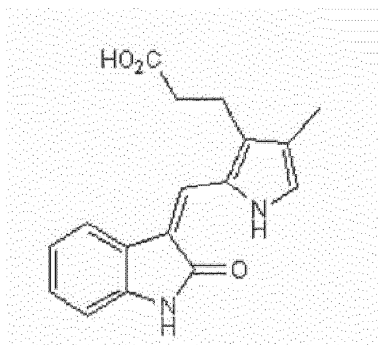


10 Como se usa en el presente documento, el término "SU5402" se refiere a una molécula pequeña con una fórmula química de  $C_{17}H_{16}N_2O_3$  y nombre químico: ácido 2-[(1,2-dihidro-2-oxo-3H-indol-3-ilideno)metil]-4-metil-1H-pirrol-3-propanoico (Sun et al (1999) Design, synthesis and evaluations of substituted 3-[(3- or 4-carboxyethylpyrrol-2-yl)methylidene]indolin-2-ones as inhibitors of VEGF, FGF and PDGF receptor tyrosine kinases. *J. Med. Chem.* 42 5120; Paterson et al (2004) Preclinical studies of fibroblast growth factor receptor 3 as a therapeutic target in multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 124 595; Tanaka et al (2005) FGF-induced vesicular release of sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature* 435:172).

20 Como se usa en el presente documento, el término "derivado" se refiere a un compuesto químico con una estructura central similar.

25 Como se usa en el presente documento, el término "WNT" o "Wingless" en referencia a un ligando se refiere a un grupo de proteínas secretadas (es decir, Int1 (integración 1) en seres humanos) capaces de interactuar con un receptor WNT, tal como un receptor en la familia de receptores Frizzled y LRPDerailed/RYK.

30 Como se usa en el presente documento, el término "WNT" o "Wingless" en referencia a una ruta de señalización se refiere a una ruta de señales compuesta por ligandos de la familia Wnt y receptores de la familia Wnt, tales como receptores Frizzled y LRPDerailed/RYK, mediados con o sin  $\beta$ -catenina. Para los fines descritos en el presente documento, una ruta de señalización WNT preferida incluye la mediación por  $\beta$ -catenina, es decir, WNT/ $\beta$ -catenina.



35 Como se usa en el presente documento, el término "PD 173074" se refiere a una molécula pequeña con un nombre químico: N-[2-[[4-(diethylamino)butil]amino]-6-(3,5-dimetoxifenil)pirido[2,3-d]pirimidin-7-il]-N'-(1,1-dimetiletil)urea. (Bansal et al (2003) Specific inhibitor of FGF receptor signaling: FGF-2-mediated effects on proliferation, differentiation,

and MAPK activation are inhibited by PD173074 in oligodendrocyte-lineage cells. *J. Neurosci. Res.* 74:486).

Como se usa en el presente documento, el término "LSB-3i" o "LSB3i" en referencia a una composición y un método de uso de esta composición se refiere a la combinación de moléculas de LSB (o equivalentes) capaces de producir células de linaje neuronal y las moléculas de 3i (o equivalentes) capaces de diferenciación dirigida de células de linaje neuronal como se usa en métodos a modo de ejemplo como se describe en el presente documento para la diferenciación dirigida de células de linaje neuronal que da como resultado nociceptores.

Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína morfógena ósea" o "BMP" se refiere a una proteína y al gen correspondiente que es miembro de una subfamilia de BMP, que según la homología de secuencia incluye GDF (factores de crecimiento/diferenciación), en una superfamilia TGF-beta de proteínas, (véase, por ejemplo, Yamashita, et al. (1996) *Bone* 19: 569). Los ejemplos de BMP incluyen, BMP1, BMP2, etc. Las BMP/GDF se agrupan en subconjuntos basados en la homología de secuencia de aminoácidos. Se sugiere que las agrupaciones sean 1) BMP-2 y BMP-4; 2) BMP-3 y BMP-3b; 3) BMP-5, BMP-6, BMP-7 y BMP-8; 4) BMP-9 y BMP-10; 5) BMP-12, BMP-13 y BMP-14; y 6) BMP-11 y GDF-8 (véase, por ejemplo, Yamashita, et al. (1996) *Bone* 19: 569, Hogan, (1996) *Genes Dev.* 10:1580, Mehler, et al. (1997) *Trends Neurosci.* 20:309, Ebendal, et al. (1998) *J. Neurosci. Res.* 51: 139). La superfamilia TGF Beta de ligandos incluye moléculas tales como proteínas morfógenas óseas (BMP), factores de crecimiento y diferenciación (GDF), hormona anti-mülleriana (AMH), Activina, Nodal, TGF $\beta$ , etc. La familia TGF beta incluye: TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3. Al igual que las BMP, las TGF beta están involucradas en la embriogénesis y la diferenciación celular, pero también están involucradas en la apoptosis, así como en otras funciones. Se unen al receptor de TGF-beta tipo-2 (TGFB2).

Como se usa en el presente documento, la expresión "receptor de proteína morfógena ósea" o "receptor de proteína morfógena ósea tipo II" o "BMP2R" se refiere a un receptor de serina/treonina cinasa que se une a una proteína morfógena ósea.

Como se usa en el presente documento, el término "LSB-Mel" se refiere a una composición y método de diferenciación dirigida que comprende el tratamiento con LSB/C de células seguido por contacto con BMP4 y endotelina-3 (EDN3) para producir células progenitoras de melanocitos (progenitoras de melanocitos), identificadas y aisladas basándose en marcadores específicos, es decir, expresión de c-kit.

Como se usa en el presente documento, la expresión "melanocito pigmentado maduro" se refiere a una célula pigmentaria que produce melanosomas pigmentados, por ejemplo, células progenitoras de melanocitos en contacto con BMP4 y cAMP.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula madre embrionaria" puede referirse a una célula primitiva (indiferenciada) que se deriva del embrión en fase previa a la implantación, capaz de dividirse sin diferenciarse durante un período prolongado en cultivo, y se sabe que se desarrolla en células y tejidos de las tres capas germinales primarias. Una célula madre embrionaria humana se refiere a una célula madre embrionaria que es humana.

Como se usa en el presente documento, la expresión "línea de células madre embrionarias" se refiere a una población de células madre embrionarias que se han cultivado en condiciones *in vitro* que permiten la proliferación sin diferenciación durante días, meses o años.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula madre" se refiere a una célula con la capacidad de dividirse durante períodos indefinidos en cultivo y dar lugar a células especializadas. Una célula madre humana se refiere a una célula madre que es humana.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula madre embrionaria humana" o "hESC" se refiere a un tipo de células madre pluripotentes derivadas de embriones humanos en fase temprana, hasta la fase de blastocisto, que es capaz de dividirse sin diferenciarse durante un período prolongado en cultivo, y se sabe que se desarrolla en células y tejidos de las tres capas germinales primarias.

Como se usa en el presente documento, el término "totipotente" se refiere a la capacidad de dar lugar a todos los tipos de células del cuerpo más todos los tipos de células que forman los tejidos extraembrionarios, tales como la placenta. (véase también Pluripotente y Multipotente).

Como se usa en el presente documento, el término "multipotente" se refiere a la capacidad de desarrollarse en más de un tipo de célula del cuerpo. Véase también pluripotente y totipotente.

Como se usa en el presente documento, el término "pluripotente" se refiere a la capacidad de desarrollarse en las tres capas germinales del organismo, que incluyen endodermo, mesodermo y ectodermo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula madre somática (adulto)" se refiere a una célula indiferenciada relativamente rara que se encuentra en muchos órganos y tejidos diferenciados con una capacidad limitada tanto para la autorrenovación (en el laboratorio) como para la diferenciación. Dichas células varían en su

capacidad de diferenciación, pero esta generalmente se limita a los tipos de células en el órgano de origen.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula somática" se refiere a cualquier célula en el cuerpo que no sean gametos (huevo o espermatozoides); a veces denominadas células "adultas".

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula del linaje neural" se refiere a una célula que contribuye al sistema nervioso (tanto central como periférico) o a los destinos de las células de la cresta neural durante el desarrollo o en el adulto. El sistema nervioso incluye el cerebro, la médula espinal y el sistema nervioso periférico. Los  
10 destinos de las células de la cresta neural incluyen craneal, tronco, vagal, sacro y cardíaco, dando lugar a mesectodermo, cartílago craneal, hueso craneal, timo, dientes, melanocitos, células pigmentarias del iris, ganglios craneales, ganglios de la raíz dorsal, ganglios simpáticos/parasimpáticos, células endocrinas, sistema nervioso entérico y partes del corazón.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula madre pluripotente inducida" o "iPSC" se refiere a un tipo de célula madre pluripotente, similar a una célula madre embrionaria, formada por la introducción de ciertos genes embrionarios (tales como transgenes OCT4, SOX2 y KLF4) (véase, por ejemplo, Takahashi y Yamanaka Cell 126, 663-676 (2006)) en una célula somática, por ejemplo, C14, C72 y similares.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula especializada" se refiere a un tipo de célula que realiza una función específica en organismos multicelulares. Por ejemplo, grupos de células especializadas, tales como las neuronas, trabajan juntas para formar un sistema, tal como un sistema nervioso.

25 Como se usa en el presente documento, el término "nociceptor" en referencia a una célula se refiere a una neurona capaz de un potencial de acción y que detecta un estímulo nocivo involucrado en la percepción del dolor. Los estímulos incluyen, pero sin limitación, térmicos (calor y frío), mecánicos, químicos e inflamación. Los nociceptores son células que expresan genes y proteínas específicos, tales como BRN3A, ISL1, TAC1, VGLUT2, SLC15A3, y comprenden una morfología descrita como dos prolongaciones distintas con un cuerpo celular a lo largo de una estructura similar a un axón. Un "nociceptor funcional" en referencia a una célula se refiere a una célula resultante de la diferenciación dirigida  
30 caracterizada por la expresión de genes y proteínas como se describe en el presente documento, la morfología como se describe en el presente documento y capaz de producir un potencial de acción como se describe en el presente documento.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "neurona peptidérgica" en general se refiere a una neurona identificada por expresión de una clase distinta de canales iónicos e identificada por expresión de péptidos pequeños tales como taquicinas. Por ejemplo, un nociceptor peptidérgico expresa NTRK1 y la sustancia de taquicina P.

En contraste con una neurona "no peptidérgica" se refiere a una neurona que no expresa NTRK1 o sustancia P.

40 Como se usa en el presente documento, el término "neuroectodermo" se refiere a una célula o destino celular que se encuentra temprano en el desarrollo o durante la diferenciación de células madre pluripotentes que puede dar lugar a células del linaje neural.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "marcadores de proliferación celular" se refiere a la expresión de moléculas asociadas con células de ciclo rápido que normalmente no están presentes en células maduras de ciclo lento o que no se reciclan, es decir, que se dividen activamente frente a células con tiempos de ciclo prolongados o células que no se reciclan. Los ejemplos de dichos marcadores incluyen un marcador Ki67 de proliferación celular (Gerdes, et al., Int J Cancer 31: 13-20 (1983)) y marcadores de fosfohistona H3 de fases G2/M de mitosis (Hendzel, et al., Chromosoma 106: 348-360 (1997)).

50 Como se usa en el presente documento, el término "proliferación" se refiere a un aumento en el número de células.

55 Como se usa en el presente documento, el término "diferenciación" se refiere a un proceso mediante el cual una célula embrionaria no especializada adquiere las características de una célula especializada, tal como una célula cardíaca, hepática o muscular. La diferenciación está controlada por la interacción de los genes de una célula con las condiciones físicas y químicas fuera de la célula, generalmente a través de rutas de señalización que involucran proteínas incrustadas en la superficie celular.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "diferenciación dirigida" se refiere a una manipulación de las condiciones de cultivo de células madre para inducir la diferenciación en un tipo de célula particular (por ejemplo, deseado), tales como las células nociceptoras.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "diferenciación dirigida" en referencia a una célula madre se refiere al uso de moléculas pequeñas, proteínas del factor de crecimiento y otras condiciones de crecimiento para promover la transición de una célula madre del estado pluripotente a un destino celular más maduro o especializado (por ejemplo, célula del sistema nervioso central, célula neural, nociceptor, etc.).

- Como se usa en el presente documento, la expresión "inducir diferenciación" en referencia a una célula se refiere a cambiar el tipo de célula predeterminado (genotipo y/o fenotipo) a un tipo de célula no predeterminado (genotipo y/o fenotipo). Por lo tanto, "inducir diferenciación en una célula madre" se refiere a inducir a la célula a dividirse en células de progenie con características que son diferentes de la célula madre, tales como el genotipo (es decir, el cambio en la expresión génica según lo determinado por análisis genético como una micromatriz) y/o el fenotipo (es decir, cambio en la expresión de una proteína, tal como PAX6 o un conjunto de proteínas, tales como positivas para HMB45 (+) mientras que son negativas (-) para SOX10.
- Como se usa en el presente documento, el término "transdiferenciación" se refiere a un proceso mediante el cual las células madre o maduras de un tejido se diferencian en células de otro tejido.
- Como se usa en el presente documento, el término "indiferenciada" se refiere a una célula que aún no se ha desarrollado en un tipo de célula especializada.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "diferenciación celular" se refiere a una ruta por la cual una célula menos especializada (es decir, una célula madre) se desarrolla o madura para poseer una forma y función más distintas (por ejemplo, una iPSC que progresa en un progenitor de cresta neural para una célula de linaje neuronal a una célula de la cresta neural, a una neurona, a una célula nociceptora a un nociceptor peptidérgico o al neuroectodermo a una célula del sistema nervioso central).
- Como se usa en el presente documento, el término "diferenciación" como se usa con respecto a las células en un sistema de células que se diferencian se refiere al proceso mediante el cual las células se diferencian de un tipo de célula (por ejemplo, una célula diferenciable multipotente, totipotente o pluripotente) a otro tipo de célula tal como una célula diferenciada diana.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "predeterminada" o "pasiva" en referencia a una ruta de diferenciación celular se refiere a una ruta donde una célula menos especializada se convierte en un cierto tipo de célula diferenciada en cultivo, cuando no se trata con ciertos compuestos, es decir, condiciones normales de cultivo celular. En otras palabras, se produce una célula predeterminada cuando una célula no entra en contacto con una molécula capaz de cambiar el tipo de célula diferenciada (es decir, un morfógeno), por ejemplo, una célula Nestina+ TUJ1. Por el contrario, "no predeterminada" en referencia a una célula se refiere a un tipo de célula diferenciada que da como resultado un tipo de célula que es diferente de una célula predeterminada, es decir, una célula no predeterminada es un tipo de célula diferenciada resultante de condiciones no predeterminadas, tal como una célula, que incluye una célula neuronal TUJ1+Nestina, una célula neuronal sensorial, un nociceptor peptidérgico, un melanocito, etc. Una célula predeterminada también puede ser una célula predeterminada después de que una célula ha contactado con un morfógeno para convertirse en una célula no predeterminada sin un compuesto morfógeno posterior, tal como una célula TUJ1+ Nestina no predeterminada que posteriormente se convierte en un nociceptor no peptidérgico predeterminado.
- Como se usa en el presente documento, el término "destino" en referencia a una célula, tal como "determinación del destino celular" en general, se refiere a una célula con un linaje genéticamente determinado cuyas células de progenie son capaces de convertirse en varios tipos de células o unos pocos tipos de células específicas dependiendo de las condiciones de cultivo *in vivo* o *in vitro*. En otras palabras, el destino predeterminado de una célula está determinado por su entorno para estar destinado a una ruta de diferenciación particular de tal manera que una célula se convierta en un tipo de célula en lugar de otro tipo de célula, por ejemplo, las células de progenie de una célula madre cuyo "destino neural" es convertirse en una célula nerviosa en lugar de una célula muscular o una célula de la piel. Normalmente, el "destino" de una célula es irreversible, excepto en condiciones muy específicas. En otro ejemplo, un "destino del SNC" se refiere a una célula capaz de convertirse en una célula asociada con el sistema nervioso central. Por el contrario, una célula destinada a convertirse en una célula neural se puede llamar una "célula progenitora neural".
- Como se usa en el presente documento, la expresión "crecimiento de neuritas" se refiere a la observación de protuberancias de citoplasma alargadas, encerradas en la membrana, de las células.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "neurona de dopamina" o "neurona dopaminérgica" en general se refiere a una célula capaz de expresar dopamina. Las "neuronas de dopamina del mesencéfalo" o "mDA" se refieren a presuntas células que expresan dopamina en las estructuras del prosencéfalo y las células que expresan dopamina en las estructuras del prosencéfalo.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "célula madre neural" se refiere a una célula madre que se encuentra en el tejido neural adulto que puede dar lugar a neuronas y células gliales (de soporte). Los ejemplos de células gliales incluyen astrocitos y oligodendrocitos.
- Como se usa en el presente documento, el término "neurona" se refiere a una célula nerviosa, las principales unidades funcionales del sistema nervioso. Una neurona consiste en un cuerpo celular y sus prolongaciones: un axón y una o más dendritas. Las neuronas transmiten información a otras neuronas o células mediante la liberación de

neurotransmisores en las sinapsis.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cultivo celular" se refiere a un crecimiento de células *in vitro* en un medio artificial para investigación o tratamiento médico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "medio de cultivo" se refiere a un líquido que cubre las células en un recipiente de cultivo, tal como una placa de Petri, una placa de pocillos múltiples y similares, y contiene nutrientes para nutrir y soportar las células. El medio de cultivo también puede incluir factores de crecimiento añadidos para producir los cambios deseados en las células.

Como se usa en el presente documento, la expresión "capa alimentadora" se refiere a una célula usada en cocultivo para mantener células madre pluripotentes. Para el cultivo de células madre embrionarias humanas, las capas alimentadoras típicas incluyen fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) o fibroblastos embrionarios humanos que han sido tratados para evitar que se dividan en cultivo.

Como se usa en el presente documento, el término "pase" en referencia a un cultivo celular, se refiere al proceso en el que las células se disocian, lavan y siembran en nuevos recipientes de cultivo después de una ronda de crecimiento y proliferación celular. El número de pases por los que ha pasado una línea de células cultivadas es una indicación de su edad y estabilidad esperada.

Como se usa en el presente documento, el término "expresar" en relación con un gen o proteína se refiere a hacer un ARNm o proteína que se puede observar usando ensayos tales como ensayos de micromatrices, ensayos de tinción de anticuerpos y similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión "gen de caja emparejada 6" o "PAX6" se refiere a un marcador de una célula neuroprogenitora no predeterminada.

Como se usa en el presente documento, el término "TUJ1" o "beta-tubulina de clase III específica de neurona" en referencia a una célula diferenciadora se refiere a un marcador de diferenciación celular neural humana temprana, tal como células progenitoras neurales, y se encuentra expresado en neuronas del SNP y el SNC.

Como se usa en el presente documento, el término "nestina" en referencia a una célula diferenciadora se refiere a una proteína asociada a filamentos intermedios que es un marcador de células madre de cresta neural y células madre neurales del SNC.

Como se usa en el presente documento, el término "homodímero" en referencia a una molécula SMAD se refiere al menos a dos moléculas de SMAD unidas entre sí, tal como por enlaces disulfuro.

Como se usa en el presente documento, el término "EDN3" se refiere a un péptido secretado de la familia endotelina de proteínas derivadas del endotelio que se une al receptor de la superficie celular EDNRB que se encuentra comúnmente en linajes celulares derivados de la cresta neural, tales como las células madre de melanocitos gliales bipotentes. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de EDN3 es: endotelina 3 en el N° de acceso NP\_000105; Acceso PI14138 (EDN3\_HUMAN) (SEQ ID NO: 1):

```
MEPGLWLLFGLTVTSAAGFVPCSQSGDAGRRGVSQAPTAARSEGDCEETVAGPGEE
TVAGPGEGTVAPTALQGPSPGSPGQEQA AEGAPEHHRSRRTCFTYKDKECVYYCH
LDIIWINTPEQTVPYGLSNYRGSFRGKRSAGPLPGNLQLSHRPHLRCACVGRYDKAC
LHFCTQTLDVSSNSRTAEKTDKEEEGKVEVKDQQSKQALDLHHPKLMPGSGLALAP
STCPRCLFQEGAP.
```

Como se usa en el presente documento, el término "Nogina" se refiere a una glucoproteína homodimérica secretada que se une a e inactiva miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) de proteínas de señalización, tales como la proteína morfógena ósea-4 (BMP4).

La nogina es normalmente una proteína de 65 kDa expresada en las células humanas como un dímero glucosilado, unido por disulfuro. (Groppe, et al., (2002). Nature 420, 636-642; Xu, et al., (2005) Nat Methods 2.185-190; Wang, et al., (2005) Biochem Biophys Res Commun 330:934-942). Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de Nogina es: N° de acceso U79163 Nogina de ratón con un solo aminoácido (SEQ ID NO: 2):

MERCPSLGVTLYALVVVLGLRAAPAGGQHYLHIRPAPSDNPLVDFTLIEHPDPI FDP

KEKDLNETLLRSLLGGHYDPGFMATSPPEDRPGGGGGPAGGAEDLAELFTDQLLRQ  
 RPSGAMPSEIKGLEFSEGLAQGKKQRLSKKLRRLQMWLWSQTFCPVLVAWNDFTL  
 GSRFWPRYVKVGSCFSKRSCSVPEGMVCKPSKSVHLTVLRWRCQRRGGQRCGWIP  
 QYFTPII SECKCSC.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "Lefty" se refiere a un miembro novedoso de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta que inhibe el TGF-beta, incluyendo, pero sin limitación, LEFTY1, LEFTY2, LEFTYA, etc., también conocidos como "EBAF" o "factor asociado a hemorragia endometrial" o "determinación izquierda-derecha, factor A". Se requiere una proteína Lefty para la determinación de la asimetría izquierda-derecha de los sistemas de órganos en mamíferos.
- 10 Como se usa en el presente documento, el término "activina" se refiere a un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), tal como la Activina A, Activina B, etc.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "factor de crecimiento transformante beta" o "TGF- $\beta$ " se refiere a una citocina que regula el crecimiento y la diferenciación de diversos tipos de células.
- 15 Como se usa en el presente documento, el término "nodal" se refiere a un miembro de la familia de TGF- $\beta$  de moléculas de señalización. La señalización nodal inhibe la diferenciación de las células madre embrionarias humanas a lo largo de la ruta neuroectodérmica predeterminada (Vallier, et al., Dev. Biol. 275, 403-421).
- 20 Como se usa en el presente documento, el término "ALK" o "linfoma anaplásico cinasa" o "tirosina cinasa del receptor de linfoma anaplásico" o "Ki-1" se refiere a un receptor de tirosina cinasa asociado a la membrana.
- 25 Como se usa en el presente documento, el término "ALK5" en referencia a un receptor de serina/treonina cinasa tipo I se refiere a un receptor de tirosina cinasa 5 del receptor de linfoma anaplásico que se une a TGF- $\beta$ 1 para funcionar como un receptor de TGF- $\beta$ 1.
- Como se usa en el presente documento, el término "ALK7" en referencia a un receptor de serina/treonina cinasa de tipo I se refiere a un receptor de tirosina cinasa 7 del receptor de linfoma anaplásico que se une a proteínas nodales y relacionadas con nodales para funcionar como un receptor de proteínas nodales y relacionadas con nodales.
- 30 Como se usa en el presente documento, la expresión "poner en contacto" las células con un compuesto se refiere a colocar el compuesto en una ubicación que le permita tocar la célula para producir células "en contacto". El contacto puede llevarse a cabo usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, en una realización, el contacto es mediante la adición del compuesto a un tubo de células. El contacto también se puede lograr añadiendo el compuesto a un cultivo de las células.
- 35 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula unida" se refiere a una célula que crece *in vitro* en la que la célula se adhiere al fondo o al costado del recipiente de cultivo, una célula unida puede contactar con el recipiente a través de moléculas de matriz extracelular y similares y requiere el uso de una enzima para separar esta célula de la placa/recipiente de cultivo, es decir, tripsina, dispasa, etc. A diferencia de una célula en un cultivo en suspensión que no está unida y no requiere el uso de una enzima para eliminar células del recipiente de cultivo.
- 40 Como se usa en el presente documento, el término "marcador" o "marcador celular" se refiere a un gen o proteína que identifica una célula o tipo de célula particular. Un marcador para una célula no puede limitarse a un marcador, los marcadores pueden referirse a un "patrón" de marcadores de modo que un grupo designado de marcadores pueda identificar una célula o tipo de célula de otra célula o tipo de célula. Por ejemplo, las células nociceptoras expresan uno o más marcadores que distinguen una célula nociceptora de una célula precursora menos diferenciada, es decir, nociceptor positivo para TUJ1 positivo y negativo para Nestina, de una célula no nociceptora o célula precursora, es decir, célula negativa para TUJ1 y positiva de Nestina.
- 45 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula positiva" en relación con una tinción se refiere a una célula que expresa un marcador y, por lo tanto, "tiñe" ese marcador en una cantidad cuantitativa y/o cualitativa detectable por encima de una célula de control o comparativa. Una célula positiva también puede referirse a una célula que tiñe una molécula tal como Nestina, etcétera.
- 50

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula negativa", se refiere a una célula sin señal detectable para un marcador, tal como una célula que no se tiñe después del contacto con un método de detección de anticuerpos Nestina, etcétera.

5 Como se usa en el presente documento, el término "DAPI" se refiere a una tinción fluorescente de 4',6-diamidino-2-fenilindol.2 HCl. Los métodos de tinción de fluorescencia DAPI son bien conocidos, como uno de los numerosos ejemplos, véase, DAPI Nucleic Acid Stain, 2006, Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregón, 97402, EE. UU.

10 Como se usan en el presente documento, las expresiones "gen informador" o "construcción informadora" se refieren a construcciones genéticas que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína que es fácilmente detectable o fácilmente analizable, tal como una proteína coloreada, proteína fluorescente tal como GFP o una enzima tal como beta-galactosidasa (gen *lacZ*).

15 Como se usa en el presente documento, el término "GFP" se refiere a cualquier secuencia de ADN de proteína fluorescente verde capaz de producir una proteína fluorescente tras la expresión en una célula que se usa normalmente como un marcador de indicación para la expresión de un gen diana. Los ejemplos de GFP incluyen secuencias de GFP aisladas de celentéreos, tales como la medusa del Pacífico, *Aequoria victoria*, y sus derivados de secuencia sintética, tales como "eGFP".

20 El término "muestra" se usa en su sentido más amplio. En un sentido, puede referirse a una célula o tejido. En otro sentido, está destinado a incluir una muestra o cultivo obtenido de cualquier fuente y abarcar fluidos, sólidos y tejidos. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como materia superficial, suelo, agua y muestras industriales. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de los tipos de muestra aplicables.

25 Los términos "purificada", "purificar", "purificación", "aislada", "aislar", "aislamiento", y sus equivalentes gramaticales, como se usan en el presente documento, se refieren a la reducción en la cantidad de al menos un contaminante de una muestra. Por ejemplo, un tipo de célula deseado se purifica en al menos un 10 %, preferentemente, en al menos un 30 %, más preferentemente en al menos un 50%, aún más preferentemente en al menos un 75 %, y de la manera más preferente en al menos un 90 %, con una reducción correspondiente en la cantidad de tipos de células indeseables, tales como las células neuronales diferenciadas aisladas de las células no neuronales. En otras palabras, "purificar" y sus equivalentes, se refiere a la eliminación de determinadas células (por ejemplo, células indeseables) de una muestra. Por ejemplo, para proporcionar una población purificada de células neuronales TUJ1+, las células neuronales Nestina+ TUJ1+ se purifican mediante la eliminación de las células neuronales Nestina+ TUJ1

30 contaminantes clasificando una población celular mixta en células NTRK1+ y NTRK1- mediante citometría de flujo, como se describe en el presente documento; las células neuronales nociceptoras también se purifican o "seleccionan" de las células no nociceptoras (células predeterminadas) usando un método específico de cultivo celular que comprende composiciones y métodos. La eliminación o selección de células no nociceptoras da como resultado un aumento en el porcentaje de células nociceptoras deseadas en la muestra.

40 Por lo tanto, la purificación de un tipo de célula da como resultado un "enriquecimiento", es decir, un aumento en la cantidad de la célula deseada, es decir, nociceptores en la muestra.

45 La expresión "de origen natural" como se usa en el presente documento cuando se aplica a un objeto (tal como célula, tejido, etc.) y/o producto químico (tal como una proteína, secuencia de aminoácidos, secuencia de ácido nucleico, codón, etc.) significa que el objeto y/o compuesto son/fueron encontrados en la naturaleza. Por ejemplo, una célula de origen natural se refiere a una célula que está presente en un organismo que puede aislarse de una fuente en la naturaleza, tal como una célula embrionaria, en la que la célula no ha sido modificada intencionadamente por el hombre en el laboratorio.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión, "*in vitro*" se refiere a un entorno artificial y a procesos o reacciones que ocurren dentro de un entorno artificial. Los entornos *in vitro* ejemplifican, pero sin limitación, tubos de ensayo y cultivos celulares.

55 Como se usa en el presente documento, la expresión, "*in vivo*" se refiere al entorno natural (por ejemplo, un animal o una célula) y a procesos o reacciones que ocurren dentro de un entorno natural, tal como el desarrollo embrionario, la diferenciación celular, la formación del tubo neural, etc.

60 La expresión "derivada de" o "establecida de" o "diferenciada de" cuando se hace en referencia a cualquier célula desvelada en el presente documento se refiere a una célula que se obtuvo de (por ejemplo, aislada, purificada, etc.) una célula progenitora en una línea celular, tejidos o fluidos usando cualquier manipulación, tal como, sin limitación, aislamiento de células individuales, cultivo *in vivo*, tratamiento y/o mutagénesis usando, por ejemplo, proteínas, productos químicos, radiación, infección con virus, transfección con secuencias de ADN, tal como con un morfógeno, etc., selección (tal como por cultivo en serie) de cualquier célula contenida en células madre cultivadas. Se puede seleccionar una célula derivada de una población mixta en virtud de la respuesta a un factor de crecimiento, citocina, progresión seleccionada de tratamientos con citocinas, adhesividad, falta de adhesividad, procedimiento de

65



clasificación y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "célula" se refiere a una sola célula, así como a una población de (es decir, más de una) células. La población puede ser una población pura que comprende un tipo de célula, tal como una población de células neuronales o una población de células embrionarias indiferenciadas. Como alternativa, la población puede comprender más de un tipo de células, por ejemplo, una población celular mixta. No pretende limitar el número de células en una población, por ejemplo, una población mixta de células puede comprender al menos una célula diferenciada. En una realización, una población mixta puede comprender al menos una diferenciada. No hay límite en el número de tipos de células que puede comprender una población celular.

Como se usa en el presente documento, la expresión "población altamente enriquecida" se refiere a una población de células, tal como una población de células en una placa de cultivo, que expresa un marcador en un porcentaje o cantidad mayor que una población de comparación, por ejemplo, tratar un cultivo celular en contacto con LSB en el día 2 con CHIR/SU o CHIR/DAPT da como resultado una población altamente enriquecida en comparación con el tratamiento con SU/DAPT.

La expresión, "biología de la célula" o "biología celular" se refiere al estudio de una célula viva, tal como la anatomía y la función de una célula, por ejemplo, las propiedades fisiológicas, la estructura, los orgánulos de la célula y las interacciones con su entorno, su ciclo de vida, división y muerte.

La expresión "secuencia de nucleótidos de interés" se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos (por ejemplo, ARN o ADN), cuya manipulación puede considerarse deseable por cualquier motivo (por ejemplo, tratar una enfermedad, conferir cualidades mejoradas, expresión de una proteína de interés en una célula huésped, expresión de una ribozima, etc.), por un experto en la materia. Dichas secuencias de nucleótidos incluyen, pero sin limitación, secuencias codificantes de genes estructurales (por ejemplo, genes informadores, genes marcadores de selección, oncogenes, genes de resistencia a fármacos, factores de crecimiento, etc.) y secuencias reguladoras no codificantes que no codifican un ARNm o producto proteico (por ejemplo, secuencia promotora, secuencia de poliadenilación, secuencia de terminación, secuencia potenciadora, etc.).

Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína de interés" se refiere a una proteína codificada por un ácido nucleico de interés.

El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que comprende secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido o precursor (por ejemplo, proinsulina). El polipéptido puede estar codificado por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier parte de la secuencia codificante siempre que la actividad o las propiedades funcionales deseadas (por ejemplo, actividad enzimática, unión a ligandos, transducción de señales, etc.) de la longitud completa o el fragmento sean conservadas. El término también abarca la región codificante de un gen estructural e incluye secuencias ubicadas adyacentes a la región codificante en los extremos 5' y 3' para una distancia de aproximadamente 1 kb o más en cada extremo, de modo que el gen corresponda a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias que están ubicadas en 5' de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias no traducidas 5'. Las secuencias que están ubicadas en 3' o cadena abajo de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias no traducidas 3'. El término "gen" abarca tanto el ADNc como las formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida con secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones intermedias" o "secuencias intermedias". Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en ARN nuclear (ARNnh); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se eliminan o "se cortan y empalman" del transcrito nuclear o primario; por lo tanto, los intrones están ausentes en la transcripción del ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia o el orden de los aminoácidos en un polipéptido naciente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "expresión génica" se refiere al proceso de convertir información genética codificada en un gen en ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt o ARNnp) a través de la "transcripción" del gen (es decir, a través de la acción enzimática de una ARN polimerasa), y para genes que codifican proteínas, en proteínas a través de la "traducción" de ARNm. La expresión génica se puede regular en muchas fases en el proceso. "Regulación positiva" o "activación" se refiere a la regulación que aumenta la producción de productos de expresión génica (es decir, ARN o proteína), mientras que "regulación negativa" o "represión" se refiere a la regulación que disminuye la producción. Las moléculas (por ejemplo, factores de transcripción) que están involucradas en la regulación positiva o negativa a menudo se denominan "activadores" y "represores", respectivamente.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "codificación de molécula de ácido nucleico", "codificación de secuencia de ADN", "codificación de ADN", "codificación de secuencia de ARN", y "codificación de ARN" se refieren al orden o secuencia de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos a lo largo de una cadena de ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico. El orden de estos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos determina el orden de los aminoácidos a lo largo de la cadena de polipéptidos (proteínas). La secuencia de ADN o ARN codifica así la secuencia de aminoácidos.

El término "aislado" cuando se usa en relación con un ácido nucleico, como en "un oligonucleótido aislado" o "polinucleótido aislado" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos un componente o contaminante con el que se asocia habitualmente en su fuente natural. El ácido nucleico aislado está presente en una forma o situación diferente de aquella en que se encuentra en la naturaleza. Por el contrario, los ácidos nucleicos no aislados como ácidos nucleicos tales como ADN y ARN se encuentran en el estado en que existen en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de ADN dada (por ejemplo, un gen) se encuentra en el cromosoma de la célula huésped cerca de genes vecinos; las secuencias de ARN, tales como una secuencia de ARNm específica que codifica una proteína específica, se encuentran en la célula como una mezcla con otros numerosos ARNm que codifican una multitud de proteínas. Sin embargo, el ácido nucleico aislado que codifica una proteína dada incluye, a modo de ejemplo, dicho ácido nucleico en las células que normalmente expresan la proteína dada donde el ácido nucleico se encuentra en una ubicación cromosómica diferente de la de las células naturales, o está flanqueado por una secuencia de ácido nucleico diferente de la encontrada en la naturaleza. El ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado puede estar presente en forma monocatenaria o bicatenaria. Cuando se va a utilizar un ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado para expresar una proteína, el oligonucleótido o polinucleótido contendrá como mínimo la cadena sentido o codificante (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser monocatenario), pero puede contener ambas cadenas sentido y antisentido (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser bicatenario).

Como se usa en el presente documento, el término "melanocito" en referencia a una célula en general se refiere a una célula derivada de PSC, que incluye un melanocito temprano, que expresa un grupo de marcadores que incluyen Sox10, HMB45, c-kit, factor de transcripción de melanocitos esencial MITF-M o MITFM, una isoforma del factor de transcripción asociado con microftalmia (MITF), un miembro de la familia básica del factor de transcripción de cremallera de leucina hélice-bucle-hélice expresado en melanocitos), tirosinasa (TYR), proteína 1 relacionada con tirosinasa (TYR-1), proteína-2 relacionada con TYR/dopacromo-tautomerasa (DCT), etc., que contiene premelanosomas y/o melanosomas, con o sin pigmento obvio (como se observa a simple vista o por microscopía). Los melanocitos maduros suelen contener melanosomas pigmentados, son positivos para tirosinasa y expresan proteínas de melanocitos tales como la proteína 1 relacionada con tirosinasa (TRP1), etc.

Como se usa en el presente documento, el término "melanocitos tempranos" o "melanoblastos" o "precursores de melanocitos" o "progenitores de melanocitos" en referencia a una célula se refiere a una célula que coexpresa Sox10::GFP y MITF, y c-kit, que es capaz de una mayor diferenciación en un melanocito maduro. En una realización, Sox10::GFP es un marcador para presuntos precursores de melanocitos. En otra realización, c-kit es un marcador para presuntos precursores de melanocitos. En una realización adicional, las células doble positivas para Sox10::GFP/c-kit son presuntas células precursoras de melanocitos.

Como se usa en el presente documento, el término "HMB45+" en referencia a una célula se refiere a una célula que expresa una glucoproteína premelanosómica, es decir, Pmel17 humana, Theos, et al., Pigment Cell Res. 2005. 18(5):322-36), tal como el melanocito (en fase) temprano (es decir, un melanocito inmaduro), una célula capaz de diferenciarse en una célula pigmentada del epitelio pigmentario de la retina, melanocitos maduros que contienen melanosomas inmaduros y similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión "modelización de enfermedad" se refiere al proceso de usar un organismo experimental o cultivos celulares *in vitro* para imitar signos o síntomas específicos observados en seres humanos como resultado de un trastorno. En una realización, las células madre pluripotentes humanas derivadas de una persona con una mutación genética que da como resultado un trastorno neurológico se pueden cultivar y diferenciar en células neurales que albergan un defecto similar observado dentro de la persona.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1- Esquema de diferenciación de LSB3i a modo de ejemplo - Una realización preferida del método. Cuando se indujo la inhibición dual de SMAD usando LDN-193189 y SB431542 (LSB), se observó una diferenciación neuronal óptima cuando se añadieron CHIR99021, SU5402 y DAPT (3i) en el día dos de diferenciación. A partir del día 4, se añadieron medios N2 en incrementos crecientes del 25 % en los días subsiguientes reemplazando KSR. Las hESC se siembran en placas como una monocapa de una sola célula sin el uso de una capa alimentadora del estroma. Durante los primeros cinco días, la inhibición combinada de BMP (ejemplificada por LDN193189) y TGF/Nodal/Activina (ejemplificada por SB431542) (LSB) se usa para restringir y promover la diferenciación neural. Tres inhibidores adicionales (ejemplificados por CHIR99021, DAPT, SU5402; denominados colectivamente 3i) se aplican 48 horas después de la inducción inicial. La inclusión o exclusión de LDN193189 de los días 5 a 10 no marca una diferencia en la diferenciación. En resumen, las células se alimentan diariamente, y los medios realizan la transición de KSR a N2 para soportar la población de células neurales emergentes. --- + L --- representa cultivos duplicados en los que se añadió LDN desde los días 5 al 10.

Figura 2 - Eficiencia a modo de ejemplo de LSB3i - Demuestra que una realización preferida del uso combinado del tratamiento con LSB y 3i promueve eficientemente la generación de una población celular similar a la neuronal en comparación con el tratamiento con LSB solo (A, B) Al teñir para TUJ1, un marcador de neuronas, se observa un número mucho mayor de células positivas cuando se añade 3i (CHIR99021, DAPT, SU5402) 48 horas después

del tratamiento de hPSC en comparación con LSB solo, que mostró una gran cantidad de células PAX6 verdes/oscuras con unas pocas células TUJ1+ (rojas/claras). (C, D) Las células se volvieron a detectar y se usó la expresión de Ki67 (células rosadas/claras) para cuantificar el número de células en el ciclo celular. Indicativo de neuronas post-mitóticas, se observan casi 3 veces menos células Ki67(+) cuando se añade 3i en comparación con LSB solo. La comparación de la expresión de Ki67 (células rosadas/claras) y (E, F) fosfohistona H3 (PPH3) (células rojas/claras) en LSB (E) y LSB3i (F) tratadas con hPSC indicó un marcado descenso en la proliferación en el día 12. (G) Se usó FACS intracelular para medir el número de progenitores (células positivas para Nestina; barra gris) frente a neuronas (células positivas para TUJ1; barra blanca). A diferencia del tratamiento con LSB solo donde aproximadamente el 5 % de las células son positivas para TUJ1, más del 75 % de las células son positivas para TUJ1 cuando se añade 3i. Cuando se añadieron uno o dos de los tres inhibidores en comparación con una realización preferida de la composición 3i, no se alcanza el mismo nivel de células TUJ1. Sin embargo, el tratamiento de las células LSB con CHIR (C) además de SU5402 o DAPT logrará más del 53 % de neuronas, lo que indica un requisito de CHIR, un inhibidor de la glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )/activador de la señalización WNT (es decir, agonista de WNT) en combinación con al menos un inhibidor seleccionado de un inhibidor de  $\gamma$ -secretasa y un inhibidor del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, en la formación de neuronas TUJ1+. La barra de escala para (A, B) representa 200  $\mu$ m y (C, D) representa 100  $\mu$ m.

Figura 3 - Las neuronas LSB3i a modo de ejemplo eran nociceptores - Demuestra que una realización preferida del uso combinado del tratamiento con LSB y 3i promueve eficientemente la generación de nociceptores en comparación con el tratamiento con LSB solo. Las neuronas positivas para TUJ1 del uso combinado del tratamiento con LSB y 3i expresan (A) ISL1, (B) BRN3A, (C) RET y (D) RUNX1 medidas por inmunofluorescencia el día 12. (E) Más del 61 % de las células expresa NTRK1 el día 10 mientras que las hiPSC tratadas con LSB3i forman neuronas con una eficiencia moderada medida por FACS. Estos resultados tomados en conjunto indican que la gran mayoría de las neuronas generadas mediante el uso combinado de LSB y el tratamiento con 3i son nociceptores. La barra de escala representa 100  $\mu$ m.

Figura 4 - Se indujeron células iPS a modo de ejemplo a nociceptores usando LSB3i - Se observan neuronas similares a las mostradas en la figura 3 cuando las líneas de hiPSC (por ejemplo, C14) se tratan con LSB3i. Demuestra que una realización preferida del uso combinado del tratamiento con LSB y 3i promueve eficientemente la generación de un nociceptor en comparación con el tratamiento con LSB solo de las poblaciones de hiPSC. Las neuronas positivas para TUJ1 de una realización preferida del uso combinado de tratamiento con LSB y 3i de una línea de hiPSC (C14) expresan (A) ISL1, (B) BRN3A, (C) RET y (D) RUNX1 medidas por inmunofluorescencia el día 12. Dos líneas diferentes de hiPSC (C14 y C72) también pueden generar nociceptores. (E) Se usó FACS intracelular para medir el número de progenitores (células positivas para Nestina; barra gris) frente a neuronas (células positivas para TUJ1; barra blanca) para los tratamientos mostrados. La barra de escala representa 100  $\mu$ m.

Figura 5- Expresión a modo de ejemplo de SOX10 - Demuestra que una realización preferida del uso combinado del tratamiento con LSB y 3i impulsa la diferenciación de nociceptores a través de una ruta que involucra un estado similar a las células madre de la cresta neural. Para monitorizar la aparición de células madre de la cresta neural, se trató una línea celular transgénica *SOX10::GFP* BAC hESC con A) LSB, B) LSB y CHIR99021 (LSB/C), y C) LSB3i que mostró numerosos verdes (células GFP+ brillantes en B) y C) por microscopía de fluorescencia. D) y E) muestran la expresión cuantitativa de GFP en poblaciones de células tratadas después del análisis de citometría de flujo Usando una línea transgénica *SOX10::GFP* BAC hESC, la expresión de SOX10, un marcador de células madre de la cresta neural, se puede detectar en más del 64 % de células en el día 8. La expresión de SOX10::GFP+ se aceleró y la expresión máxima (80 % de GFP+ en el día 12) donde las poblaciones de GFP+ más grandes ocurrieron antes en comparación con el tratamiento con LSB y CHIR99021 (LSB/C) o LSB solo como se muestra en D) y E) Los valores de LSB están justo por encima del valor inicial, los puntos de LSB/C son líneas negras (entre LSB y LSB3i) y los valores de LSB3i están conectados por una línea roja (clara). Barras de escala = 50  $\mu$ m.

Figura 6 - Demostración a modo de ejemplo de 3i añadido cuando las células aún conservan la expresión de OCT4 - Demuestra que una realización preferida del uso combinado de LSB y el tratamiento con 3i impulsa la diferenciación de nociceptores comenzando muy temprano en la ruta de diferenciación cuando la población de hESC aún conserva características pluripotentes (A) Cuando CHIR99021, DAPT, SU5402 se añaden a 7 cultivos duplicados en diversos días (es decir, un cultivo en cada uno de día 1 - día 7) después de la inducción de LSB y las células se fijan el día 11, la mayor supervivencia celular y la expresión más homogénea de TUJ1 es observada para el día 2. Así se descubrió el tiempo óptimo del día 2 para la adición de 3i. (B) Esto corresponde a un momento en que las células cultivadas en Nogina y SB431542 (NSB) continúan expresando OCT4, un marcador de pluripotencia, y aún no expresan PAX6, un marcador del destino de las células neurales (véase la falta de tinción marcada por un asterisco). Se observa una muerte celular profunda cuando se añade 3i en los días 5-7 en un momento en que las células se han comprometido con el linaje neural, marcado por la expresión de PAX6, véase, tinción DAPI en A) 3i añadido en los días 5, 6 y 7 y B) día 6 de cultivo. Las células se tiñeron para identificar anticuerpos que se unían a OCT4 (rojo/oscuro) y PAX6 (verde/claro) además de una tinción nuclear de 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (azul brillante).

Figura 7- Las hPSC artificiales tratadas con LSB3i a modo de ejemplo (células SOX10::GFP) demostraron el

desarrollo de una célula intermedia de la cresta neural con maduración acelerada en nociceptores bipolares capaces de producir un potencial de acción. La citometría de flujo se usó para clasificar las células SOX10::GFP+ a partir de las células negativas SOX10::GFP. Cuando SOX10::GFP+ fueron tratadas con LSB3i, dieron lugar a neuronas positivas (producidas) (A) ISL1 y (B) BRN3A (producidas). Las neuronas LSB3i teñidas para (C) glutamato y (D) TRPV1, (E) Cada neurona positiva TUJ1 exhibió una morfología bipolar con dos conos de crecimiento distintos y (F) expresó MAP2 polarizado. Después de 1 mes, los cuerpos de células neuronales (G) se agrupan para formar ganglios positivos para (H) Sustancia P y (I) CGRP. (J) 95 pA (trazo rojo) es suficiente para provocar un potencial de acción único maduro a partir de los nociceptores de LSB3i. La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$  (A-D y F-I) y 50  $\mu\text{m}$  (E).

Figura 8 - El clon de iPSC tratado con LSB3i a modo de ejemplo C72 adquirió rápidamente un fenotipo nociceptor. Las neuronas positivas para TUJ1 (tinción axonal verde/clara) de las células de clon C72 de iPSC tratadas con LSB3i expresaron A) ISL1, B) BRN3A, C) RET y D) RUNX1 (tinción roja/rosa de los cuerpos celulares).

Figura 9 - La clasificación por FACS de NTRK1 a modo de ejemplo enriquecía neuronas LSB3i derivadas de hiPSC. La clasificación por FACS de NTRK1 en el día 10 de diferenciación aumentó las neuronas positivas para TUJ1 (tinción axonal verde/clara) en células NTRK1+ y eliminó las poblaciones de células progenitoras positivas para nestina (rojo) (NTRK1-) de las líneas celulares C14 y C72. Las células se inmunotifieron con TUJ1 y Nestina además de DAPI 24 horas después de colocarlas en un recipiente de cultivo recubierto con matrigel.

Figura 10 - Expresión génica a modo de ejemplo de nociceptores de LSB3i - El análisis de la expresión génica se realizó los días 2, 3, 5, 7, 9 y 15 para las células tratadas con LSB y LSB3i. (a) Se observan distintas fases de diferenciación cuando se examinan los marcadores de neuroectodermo, cresta neural, neuronas y nociceptores (N.E., N.C., Nn. y Noci., respectivamente), (b) Los veinte genes más significativos regulados positiva (rojo) y negativamente (azul) por cambio de veces en el día 15 para LSB3i se compararon con las células tratadas con LSB, (c) La expresión de OCT4, DLK1, PAX6, SOX10, POU4F1 (BRN3A), ISL1, NEUROG2, NEUROG1, NTRK1, VGLUT2, TAC1 y TRPV1 son consistentes con la aparición de un nociceptor peptidérgico.

Figura 11 - Validación a modo de ejemplo por qRT-PCR de genes inducidos en una línea celular SOX10::GFP BAC. En comparación con las hPSC clasificadas para SSEA-4 y un método anterior para enriquecer las células madre de la cresta neural clasificando las células HNK1+ a partir de los cultivos neurales (Lee, et al., Nat Biotechnol 25, 1468-1475), las células GFP+ clasificadas usando la SOX10::GFP BAC enriquecieron enormemente las células que expresan los genes de la cresta neural SOX10, p75 y AP2B medidas por qRT-PCR.

Figura 12 - Los nociceptores de LSB3i a modo de ejemplo tienen dos conos de crecimiento distintos. Cuando se pasaron el día 12 después del contacto inicial con LSB, los nociceptores de LSB3i se fijaron y se tiñeron con anticuerpos TUJ1 (verde; áreas claras) y DAPI (núcleos azul/oscuro) se pueden observar dos conos de crecimiento distintos en estas células representativas con un cuerpo celular marcado por DAPI (azul; áreas ovales más oscuras) área nuclear en el medio con varias formas y tamaños similares a axones. Un extremo exhibía una arborización elaborada (arriba) similar a las dendritas y el otro una forma bulbar (abajo) similar a los extremos sinápticos. En general, la morfología de los nociceptores peptidérgicos coincidía con la morfología de las neuronas sensoriales.

Figura 13 - Especificación a modo de ejemplo y aislamiento de progenitores de melanocitos/melanoblastos - El protocolo LSB-C de 11 días apoyó la derivación de progenitores de melanocitos que coexpresan Sox10::GFP, MITF (A, panel derecho). También se observaron poblaciones positivas únicas de MITF (A, panel izquierdo). c-Kit fue identificado como un marcador potencial de progenitores de melanocitos. Se observó un bajo porcentaje de células que coexpresan Sox10::GFP, c-kit después de la diferenciación de LSB-C (B, población naranja). El análisis por qRT-PCR confirmó el enriquecimiento de los marcadores de melanocitos MITFM y Dct en la población doblemente positiva (C). El tratamiento con BMP4 y EDN3 ("LSB-Mel") mejoró la inducción de la población de progenitores de melanocitos supuestos positivos dobles Sox10::GFP, c-kit (D). Las células doble positivas Sox10::GFP, c-kit aisladas después del tratamiento con LSB-Mel exhibieron niveles significativamente más altos de marcadores de melanocitos MITFM y Dct (E). Todas las barras de error representan s.e.m. \* p<0,05.

Figura 14 - Expansión y maduración a modo de ejemplo de precursores de melanocitos - Resumen de condiciones de diferenciación (A). Después de la especificación en condiciones de LSB-C con BMP4 y EDN3 (LSB-Mel) las células se clasificaron el día 11 y se volvieron a sembrar en placas. Las células post-clasificación (PS) se mantuvieron en medios de maduración que contenían ligando c-kit (SCF), endotelina 3 (EDN3), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y CHIR. Las células pigmentadas observadas por microscopía de campo claro en el día 6 PS fueron positivas para el marcador de melanocitos MITF pero parecían haber regulado negativamente el indicador Sox10::GFP (B). Todas las poblaciones, excepto las doble negativas Sox10::GFP, c-kit eventualmente dieron lugar a células que expresan MITF y grupos pigmentados macroscópicos, pero a tasas diferentes (C). El tratamiento con BMP4 y cAMP mejoró la diferenciación en células pigmentadas que exhiben una morfología similar a un huso típica de los melanocitos (D).

Figura 15 - Caracterización a modo de ejemplo de melanocitos maduros - Las poblaciones puras de melanocitos

maduros derivados del protocolo LSB-Mel mantienen la expresión de marcadores de melanocitos comunes, incluyendo MITF, Sox10, Tyrp1 y HMB45 después de más de 8 semanas en cultivo (A). Los melanocitos conservan su fenotipo pigmentado oscuro durante varias semanas en pase (B). Se sedimentaron  $1 \times 10^6$  células y se fotografiaron para evaluar los niveles de pigmentación, caracterización ultraestructural microscópica electrónica de melanocitos maduros (C, D). La presencia de numerosos melanosomas de pigmentación oscura en el citoplasma de los melanocitos derivados de LSB-Mel se puede observar por MET (C). Obsérvese la presencia y el depósito progresivo de pigmento de melanina con la maduración de las vesículas de melanosomas de las fases I a IV (D).

Figura 16 - Muestra una formulación a modo de ejemplo de medio LSB-MEL que requiere ácido linoleico para el crecimiento de melanocitos y un esquema de un linaje de melanocitos. El componente de medio que se muestra por encima de las vistas microscópicas representa el componente de medio que queda fuera de la formulación; Ph = contraste de fase; BF = campo claro. Un esquema a modo de ejemplo muestra marcadores progenitores de melanocitos usados para identificar células de un linaje de melanocitos desarrollado.

Figura 17 - Modelo de diferenciación a modo de ejemplo - el tratamiento temprano con LSB de células madre humanas embrionarias pluripotentes inhibió los destinos de células de trofoectodermo, mesoendodermo y ectodermo no neural produciendo células con un destino de neuroectodermo. La adición de CHIR99021, SU5402 y DAPT (3i) en el día 2 después del tratamiento inicial con LSB indujo y aceleró (respecto al tratamiento con LSB-C y LSB) marcadores de identidad de células madre de la cresta neural para el día 8 y promovió la rápida diferenciación de las células madre de la cresta neural en nociceptores peptidérgicos para el día 10.

### Descripción detallada

La presente divulgación se refiere al campo de la biología de células madre, en particular a la diferenciación específica de linaje de células madre pluripotentes o multipotentes, que pueden incluir, pero sin limitación, células madre embrionarias humanas (hESC), células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC), células madre somáticas, células madre cancerosas o cualquier otra célula capaz de diferenciación específica de linaje. Se describen específicamente métodos para dirigir la diferenciación específica de linaje de hESC y/o hiPSC a nociceptores (es decir, células nociceptoras) usando nuevas condiciones de cultivo. Los nociceptores fabricados usando los métodos se contemplan adicionalmente para diversos usos que incluyen, pero sin limitación, el uso en ensayos de descubrimiento de fármacos *in vitro*, investigación del dolor y como un tratamiento terapéutico para revertir la enfermedad de, o el daño a, el sistema nervioso periférico (SNP). Además, se proporcionan composiciones y métodos para producir melanocitos a partir de células madre pluripotentes humanas para usar en la modelización de enfermedades. Las realizaciones y ejemplos que se describen a continuación deben interpretarse como meramente ilustrativos y no limitan el alcance de ninguna manera.

Los autores han desvelado previamente el uso de la inhibición dual de SMAD para la diferenciación directa de las células madre hacia las poblaciones de células neurales, y la proporción del SNC y la progenie de la cresta neural depende de la confluencia celular en el momento del inicio del tratamiento; la alta densidad de siembra en placas, es decir, la alta confluencia, produce la progenie del SNC, mientras que la baja densidad de siembra en placas, es decir, la baja confluencia, produce la progenie de la cresta neural. Además, desvelaron que se podría lograr el patrón de la progenie neuronal del SNC diferenciada a las neuronas dopaminérgicas funcionales.

En el presente documento se describe el inesperado y novedoso hallazgo de que los nociceptores funcionales, un linaje celular derivado de la cresta neural, se pueden diferenciar directamente a partir de las células madre embrionarias o somáticas sembradas en placa con alta densidad en aproximadamente 10 días mediante la inhibición secuencial de la señalización de SMAD seguida de la inhibición de la señalización de FGF y Notch y la activación de la señalización Wnt y dichos nociceptores funcionales pueden mantenerse *in vitro* durante 7 días o más.

En particular, se realizó un examen combinatorio de moléculas pequeñas para descubrir compuestos para su uso en la diferenciación dirigida de células madre pluripotentes humanas. Durante este cribado, se descubrieron pequeñas moléculas que convertían las PSC en neuronas postmitóticas. Específicamente, se descubrió que una combinación de cinco moléculas pequeñas que eran inhibidores de la ruta, es decir, SB431542, LDN-193189, CHIR99021, SU5402 y DAPT, era suficiente en ciertas condiciones de ensayo descritas en el presente documento para producir neuronas con una eficiencia >75 % de hPSC dentro de 10 días de diferenciación en ausencia de cualquier factor de crecimiento recombinante. Por consiguiente, el uso de composiciones (incluyendo kits) y métodos da como resultado al menos un 50 % de rendimiento de nociceptores peptidérgicos, o al menos un 60 %, o al menos un 70 %, o al menos un 75 % de eficiencia de las hPSC. Estas neuronas humanas resultantes expresaron marcadores canónicos del destino sensorial nociceptivo, incluyendo NTRK1, BRN3A, ISL1, NEUROG1, Sustancia P y CGRP. Esta aceleración basada en moléculas pequeñas de la adquisición del destino neuronal ocurrió en un marco temporal de tres a cinco veces más rápido en comparación con el desarrollo *in vivo* normal (Bystron, et al., Nat Neurosci 9: 880-886, (2006)) indicando que la inhibición de determinadas rutas de señalización fue suficiente para acelerar el tiempo del desarrollo de las células neuronales humanas. Esta derivación rápida, potencialmente escalable (es decir, el procesamiento por lotes para producir grandes cantidades de neuronas nociceptoras peptidérgicas sensoriales maduras) y de alta eficiencia de los nociceptores peptidérgicos permitió un acceso sin precedentes a este nuevo método para producir un tipo de célula médicamente relevante para su uso en estudios de percepción del dolor humano. Las cribas combinatorias de

moléculas pequeñas representan una poderosa herramienta de método para una nueva generación de estrategias de diferenciación dirigida en biología de hPSC.

5 Este descubrimiento de composiciones y métodos para la producción *in vitro* de neuronas nociceptoras peptidérgicas sensoriales maduras dentro de los 10 días representa significativamente menos tiempo para producir neuronas sensoriales maduras que los métodos actuales. Antes de este descubrimiento, la derivación *in vitro* de neuronas postmitóticas a partir de hPSC requería períodos de cultivo extendidos que normalmente duraban 30 días o más (Zhang, et al., *Methods Mol Biol* 584: 355-366 (2010); Elkabetz, et al., *Genes Dev* 22: 152-165 (2008)). Se pensó que esta diferenciación *in vitro* prolongada de hPSC reflejaba la cronología del desarrollo humano in vivo (Perrier, *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 12543-12548 (2004)). Por lo tanto, en una realización, composiciones y métodos para producir neuronas nociceptoras peptidérgicas maduras incluye menos de 30 días de cultivo después del contacto inicial con al menos uno de los cinco compuestos, es decir, SB431542, LDN-19318 o equivalentes. Por consiguiente, los nociceptores peptidérgicos se pueden obtener en menos de 29, menos de 25, menos de 20, menos de 15, menos de 12 y menos de 10 días después del contacto inicial con al menos uno de los cinco compuestos.

15 Identificar estrategias *in vitro* para superar el lento ritmo de desarrollo humano es un desafío fundamental para aprovechar todo el potencial de las hPSC en la biología básica y la modelización de enfermedades humanas (Saha, *Cell Stem Cell* 5, 584-595 (2009)). Los autores describen en el presente documento el descubrimiento de un nuevo método basado en moléculas pequeñas para convertir las células pluripotentes en neuronas maduras. Así, en una realización, una célula pluripotente se dirige a la diferenciación en una célula nociceptora madura. Además, los autores describen materiales y métodos para producir neuronas maduras, es decir, células nociceptoras, en varias formas y en grandes cantidades.

#### 25 **I. Métodos de cultivo celular para inducir células precursoras neuronales (linaje): La puesta en contacto de células madre pluripotentes humanas con SB431542 y LDN-193189 produjo células de linaje neural.**

El siguiente ejemplo describe métodos a modo de ejemplo para proporcionar células de un linaje neural para su uso durante el desarrollo.

30 La inhibición dual de SMAD se usaba anteriormente como un método rápido y altamente efectivo para inducir un tipo de células de linaje neural a partir de hPSC (Chambers, et al., *Nat Biotechnol* 27, (2009)). Estas células de linaje neural inducidas por moléculas que incluyen Nogina, tenían un ruta predeterminada que permitió el desarrollo en las células del sistema nervioso central, es decir, destino de células neurales. Los estudios de seguimiento informaron el uso de una molécula pequeña de dorsomorfina (DM) en lugar de Nogina, que al menos en parte produjo células similares con diferencias en la consistencia de los cultivos (Kim, et al., *Robust enhancement of neural differentiation from human ES and iPS cells regardless of their innate difference in differentiation propensity. Stem Cell Rev* 6, 270-281, (2010); Zhou, et al., *High-Efficiency Induction of Neural Conversion in hESCs and hiPSCs with a Single Chemical Inhibitor of TGF-beta Superfamily Receptors. Stem Cells*, 504, (2010).

40 Los autores observaron que las células generadas usando Nogina a pesar de mostrar la misma fase de desarrollo que las células tratadas con LDN, la expresión de la gran mayoría de los mismos marcadores, y capaces de un potencial de desarrollo similar para hacer varios linajes neurales, también mostraron diferencias, como ser más anteriores en un eje anterior-posterior (es decir, más prosencéfalo, más células expresan FOXP1 y similares) en comparación con las células neurales inducidas usando LDN. Por lo tanto, aunque se utilizó LDN en lugar de Nogina para inhibir BMP entre otras rutas de señalización, Nogina y LDN pueden tener otros tipos de actividades que son diferentes, además de inhibir BMP.

50 En parte debido al alto coste del uso de Nogina, los autores contemplaron que el uso de un inhibidor de BMP podría sustituir a Nogina en la producción de células con destino de células neurales. Por lo tanto, se usó un inhibidor de BMP de molécula pequeña, LDN-193189, (Yu, et al., *Nat Med* 14, 1363-1369, (2008)) y se encontró durante el desarrollo para reemplazar a Nogina, en combinación con SB431542, para generar neuroectodermo primitivo de hPSC, células que tienen un destino de células neurales, es decir, células del SNC (figura 2A). Este tratamiento combinado se denominó LSB para la combinación de estos dos inhibidores LDN-193189 y SB431542.

55 En general, la diferenciación celular se inició mediante el tratamiento de hES o hiPS de monocapa de alta confluencia con doble inhibición de la señalización de SMAD. Una realización preferida utiliza un porcentaje de confluencia del 50 %-100 %, con una realización más preferida del 70 %-80 % de confluencia. Será obvio para un experto en la materia que la densidad de siembra en placas inicial requerida para lograr una confluencia preferida dependerá del tipo de célula, el tamaño, la eficiencia de la siembra en placas, la supervivencia, la adhesión y otros parámetros que pueden determinarse empíricamente sin una experimentación excesiva por parte del experto en la materia. La inhibición dual de SMAD se puede lograr con varios compuestos que incluyen Nogina, SB431542, LDN193189, Dorsomorfina u otras moléculas que bloquean la señalización de TGFβ, BMP y Activina/Nodal. Una realización preferida utiliza la composición que comprende SB431542 y LDN193189 (colectivamente, LSB) a una concentración de 0,1 μM-250 μM, o más preferentemente 1-25 μM, o más preferentemente 10 μM de SB431542 y 10-5000 nM, o de la manera más preferente 100-500 nM de LDN193189.

**II. Compuestos para su uso en diferenciación dirigida: el cribado de pequeñas moléculas usando células de linaje neuronal dio como resultado compuestos que produjeron células neuronales bajas en PAX6 y altas en TUJ1 para su uso en la diferenciación dirigida.**

- 5 El siguiente ejemplo describe el uso de células a modo de ejemplo de un linaje neural del ejemplo II para cribar compuestos candidatos de molécula pequeña para su uso en diferenciación dirigida.

10 Específicamente, en el contexto de la inhibición dual de SMAD (LSB), es decir, las células ES humanas se trataron primero con LSB (LDN-193189 y SB431542) para cribar compuestos candidatos (es decir, moléculas pequeñas) en aproximadamente 400 condiciones para encontrar combinaciones de moléculas pequeñas que podrían acelerar la adquisición de marcadores neuronales postmitóticos a partir de células ES humanas. Los compuestos candidatos se eligieron entre moléculas que se dirigían a (alteraban) las rutas de señalización celular que se sabe que son importantes y que se usan con frecuencia en estudios de desarrollo para determinar los destinos celulares (por ejemplo, rutas de señalización tales como FGF, Notch, WNT, SHH (Sonic Hedgehog), etc.) para determinar las células capaces de desarrollar el SNC. Como ejemplo, se ensayaron 4 tipos de inhibidores (es decir, 15 SU/DAPT/CHIR/Ciclopamina) en diferentes combinaciones (como se alimentan a las células en medio celular) en diferentes días de tratamiento con LSB. Cada tratamiento se analizó el día 10 para la expresión de TUJ1/PAX6. Como un ejemplo de una condición de tratamiento: LSB se alimentó diariamente, CHIR y SU se añadieron al medio para alimentar células diariamente en los días 4-10.

20 En general, los resultados de los tratamientos de cribado dieron como resultado un gran número de cultivos que contenían células muertas. En otras palabras, las condiciones de cultivo viables durante este examen se encontraron con mucha menos frecuencia que las condiciones inviables (es decir, muerte celular), por ejemplo, cuando se añadió SU/DAPT a cultivos tempranos, es decir, antes del día 2. Los autores contemplaron que las células madre del SNC dependen de la señalización de FGF y la actividad de la gamma-secretasa/señalización de Notch para la supervivencia, por lo tanto, cuando CHIR estaba ausente cuando SU/DAPT indujo a las células a cambiar del SNC a la cresta neural, en lugar de cambiar, las células murieron.

30 El día 10 después de la adición de LSB, las células que sobrevivieron durante el cribado fueron monitorizadas para detectar la pérdida del marcador de neuroectodermo humano PAX6 (Zhang, et al., Cell Stem Cell 7, 90-100, (2010) y el inicio de la diferenciación neuronal mediante expresión de TUJ1 (Lee, et al., Cell Motil Cytoskeleton 17, 1 18-132, (1990). Las células se tiñeron para detectar neuronas (TUJ1+) y una pérdida de neuroectodermo (observación de menos células PAX6+) usando un anticuerpo que se une al extremo C de PX6), por inmunofluorescencia (inmunoF). Este cribado se realizó en las numerosas combinaciones de inhibidores (por ejemplo, SU, SU/DAPT, SU/DAPT/CHIR, 35 DAPT/CHTR, SU/CHIR, SU/Ciclopamina, etc.) que se añadieron en variaciones de alimentación diaria en combinaciones de días, (por ejemplo, días 0-10, 1-10, 2-10, 3-10, etc.). En general, los resultados se determinaron observando cantidades comparativas de tinción TUJ1+/PAX6- de células generadas por cada tratamiento de manera que se eligieron las condiciones y compuestos que muestran las mayores cantidades de tinción TUJ1+/PAX6- suficientemente exitosos para proporcionar células para su posterior análisis. Un ejemplo de una molécula pequeña que se consideró un fracaso durante el ensayo de cribado para producir células que fueron TUJ1+/PAX6- por 40 inmunotinción de células fue la ciclopamina. La ciclopamina parecía no tener efecto sobre las células para producir la tinción de TUJ1/PAX6 sin importar cuándo se añadió. En otras palabras, la morfología celular permaneció similar a aquellas células con tratamiento con LSB solo (es decir, > 90 % PAX6+ y < 10 % TUJ1+) en el día 10 por inmunofluorescencia.

45 Sin embargo, durante el cribado, los autores descubrieron que una combinación específica de tres moléculas pequeñas (SU5402, CHIR99021 y DAPT; denominada 3i para tres inhibidores), añadida el día 2 del tratamiento con LSB (figuras 6A y B), abolió la expresión de PAX6 e indujo TUJ1 en hPSC en el día 10 de diferenciación (figuras 2A y B). Este fue un descubrimiento sorprendente porque en el día 2 del tratamiento con LSB aún no se sabía que las 50 células tratadas tuvieran un destino de células neurales o que tuvieran la capacidad de convertirse en un destino de células neurales. En cambio, el tratamiento con 3i dirigió las células lejos del destino de las células neurales hacia las células de la cresta neural que se diferenciaron aún más en las células nociceptoras.

55 Después se investigaron las funciones para cada una de estas pequeñas moléculas con el fin de descubrir qué rutas de señalización se consideraron involucradas en la conversión de una población de células ES humanas PAX6+TUJ1- en una población PAX6-TUJ1+. Primero, se informó que SU5402 era un potente inhibidor de la señalización de VEGF, FGF y PDGF tirosina cinasa (Sun, et al., J Med Chem 42, 5120-5130, (1999). Por lo tanto, en general, se contempló que al menos una de las moléculas pequeñas estaban involucradas con la inhibición de las rutas de señalización de FGFR. En segundo lugar, CHIR99021 se informó como un agonista de WNT por inhibición selectiva de GSK-3 $\beta$  que 60 estabilizaba  $\beta$ -catenina (Bennett, et al., J Biol Chem 277, 30998-31004, (2002). Por lo tanto, en general, se contempló que al menos una de las moléculas pequeñas estaba involucrada en la inhibición de la glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). En una realización, esta molécula pequeña, como alternativa, es capaz de activar al menos una de las rutas de señalización de WNT, tales como a través de la inhibición de la glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Y en tercer lugar, se informó que DAPT era un inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa capaz de bloquear la señalización de Notch (Dovey, et al., J Neurochem 76, 173-181 (2001). Por lo tanto, en general se contempló que al menos una de las moléculas 65 pequeñas estuvo involucrada con la inhibición de al menos una ruta de señalización de Notch. Así, en una realización,

una de las moléculas pequeñas se contemplaba como un inhibidor no selectivo o pan-Notch. En otra realización, uno de los inhibidores es un inhibidor de moléculas de  $\gamma$ -secretasa, capaz de bloquear al menos una ruta de señalización de Notch. Por lo tanto, en una realización a modo de ejemplo, una combinación de inhibidores incluiría al menos una molécula pequeña involucrada en la inhibición de las rutas de señalización de FGFR, al menos una molécula pequeña involucrada en la inhibición de al menos una ruta de señalización de Notch, y al menos una molécula pequeña involucrada en la inhibición de GSK-3 $\beta$  mientras que activa al menos una de las rutas de señalización WNT para producir células neuronales humanas PAX6-TUJ1+. En realizaciones adicionales, uno de los inhibidores fue capaz de bloquear al menos una molécula de  $\gamma$ -secretasa en la ruta de señalización de Notch.

#### 10 **A. LSB-3i: Una combinación de dos inhibidores de la señalización de FGF y Notch con un activador de señalización Wnt produjo células neuronales TUJ1+.**

15 Los inhibidores de la señalización de FGF y Notch y los activadores de la señalización Wnt se añadieron aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días después del inicio del tratamiento con LSB. La inhibición de la señalización de FGF se puede lograr con varios compuestos que incluyen SU5402, PD-161570, PD-173074, Suramina u otras moléculas que bloquean las rutas de señalización de FGF. La inhibición de la señalización de Notch se puede lograr con varios compuestos que incluyen DAPT, L-685.458, Compuesto E, MK0752 u otras moléculas que bloquean las rutas de señalización de Notch.

20 La activación de la señalización Wnt se puede lograr con varios compuestos que incluyen CHIR99021, LiCl, TDZD-8, Wnt recombinante u otras moléculas que activan las rutas de señalización Wnt. Una realización preferida utiliza la composición que comprende CHIR99021, DAPT y SU5402 (colectivamente, 3i) a una concentración de 0,3-100  $\mu$ M, o más preferible 3-10  $\mu$ M, o de la manera más preferible 3  $\mu$ M de CHIR99021; 1-100  $\mu$ M, o de la manera más preferible, 10  $\mu$ M de DAPT; y 0,5-200  $\mu$ M, o de la manera más preferible 5-20  $\mu$ M, o de la manera más preferible 10  $\mu$ M de SU5402.

30 Las células madre tratadas con la combinación de LSB y 3i se fijaron el día 11 y se examinaron para determinar la supervivencia y la expresión del marcador neuronal TUJ1. La población que había sido tratada con 3i en el día 2 de tratamiento con LSB produjo la tasa de supervivencia más alta, así como una alta expresión del marcador neuronal TUJ1, mientras que la población que había sido tratada con 3i después del día 5 de tratamiento con LSB mostró citotoxicidad y muerte celular (figura 6A). Sorprendentemente, en el día 2 después del tratamiento con LSB, la población celular sigue siendo progenitora ya que la expresión de Oct4 es alta (figura 6B). No es hasta el día 6 después del tratamiento con LSB que se expresa el marcador de compromiso neural Pax6; sin embargo, el tratamiento en el día 6 con 3i produce citotoxicidad, lo que indica que las poblaciones neuronales derivadas del tratamiento combinado con LSB y 3i se diferencian directamente a partir de la célula madre pluripotente y no a partir de un intermediario neuronal. Por lo tanto, una realización preferida del tratamiento con 3i es entre 1 y 4 días después del tratamiento con LSB, con la realización más preferida del tratamiento con 3i 2 días después del tratamiento con LSB. Además, los 3 componentes de la composición 3i son necesarios para obtener el máximo rendimiento de las neuronas diferenciadas (figura 2E).

#### 40 **Las células neuronales TUJ1+ muestran una pérdida de expresión de marcadores de proliferación celular.**

El siguiente ejemplo describe un método a modo de ejemplo para determinar la fase de maduración (ciclo celular) de las células neuronales TUJ1+.

45 Tras la maduración, las neuronas producidas en cultivo dejaron de sufrir mitosis al perder Ki67 y fosfohistona H3 (PHH3), marcadores de proliferación celular (Gerdes, et al., Int J Cancer 31, 13-20 (1983),) y las fases G2/M de la mitosis (Hendzel, et al., Chromosoma 106, 348-360 (1997),), respectivamente. Por lo tanto, las células producidas usando LSB en combinación con 3i (es decir, LSB3i) se pasaron a una densidad más baja, aproximadamente 10-100.000 células/cm<sup>2</sup> y se analizaron los marcadores de proliferación celular, Ki67 y fosfohistona H3 (PHH3), después de la fijación para evaluar mejor la expresión, en células individuales. En particular, se sabía que la expresión de Ki67 era un mejor predictor de proliferación. Por lo tanto, en comparación con las células cultivadas en LSB sin compuestos 3i, después de 12 días menos células, el 50 % y el 16 %, cultivadas en presencia de 3i mostraron una pérdida de células Ki67+ y pHH3+, respectivamente (figuras 2 C-F).

55 La tinción FACS intercelular para Nestina, un marcador de progenitores neurales, y  $\beta$ 3-tubulina (TUJ1), un marcador de diferenciación neuronal, se realizó para cuantificar la eficiencia (porcentaje) de diferenciación neuronal usando LSB3i en comparación con LSB solo como control además de LSB/CHIR (CHIR99021;C), SU/DAPT (SU5402/DAPT), SU/CHIR (SU5402/CHIR99021), DAPT, SU (SU5402), CHIR (figura 2G). En presencia de LSB, SU/DAPT, DAPT, SU y CHIR, la mayoría de las células expresaron Nestina. En particular, > 95 % de la población de células LSB eran Nestina+. Numerosas células mostraron tinción de Nestina después de la inhibición dual de SMAD, pero no se cuantificaron mientras que las células cultivadas a más largo plazo, es decir, 19 días, mostraron neuronas TUJ1+ donde la mayoría de estas células coexpresaron tirosina hidroxilasa (TH) que identificaba neuronas dopaminérgicas potenciales (Chambers, et al., Nat Biotechnol 27, (2009),). Por el contrario, cuando las células en contacto con LSB fueron puestas en contacto 2 días después con los compuestos 3i, después de 10 días, aproximadamente el 25 % de las células expresaron Nestina, mientras que aproximadamente el 75 % de las células expresaron TUJ1, lo que



demuestra una conversión eficiente a un destino celular neuronal después del cultivo celular a corto plazo, es decir, menos de 19 días.

5 Sorprendentemente, el tratamiento con LSB siguió 2 días después poniendo en contacto las células con CHIR99021 y cualquiera de DAPT o SU dio como resultado que el 50 % de la población celular se diferenciara en células TUJ1+. Cuando cada uno de los tres inhibidores se usó solo después del tratamiento con LSB, el 20 % o menos de las células fueron TUJ1+. Por lo tanto, CHIR99021 fue descubierto como el contribuyente clave para la diferenciación dirigida de esta población celular en células neuronales TUJ1+. Los autores contemplaron que la diferenciación directa de las células nestina+TUJ1- en células neuronales nestina-TUJ1+ dependía de la inhibición de GSK-3 $\beta$  mientras se activaba al menos una de las rutas de señalización WNT además de inhibir las rutas del receptor FGF o una gamma secretasa dentro de una ruta de señalización de Notch. Además, la adición de los compuestos 3i dio como resultado una conversión de un 25 % adicional de células neuronales nestina-TUJ1+, véase, la figura 2G.

15 En resumen, la población neuronal derivada de una realización preferida del tratamiento con 3i 2 días después del tratamiento con LSB se examinó adicionalmente. Esta población mostró una alta expresión del marcador neuronal TUJ1 en comparación con las células tratadas con LSB solo (figuras 2A, B), así como la pérdida de Ki67 (figuras 2C, D). La pérdida de Ki67 indica una reducción en el ciclo celular que es característica de las neuronas diferenciadas postmitóticas. Además, el análisis FACS reveló que más del 75 % de la población celular tratada con una composición preferida que consiste en LSB y 3i expresó TUJ 1 en comparación con el 99 % de la población tratada con LSB solo que expresó Nestina, un marcador de progenitores (figura 2G).

25 La población neuronal derivada de una realización preferida del tratamiento con 3i 2 días después del tratamiento con LSB se examinó adicionalmente. Esta población mostró una alta expresión del marcador neuronal TUJ1 en comparación con las células tratadas con LSB solo (figuras 2A, B), así como la pérdida de Ki67 (figuras 2C, D). La pérdida de Ki67 indica una reducción en el ciclo celular que es característica de las neuronas diferenciadas postmitóticas. Además, el análisis FACS reveló que más del 75 % de la población celular tratada con una composición preferida que consiste en LSB y 3i expresó TUJ1 en comparación con el 99 % de la población tratada con LSB solo que expresó Nestina, un marcador de progenitores (figura 2E).

### 30 **B. Las células neuronales TUJ1+ expresaron marcadores celulares del SNP en lugar de del SNC.**

El siguiente ejemplo describe un método a modo de ejemplo para identificar el tipo de neurona positiva para TUJ1 producida durante el desarrollo.

35 Para caracterizar adicionalmente el subtipo de neuronas obtenidas de una realización preferida del tratamiento con 3i 2 días después del tratamiento con LSB, la población positiva para TUJ1 se tiñó para marcadores de diversos subtipos neuronales. Específicamente, se sabía que el protocolo de inhibición dual de SMAD generaba células neuroepiteliales PAX6+ sesgadas hacia la identidad del prosencéfalo anterior que expresan FOXG1 (proteína de caja Forkhead G1) (Chambers, et al., Nat Biotechnol 27, (2009),). Por lo tanto, para determinar la identidad del subtipo neuronal después del tratamiento con LSB/3i, las células se pasaron a una densidad más baja, aproximadamente 10-100.000 células/cm<sup>2</sup> en el día 10 y se evaluó para un intervalo de expresión del marcador en el día 12.

45 Dado que el tipo neuronal esperado era un destino del SNC, la mayoría de los marcadores iniciales ensayados fueron para la identificación de células de tipo del SNC. De hecho, se esperaba una neurona del prosencéfalo del SNC ya que las células LSB están predeterminadas a este subtipo (positivas para PAX6, FOXG1). Sorprendentemente, se obtuvieron al menos 12 resultados negativos (se muestran 10 a modo de ejemplo a continuación) para los marcadores del SNC antes de descubrir la tinción para ISL1, un marcador para las células del SNP. ISL1 es expresado por motoneuronas y neuronas sensoriales periféricas. La expresión de BRN3A se ensayó y se descubrió que era expresado por células LSB/3i. Por lo tanto, los autores descubrieron neuronas BRN3A+/ ISL1+ que indicaban el desarrollo de neuronas sensoriales periféricas, véase la tabla A, a continuación.

55 Tabla A: la siguiente lista de genes/proteínas que representan numerosas moléculas con destino del SNC que se esperaba que fueran positivas (expresadas) en las células que usan la diferenciación inducida por LDN/3i como se describe en el presente documento. Sin embargo, estos resultados mostraron una falta a modo de ejemplo de marcadores del SNC, resultados que fueron respaldados por el hallazgo posterior de marcadores potenciales para el linaje del SNP, es decir, ISL1 y BRN3A.

Gen/Proteína	Marcas (tipo de neurona)	Resultado (IF o FACS)
FOXG1	Prosencéfalo	Negativa
FOXA2	Mesencéfalo	Negativa
TBR1	Cortical	Negativa
PAX6	Prosencéfalo	Negativa

(continuación)

Gen/Proteína	Marcas (tipo de neurona)	Resultado (IF o FACS)
AADC	Dopamina	Negativa
TH	Dopamina	Negativa
DCX	Pan-neuronal	> 75 %, coteñida con TUJ1
Nestina	Progenitoras	< 25 %, contrateñida con TUJ1
ChAT	Colinérgica	Negativa
GAD65	GABA	Negativa
Reelina	Neuronas corticales y juveniles	Positiva
GABA	GABA	Negativa
MASH	Autónoma	Negativa
BRN3A	Sensorial periférica	Positiva
ISL1	Motoneuronas, Sensorial periférica	Positiva

- Sorprendentemente, se observó una expresión homogénea de ISL1 y BRN3A (áreas rojas/oscuras dentro de las células) (figuras 3A y B) en las células TUJ1+ (cuerpos celulares verdes/más claros en comparación con la tinción roja). ISL1 y BRN3A son marcadores clave para las neuronas sensoriales (ISL1: Sun, et al., Nat Neurosci 11, 1283-1293, (2008); BRN3A: Gerrero, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 90, 10841-10845 (1993),). Este descubrimiento indicó que las neuronas que resultaron del tratamiento con LSB3i eran células del SNP en lugar de del SNC. Estos resultados contrastaron con las células LSB que tienen un subtipo de neurona del prosencéfalo del SNC (PAX6+, positiva para FOXG1). Este es un hallazgo bastante inesperado ya que la alta confluencia de las células madre al inicio del tratamiento, como se representa por la densidad de siembra en placas, de acuerdo con las enseñanzas de la técnica anterior, debería haber dado como resultado poblaciones neuronales derivadas del SNC. Sin embargo, los nociceptores se derivan de las poblaciones de células de la cresta neural que, de acuerdo con las enseñanzas de la técnica anterior, se derivan de la baja confluencia de las células madre al inicio del tratamiento, como se representa por la densidad de siembra en placas. En otras palabras, la expectativa era que una alta densidad de placas inicial > 20.000 células/cm<sup>2</sup> de células madre pluripotentes en el momento del inicio del tratamiento con LSB daría como resultado una población neuronal comprometida con el SNC. Por el contrario, se sabía que una baja densidad de siembra en placas inicial de aproximadamente 10.000 células/cm<sup>2</sup> era necesaria para producir células de la cresta neural (Chambers et al, Nature Biotech, 2009 (Véase la mitad inferior de la figura 4),).
- Para caracterizar adicionalmente el subtipo de neuronas obtenidas de una realización preferida del tratamiento con 3i 2 días después del tratamiento con LSB, la población positiva para TUJ1 se tiñó para marcadores de diversos subtipos neuronales. Esta población fue positiva para la expresión de ISL1, BRN3A, RET y RUNX1 (figuras 3 A-D). El análisis FACS reveló que más del 60 % de estas neuronas eran positivas para NTRK1 (figura 3E).
- Estos marcadores indican colectivamente que la población neuronal son neuronas sensoriales periféricas, en particular nociceptores. Este es un hallazgo bastante inesperado ya que la alta confluencia de las células madre al inicio del tratamiento, como se representa por la densidad de siembra en placas, de acuerdo con las enseñanzas de la técnica anterior, debería haber dado como resultado poblaciones neuronales derivadas del SNC. Sin embargo, los nociceptores se derivan de las poblaciones de células de la cresta neural que, de acuerdo con las enseñanzas de la técnica anterior, se derivan de la baja confluencia de las células madre al inicio del tratamiento, como se representa por la densidad de siembra en placas. Por lo tanto, una realización preferida de la combinación de LSB con el tratamiento con 3i en el día 2 da como resultado la formación inesperada de poblaciones derivadas de la cresta neural, en concreto, nociceptores. Para establecer la generalidad, los autores repitieron una realización preferida que combina el tratamiento con 3i 2 días después del tratamiento con LSB usando hiPSC como fuente de células madre. La técnica actual describe cualquier número de métodos para producir hiPSC y serán conocidos por los expertos en la materia. Las células hiPSC sembradas a una alta confluencia tratadas con LSB seguido de 3i en el día 2 dan como resultado la formación de células neuronales positivas para los marcadores de nociceptores ISL1, BRN3A, RET y RUNX1 (figuras 4A-D).
- 40 C. Células neuronales TUJ1+ del SNP expresaban marcadores de células nociceptoras-peptidérgicas**
- El siguiente ejemplo describe el uso de métodos a modo de ejemplo para determinar qué tipo o tipos de neuronas del sistema nervioso periférico (SNP) se produjeron usando los métodos descritos en el presente documento.
- 45 No se sabía qué tipo o tipos de neuronas del SNP fueron producidas por los métodos descritos en el presente

documento, ya que había varios tipos de neuronas candidatas, tales como las neuronas sensoriales y las neuronas motoras, y además había al menos tres subconjuntos principales de neuronas sensoriales conocidas en el SNP incluye células propioceptoras, células mecanorreceptoras y células nociceptoras.

5 Durante el desarrollo, los nociceptores en fase temprana fueron tanto peptidérgicos como no peptidérgicos y expresaron de forma única NTRK1, RUNX1, seguidos de la expresión RET (para un ejemplo de información sobre RET, véase, Woolf, et al., Neuron 55, 353-364, (2007)). Los cultivos duplicados de LSB3i en fase temprana con neuronas TUJ1+ se ensayaron para la expresión de RET (figura 3C), y se descubrió que eran positivos para este marcador (áreas rojas/más oscuras dentro de las células en el cuadro más grande en comparación con la tinción  
10 TUJ1+ (cuerpos celulares verdes/más claros en comparación con la tinción de RET) y áreas más claras en la caja RET insertada). (Figura 3D), y más del 60 % de todas las células en cultivo expresaron NTRK1 cuando se midió por FACS en el día 10 (figura 3E).

15 En resumen, esta población fue positiva para la expresión de ISL1, BRN3A, RET y RUNX1 (figuras 3A-D) lo que indica la producción de nociceptores en fase temprana (tanto peptidérgicos como no peptidérgicos). El análisis FACS reveló que más del 60 % de estas neuronas eran positivas para NTRK1 (figura 3E). Estos marcadores indican colectivamente que la población neuronal son neuronas sensoriales periféricas, en particular nociceptores.

20 Por lo tanto, una realización preferida de la combinación de LSB con el tratamiento con 3i en el día 2 da como resultado la formación inesperada de poblaciones derivadas de la cresta neural, en concreto, nociceptores.

Además, los autores combinaron información de varios ensayos, incluidos los resultados iniciales de inmunofluorescencia, es decir, BRN3A+, 1SL1+, datos de matriz, es decir, expresión de TAC1 (Sustancia P), después eligieron un marcador NTRK1 y encontraron células NTRK1+, además de las observaciones descritas en el presente  
25 documento donde las células obtenidas por el tratamiento con LSB/3i hicieron la transición a través de la cresta neural y expresaron transitoriamente Neurogenina1 (NEUROG1) en lugar de diferenciarse en un destino del SNC. Por lo tanto, los autores contemplaron que la célula del SNP resultante era muy probablemente un nociceptor peptidérgico.

#### 30 **D. LSB-3i indujo de forma reproducible células neuronales nociceptoras-peptidérgicas SNP TUJ1+.**

El siguiente ejemplo describe el uso de métodos a modo de ejemplo para determinar la reproducibilidad.

Para establecer la generalidad, los autores repitieron una realización preferida que combina el tratamiento con 3i 2 días después del tratamiento con LSB usando hiPSC como fuente de células madre. Se pudo acceder a la reproducibilidad del tratamiento con LSB3i a través de líneas de hPSC adicionales, incluidas las líneas de células madre pluripotentes inducidas (hiPSC). La técnica actual describe cualquier número de métodos para producir hiPSC y serán conocidos por los expertos en la materia. En particular, se utilizaron dos líneas hiPSC (C14 y C72) que se generaron insertando genes como Oct4 (factor de transcripción de unión a octámero 4), Sox2 (SRX (región Y de determinación del sexo)-caja 2), Klf4 (factor de tipo Kruppel 4) y c-Myc (factor de transcripción p64) y se ha demostrado  
40 que se neutraliza de manera eficiente (véase, (Papapetrou, et al., Proc Natl Acad Sci., USA 106, (2009)),).

La expresión de PAX6 se examinó por ImmunoF. El tratamiento con LSB y LSB3i de las líneas celulares C14 y C72 mostró resultados de tinción neuronal similares en comparación con las líneas celulares humanas que se muestran en las figuras 3A-D. Los resultados de tinción de C14 a modo de ejemplo se muestran en las figuras 4A-D, mientras  
45 que los resultados de tinción de C72 a modo de ejemplo se muestran en las figuras 8A-D para ISL1, BRN3A, RET, RUNX1 y TUJ1, como se ha descrito anteriormente.

El tratamiento con LSB de las líneas celulares C14 y C72 dio lugar de manera homogénea a células positivas para Nestina (>95 % de la población de células tratadas) y fueron capaces de formar células TUJ+ cuando se trataron con la combinación de LSB3i según lo medido por FACS (40 % para C14 y 33 % para C72; figura 4E). Estos resultados se compararon con la línea celular H9 (es decir, una línea hESC) tratada con LSB y LSB3i mostrada para los resultados de LSB y LSB3i en (figura 4E). Incluso los rendimientos neuronales más altos, del 40 % y el 33 % medidos por FACS, se convirtieron en > 90 % de la tinción de núcleos que son neuronas cuando se clasificaron en NTRK1 en esas dos líneas hiPSC al pasar los cultivos a granel en recipientes de cultivo recubiertos con medios N2 que contienen Matrigel™ después de clasificar en la expresión del marcador NTRK1 (receptor de tirosina cinasa neurotrófico tipo 1). Las células se desagregaron con Accutase, se resuspendieron en N2 y se incubaron en hielo con anticuerpo NTRK1 conjugado con APC (R&D) durante 15 minutos, se lavaron y se resuspendieron en N2 para FACS. Después de clasificar las células se cultivaron durante 24 horas en medio N2 y se fijaron en su lugar. Las células se recogieron y se tiñeron para BRN3A, ISL1, TUJ1 y DAPI. En particular, se muestran numerosas células Nestina+ (tinción roja/oscura) para células C14 y C72 NTRK1- a partir de células tratadas con LSB3i en comparación con pocas células Nestina+ en la población representativa de células NTRK1+ tratadas con LSB3i (figura 9). Además, aunque pocas células C14 NTRK1- expresaron TUJ1, la línea celular C27 mostró un mayor número de NTRK1- TUJ1+ (verde; tinción brillante). Ambas líneas celulares mostraron un alto número de células Nestina-TUJ1+ según lo observado en comparación con los cuerpos celulares identificados por la tinción DAPI (azul; nuclear claro).  
60

65 En resumen, las células hiPSC sembradas a una alta confluencia tratadas con LSB seguido de 3i en el día 2 dieron

como resultado la formación de células neuronales positivas para los marcadores de nociceptores ISL1, BRN3A, RET y RUNX1 (figuras 4A-D, figuras 8A-D y figura 9.

La velocidad con la que el destino de las células neuronales maduras y estables puede diferenciarse de las hPSC usando este enfoque combinado de molécula pequeña (figura 4) sigue siendo el hallazgo más sorprendente. El marco temporal de 10-15 días para la generación de un fenotipo de neurona madura se acelera mucho en comparación con las estimaciones de la aparición de nociceptores durante el desarrollo humano (30-50 días) (Kitao, et al., J Comp Neurol 371.249-257, (1996),). La regulación positiva de ISL1 y BRN3A es concomitante con la expresión de SOX10, comenzando entre los días 5 y 7. El momento óptimo para añadir 3i es el día 2 de inhibición dual de SMAD que refleja un hallazgo previo de que el tratamiento con Sonic Hedgehog en el día 2 es más efectivo para promover la expresión de FOXA2 y la diferenciación de la placa del piso humana (Fasano, et al., Cell Stem Cell 6, 336-347, (2010),). Esto sugiere que el patrón neuronal puede ocurrir antes de la pérdida de la expresión de la proteína OCT4 y que la presencia de la proteína OCT4 no parece restringir los eventos previos al patrón. El potente papel de CHIR99021 en la derivación de las neuronas sensoriales derivadas de la cresta neural probablemente esté relacionado con la activación de la señalización WNT canónica, que se sabe que es esencial durante la especificación temprana de la cresta neural de (Dorsky, et al., Nature 396, 370-373, (1998),), y capaz de instruir a los precursores de la cresta neural sin estimulación previa hacia el linaje de neuronas sensoriales (Lee, et al., Science 303, 1020-1023, (2004)).

La reprogramación de linaje de células de ratón basada en el factor de transcripción ha suscitado una atención muy merecida como un medio para derivar neuronas directamente de fibroblastos (Vierbuchen, et al., Nature 463, 1035-1041, (2010),), y con el tiempo este método puede ser usado en células humanas. Los datos mostrados en el presente documento demostraron que LSB3i era capaz de derivar rápidamente neuronas postmitóticas humanas. Algunas de las ventajas clave de usar métodos que comprenden LSB3i fueron la velocidad y la eficiencia de la producción de neuronas postmitóticas humanas a partir de células precursoras humanas, es decir, PSC. Además, el protocolo no requería manipulación genética o intervención mecánica, tal como pases, lo que dio como resultado poblaciones de neuronas altamente enriquecidas en 10 días en una sola etapa de cultivo.

LSB3i es también uno de los primeros ejemplos de uso de cribados combinatorios de moléculas pequeñas para impulsar la especificación de linaje en hPSC, dado el número limitado de rutas de desarrollo utilizadas de forma iterativa en los puntos de decisión del desarrollo (Brivanlou, et al., Science 295, 813-818, (2002),) el enfoque descrito en el presente documento debería ser generalmente aplicable para especificar linajes pluripotentes humanos. La mayoría de las cinco moléculas pequeñas utilizadas en LSB3i eran inhibidores conocidos de las rutas de señalización, lo que indica que la supresión de las rutas de señalización endógenas es particularmente efectiva para dirigir el destino de hPSC. Aunque los efectos fuera de la diana son una consideración importante cuando se usan moléculas pequeñas, de modo que las moléculas pequeñas a menudo producen resultados no pretendidos o inesperados, los datos obtenidos durante el desarrollo demostraron que la inhibición combinada de moléculas pequeñas de las rutas de señalización endógena proporcionó medios no genéticos eficientes (sin cambios en las secuencias codificantes de ADN), entre especies, rentables, rápidos y reversibles para modular el destino de las células hPSC.

### III. LSB-C: CHIR99021 fue necesario para la generación de nociceptores por LSB3i y se descubrió que dirigía la diferenciación a células madre de la cresta neural.

Durante el desarrollo, los autores descubrieron que las células puestas en contacto con LSB podían dirigirse a diferenciarse en un gran número en nociceptores cuando se ponían en contacto, el día 2 después del tratamiento con LSB, con CHR/SU o CHR/DAPT pero no con SU/DAPT. Tras una investigación adicional, los autores se sorprendieron al descubrir que LSB-C, las células tratadas con LSB en contacto con CHIR dieron como resultado una población de células madre de la cresta neural.

#### A. CHIR99021 (C) es el factor clave para inducir la diferenciación neuronal de las células cultivadas con LSB (es decir, LSB-C)

El siguiente ejemplo describe el uso de métodos a modo de ejemplo para ensayar la eficacia de cada compuesto para inducir la diferenciación neuronal dirigida.

Con el fin de obtener información mecanicista sobre la suficiencia de cada compuesto que se descubrió que se asocia, con la inducción de células TUJ1+ del ejemplo III, se ensayaron combinaciones específicas de compuestos 3i para inducir la expresión celular de Nestina y TUJ1 según se midió usando FACS intercelular (mostrado en la figura 1G). Se usó Nestina como marcador de las células del linaje neural LSB mientras que TUJ1 se usó para identificar una célula neuronal cadena abajo (es decir, más diferenciada).

Aunque ninguno de los factores individuales produjo números altos (más del 60 %) de neuronas TUJ1+, CHIR99021 en combinación con cualquiera de los otros dos factores de inhibición de la señal fue capaz de generar números moderados de neuronas TUJ1+ (53 % para DAPT y 58 % para SU5402). Estos datos indican que, en las condiciones de ensayo usadas en el presente documento, CHIR99021 fue el factor clave para acelerar la diferenciación neuronal, mientras que SU5402 y DAPT proporcionaron estímulos importantes, pero aditivos.

Además, los 3 componentes de la composición 3i son necesarios para obtener el máximo rendimiento de las neuronas diferenciadas (figura 2G).

**B. Las células madre de la cresta neural se derivaron de células puestas en contacto con LSB (D0) puestas en contacto además con CHIR (D2).**

Los autores descubrieron que la señalización de BMP y la señalización de TGF- $\beta$  se optimizó para la inducción de la cresta neural a través de experimentos que usaron la retirada temprana de estos inhibidores respectivos. La señalización Wnt se activó a su vez junto con la inhibición de GSK3 $\beta$ , usando un inhibidor de GSK3 $\beta$  de molécula pequeña (CHIR99021). Por lo tanto, los autores descubrieron que una ventana estrecha (día 2) de señalización Wnt gobierna la inducción de la cresta neural en el contexto del protocolo de inhibición dual de SMAD. Un protocolo de inhibición dual de SMAD modificado (LSB-C) que combinó la señalización optimizada para estas tres rutas mejoró la inducción de la cresta neural que expresa Sox10::GFP en hasta un 65 % de la población.

**IV. Las células artificiales SOX10+ inducidas por LSB-3i y LSB-C son capaces de producir células nociceptoras.**

El siguiente ejemplo describe el uso de métodos a modo de ejemplo para la diferenciación dirigida de células humanas genomanipuladas que expresan GFP, SOX10+.

Se contempla que las células nociceptoras surgen de dos tipos de intermedios celulares durante el desarrollo humano: específicamente se descubrió que las células de la cresta neural del embrión de pollo SOX10+ son capaces de generar células nociceptoras del tronco que flanquean a la médula espinal (George, et al., Nat Neurosci 10: 1287-1293, (2007), incorporado en el presente como referencia). Además, el tejido placoda de la cabeza de *Xenopus laevis* contribuyó a la población de células nociceptoras trigeminales en el tejido facial (Schlosser, et al., J Comp Neurol 418: 121-146, (2000); Schlosser, et al., Dev Biol 294: 303-351, (2006)).

Por lo tanto, para determinar si una cresta neural tiene un destino celular intermedio marcado por SOX10 (Aoki, et al., Dev Biol 259, 19-33, (2003); Lee, et al., Nat Biotechnol 25, 1468-1475, (2007),) en células humanas se observaría durante la diferenciación usando una línea de hPSC del cromosoma artificial bacteriano (BAC) SOX10::GFP transgénico. Esta línea celular SOX10::GFP (BAC) se generó con marcadores de genes de la cresta neural enriquecidos que coexpresaron con un gen GFP usando métodos previamente descritos (Placantonakis, et al., Stem Cells 27: 521-532, (2009),). La línea celular SOX10::GFP fue un subclon de la línea H9 hESC. Las células se disociaron y el suministro de genes se realizó usando reactivos (solución V), protocolo (B-16) y equipo de Amaxa. El ADN nucleofectado (transfectado en el núcleo) era un cromosoma artificial bacteriano (BAC) que contenía el gen SOX10 con un GFP insertado, obtenido del Gene Expression Nervous System Atlas [GENSAT] (número de acceso: GENSAT1-BX1086). El BAC se modificó para incluir un gen de resistencia a la neomicina para la selección (véase Tomishima, et al. Stem cells 25(1):39-45. Publicación en línea 21 de septiembre de 2006 (2007) usando recombinación cre/LoxP de un casete de selección extraído del Plásmido pL452 en el BAC del GENSAT. Después del suministro del gen, se sembraron hESC como células individuales en presencia de G418 para la selección de resistencia a la neomicina y los clones se seleccionaron manualmente y se cribaron para detectar la presencia de GFP tras la diferenciación. Las células GFP se clasificaron para confirmar la expresión de SOX10 y otros marcadores de cresta neural por qRT-PCR.

La expresión de GFP se midió mediante identificación FACS y clasificación de células SOX10:: GFP+ a los 4, 8, 12 y 16 días después de iniciar la diferenciación con LSB cuando se pusieron en contacto dos muestras duplicadas adicionales con una de LSB y luego CHIR99021 (LSB/C) o LSB con 3i.

Cuando CHIR99021 estaba presente, más del 70 % de estas células tratadas en cultivo se convirtió en SOX10::GFP+ en el día 12 de diferenciación para las condiciones de cultivo (70 % para LSB/C y 80 % para LSB3i; figuras 5D y E). Este resultado indicó que la mayoría de las células desarrollan una identidad de cresta neural, lo que respalda la observación de que se requería CHIR99021 para la generación de células nociceptoras por LSB3i. Por lo tanto, la inhibición combinada por estas pequeñas moléculas que inhibieron los receptores de receptores de tirosina cinasa y la señalización de Notch, además de ponerse en contacto con SU5402 y DAPT, respectivamente, aceleraron el destino de las células de la cresta neural, ya que las células tratadas con LSB3i adquirieron un destino de cresta neural más rápidamente en comparación con hPSC tratadas con LSB/C (figuras 5D y E). Los autores contemplaron que CHIR indujo la cresta neural y las neuronas sensoriales, mientras que SU aceleró la expresión del marcador de la cresta neural y la diferenciación neuronal. Finalmente, los autores contemplaron que DAPT en combinación con CHIR y SU aceleraba la diferenciación neuronal. Además, el uso de CHIR99021 en combinación con LSB, es decir, LSB/C dio como resultado una tasa de conversión más lenta de más del 60 % de las células neuronales Nestina-TUJ1+ en comparación con LSB3i entre los días 12 y 16 cuando se utilizaron las células SOX::GFP genomanipuladas como una lectura.

**V. Las células nociceptoras humanas NTRK1+ producidas por los métodos descritos en el presente documento mostraron respuestas electrofisiológicas similares a las células nociceptoras de rata in situ.**

El siguiente ejemplo describe el uso de métodos a modo de ejemplo para determinar la capacidad funcional de las células nociceptoras producidas por los métodos descritos en el presente documento.

5 Las células tratadas con LSB3i se examinaron para determinar su función, fases de maduración y comportamientos para confirmar que las neuronas derivadas por LSB3i eran células neuronales nociceptoras auténticas. Después de que el tratamiento con LSB3i de células madre pluripotentes dio como resultado células nociceptoras, se obtuvieron cultivos a largo plazo a partir de una densidad de siembra en placas de 10-100.000 células/cm<sup>2</sup> y se pasaron el día 10, 30 días en cultivo en medio N2 suplementado con beta NGF, BDNF y GDNF humanos (véase el ejemplo I para detalles adicionales). Se descubrió que la tasa de supervivencia de estas células en condiciones de cultivo a largo plazo es dependiente de NGF compatible con el estado de nociceptor NTRK1+. Los nociceptores de LSB3i expresaron altos niveles de TUJ1, ISL1, BRN3A (figura 7A-C) como se ha mostrado anteriormente, además de glutamato (figura 7C). La producción de glutamato fue coherente con una neurona glutamatérgica excitadora, es decir, una fibra aferente nociceptiva que libera glutamato, y el receptor de capsaicina TRPV1 (figura 7D), un importante canal iónico para el estímulo nocivo. El día 15 en cultivo se pudieron identificar dos procesos de crecimiento distintos para cada neurona (figura 7E, figura 12).

El marcador de dendrita MAP2 se expresó principalmente en una de las dos prolongaciones de forma polarizada (figura 7F). La naturaleza bipolar de las neuronas concordaba con el papel de la neurona sensorial en los ganglios periféricos con el cuerpo celular se encuentra en las prolongaciones de proyección del ganglio de la raíz dorsal tanto hacia la médula espinal como hacia la periferia (Woolf, et al., *Neuron* 55, 353-364, (2007); George, et al., *Nat Neurosci* 10, 1287-1293, (2007),).

En presencia del factor de crecimiento nervioso (NGF), las neuronas se cultivaron a largo plazo (por ejemplo, las células se pasaron el día 10 y se cultivaron hasta el día 30). El LSB se retiró el día 5, 3i se retiró de las células el día 10 cuando se añadieron NGF/GDNF/BDNF al medio. Las neuronas fueron alimentadas con NGF/GDNF/BDNF desde el día 10 hasta el día 30. El día 30, el número de días desde el tratamiento inicial con LSB, se observó que las neuronas comenzaron a autoorganizarse en estructuras similares a los ganglios. Este tipo de morfología es común a las neuronas sensoriales periféricas (Marmigere, et al., *Nat Rev Neurosci* 8, 114-127, (2007),) (figuras 7G, H e I).

30 Los nociceptores maduros son normalmente peptidérgicos o no peptidérgicos, dependiendo de la expresión de neuropéptidos, tales como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la sustancia P (un neuropéptido) expresada por las neuronas sensoriales peptidérgicas, (Woolf, et al., *Neuron* 55, 353-364, (2007),). Por el contrario, las neuronas no peptidérgicas no expresan CGRP ni la sustancia P y tienen otros marcadores, tales como la unión a la lectina IB<sub>4</sub>.

35 Por lo tanto, las neuronas inducidas por LSB3i se clasificaron para la expresión de NTRK1 (véanse los métodos descritos anteriormente), usando FAC, en poblaciones NTRK1+ y NTRK1- (por ejemplo, de una célula clasificada, véase, figura 7G. Las células NTRK1+ fueron positivas tanto para sustancia P como para CGRP lo que indica principalmente un fenotipo de nociceptores peptidérgicos (figuras 7H e I; día 30 de diferenciación).

40 Una característica distintiva funcional primaria de la identidad de la neurona sensorial (es decir, la función) es su firma electrofisiológica (Fang, et al., *J Physiol* 565, 927-943, (2005),). Las neuronas clasificadas NTRK1+ también se probaron mediante técnicas electrofisiológicas estándar para neuronas cultivadas (Placantonakis, et al. *Stem Cells*. 2009, la figura 5 tiene un ejemplo)

45 Las células NTRK1+ exhibieron un potencial de acción (AP) característico único, firma electrofisiológica, patrón de activación con un potencial de reposo de membrana promedio de 67 ± 4 mV para el día 21 después del tratamiento inicial con LSB3i. La cronología de AP resultante y la forma de la curva de acción en las neuronas humanas LSB3i se muestran en la figura 7J, (véase la línea roja gruesa) y la tabla 1 a continuación. Estos resultados fueron similares a los descritos previamente en informes electrofisiológicos de nociceptores primarios de ratas adultas anestesiadas (Fang, et al., *J Physiol* 565, 927-943, (2005),).

**Tabla 1: electrofisiología de células cultivadas con LSB3i humanas en comparación con neuronas de ganglio de la raíz dorsal nociceptivas y no nociceptivas de rata *in vivo*.**

Potencial de acción	Células de LSB3i	Células nociceptoras*	Células mecanorreceptoras*
Duración en la base (milisegundos; ms)	9,5	6	2
Tiempo de ascensión (milisegundos; ms)	3,8	2	0,8
Tiempo de caída, Tussman y Misc. (milisegundos; ms)	5,8	3,5	1

55

(continuación)

Potencial de acción	Células de LSB3i	Células nociceptoras*	Células mecanorreceptoras*
Sobreimpulso (milivoltios; mV)	29	22,5	5
Recuperación del 80 % (milisegundos; ms)	15,1	21	5

\* Fang, et al., J Physiol 565.3:927-943 (2005).

## VI. El análisis de expresión génica global muestra una cronología a modo de ejemplo de expresión génica.

- 5 El siguiente ejemplo describe el uso de métodos a modo de ejemplo para determinar la expresión génica global de las células nociceptoras y otros tipos de células producidas por los métodos descritos en el presente documento.

El análisis de la expresión génica global se realizó a una resolución temporal fina (días 2, 3, 5, 7, 9 y 15, número de acceso del NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) GSE26867; tanto para hPSC tratadas con LSB como con LSB3i para caracterizar aún más el momento de los eventos (es decir, expresión de marcador) durante el proceso de diferenciación inducida. Cuando se analizaron marcadores de selección para neuroectodermo, cresta neural, neuronas y nociceptores (véase la tabla 2 a continuación), se pudieron observar distintas fases de diferenciación para cada uno (figura 10).

- 15 **Tabla 2: expresión génica asignada a fases específicas de diferenciación durante la diferenciación dirigida después del contacto con LSB-3i. Véase también, figura 10A.**

Fases de diferenciación	Genes expresados
Neuroectodermo	PAX6, OTX2, DLK1, DKK1, CUZD1
Cresta neural	SOX10, MSX1, ID2, AP2B, ETS1, FOXD3
Neurona	NGN1, DCX, TUBB3, SYT4, STMN2, INA, GAP43, ISL1, POU4F1
Nociceptor	TAC1, VGLUT2, SLC15A3

- 20 Este análisis de expresión génica (figura 10B, C y tabla 2 anterior) fue coherente con la mayoría de los resultados de inmunofluorescencia. Por ejemplo, el análisis génico mostró que en las neuronas en maduración, los genes ISL1, POU4F1 (BRN3A), SOX10, TAC1 (pro-péptido para la sustancia P), NTRK1 y el transportador vesicular de glutamato VGLUT2 estaban todos regulados positivamente (es decir, el número de células en cultivo aumentó la expresión de estos marcadores con el tiempo). Al mismo tiempo, mientras se observaba que estos marcadores aumentaban en las células inducidas, se observaba que los marcadores para el neuroectodermo primitivo derivado de hESC estaban regulados negativamente (es decir, expresados en menos células en cultivo), en particular DLK1, LHX2, OTX2, LEFTY2, PAX6 y HES5.

- 25 Sin embargo, la expresión de somatostatina (SST) y SOX10 se descubrió en el día 15 en cultivos celulares tratados con LSB3i, que se espera que se exprese en nociceptores maduros. Sin embargo, la SST también se mostró expresada en neuronas sensoriales en desarrollo. Por lo tanto, los autores contemplaron que este marcador indicaba la presencia de células inmaduras en el día 15. Aunque regulada negativamente en cierta medida, la expresión de SOX10 también se observó en un momento en que la mayoría de las células parecían ser neuronas. Este hallazgo fue inesperado ya que se esperaba que SOX10 se regulara negativamente a medida que las células se diferencian en neuronas. Este hallazgo inesperado de la expresión de SST y SOX10 en células de los cultivos del día 15 se contempló como que no todas las células se convirtieron en nociceptores, aproximadamente el 20-30 %. Esto indicó que otros tipos de células maduras (tales como las células de Schwann) continúan expresando SOX10.

- 30 Cultivos celulares de neuroectodermo primitivo derivados de hESC producidos por inhibición dual de SMAD en Chambers, et al., Nat Biotechnol 27, (2009); Fasano, et al., Cell Stem Cell 6, 336-347, (2010), demostraron una alta expresión de los genes DLK1, LHX2, OTX2, LEFTY2, PAX6 y HES5. De forma análoga, se observó una alta expresión similar para estos genes cuando se produjeron cultivos de células de neuroectodermo primitivo derivadas de hESC por inhibición dual de SMAD usando LSB (véase las figuras 10B, C y la tabla 3 a continuación). Estos genes se redujeron durante el tratamiento con LSB3i mientras producían nociceptores durante el desarrollo.

**Tabla 3: cronología de la expresión génica durante la diferenciación dirigida con LSB-3i en comparación con LSB.**

Diferenciación por LSB-3i en comparación con control con LSB	Genes regulados positivamente	Genes regulados negativamente
Día 7	ISL1, POU4F1 (BRN3A), SOX10, NTRK1, y el transportador vesicular de glutamato VGLUT2	DLK1
Día 9	ISL1, POU4F1 (BRN3A), SOX10, NTRK1, y el transportador vesicular de glutamato VGLUT2	DLK1 y PAX6
Día 15	ISL1, POU4F1 (BRN3A), SOX10, TAC1 (pro-péptido para la Sustancia P), y el transportador vesicular de glutamato VGLUT2	DLK1, LHX2, OTX2, LEFTY2, PAX6 y HESS

Además, el análisis del transcriptoma temporal proporcionó evidencia adicional del destino de las células intermedias nociceptoras, distinto de las células mecanoreceptoras y las células propioceptoras. Las proteínas básicas de neurogenina hélice-bucle-hélice median dos ondas secuenciales de neurogénesis en los ganglios de la raíz dorsal durante el desarrollo del ratón (Marmigere, et al., Nat Rev Neurosci 8, 114-127, (2007); Ma, et al., Genes Dev 13, 1717-1728 (1999),). La primera onda, marcada por NEUROG2 (Neurogenina-2) da lugar a las células mecanoreceptoras y las células propioceptoras, y la segunda marcada por NEUROG1 (Neurogenina-1) da lugar a las células nociceptoras. Cuando las hPSC se tratan con LSB, la expresión de NEUROG2 es fuertemente inducida en el día 7 (figura 10C y tabla 4 a continuación). Por el contrario, las hPSC tratadas con LSB3i muestran una inducción menos pronunciada de NEUROG2 en el día 7 pero una inducción selectiva de NEUROG1 en el día 9 (figura 10C).

**Tabla 4: cronología de la expresión génica durante la diferenciación dirigida con LSB-3i en comparación con LSB.**

genes básicos de neurogenina hélice-bucle-hélice expresados en hPSC tratadas	Día 7	Día 9
LSB-3i	Sin diferencia en NEUROG1 en comparación con células de control con LSB Sin cambios en el % de células que expresan NEUROG2	Inducción por NEUROG1 Sin cambios en el % de células que expresan NEUROG2
Control con LSB	Sin diferencia en la inducción por NEUROG1 NEUROG2	Sin diferencia en NEUROG1 Regulación negativa de NEUROG2

**VII. Cultivo a gran escala contemplado usando composiciones y métodos para proporcionar células nociceptoras a modo de ejemplo.**

La siguiente descripción contemplada muestra métodos y usos a modo de ejemplo para la producción a gran escala de células nociceptoras producidas por los métodos descritos en el presente documento.

La generación escalable (es decir, métodos contemplados para tener éxito para generar células nociceptoras a partir de ambos cultivos que contienen un número relativamente pequeño de células, por ejemplo,  $1,5 \times 10^4$  células/pocillo de placas de 48 pocillos, como se ha descrito en los Ejemplos, *supra*), y contemplados para  $5 \times 10^3$  células/pocillo en una placa de 96 pocillos, hasta cultivos en grandes lotes de nociceptores derivados de hPSC, (por ejemplo,  $1 \times 10^7$  -  $1 \times 10^8$  células en lotes de 18 placas de 15 cm (aproximadamente  $5,5 \times 10^7$  células), utilizando LSB3i. Estos métodos están contemplados para proporcionar células nociceptoras derivadas de hPSC para su uso en ensayos de compuestos para su uso en estudios de biología básica y para el descubrimiento de fármacos aplicables a aplicaciones médicas en seres humanos y animales. En particular, los autores contemplan el uso de composiciones y métodos para tratamientos para reducir el dolor agudo y crónico en seres humanos y animales.

En particular, se contemplan cultivos en grandes lotes en los que se cultivan  $1 \times 10^8$  -  $1 \times 10^9$  células hPSC a modo de ejemplo en cultivos de cuerpos embrioides por lotes usando medio de cultivo y compuestos a modo de ejemplo como se describe en el presente documento para proporcionar células nociceptoras a modo de ejemplo, por ejemplo, células nociceptoras peptidérgicas, en intervalos no limitantes a modo de ejemplo de  $7 \times 10^7$  -  $7 \times 10^8$  (en el que se contempla una eficiencia del 70 % de la recolección de células nociceptoras). Se contempla que las células nociceptoras a modo de ejemplo expresen genes (es decir, ARNm y proteína) que identifican células nociceptoras, tales como TAC1, VGLUT2 y SLC15A3. Se contemplan que células nociceptoras a modo de ejemplo expresan marcadores de identificación, tales como ISL1, BRN3A, RET, RUNX1, Sustancia P, CGRP, etc.

En resumen, los autores contemplan el uso de composiciones y métodos para proporcionar plataformas novedosas



en biología básica y descubrimiento de fármacos para el estudio y tratamiento de afecciones asociadas con las células nociceptoras, en particular el dolor, en seres humanos y animales.

#### **VIII. Derivación de melanocitos a partir de células madre pluripotentes humanas: LSB-Mel. LDN-193189, SB431542, CHIR99021, EDNR3 y BMP**

Los melanocitos son células productoras de pigmentos que se encuentran predominantemente en la epidermis, donde establecen una barrera fotoprotectora contra el daño del ADN inducido por la radiación UV. Los defectos en la biología de los melanocitos están asociados con una serie de trastornos de pigmentación que incluyen albinismo, vitíligo y piebaldismo. Los melanocitos son la célula de origen del melanoma maligno. Sin embargo, la comprensión/tratamiento de estos trastornos está limitada por la falta de sistemas experimentales adecuados para el estudio de melanocitos humanos in vitro.

Durante el desarrollo, se descubrió un protocolo que causó la diferenciación rápida y altamente eficiente de las células pluripotentes humanas en precursores de células neurales y precursores de la cresta neural (NC). Debido a que los melanocitos de la piel se derivan de los precursores de las células de la cresta neural, los autores descubrieron formas de usar células de linaje de células de la cresta neural derivadas de LSB-C para dirigir la diferenciación a lo largo del linaje de melanocitos en melanocitos maduros.

En otras palabras, las ESC pluripotentes (células madre embrionarias) fueron inducidas a convertirse en células precursoras de la cresta neural (LSB-C) que fueron inducidas a convertirse en progenitores de melanocitos y luego inducidas a convertirse en melanocitos diferenciados. Esta progresión se modelizó como una especificación progresiva a lo largo del linaje melanocítico, desde ESC pluripotentes pasando por precursor de la cresta neural, hacia progenitores de melanocitos más comprometidos antes de establecer un estado terminalmente diferenciado (véase el esquema que muestra marcadores a modo de ejemplo para cada una de estas fases en la figura 16). Los autores contemplan el uso de estos melanocitos diferenciados dirigidos en ensayos novedosos para identificar mecanismos moleculares del desarrollo de melanocitos. En particular, los autores contemplan ensayos que usan estos melanocitos diferenciados dirigidos en combinación con un enfoque recientemente establecido para derivar células madre pluripotentes inducidas específicas del paciente (iPSC). Se contempla que estos melanocitos diferenciados dirigidos novedosos generan ensayos para modelos de enfermedad humana relacionados con los melanocitos, tales como albinismo, vitíligo, piebaldismo, melanoma y melanoma maligno, etc.

#### **A. Derivación de la cresta neural de los ESC humanas (una primera etapa en la diferenciación dirigida para producir melanocitos).**

Los melanocitos surgen de una población migratoria transitoria de células exclusivas de los vertebrados conocida como la cresta neural (NC) que surge durante la gastrulación en el límite entre el ectodermo neural y no neural. La cresta neural multipotente se diferencia en una amplia gama de derivados determinados, en parte, por la ubicación anatómica (nivel axial) de la célula de NC.

Evidencia considerable en la bibliografía identificó la señalización de Wnt, BMP y TGF- $\beta$  como requisitos clave en la especificación temprana de la cresta neural. De estas, las dos últimas rutas son activamente inhibidas por el tratamiento de molécula pequeña de un protocolo de inhibición dual de SMAD. Como se describe en el presente documento, los autores descubrieron que la señalización de BMP y TGF- $\beta$  se optimizó para la inducción de la cresta neural a través de la retirada temprana de sus respectivos inhibidores. Además, como se describe en el presente documento, el uso de un inhibidor de GSK3 $\beta$  de molécula pequeña (CHIR99021) que a su vez activó la señalización Wnt se descubrió que produce poblaciones que expresan marcadores de células madre de la cresta neural cuando se añade a las células tratadas con LSB en el día 2 de tratamiento. Por lo tanto, se usó un protocolo de inhibición dual de SMAD modificado que combina la señalización optimizada para las tres rutas en la línea celular *Sox10::GFP* y se descubrió que mejora la inducción de la cresta neural que expresa *Sox10::GFP* al 65 % de la población (tratamiento con LSB-C).

#### **B. Especificación de linaje y aislamiento de melanoblastos derivados de la cresta neural.**

La NC que expresa *Sox10::GFP* derivada con LSB-C se ensayó después para determinar la competencia a lo largo del linaje de melanocitos. A través de la identificación de células que coexpresan *Sox10::GFP* y MITF, un marcador expresado pero no exclusivo del linaje de melanocitos, se confirmó la presencia de supuestos precursores de melanocitos el día 11 del protocolo de diferenciación modificado (LSB-C) (figura 13A).

Se necesitaba un marcador de superficie celular que permitiera la identificación de los linajes de melanocitos para optimizar aún más la inducción de estas poblaciones de células y, posteriormente, aislar o purificar tipos específicos de precursores de melanocitos. Después de una búsqueda bibliográfica, se identificó c-kit como un marcador candidato para los presuntos precursores de melanocitos. Los marcadores para c-kit ensayados en las células *Sox10::GFP* + confirmaron la presencia de un bajo porcentaje (aproximadamente el 9 %) de células que coexpresan *Sox10::GFP/c-kit* (figura 13B) que enriqueció enormemente la expresión de marcadores tempranos de melanocitos (figura 13C). La optimización adicional del protocolo de diferenciación reveló que la abundancia de células positivas dobles para *Sox10::GFP/c-kit* se aumentó casi cuatro veces a través de un tratamiento adicional con BMP4 y Endotelina-3 (LSB-

Mel, figura 13D-E), dos factores implicados en la especificación de melanocitos.

### C. Expansión y maduración de melanocitos.

5 Los autores descubrieron que los presuntos precursores de melanocitos pueden madurar a un estado pigmentado después de tan solo seis días adicionales en el cultivo posterior a la clasificación (figura 14A-B). Sorprendentemente, las poblaciones dobles positivas y simples positivas para Sox10::GFP/c-kit para cada uno de los dos marcadores dieron lugar a células pigmentadas, aunque con una cinética diferente (figura 14C), lo que indica una jerarquía de linaje entre las tres poblaciones (cKit+/SOX10-, cKit-/SOX10+, cKit+/SOX10+). La identificación de estas 3 células de linaje de melanocitos se contempló para permitir el aislamiento de intermedios de diferenciación a lo largo del linaje de melanocitos.

15 Con el uso de estas células precursoras de melanocitos, se identificaron las condiciones óptimas de maduración capaces de inducir y soportar células que poseen fenotipos de melanocitos maduros usando una gran cantidad de compuestos contemplados para soportar dicha maduración. Las características de los melanocitos evaluados incluyeron la inducción de la morfología del huso, la pigmentación y la formación de melanosomas.

20 La adición de BMP4 y cAMP al medio de cultivo promovió una morfología y pigmentación maduras en forma de huso (figura 14D). Se obtuvieron cultivos puros de melanocitos cuando las células se propagaron durante ocho semanas (a largo plazo) en medios de cultivo que contenían SCF, EDN3, FGF, Wnt (CHIR), BMP4 y cAMP sobre la base de la expresión de los marcadores de melanocitos maduros MITF, SOX10, Tyrp1 y HMB45 (figura 15A). Se observó un sedimento oscuro cuando se centrifugaron células LSB-MEL a largo plazo para estimar la concentración de pigmento (figura 15B). La caracterización ultraestructural microscópica electrónica de melanocitos maduros reveló la presencia de numerosos melanosomas de pigmento oscuro en el citoplasma de los melanocitos derivados de LSB-Mel (figura 25 15C) en diversas fases de desarrollo (figura 15D).

### D. Los melanocitos se derivan de células madre pluripotentes humanas: LSB-melanocitos (LSB-Mel).

30 A continuación se describen composiciones y métodos a modo de ejemplo para proporcionar melanocitos para su uso en modelos de enfermedades relacionadas.

35 Se generó una línea informadora de células madre embrionarias humanas (hESC) del cromosoma bacteriano artificial (BAC) Sox10::GFP que permitió monitorizar la inducción de células de la cresta neural *in vitro* ya que esta línea celular responde al contacto con moléculas pequeñas. Sox10 fue el marcador temprano más robusto de células madre de la cresta neural multipotentes y también se encontró expresado en algunos derivados de la cresta neural, incluidos los progenitores de melanocitos. Este sistema informador se usó para identificar y aislar prospectivamente las poblaciones de crestas neurales en el desarrollo de un esquema de diferenciación dirigida con el fin de producir cultivos de melanocitos con mayor pureza y números que los obtenidos con esquemas de maduración previos (figura 14, LSB-C).

40 En un protocolo de inhibición dual de SMAD (Chambers, et al. *Nat. Biotech.* (2009),), las células madre pluripotentes humanas (hPSC) tratadas con dos moléculas pequeñas para inhibir la señalización de SMAD produjeron eficientemente tejidos neurales del SNC. Además, cuando se sembró en placas hESC a densidades más bajas, se observaron niveles bajos de inducción espontánea de células de la cresta neural (por ejemplo, se observaron aproximadamente un 3 % de células del tipo de la cresta neural Sox10::GFP+). Sin embargo, para su uso en investigación y estudios médicos, se necesitaban un mayor número de células del tipo de la cresta neural. Además, para la investigación de melanocitos, era necesaria una población más pura con un mayor número de células que no recibieran la diferenciación espontánea de bajo nivel.

50 Durante el desarrollo, los autores descubrieron métodos para optimizar el protocolo de inhibición dual de SMAD para la inducción de la cresta neural de una manera que produciría rendimientos muy puros de precursores de melanocitos, melanocitos en maduración y melanocitos maduros.

55 Específicamente, se desarrolló la siguiente línea temporal de condiciones de cultivo que produjeron melanocitos. Alimentación los días 0 y 1 con LDN y SB (usando los mismos intervalos de concentración que LDN y SB en los métodos que comprenden 3i); Alimentación el día 2 con LDN, SB, CHIR (usando los mismos intervalos de concentración que LDN, SB y CHIR en los métodos que comprenden 3i como se describe en el presente documento); En una realización, alimentación el día 3 con SB, CHIR (usando los mismos intervalos de concentración que SB y CHIR en los métodos que comprenden 3i como se describe en el presente documento), en otra realización alimentación el día 3 con LDN, SB, CHIR (usando los mismos intervalos de concentración que LDN, SB y CHIR en los métodos que comprenden 3i como se describe en el presente documento); Alimentación en el día 4 y 5 con CHIR (usando los mismos intervalos de concentración que CHIR en los métodos que comprenden 3i como se describe en el presente documento); Alimentación en los días 6 a 11 con CHIR, BMP4 y EDN3 (usando los mismos intervalos de concentración que CHIR en los métodos que comprenden 3i como se describe en el presente documento, véanse los 65 intervalos de concentración a continuación para BMP4 y EDN3). El día 11, las células se pasaron y se alimentaron con medios MEL (incluido CHIR) hasta 8 semanas.

Los medios MEL enriquecieron los melanocitos de tal manera que a las 8 semanas los cultivos celulares mostraron hasta el 100 % de una población pura. Así, este método/protocolo LSB-MEL tenía una alta eficiencia en la producción de melanocitos. Durante el desarrollo de los melanocitos, el ácido linoleico era al menos un ingrediente requerido en el medio MEL (véase la figura 16).

Durante el desarrollo de los melanocitos, se observaron múltiples fases precursoras en el siguiente orden: células madre de la cresta neural, células madre embrionarias gliales-de melanoblastos, células madre de melanocitos adultos, melanocitos, véase, esquemas a modo de ejemplo en la figura 13. Figura 13. Especificación y aislamiento de progenitores de melanocitos/melanoblastos. El protocolo LSB-C de 11 días soportó la derivación de *Sox10::GFP*, MITF coexpresando progenitores de melanocitos (A, panel derecho). Se observaron poblaciones positivas únicas de MITF (A, panel izquierdo). c-Kit fue identificado como un marcador potencial de progenitores de melanocitos. Se observó un bajo porcentaje de células que coexpresan *Sox10::GFP*, c-kit después de la diferenciación de LSB-C (B, población naranja). El análisis por qRT-PCR confirmó el enriquecimiento de los marcadores de melanocitos MITFM (una proteína básica de hélice-bucle-hélice-cremallera de leucina) y Dct (dopacromo tautomerasa (dopacromo delta-isomerasa, proteína relacionada con la tirosina 2)) en la población doble positiva (C). El tratamiento con BMP4 y EDN3 ("LSB-Mel") mejoró la inducción de la población de progenitores de melanocitos supuestos positivos dobles *Sox10::GFP*, c-kit (D). Las células doble positivas *Sox10::GFP*, c-kit aisladas después del tratamiento con LSB-Mel exhibieron niveles significativamente más altos de marcadores de melanocitos MITFM y Dct (E). Las barras de error representan s.e.m. \* p<0,05.

Figura 14. Expansión y maduración de precursores de melanocitos.

Resumen de condiciones de diferenciación (A). Después de la especificación en condiciones de LSB-C con BMP4 y EDN3 (LSB-Mel) las células se clasificaron el día 11 y se volvieron a sembrar en placas. Las células post-clasificación (PS) se mantuvieron en medios de maduración que contenían ligando c-kit (SCF), endotelina 3 (EDN3), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y activadores de Wnt. Las células pigmentadas observadas por microscopía de campo claro en el día 6 PS fueron positivas para el marcador de melanocitos MITF pero parecían haber regulado negativamente el indicador *Sox10::GFP* (B). Todas las poblaciones, excepto las doble negativas *Sox10::GFP*, c-kit eventualmente dieron lugar a células que expresan MITF y grupos pigmentados macroscópicos, pero a tasas diferentes (C). El tratamiento con BMP4 y cAMP mejoró la diferenciación en células pigmentadas que exhiben una morfología similar a un huso típica de los melanocitos (D).

Figura 15. Caracterización de melanocitos maduros.

Las poblaciones puras de melanocitos maduros derivados del protocolo LSB-Mel mantienen la expresión de marcadores de melanocitos comunes, incluyendo MITF, *Sox10*, *Tyrp1* (proteína relacionada con la tirosinasa 1) y HMB45 después de más de 8 semanas en cultivo (A). Los melanocitos conservan su fenotipo pigmentado oscuro durante varias semanas en pase (B). Se sedimentaron  $1 \times 10^6$  células y se fotografiaron para evaluar los niveles de pigmentación. caracterización ultraestructural microscópica electrónica de melanocitos maduros (C, D). La presencia de numerosos melanosomas de pigmentación oscura en el citoplasma de los melanocitos derivados de LSB-Mel se observó por MET (C). Obsérvese la presencia y el depósito progresivo de pigmento de melanina con la maduración de las vesículas de melanosomas de las fases I a IV (D).

Por lo tanto, los autores demostraron que un protocolo de inhibición dual de SMAD, LSB, generó rápida y eficientemente poblaciones de cresta neural que expresan *Sox10::GFP* a partir de células madre embrionarias humanas. Este protocolo modificado apoyó la inducción de niveles bajos de progenitores de melanocitos, que se identificaron y aislaron prospectivamente mediante la expresión de c-kit. La inducción de estas células se mejoró aún más mediante el tratamiento con BMP4 y EDN3. Los progenitores de melanocitos se maduraron posteriormente a un estado pigmentado después de un cultivo adicional in vitro en presencia de BMP4 y cAMP.

Medio celular para LSB-MEL:

Medios Mel-1:		
NeuroBasal	Invitrogen 21103049	50 %
DMEM bajo en glucosa	Invitrogen 11885	30 %
MCDDB201	Sigma M6770	20 %
B27	Invitrogen 17504-044	2 %
ITS	Sigma I314	1 %
Ácido linoleico-BSA	Sigma L9530	1 %

(continuación)			
L-glut	Gibco 25030-164	250	nM
Dexametasona	Sigma D2915	0,05	uM
Toxina colérica	Sigma C8052	50	ng/ml
L-AA	Sigma A5960	100	uM
SCF	Peprotech 300-07	50	ng/ml
EDN3	American Peptide Company 88-5-10B	100	nM
FGF2	R&D 233-FB-001MG/CF	4	ng/ml
cAMP	Sigma D-0260	500	uM
BMP4	R&D 314-bp	25	ng/ml
Chir	Stemgent 04-0004	3	uM

<b>Día 6-11:</b>			
BMP4	R&D 314-bp	25	ng/ml
EDN3	American Peptide Company 88-5-10B	100	nM

Intervalos de concentración para BMP4 de R&D: se usan entre 10 ng/ml y 100 ng/ml (en una realización a 25 ng/ml), y se usa EDN de American Peptide Company a 25-300 nM (en una realización a 100 nM).

5 Figura 16. Muestra una formulación a modo de ejemplo de medio LSB-MEL que requirió ácido linoleico para el crecimiento de melanocitos. El componente de medio que se muestra por encima de las vistas microscópicas representa el componente de medio que queda fuera de la formulación; Ph = contraste de fase; BF = campo claro. Un esquema a modo de ejemplo muestra marcadores progenitores de melanocitos usados para identificar células.

10 Así, los autores descubrieron y desarrollaron un protocolo rápido y definido para la inducción de la cresta neural *in vitro*. Además, los autores usaron este protocolo rápido y definido para la inducción de células de la cresta neural *in vitro* para desarrollar composiciones y métodos para la diferenciación dirigida de estas células en melanocitos. Estos melanocitos fueron únicos en su capacidad para el cultivo a largo plazo y la producción continua de eumelanina.

15 Por lo tanto, se contempla la derivación de melanocitos a partir de células madre embrionarias humanas (hESC) para proporcionar una herramienta valiosa para futuras investigaciones sobre la biología de la enfermedad de los melanocitos.

## PARTE EXPERIMENTAL

20 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar determinadas realizaciones y aspectos y no deben interpretarse como limitantes del alcance. En las divulgaciones experimentales que siguen, se aplican las siguientes abreviaturas: N (normal); M (molar); mM (milimolar);  $\mu$ M (micromolar); mol (moles); mmol (milimoles);  $\mu$ mol (micromoles); nmol (nanomoles); pmol (picomoles); g (gramos); mg (miligramos);  $\mu$ g (microgramos); ng (nanogramos); pg (picogramos); l (litros); ml (mililitros);  $\mu$ l (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros);  $\mu$ m (micrómetros); nm (nanómetros); U (unidades); min (minuto); s y seg (segundo); grad (grado); pen (penicilina), estrep (estreptomicina) y °C 10 (grados centígrados/Celsius).

30 Las siguientes formulaciones describen un medio de cultivo celular a modo de ejemplo para su uso en realizaciones en desarrollo.

Medio hESC para mantenimiento (1 litro): 800 ml de DMEM/F12, 200 ml de reemplazo de suero Knockout, 5 ml de L-glutamina 200 mM, 5 ml de pen/estrep, 10 ml de MEM 10 mM solución de 15 aminoácidos no esenciales, 55  $\mu$ M de 13-mercaptoetanol y bFGF (la concentración final es de 4 ng/ml).

35 Medio KSR para diferenciación de hESC (1 litro): 820 ml de DMEM Knockout, 150 ml de reemplazo de suero Knockout, 10 ml de L-glutamina 200 mM, 10 ml de pen/estrep, 10 ml de MEM 10 mM y 55  $\mu$ M de 13-mercaptoetanol,

Medio N2 para diferenciación de hESC (1 litro): 985 ml de H<sub>2</sub>O dest. con polvo de DMEM/F12, 1,55 g de glucosa (Sigma, n° de cat. G7021), 2,00 g de bicarbonato de sodio (Sigma, n° de cat. S5761), putrescina (alícuota de 100  $\mu$ l de 1,61 g disueltos en 100 ml de agua destilada; Sigma, n° de cat. P5780), progesterona (alícuota de 20  $\mu$ l de 0,032 g disueltos en 100 ml de etanol al 100 %; Sigma, n° de cat. P8783), selenito de sodio (alícuota de 60  $\mu$ l de solución 0,5 mM en agua destilada; Bioshop Canada, n° de cat. SEL888) y 100 mg de transferrina (Celliance/Millipore, n° de cat. 4452-01) y 25 mg de insulina (Sigma, n° de cat. I6634) en 10 ml de NaOH 5 mM.

40 Modificación por Dulbecco de medio Eagle (DMEM), con FBS al 10 % para preparar PMEF ((células alimentadoras de fibroblastos de embrión primario de ratón (PMEF)) (1 litro): 885 ml de DMEM, 100 ml de FBS, 10 ml de pen/estrep y 5 ml de L-glutamina.

45 Medio mínimo esencial alfa (MEM) con FBS al 10 % para preparar medio de células alimentadoras MS-5 (1 litro): 890 ml de MEM alfa, 100 ml de FBS, 10 ml de solución en gelatina de pen/estrep (500 ml): disolver 0,5 g de gelatina en 500 ml de agua tibia (50-60 °C) Milli-Q. Enfriar a temperatura ambiente.

**EJEMPLO de referencia I****Materiales y métodos**

5

Los siguientes ejemplos describen materiales y métodos a modo de ejemplo usados durante el desarrollo.

5 Células y condiciones de cultivo. Las células madre embrionarias humanas (hESC) (WA-09; pases 32-50) y las líneas hiPSC (C14, C72; pases 10-20) se cultivaron con fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, Globalstem, Rockville, Estado de Maryland, Estados Unidos de América (EE. UU.)) pre-sembradas en placas a 12-15.000 células/cm<sup>2</sup>. Se generaron líneas de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) como se informó (Papapetrou, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 106, (2009).). Se preparó medio que contiene Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)/F12, 20 % de reemplazo de suero Knockout, L-glutamina 1 mM (Invitrogen, Carlsbad, Estado de California, EE. UU.), aminoácidos MEM no esenciales (Invitrogen) 100 µM y β-mercaptoetanol 0,1 mM (Invitrogen). Se añadieron 6 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2, R&D Systems, Mineápolis, estado de Minnesota) después de la filtración estéril y las células se alimentaron diariamente y se pasaron semanalmente usando dispa 6 U/ml (Worthington Biochemical, Lakewood, Estado de Nueva Jersey, EE. UU.). La línea celular de cromosoma artificial bacteriano *SOX10::GFP* se generó como se informó (Placantonakis, et al., Stem Cells 27, 521-532, (2009).).

10 Inducción neural y de nociceptores. La inducción neural se realizó como se informó anteriormente (Chambers, et al., Nat Biotechnol 27, (2009).). En resumen, las células se recogieron y después se convirtieron en una suspensión de células individuales usando ACCUTASE (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, Missouri, EE. UU.) y se sembraron en placas sobre gelatina durante 30 minutos para eliminar las células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) (los MEF se adhieren a la placa recubierta de gelatina). Las células no adherentes se recogieron y se sembraron en placas sobre placas tratadas con matrigel a una densidad de 20-40.000 células/cm<sup>2</sup> en presencia de medios hESC acondicionados con MEF que contenían FGF-2 10 ng/ml y Y-27632 10 µM (inhibidor de rho-cinasa-Tocris Bioscience). La diferenciación neural se inició cuando las células eran confluentes usando medios de reemplazo de suero Knockout (KSR) que contenían 820 ml de DMEM Knockout, 150 ml de reemplazo de suero Knockout, L-glutamina 1 mM, aminoácidos MEM no esenciales 100 µM y β-mercaptoetanol 0,1 mM. Para inhibir la señalización de SMAD, se añadieron LDN-193189 100 nM y SB431542 10 µM diariamente desde el día 0 (cuando se añadieron los inhibidores de señalización de SMAD LSB) hasta el día 5. Las células se alimentaron diariamente (es decir, 6 alimentaciones con inhibidores, D0, D1, D2, D3, D4 y D5), y los medios N2 se añadieron al medio inicial en incrementos de 25 % cada dos días a partir del día 4 (hasta el 100 % de N2 en el día 10). La inducción de nociceptores se inició mediante la adición de los tres inhibidores (a menos que se indique lo contrario) a CHIR99021 3 µM, SU5402 10 µM y DAPT 10 µM diariamente desde los días 2 al 10. Después del día 10, los medios de cultivo a largo plazo consistieron en medios N2 que contenían 10-100 ng/ml de factor de crecimiento nervioso β humano (NGF), 10-100 ng/ml de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y 10-100 ng/ml de factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF).

20 Microscopía, anticuerpos y citometría de flujo (FACS). Las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se permeabilizaron con Triton X al 0,5 % en PBS y se bloquearon con BSA albúmina de suero bovino al 1 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Para la tinción de glutamato, se añadió glutaraldehído al 0,05 % al fijador. Los anticuerpos primarios utilizados para la microscopía incluyeron PAX6; gen de caja emparejada 6 (aniridia, queratitis) (Covance, Princeton, Nueva Jersey, EE. UU.), TUJ1; Beta-tubulina clase III específica de neurona (Covance, Princeton, Nueva Jersey, EE. UU.), Ki67; Antígeno KI-67; MKI67 (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, Missouri, EE. UU.), ISL1 (Developmental Studies Hybridoma Bank; DSHB), BRN3A; Proteína 3A de dominio homeobox/POU específica del cerebro (Chemicon, Billerica, Massachusetts, EE. UU.), RET; Proto-oncogén receptor de proteína tirosina cinasa (R&D), RUNX1; Factor de transcripción relacionado con Runt 1 (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, Missouri, EE. UU.), MAP2; Proteína 2 asociada a microtúbulos (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, Missouri, Estados Unidos de América), TRPV1; miembro 1 de la subfamilia V del canal de cationes del receptor de potencial transitorio, (Neuromics Inc., Mineápolis, Estados Unidos de América), Sustancia P (Neuromics Inc., Mineápolis, Estados Unidos de América), CGRP; péptido relacionado con el gen de la calcitonina (Neuromics Inc., Mineápolis, Estados Unidos de América). Para la citometría de flujo, las células se fijaron usando el kit BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences Pharmingen), en una realización, las células se fijaron adicionalmente en paraformaldehído al 4 %. Los anticuerpos conjugados primarios para citometría de flujo fueron NTRK1 (tirosina cinasa neurotrófica, receptor, tipo 1)-APC (R&D Systems, Inc., Inc., Mineápolis, Minnesota, EE. UU.), Nestina-Alexa647 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, California, EE.UU.), TUJ1-Alexa488 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, California, EE. UU.).

35 Electrofisiología. Las células clasificadas positivas para tirosina cinasa neurotrófica, receptor, tipo 1 (NTRK1)+ se sembraron en placas de vidrio tratadas con poliornitina/laminina/fibronectina en los días 10-12 y se dejaron madurar durante 3 semanas adicionales en medios de cultivo a largo plazo. Los cubreobjetos se transfirieron a un líquido cefalorraquídeo artificial que contenía (en mM): 125 de NaCl, 2,5 de KCl, 1,25 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 de MgCl<sub>2</sub>, 2 de CaCl<sub>2</sub>, 25 de NaHCO<sub>3</sub>, 1,3 de ascorbato, 2,4 de piruvato y 25 de glucosa, burbujeado con el 95 % de O<sub>2</sub> y el 5 % de CO<sub>2</sub>) a temperatura ambiente. Se usó un microscopio de contraste de interferencia diferencial infrarrojo (DIC) (Olympus) equipado con iluminación de epifluorescencia, una cámara con dispositivo de carga acoplada y dos lentes de inmersión en agua (X10 y X60) para visualizar y dirigir los electrodos de grabación a las células. Los electrodos de grabación de vidrio (resistencia de 7-9 MΩ) se llenaron con una solución intracelular que consistía (en mM, pH 7,25) en gluconato de potasio 130 mM, KCl 16 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, EGTA 0,2 mM, HEPES 10 mM, Na<sub>2</sub>ATP 4 mM, Na<sub>3</sub>GTP 0,4 mM y Alexa-568 al 0,2 %. Las propiedades del potencial de acción a las corrientes umbral se determinaron a partir de registros de células después de la aplicación de una serie creciente de etapas de corriente de 300 ms de 25 pA. Las grabaciones

65

se recopilaron y analizaron usando el amplificador Axopatch 700B y el software pCLAMP10 (Molecular Devices, Sunnyvale, California, Estados Unidos).

Perfiles de expresión génica. El ARN total se aisló en los días 2, 3, 5, 7, 9 y 15 de diferenciación de hPSC tratadas con LSB o LSB3i usando Trizol LS. Las muestras fueron procesadas por el Centro de Genómica del Centro de Cáncer Memorial Sloan-Kettering (MSKCC) e hibridadas con el Illumina Human HT-12 v4 Expression BeadChip. Las medidas de normalización y expresión basadas en modelos se calcularon usando el paquete de análisis Illumina (LUMI) del proyecto Bioconductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)) con el lenguaje de programación estadística R (<http://cran.r-project.org/>). Los valores de expresión son  $\log_2$  del cambio en veces. El corte de comparación por pares fue significativo si el valor p corregido de prueba múltiple fue  $<0,05$ .

PCR cuantitativa en tiempo real. El ARN total se extrajo usando un kit RNeasy (Qiagen). Para cada muestra, 1  $\mu$ g de ARN total se trató por contaminación de ADN y se transcribió inversamente usando el kit Quantitect RT (Qiagen). El material amplificado se detectó usando sondas verdes Quantitect SYBR y el kit de PCR (Qiagen) en un Mastercycler RealPlex2 (Eppendorf). Todos los resultados se normalizaron a un control HPRT y son de 4-6 réplicas técnicas de 2-3 muestras biológicas independientes en cada punto de datos.

## EJEMPLO de referencia II

### La puesta en contacto de células madre pluripotentes humanas con SB431542 y LDN-193189 (LSB) produjo células de linaje neural.

El siguiente ejemplo describe métodos a modo de ejemplo para proporcionar células de un linaje neural para su uso durante el desarrollo.

La inhibición dual de SMAD se usaba anteriormente como un método rápido y altamente efectivo para inducir un tipo de células de linaje neural a partir de hPSC (Chambers, et al., Nat Biotechnol 27, (2009)). Estas células de linaje neural inducidas por moléculas que incluyen Nogina, tenían un ruta predeterminada que permitió el desarrollo en las células del sistema nervioso central, es decir, destino de células neurales. Los estudios de seguimiento informaron el uso de una molécula pequeña de dorsomorfinina (DM) en lugar de Nogina, que al menos en parte produjo células similares con diferencias en la consistencia de los cultivos (Kim, et al., Robust enhancement of neural differentiation from human ES and IPS cells regardless of their innate difference in differentiation propensity. Stem Cell Rev 6, 270-281, (2010); Zhou, et al., High-Efficiency Induction of Neural Conversion in hESCs and hiPSCs with a Single Chemical Inhibitor of TGF-beta Superfamily Receptors. Stem Cells, 504, (2010)).

Los autores observaron que las células generadas usando Nogina a pesar de mostrar la misma fase de desarrollo que las células tratadas con LDN, la expresión de la gran mayoría de los mismos marcadores, y capaces de un potencial de desarrollo similar para hacer varios linajes neurales, también mostraron diferencias, como ser más anteriores en un eje anterior-posterior (es decir, más prosencéfalo, más células expresan FOXG1 y similares) en comparación con las células neurales inducidas usando LDN. Por lo tanto, aunque se utilizó LDN en lugar de Nogina para inhibir BMP entre otras rutas de señalización, Nogina y LDN pueden tener otros tipos de actividades que son diferentes, además de inhibir BMP.

En parte debido al alto coste del uso de Nogina, los autores contemplaron que el uso de un inhibidor de BMP podría sustituir a Nogina en la producción de células con destino de células neurales. Por lo tanto, se usó un inhibidor de BMP de molécula pequeña, LDN-193189, (Yu, et al., Nat Med 14, 1363-1369, (2008)) y se encontró durante el desarrollo para reemplazar a Nogina, en combinación con SB431542, para generar neuroectodermo primitivo de hPSC, células que tienen un destino de células neurales, es decir, células del SNC (figura 2A). Este tratamiento combinado se denominó LSB para la combinación de estos dos inhibidores LDN-193189 y SB431542.

## EJEMPLO de referencia III

### el cribado de pequeñas moléculas usando células de linaje neuronal dio como resultado compuestos que produjeron células neuronales bajas en PAX6 y altas en TUJ1.

El siguiente ejemplo describe el uso de células a modo de ejemplo de un linaje neural del ejemplo II para cribar compuestos candidatos de molécula pequeña para su uso en diferenciación dirigida.

Específicamente, en el contexto de la inhibición dual de SMAD (LSB), es decir, las células ES humanas se trataron primero con LSB (LDN-193189 y SB431542) para cribar compuestos candidatos (es decir, moléculas pequeñas) en aproximadamente 400 condiciones para encontrar combinaciones de moléculas pequeñas que podrían acelerar la adquisición de marcadores neuronales postmitóticos a partir de células ES humanas. Los compuestos candidatos se eligieron entre moléculas que se dirigían a (alteraban) las rutas de señalización celular que se sabe que son importantes y que se usan con frecuencia en estudios de desarrollo para determinar los destinos celulares (por ejemplo, rutas de señalización tales como FGF, Notch, WNT, SHH (Sonic Hedgehog), etc.) para determinar las células capaces de desarrollar el SNC. Como ejemplo, se ensayaron 4 tipos de inhibidores (es decir, SU/DAPT/CHIR/Ciclopamina) en diferentes combinaciones (como se alimentan a las células en medio celular) en diferentes días de tratamiento con LSB. Cada tratamiento se analizó el día 10 para la expresión de TUJ1/PAX6. Como

un ejemplo de una condición de tratamiento: LSB se alimentó diariamente, CHIR y SU se añadieron al medio para alimentar células diariamente en los días 4-10.

5 En general, los resultados de los tratamientos de cribado dieron como resultado un gran número de cultivos que contenían células muertas. En otras palabras, las condiciones de cultivo viables durante este examen se encontraron con mucha menos frecuencia que las condiciones inviables (es decir, muerte celular), por ejemplo, cuando se añadió SU/DAPT a cultivos tempranos, es decir, antes del día 2. Los autores contemplaron que las células madre del SNC dependen de la señalización de FGF y la actividad de la gamma-secretasa/señalización de Notch para la supervivencia, por lo tanto, cuando CHIR estaba ausente cuando SU/DAPT indujo a las células a cambiar del SNC a la cresta neural, en lugar de cambiar, las células murieron.

15 El día 10 después de la adición de LSB, las células que sobrevivieron durante el cribado fueron monitorizadas para detectar la pérdida del marcador de neuroectodermo humano PAX6 (Zhang, et al., Cell Stem Cell 7, 90-100, (2010),) y el inicio de la diferenciación neuronal mediante expresión de TUJ1 (Lee, et al., Cell Motil Cytoskeleton 17, 118-132, (1990), incorporado en el presente como referencia). Las células se tiñeron para detectar neuronas (TUJ1 +) y una pérdida de neuroectodermo (observación de menos células PAX6+) usando un anticuerpo que se une al extremo C de PX6), por inmunofluorescencia (inmunoF). Este cribado se realizó en las numerosas combinaciones de inhibidores (por ejemplo, SU, SU/DAPT, SU/DAPT/CHIR, DAPT/CHIR, SU/CHIR, SU/Ciclopamina, etc.) que se añadieron en variaciones de alimentación diaria en combinaciones de días, (por ejemplo, días 0-10, 1-10, 2-10, 3-10, etc.). En general, los resultados se determinaron observando cantidades comparativas de tinción TUJ1+/PAX6- de células generadas por cada tratamiento de manera que se eligieron las condiciones y compuestos que muestran las mayores cantidades de tinción TUJ1+/PAX6- suficientemente exitosos para proporcionar células para su posterior análisis. Un ejemplo de una molécula pequeña que se consideró un fracaso durante el ensayo de cribado para producir células que fueron TUJ1+/PAX6- por inmunotinción de células fue la ciclopamina. La ciclopamina parecía no tener efecto sobre las células para producir la tinción de TUJ1/PAX6 sin importar cuándo se añadió. En otras palabras, la morfología celular permaneció similar a aquellas células con tratamiento con LSB solo (es decir, > 90 % PAX6+ y < 10 % TUJ1+) en el día 10 por inmunofluorescencia.

30 Sin embargo, durante el cribado, los autores descubrieron que una combinación específica de tres moléculas pequeñas (SU5402, CHIR99021 y DAPT; denominada 3i para tres inhibidores), añadida el día 2 del tratamiento con LSB (figuras 6A y B), abolió la expresión de PAX6 e indujo TUJ1 en hPSC en el día 10 de diferenciación (figuras 2A y B). Este fue un descubrimiento sorprendente porque en el día 2 del tratamiento con LSB aún no se sabía que las células tratadas tuvieran un destino de células neurales o que tuvieran la capacidad de convertirse en un destino de células neurales. En cambio, el tratamiento con 3i dirigió las células lejos del destino de las células neurales hacia las células de la cresta neural que se diferenciaron aún más en las células nociceptoras.

Después se investigaron las funciones para cada una de estas pequeñas moléculas con el fin de descubrir qué rutas de señalización se consideraron involucradas en la conversión de una población de células ES humanas PAX6+TUJ1- en una población PAX6-TUJ1+. Primero, se informó que SU5402 era un potente inhibidor de la señalización de VEGF, FGF y PDGF tirosina cinasa (Sun, et al., J Med Chem 42, 5120-5130, (1999),). Por lo tanto, en general, se contempló que al menos una de las moléculas pequeñas estaban involucradas con la inhibición de las rutas de señalización de FGFR. En segundo lugar, CHIR99021 se informó como un agonista de WNT por inhibición selectiva de GSK-3 $\beta$  que estabilizaba  $\beta$ -catenina (Bennett, et al., J Biol Chem 277, 30998-31004, (2002),). Por lo tanto, en general, se contempló que al menos una de las moléculas pequeñas estaba involucrada en la activación de al menos una de las rutas de señalización WNT a través de la inhibición de la glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Y en tercer lugar, se informó que DAPT era un inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa capaz de bloquear la señalización de Notch (Dovey, et al., J Neurochem 76, 173-181 (2001)). Por lo tanto, en general se contempló que al menos una de las moléculas pequeñas estuvo involucrada con la inhibición de al menos una ruta de señalización de Notch. Así, en una realización, una de las moléculas pequeñas se contemplaba como un inhibidor no selectivo o pan-Notch. En otra realización, uno de los inhibidores es un inhibidor de moléculas de  $\gamma$ -secretasa, capaz de bloquear al menos una ruta de señalización de Notch. Por lo tanto, en una realización a modo de ejemplo, una combinación de inhibidores incluiría al menos una molécula pequeña involucrada en la inhibición de las rutas de señalización de FGFR, al menos una molécula pequeña involucrada en la inhibición de al menos una ruta de señalización de Notch, y al menos una molécula pequeña involucrada en la inhibición de **GSK-B $\beta$**  mientras que activa al menos una de las rutas de señalización WNT para producir células neuronales humanas PAX6-TUJ1+. En realizaciones adicionales, uno de los inhibidores fue capaz de bloquear al menos una molécula de  $\gamma$ -secretasa en la ruta de señalización de Notch.

#### **EJEMPLO de referencia IV**

60 **Las células neuronales TUJ1+ muestran una pérdida de expresión de marcadores de proliferación celular.**

El siguiente ejemplo describe un método a modo de ejemplo para determinar la fase de maduración (ciclo celular) de las células neuronales TUJ1+.

65 Tras la maduración, las neuronas producidas en cultivo dejaron de sufrir mitosis al perder Ki67 y fosfohistona H3 (PHH3), marcadores de proliferación celular (Gerdes, et al., Int J Cancer 31, 13-20 (1983),) y las fases G2/M de la

mitosis (Hendzel, et al., Chromosoma 106, 348-360 (1997).), respectivamente. Por lo tanto, las células producidas usando LSB en combinación con 3i (es decir, LSB3i) se pasaron a una densidad más baja, aproximadamente 10-100.000 células/cm<sup>2</sup> y se analizaron los marcadores de proliferación celular, Ki67 y fosfohistona H3 (PHH3), después de la fijación para evaluar mejor la expresión, en células individuales. En particular, se sabía que la expresión de Ki67 era un mejor predictor de proliferación. Por lo tanto, en comparación con las células cultivadas en LSB sin compuestos 3i, después de 12 días menos células, el 50 % y el 16 %, cultivadas en presencia de 3i mostraron una pérdida de células Ki67+ y pHH3+, respectivamente (figuras 2 C-F).

La tinción FACS intercelular para Nestina, un marcador de progenitores neurales, y  $\beta$ 3-tubulina (TUJ1), un marcador de diferenciación neuronal, se realizó para cuantificar la eficiencia (porcentaje) de diferenciación neuronal usando LSB3i en comparación con LSB solo como control además de LSB/ CHIR (CHIR99021;C), SU/DAPT (SU5402/DAPT), SU/CHIR (SU5402/CHIR99021), DAPT, SU (SU5402), CHIR (figura 2G). En presencia de LSB, SU/DAPT, DAPT, SU y CHIR, la mayoría de las células expresaron Nestina. En particular, > 95 % de la población de células LSB eran Nestina+. Numerosas células mostraron tinción de Nestina después de la inhibición dual de SMAD, pero no se cuantificaron mientras que las células cultivadas a más largo plazo, es decir, 19 días, mostraron neuronas TUJ1+ donde la mayoría de estas células coexpresaron tirosina hidroxilasa (TH) que identificaba neuronas dopaminérgicas potenciales (Chambers, et al., Nat Biotechnol 27, (2009).). Por el contrario, cuando las células en contacto con LSB fueron puestas en contacto 2 días después con los compuestos 3i, después de 10 días, aproximadamente el 25 % de las células expresaron Nestina, mientras que aproximadamente el 75 % de las células expresaron TUJ1, lo que demuestra una conversión eficiente a un destino celular neuronal después del cultivo celular a corto plazo, es decir, menos de 19 días.

Sorprendentemente, el tratamiento con LSB siguió 2 días después poniendo en contacto las células con CHIR99021 y cualquiera de DAPT o SU dio como resultado que el 50 % de la población celular se diferenciara en células TUJ1+. Cuando cada uno de los tres inhibidores se usó solo después del tratamiento con LSB, el 20 % o menos de las células fueron TUJ1+. Por lo tanto, CHIR99021 fue descubierto como el contribuyente clave para la diferenciación dirigida de esta población celular en células neuronales TUJ1+. Los autores contemplaron que la diferenciación directa de las células nestina+TUJ1- en células neuronales nestina-TUJ1+ dependía de la inhibición de **GSK-3 $\beta$**  mientras se activaba al menos una de las rutas de señalización WNT además de inhibir las rutas del receptor FGF o una gamma secretasa dentro de una ruta de señalización de Notch. Además, la adición de los compuestos 3i dio como resultado una conversión de un 25 % adicional de células neuronales nestina-TUJ1+, véase, la figura 2G.

En resumen, la población neuronal derivada de una realización preferida del tratamiento con 3i 2 días después del tratamiento con LSB se examinó adicionalmente. Esta población mostró una alta expresión del marcador neuronal TUJ1 en comparación con las células tratadas con LSB solo (figuras 2A, B), así como la pérdida de Ki67 (figuras 2C, D). La pérdida de Ki67 indica una reducción en el ciclo celular que es característica de las neuronas diferenciadas postmitóticas. Además, el análisis FACS reveló que más del 75 % de la población celular tratada con una composición preferida que consiste en LSB y 3i expresó TUJ1 en comparación con el 99 % de la población tratada con LSB solo que expresó Nestina, un marcador de progenitores (figura 2G).

#### EJEMPLO de referencia V

**Las neuronas TUJ1+ fueron sorprendentemente células del sistema nervioso periférico (SNP) en lugar de las células esperadas del sistema nervioso central (SNC).**

El siguiente ejemplo describe un método a modo de ejemplo para identificar el tipo de neurona positiva para TUJ1 producida durante el desarrollo. Para caracterizar adicionalmente el subtipo de neuronas obtenidas de una realización preferida del tratamiento con 3i 2 días después del tratamiento con LSB, la población positiva para TUJ1 se tiñó para marcadores de diversos subtipos neuronales. Específicamente, se sabía que el protocolo de inhibición dual de SMAD generaba células neuroepiteliales PAX6+ sesgadas hacia la identidad del prosencéfalo anterior que expresan FOXG1 (proteína de caja Forkhead G1) (Chambers, et al., Nat Biotechnol 27, (2009).). Por lo tanto, para determinar la identidad del subtipo neuronal después del tratamiento con LSB3i, las células se pasaron a una densidad más baja, aproximadamente 10-100.000 células/cm<sup>2</sup> en el día 10 y se evaluó para un intervalo de expresión del marcador en el día 12.

Dado que el tipo neuronal esperado era un destino del SNC, la mayoría de los marcadores iniciales ensayados fueron para la identificación de células de tipo del SNC. De hecho, se esperaba una neurona del prosencéfalo del SNC ya que las células LSB están predeterminadas a este subtipo (positivas para PAX6, FOXG1). Sorprendentemente, se obtuvieron al menos 12 resultados negativos (se muestran 10 a modo de ejemplo a continuación) para los marcadores del SNC antes de descubrir la tinción para ISL1, un marcador para las células del SNP. ISL1 es expresado por motoneuronas y neuronas sensoriales periféricas. La expresión de BRN3A se ensayó y se descubrió que era expresado por células LSB/3i. Por lo tanto, los autores descubrieron neuronas BRN3A+/ ISL1+ que indicaban el desarrollo de neuronas sensoriales periféricas, véase la tabla A, a continuación.



Tabla A: la siguiente lista de genes/proteínas que representan numerosas moléculas con destino del SNC que se esperaba que fueran positivas (expresadas) en las células que usan la diferenciación inducida por LDN/3i como se describe en el presente documento. Sin embargo, estos resultados mostraron una falta a modo de ejemplo de marcadores del SNC, resultados que fueron respaldados por el hallazgo posterior de marcadores potenciales para el linaje del SNP, es decir, ISL1 y BRN3A.

5

Gen/Proteína	Marcas (tipo de neurona)	Resultado (IF o FACS)
FOXG1	Prosencéfalo	Negativa
FOXA2	Mesencéfalo	Negativa
TBR1	Cortical	Negativa
PAX6	Prosencéfalo	Negativa
AADC	Dopamina	Negativa
TH	Dopamina	Negativa
DCX	Pan-neuronal	> 75 %, coteñida con TUJ1
Nestina	Progenitoras	< 25 %, contrateñida con TUJ1
ChAT	Colinérgica	Negativa
GAD65	GABA	Negativa
Reelina	Neuronas corticales	Positiva
GABA	GABA	Negativa
MASH1	Autónoma	Negativa
BRN3A	Sensorial periférica	Positiva
ISL1	Motoneuronas, Sensorial periférica	Positiva

Sorprendentemente, se observó una expresión homogénea de ISL1 y BRN3A (áreas rojas/ oscuras dentro de las células) (figuras 3A y B) en las células TUJ1+ (cuerpos celulares verdes/más claros en comparación con la tinción roja). ISL1 y BRN3A son marcadores clave para las neuronas sensoriales (ISL1: Sun, et al., Nat Neurosci 11, 1283-1293, (2008); BRN3A: Gerrero, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 90, 10841-10845 (1993)). Este descubrimiento indicó que las neuronas que resultaron del tratamiento con LSB3i eran células del SNP en lugar de del SNC. Estos resultados contrastaron con las células LSB que tienen un subtipo de neurona del prosencéfalo del SNC (PAX6+, positiva para FOXG1). Este es un hallazgo bastante inesperado ya que la alta confluencia de las células madre al inicio del tratamiento, como se representa por la densidad de siembra en placas, de acuerdo con las enseñanzas de la técnica anterior, debería haber dado como resultado poblaciones neuronales derivadas del SNC. Sin embargo, los nociceptores se derivan de las poblaciones de células de la cresta neural que, de acuerdo con las enseñanzas de la técnica anterior, se derivan de la baja confluencia de las células madre al inicio del tratamiento, como se representa por la densidad de siembra en placas. En otras palabras, la expectativa era que una alta densidad de placas inicial > 20.000 células/cm<sup>2</sup> de células madre pluripotentes en el momento del inicio del tratamiento con LSB daría como resultado una población neuronal comprometida con el SNC. Por el contrario, se sabía que una baja densidad de siembra en placas inicial de aproximadamente 10.000 células/cm<sup>2</sup> era necesaria para producir células de la cresta neural (Chambers et al, Nature Biotech, 2009 (Véase la mitad inferior de la figura 4)).

10

15

20

#### EJEMPLO de referencia VI

25

**Se descubrió que las neuronas del sistema nervioso periférico (SNP) eran células nociceptoras en fase temprana.**

30

El siguiente ejemplo describe el uso de métodos a modo de ejemplo para determinar qué tipo o tipos de neuronas del sistema nervioso periférico (SNP) se produjeron usando los métodos descritos en el presente documento.

35

No se sabía qué tipo o tipos de neuronas del SNP fueron producidas por los métodos descritos en el presente documento, ya que había varios tipos de neuronas candidatas, tales como las neuronas sensoriales y las neuronas motoras, y además había al menos tres subconjuntos principales de neuronas sensoriales conocidas en el SNP incluye células propioceptoras, células mecanceptoras y células nociceptoras.

Durante el desarrollo, los nociceptores en fase temprana fueron tanto peptidérgicos como no peptidérgicos y expresaron de forma única NTRK1, RUNX1, seguidos de la expresión RET (para un ejemplo de información sobre RET, véase, Woolf, et al, Neuron 55, 353-364, (2007)).

Los cultivos duplicados de LSB3i en fase temprana con neuronas TUJ1+ se ensayaron para la expresión de RET (figura 3C), y se descubrió que eran positivos para este marcador (áreas rojas/más oscuras dentro de las células en el cuadro más grande en comparación con la tinción TUJ1 + (cuerpos celulares verdes/más claros en comparación con la tinción de RET) y áreas más claras en la caja RET insertada). (Figura 3D), y más del 60 % de todas las células en cultivo expresaron NTRK1 cuando se midió por FACS en el día 10 (figura 3E).

En resumen, esta población fue positiva para la expresión de ISL1, BRN3A, RET y RUNX1 (figuras 3A-D) lo que indica la producción de nociceptores en fase temprana (tanto peptidérgicos como no peptidérgicos). El análisis FACS reveló que más del 60 % de estas neuronas eran positivas para NTRK1 (figura 3E). Estos marcadores indican colectivamente que la población neuronal son neuronas sensoriales periféricas, en particular nociceptores.

Por lo tanto, una realización preferida de la combinación de LSB con el tratamiento con 3i en el día 2 da como resultado la formación inesperada de poblaciones derivadas de la cresta neural, en concreto, nociceptores.

Además, los autores combinaron información de varios ensayos, incluidos los resultados iniciales de inmunofluorescencia, es decir, BRN3A+, ISL1+, datos de matriz, es decir, expresión de TAC1 (Sustancia P), después eligieron un marcador NTRK1 y encontraron células NTRK1+, además de las observaciones descritas en el presente documento donde las células obtenidas por el tratamiento con LSB/3i hicieron la transición a través de la cresta neural y expresaron transitoriamente Neurogenina1 (NEUROG1) en lugar de diferenciarse en un destino del SNC. Por lo tanto, los autores contemplaron que la célula del SNP resultante era muy probablemente un nociceptor peptidérgico.

## EJEMPLO VII

### El tratamiento con LSB3i es reproducible.

El siguiente ejemplo describe el uso de métodos a modo de ejemplo para determinar la reproducibilidad.

Para establecer la generalidad, los autores repitieron una realización preferida que combina el tratamiento con 3i 2 días después del tratamiento con LSB usando hiPSC como fuente de células madre. Se pudo acceder a la reproducibilidad del tratamiento con LSB3i a través de líneas de hPSC adicionales, incluidas las líneas de células madre pluripotentes inducidas (hiPSC). La técnica actual describe cualquier número de métodos para producir hiPSC y serán conocidos por los expertos en la materia. En particular, se utilizaron dos líneas hiPSC (C14 y C72) que se generaron insertando genes como Oct4 (factor de transcripción de unión a octámero 4), Sox2 (SRY (región Y de determinación del sexo)-caja 2), Klf4 (factor de tipo Kruppel 4) y c-Myc (factor de transcripción p64) y se ha demostrado que se neutraliza de manera eficiente (véase, (Papapetrou, et al., Proc Natl Acad Sci., U S A 106, (2009),)).

La expresión de PAX6 se examinó por Immunofluorescencia. El tratamiento con LSB y LSB3i de las líneas celulares C14 y C72 mostró resultados de tinción neuronal similares en comparación con las líneas celulares humanas que se muestran en las figuras 3A-D. Los resultados de tinción de C14 a modo de ejemplo se muestran en las figuras 4A-D, mientras que los resultados de tinción de C72 a modo de ejemplo se muestran en las figuras 8A-D para ISL1, BRN3A, RET, RUNX1 y TUJ1, como se ha descrito anteriormente.

El tratamiento con LSB de las líneas celulares C14 y C72 dio lugar de manera homogénea a células positivas para Nestina (>95 % de la población de células tratadas) y fueron capaces de formar células TUJ+ cuando se trataron con la combinación de LSB3i según lo medido por FACS (40 % para C14 y 33 % para C72; figura 4E). Estos resultados se compararon con la línea celular H9 (es decir, una línea hESC) tratada con LSB y LSB3i mostrada para los resultados de LSB y LSB3i en (figura 4E). Incluso los rendimientos neuronales más altos, del 40 % y el 33 % medidos por FACS, se convirtieron en > 90 % de la tinción de núcleos que son neuronas cuando se clasificaron en NTRK1 en esas dos líneas hiPSC al pasar los cultivos a granel en recipientes de cultivo recubiertos con medios N2 que contienen Matrigel™ después de clasificar en la expresión del marcador NTRK1 (receptor de tirosina cinasa neurotrófico tipo 1). Las células se desagregaron con Accutase, se resuspendieron en N2 y se incubaron en hielo con anticuerpo NTRK1 conjugado con APC (R&D) durante 15 minutos, se lavaron y se resuspendieron en N2 para FACS. Después de clasificar las células se cultivaron durante 24 horas en medio N2 y se fijaron en su lugar. Las células se recogieron y se tiñeron para BRN3A, ISL1, TUJ1 y DAPI. En particular, se muestran numerosas células Nestina+ (tinción roja/oscura) para células C14 y C72 NTRK1- a partir de células tratadas con LSB3i en comparación con pocas células Nestina+ en la población representativa de células NTRK1+ tratadas con LSB3i (figura 9). Además, aunque pocas células C14 NTRK1 - expresaron TUJ1, la línea celular C27 mostró un mayor número de NTRK1 - TUJ1 + (verde; tinción brillante). Ambas líneas celulares mostraron un alto número de células Nestina-TUJ1 + según lo observado en comparación con los cuerpos celulares identificados por la tinción DAPI (azul; nuclear claro).

En resumen, las células hiPSC sembradas a una alta confluencia tratadas con LSB seguido de 3i en el día 2 dieron como resultado la formación de células neuronales positivas para los marcadores de nociceptores ISL1, BRN3A, RET y RUNX1 (figuras 4A-D, figura 8A-D y figura 9).

## EJEMPLO de referencia VIII

**CHIR99021 (C) es el factor clave para inducir la diferenciación neuronal de las células cultivadas con LSB (es decir, LSB-C)**

- 5 El siguiente ejemplo describe el uso de métodos a modo de ejemplo para ensayar la eficacia de cada compuesto para inducir la diferenciación neuronal dirigida.

10 Con el fin de obtener información mecanicista sobre la suficiencia de cada compuesto que se descubrió que se asocia, con la inducción de células TUJ1 + del ejemplo III, se ensayaron combinaciones específicas de compuestos 3i para inducir la expresión celular de Nestina y TUJ1 según se midió usando FACS intercelular (mostrado en la figura 1G). Se usó Nestina como marcador de las células del linaje neural LSB mientras que TUJ1 se usó para identificar una célula neuronal cadena abajo (es decir, más diferenciada).

15 Aunque ninguno de los factores individuales produjo números altos (más del 60 %) de neuronas TUJ1 +, CHIR99021 en combinación con cualquiera de los otros dos factores de inhibición de la señal fue capaz de generar números moderados de neuronas TUJ1 + (53 % para DAPT y 58 % para SU5402). Estos datos indican que, en las condiciones de ensayo usadas en el presente documento, CHIR99021 fue el factor clave para acelerar la diferenciación neuronal, mientras que SU5402 y DAPT proporcionaron estímulos importantes, pero aditivos.

20 Además, los 3 componentes de la composición 3i son necesarios para obtener el máximo rendimiento de las neuronas diferenciadas (figura 2G).

**EJEMPLO de referencia IX****25 Las células artificiales SOX10+ son capaces de producir células nociceptoras.**

El siguiente ejemplo describe el uso de métodos a modo de ejemplo para la diferenciación dirigida de células humanas genomanipuladas que expresan GFP, SOX10+.

30 Se contempla que las células nociceptoras surgen de dos tipos de intermedios celulares durante el desarrollo humano: específicamente se descubrió que las células de la cresta neural del embrión de pollo SOX10+ son capaces de generar células nociceptoras del tronco que flanquean a la médula espinal (George, et al., Nat Neurosci 10: 1287-1293, (2007).). Además, el tejido placoda de la cabeza de *Xenopus laevis* contribuyó a la población de células nociceptoras trigeminales en el tejido facial (Schlosser, et al., J Comp Neurol 418: 121-146, (2000); Schlosser, et al., Dev Biol 294: 303-351, (2006).).

40 Por lo tanto, para determinar si una cresta neural tiene un destino celular intermedio marcado por SOX10 (Aoki, et al., Dev Biol 259, 19-33, (2003); Lee, et al., Nat Biotechnol 25, 1468-1475, (2007).) en células humanas se observaría durante la diferenciación usando una línea de hPSC del cromosoma artificial bacteriano (BAC) *SOX10::GFP* transgénico. Esta línea celular *SOX10::GFP* (BAC) se generó con marcadores de genes de la cresta neural enriquecidos que coexpresaron con un gen GFP usando métodos previamente descritos (Placantonakis, et al., Stem Cells 27: 521-532, (2009).). La línea celular SOX10:GFP fue un subclon de la línea H9 hESC. Las células se disociaron y el suministro de genes se realizó usando reactivos (solución V),

45 protocolo (B-16) y equipo de Amaxa. El ADN nucleofectado (transfectado en el núcleo) era un cromosoma artificial bacteriano (BAC) que contenía el gen SOX10 con un GFP insertado, obtenido del Gene Expression Nervous System Atlas [GENSAT] (número de acceso: GENSAT1-BX1086). El BAC se modificó para incluir un gen de resistencia a la neomicina para la selección (véase Tomishima, et al. Stem cells 25(1):39-45. Publicación en línea 21 de septiembre de 2006 (2007) usando recombinación cre/LoxP de un casete de selección extraído del Plásmido pL452 en el BAC del GENSAT. Después del suministro del gen, se sembraron hESC como células individuales en presencia de G418 para la selección de resistencia a la neomicina y los clones se seleccionaron manualmente y se cribaron para detectar la presencia de GFP tras la diferenciación. Las células GFP se clasificaron para confirmar la expresión de SOX10 y otros marcadores de cresta neural por qRT-PCR.

55 La expresión de GFP se midió mediante identificación FACS y clasificación de células *SOX10::GFP+* a los 4, 8, 12 y 16 días después de iniciar la diferenciación con LSB cuando se pusieron en contacto dos muestras duplicadas adicionales con una de LSB y luego CHIR99021 (LSB/C) o LSB con 3i.

60 Cuando CHIR99021 estaba presente, más del 70 % de estas células tratadas en cultivo se convirtió en SOX10:GFP+ en el día 12 de diferenciación para las condiciones de cultivo (70 % para LSB/C y 80 % para LSB3i; figura 5D y E). Este resultado indicó que la mayoría de las células desarrollan una identidad de cresta neural, lo que respalda la observación de que se requería CHIR99021 para la generación de células nociceptoras por LSB3i. Por lo tanto, la inhibición combinada por estas pequeñas moléculas que inhibieron los receptores de receptores de tirosina cinasa y la señalización de Notch, además de ponerse en contacto con SU5402 y DAPT, respectivamente, aceleraron el destino de las células de la cresta neural, ya que las células tratadas con LSB3i adquirieron un destino de cresta neural más rápidamente en comparación con hPSC tratadas con LSB/C (figuras 5D y E). Los autores contemplaron que CHIR

indujo la cresta neural y las neuronas sensoriales, mientras que SU aceleró la expresión del marcador de la cresta neural y la diferenciación neuronal. Finalmente, los autores contemplaron que DAPT en combinación con CHIR y SU aceleraba la diferenciación neuronal. Además, el uso de CHIR99021 en combinación con LSB, es decir, LSB/C dio como resultado una tasa de conversión más lenta de más del 60 % de las células neuronales Nestina-TUJ1+ en comparación con LSB3i entre los días 12 y 16 cuando se utilizaron las células SOX::GFP genomanipuladas como una lectura.

**EJEMPLO X Las células nociceptoras humanas NTRK1+ producidas por los métodos descritos en el presente documento mostraron expresión génica coherente con células peptidérgicas y respuestas electrofisiológicas similares a las células nociceptoras de rata in situ.**

El siguiente ejemplo describe el uso de métodos a modo de ejemplo para determinar la capacidad funcional de las células nociceptoras producidas por los métodos descritos en el presente documento.

Las células tratadas con LSB3i se examinaron para determinar su función, fases de maduración y comportamientos para confirmar que las neuronas derivadas por LSB3i eran células neuronales nociceptoras auténticas. Después de que el tratamiento con LSB3i de células madre pluripotentes dio como resultado células nociceptoras, se obtuvieron cultivos a largo plazo a partir de una densidad de siembra en placas de 10-100.000 células/cm<sup>2</sup> y se pasaron el día 10, 30 días en cultivo en medio N2 suplementado con beta NGF, BDNF y GDNF humanos (véase el ejemplo I para detalles adicionales). Se descubrió que la tasa de supervivencia de estas células en condiciones de cultivo a largo plazo es dependiente de NGF compatible con el estado de nociceptor NTRK1+. Los nociceptores de LSB3i expresaron altos niveles de TUJ1, ISL1, BRN3A (figura 7A-C) como se ha mostrado anteriormente, además de glutamato (figura 7C). La producción de glutamato fue coherente con una neurona glutamatérgica excitadora, es decir, una fibra aferente nociceptiva que libera glutamato, y el receptor de capsaicina TRPV1 (figura 7D), un importante canal iónico para el estímulo nocivo. El día 15 en cultivo se pudieron identificar dos procesos de crecimiento distintos para cada neurona (figura 7E, figura 12).

El marcador de dendrita MAP2 se expresó principalmente en una de las dos prolongaciones de forma polarizada (figura 7F). La naturaleza bipolar de las neuronas concordaba con el papel de la neurona sensorial en los ganglios periféricos con el cuerpo celular se encuentra en las prolongaciones de proyección del ganglio de la raíz dorsal tanto hacia la médula espinal como hacia la periferia (Woolf, et al., *Neuron* 55, 353-364, (2007); George, et al., *Nat Neurosci* 10, 1287-1293, (2007).

En presencia del factor de crecimiento nervioso (NGF), las neuronas se cultivaron a largo plazo (por ejemplo, las células se pasaron el día 10 y se cultivaron hasta el día 30). El LSB se retiró el día 5, 3i se retiró de las células el día 10 cuando se añadieron NGF/GDNF/BDNF al medio. Las neuronas fueron alimentadas con NGF/GDNF/BDNF desde el día 10 hasta el día 30. El día 30, el número de días desde el tratamiento inicial con LSB, se observó que las neuronas comenzaron a autoorganizarse en estructuras similares a los ganglios. Este tipo de morfología es común a las neuronas sensoriales periféricas (Marmigere, et al., *Nat Rev Neurosci* 8, 114-127, (2007), (Figura 7G, H e I).

Los nociceptores maduros son normalmente peptidérgicos o no peptidérgicos, dependiendo de la expresión de neuropéptidos, tales como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la sustancia P (un neuropéptido) expresada por las neuronas sensoriales peptidérgicas, (Woolf, et al., *Neuron* 55, 353-364, (2007),). Por el contrario, las neuronas no peptidérgicas no expresan CGRP ni la sustancia P y tienen otros marcadores, tales como la unión a la lectina IB<sub>4</sub>.

Por lo tanto, las neuronas inducidas por LSB3i se clasificaron para la expresión de NTRK1 (véanse los métodos descritos anteriormente), usando FAC, en poblaciones NTRK1+ y NTRK1- (por ejemplo, de una célula clasificada, véase, figura 7G. Las células NTRK1+ fueron positivas tanto para sustancia P como para CGRP lo que indica principalmente un fenotipo de nociceptores peptidérgicos (figuras 7H e I; día 30 de diferenciación).

Una característica distintiva funcional primaria de la identidad de la neurona sensorial (es decir, la función) es su firma electrofisiológica (Fang, et al., *J Physiol* 565, 927-943, (2005),). Las neuronas clasificadas NTRK1+ también se probaron mediante técnicas electrofisiológicas estándar para neuronas cultivadas (Placantonakis, et al. *Stem Cells*. 2009, la figura 5 tiene un ejemplo)

Las células NTRK1+ exhibieron un potencial de acción (AP) característico único, firma electrofisiológica, patrón de activación con un potencial de reposo de membrana promedio de  $67 \pm 4$  mV para el día 21 después del tratamiento inicial con LSB3i. La cronología de AP resultante y la forma de la curva de acción en las neuronas humanas LSB3i se muestran en la figura 7J, (véase la línea roja gruesa) y la tabla 1 a continuación. Estos resultados fueron similares a los descritos previamente en informes electrofisiológicos de nociceptores primarios de ratas adultas anestesiadas (Fang, et al., *J Physiol* 565, 927-943, (2005),).

**Tabla 1: electrofisiología de células cultivadas con LSB3i humanas en comparación con neuronas de ganglio de la raíz dorsal nociceptivas y no nociceptivas de rata *in vivo*.**

Potencial de acción	Células de LSB3i	Células nociceptoras*	Células mecanorreceptoras*
Duración en la base (milisegundos; ms)	9,5	6	2
Tiempo de ascensión (milisegundos; ms)	3,8	2	0,8
Tiempo de caída, Tussman y Misc. (milisegundos; ms)	5,8	3,5	1
Sobreimpulso (milivoltios; mV)	29	22,5	5
Recuperación del 80 % (milisegundos; ms)	15,1	21	5

\* Fang, et al., J Physiol 565.3:927-943 (2005)

**Ejemplo XI.**

5

**Expresión génica de células producidas por composiciones y métodos descritos en el presente documento.**

El siguiente ejemplo describe el uso de métodos a modo de ejemplo para determinar la expresión génica global de las células nociceptoras y otros tipos de células producidas por los métodos descritos en el presente documento.

10

El análisis de la expresión génica global se realizó a una resolución temporal fina (días 2, 3, 5, 7, 9 y 15, número de acceso del NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) GSE26867; tanto para hPSC tratadas con LSB como con LSB3i para caracterizar aún más el momento de los eventos (es decir, expresión de marcador) durante el proceso de diferenciación inducida. Cuando se analizaron marcadores de selección para neuroectodermo, cresta neural, neuronas y nociceptores (véase la tabla 2 a continuación), se pudieron observar distintas fases de diferenciación para cada uno (figura 10).

15

**Tabla 2: expresión génica asignada a fases específicas de diferenciación durante la diferenciación dirigida después del contacto con LSB-3i. Véase también, figura 10A.**

Fases de diferenciación	Genes expresados
Neuroectodermo	PAX6, OTX2, DLK1, DKK1, CUZD1
Cresta neural	SOX10, MSX1, ID2, AP2B, ETS1, FOXD3
Neurona	NGN1, DCX, TUBB3, SYT4, STMN2, INA, GAP43, ISL1, POU4F1
Nociceptor	TAC1, VGLUT2, SLC15A3

20

Este análisis de expresión génica (figura 10B, C y tabla 2 anterior) fue coherente con la mayoría de los resultados de inmunofluorescencia. Por ejemplo, el análisis génico mostró que en las neuronas en maduración, los genes ISL1, POU4F1 (BRN3A), SOX10, TAC1 (pro-péptido para la sustancia P), NTRK1 y el transportador vesicular de glutamato VGLUT2 estaban todos regulados positivamente (es decir, el número de células en cultivo aumentó la expresión de estos marcadores con el tiempo). Al mismo tiempo, mientras se observaba que estos marcadores aumentaban en las células inducidas, se observaba que los marcadores para el neuroectodermo primitivo derivado de hESC estaban regulados negativamente (es decir, expresados en menos células en cultivo), en particular DLK1, LHX2, OTX2, LEFTY2, PAX6 y HESS.

25

30

Sin embargo, la expresión de somatostatina (SST) y SOX10 se descubrió en el día 15 en cultivos celulares tratados con LSB3i, que se espera que se exprese en nociceptores maduros. Sin embargo, la SST también se mostró expresada en neuronas sensoriales en desarrollo. Por lo tanto, los autores contemplaron que este marcador indicaba la presencia de células inmaduras en el día 15. Aunque regulada negativamente en cierta medida, la expresión de SOX10 también se observó en un momento en que la mayoría de las células parecían ser neuronas. Este hallazgo fue inesperado ya que se esperaba que SOX10 se regulara negativamente a medida que las células se diferencian en neuronas. Este hallazgo inesperado de la expresión de SST y SOX10 en células de los cultivos del día 15 se contempló como que no todas las células se convirtieron en nociceptores, aproximadamente el 20-30 %. Esto indicó que otros tipos de células maduras (tales como las células de Schwann) continúan expresando SOX10.

35

40

Cultivos celulares de neuroectodermo primitivo derivados de hESC producidos por inhibición dual de SMAD en Chambers, et al., Nat Biotechnol 27, (2009); Fasano, et al., Cell Stem Cell 6, 336-347, (2010), demostraron una alta expresión de los genes DLK1, LHX2, OTX2, LEFTY2, PAX6 y HES5. De forma análoga, se observó una alta expresión

similar para estos genes cuando se produjeron cultivos de células de neuroectodermo primitivo derivadas de hESC por inhibición dual de SMAD usando LSB (véase las figuras 10B, C y la tabla 3 a continuación). Estos genes se redujeron durante el tratamiento con LSB3i mientras producían nociceptores durante el desarrollo.

5 **Tabla 3: cronología de la expresión génica durante la diferenciación dirigida con LSB-3i en comparación con LSB.**

Diferenciación por LSB-3i en comparación con control con LSB	Genes regulados positivamente	Genes regulados negativamente
Día 7	ISL1, POU4F1 (BRN3A), SOX10, NTRK1, y el transportador vesicular de glutamato VGLUT2	DLK1
Día 9	ISL1, POU4F1 (BRN3A), SOX10, NTRK1, y el transportador vesicular de glutamato VGLUT2	DLK1 y PAX6
Día 15	ISL1, POU4F1 (BRN3A), SOX10, TAC1 (pro-péptido para la Sustancia P), y el transportador vesicular de glutamato VGLUT2	DLK1, LHX2, OTX2, LEFTY2, PAX6 y HESS

Además, el análisis del transcriptoma temporal proporcionó evidencia adicional del destino de las células intermedias nociceptoras, distinto de las células mecanoceptoras y las células propioceptoras. Las proteínas básicas de neurogenina hélice-bucle-hélice median dos ondas secuenciales de neurogénesis en los ganglios de la raíz dorsal durante el desarrollo del ratón (Marmigere, et al., Nat Rev Neurosci 8, 114-127, (2007); Ma, et al., Genes Dev 13, 1717-1728 (1999),). La primera onda, marcada por NEUROG2 (Neurogenina-2) da lugar a las células mecanoceptoras y las células propioceptoras, y la segunda marcada por NEUROG1 (Neurogenina-1) da lugar a las células nociceptoras. Cuando las hPSC se tratan con LSB, la expresión de NEUROG2 es fuertemente inducida en el día 7 (figura 10C y tabla 4 a continuación). Por el contrario, las hPSC tratadas con LSB3i muestran una inducción menos pronunciada de NEUROG2 en el día 7 pero una inducción selectiva de NEUROG1 en el día 9 (figura 10C).

**Tabla 4: cronología de la expresión génica durante la diferenciación dirigida con LSB-3i en comparación con LSB.**

genes básicos de neurogenina hélice-bucle-hélice expresados en hPSC tratadas	Día 7	Día 9
LSB-3i	Sin diferencia en NEUROG1 en comparación con células de control con LSB Sin cambios en el % de células que expresan NEUROG2	Inducción por NEUROG1 Sin cambios en el % de células que expresan NEUROG2
Control con LSB	Sin diferencia en la inducción por NEUROG1 NEUROG2	Sin diferencia en NEUROG1 Regulación negativa de NEUROG2

**Ejemplo XII.**

**Cultivo a gran escala contemplado usando composiciones y métodos para proporcionar células nociceptoras a modo de ejemplo.**

La siguiente descripción contemplada muestra métodos y usos a modo de ejemplo para la producción a gran escala de células nociceptoras producidas por los métodos descritos en el presente documento.

La generación escalable (es decir, métodos contemplados para tener éxito para generar células nociceptoras a partir de ambos cultivos que contienen un número relativamente pequeño de células, por ejemplo,  $1,5 \times 10^4$  células/pocillo de placas de 48 pocillos, como se ha descrito en los Ejemplos, *supra*), y contemplados para  $5 \times 10^3$  células/pocillo en una placa de 96 pocillos, hasta cultivos en grandes lotes de nociceptores derivados de hPSC, (por ejemplo,  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$  células en lotes de 18 placas de 15 cm (aproximadamente  $5,5 \times 10^7$  células), utilizando LSB3i. Estos métodos están contemplados para proporcionar células nociceptoras derivadas de hPSC para su uso en ensayos de compuestos para su uso en estudios de biología básica y para el descubrimiento de fármacos aplicables a aplicaciones médicas en seres humanos y animales. En particular, los autores contemplan el uso de composiciones y métodos para tratamientos para reducir el dolor agudo y crónico en seres humanos y animales.

En particular, se contemplan cultivos en grandes lotes en los que se cultivan  $1 \times 10^8$ - $1 \times 10^9$  células hPSC a modo de ejemplo en cultivos de cuerpos embrioides por lotes usando medio de cultivo y compuestos a modo de ejemplo como se describe en el presente documento para proporcionar células nociceptoras a modo de ejemplo, por ejemplo, células nociceptoras peptidérgicas, en intervalos no limitantes a modo de ejemplo de  $7 \times 10^7$  -  $7 \times 10^8$  (en el que se contempla

una eficiencia del 70 % de la recolección de células nociceptoras). Se contempla que las células nociceptoras a modo de ejemplo expresen genes (es decir, ARNm y proteína) que identifican células nociceptoras, tales como TAC1, VGLUT2 y SLC15A3. Se contemplan que células nociceptoras a modo de ejemplo expresan marcadores de identificación, tales como ISL1, BRN3A, RET, RUNX1, Sustancia P, CGRP, etc.

5 En resumen, los autores contemplan el uso de composiciones y métodos para proporcionar plataformas novedosas en biología básica y descubrimiento de fármacos para el estudio y tratamiento de afecciones asociadas con las células nociceptoras, en particular el dolor, en seres humanos y animales.

10 **Tabla 5. Pares de cebadores usados para la amplificación e identificación de la expresión génica por PCR.**

SEQ ID NO.			Tf (°C)	Producto (pb)		Referencia
<u>03</u> <u>04</u>	Directo	CAGCTGTGTGACTCAATGATAGATTTC	58	461	ARNm	Este estudio
	Inverso	GGAGAATTTGGCTGGAAGTGCATG	60	1840	genómico	
PCU5F1 (OCT3/4)						
<u>05</u> <u>06</u>	Directo	CCTGAAGCAGAAGAGGATCACC	58	422	ARNm	Este estudio
	Inverso	CATAGTCGCTGCTTGATCGC	57	1191	genómico	
POU5F1 (OCT3/4) (qPCR)						
<u>07</u>	Directo	GAACCGAGTGAGAGGCAACCT	60	80	en exón	Este estudio
	Inverso	GGGCGATGTGGCTGATCT	58			
SOX2						
<u>09</u> <u>10</u>	Directo	CAACATGATGGAGACGGAGC	57	377	en exón	Este estudio
	Inverso	GCAGCGTGTACTTATCCTTCTTC	57			
GAPDH						
<u>11</u> <u>12</u>	Directo	AGCCACATCGCTCAGACACC	61	305	ARNm	Joannides et al. (2006) Stem Cells
	Inverso	GTACTCAGCGCCAGCATCG	59	2153	genómico	
GAPDH (qPCR)						
<u>13</u> <u>14</u>	Directo	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	59	93	ARNm	Este estudio
	Inverso	CGCCCCACTTGATTTTGG	55	222	genómico	
BMP4						
<u>15</u> <u>16</u>	Directo	CCAACACCGTGAGGAGCTTC	59	397	ARNm	Este estudio
	Inverso	GTCCGAGTCTGATGGAGGTG	58	1360	genómico	
AFP						
<u>12</u> <u>18</u>	Directo	GTGCTTCCACCACTGCCAATAAC	60	283	ARNm	Este estudio
	Inverso	GTTTCATCTCCAGTGGGTTTCTCAA	59	2057	genómico	
BRACHYURY						
<u>19</u> <u>20</u>	Directo	GATCACCAGCCACTGCTTCC	59	161	ARNm	Este estudio
	Inverso	CTCCGGGTTCCCTCATCATCT	59	1138	genómico	
PAX6						
<u>21</u> <u>22</u>	Directo	GGAGTGAATCAGCTCGGTGG	59	441	ARNm	Este estudio
	Inverso	GGTCTGCCCGTTCAACATCC	59	2072	genómico	
NCAM1						
<u>23</u> <u>24</u>	Directo	GGGCACTTATCGCTGTGAGG	59	334	ARNm	Este estudio
	Inverso	CTCGCCAGCCTTGTCTCAG	59	1868	genómico	
SOX1						
<u>25</u> <u>26</u>	Directo	GCAAGATGGCCCAGGAGAAC	59	203	en exón	Este estudio
	Inverso	CTTGTCTTCTTGAGCAGCGT	59			
SOX1 (αPCR)						
<u>27</u> <u>28</u>	Directo	GAGAACCCCAAGATGCACAA	56	70	en exón	Este estudio
	Inverso	CCTCGGACATGACCTTCCA	57			

(continuación)

SEQ ID NO.	NANOG	Tf (°C)	Producto (pb)	Referencia
	<b>BF1</b>			
<u>29</u> <u>30</u>	Directo Inverso ACTCAGAACTCGCTGGGCAAC CGTGGGGGAAAAAGTAACTGG	60 57	226 en exón	Yan et al. (2005) Stem Cells
	<b>HASH1</b>			
<u>31</u> <u>32</u>	Directo Inverso CAAGTCAGCGCCAAGCAAGTCAAG GAGCCGGCCATGGAGTTCAAGTCGT	64 67	384 en exón	Kodama et al. (2006) Immunol. Cell Biol.
	<b>SIX3</b>			
<u>33</u> <u>34</u>	Directo Inverso CACTCCCACACAAGTAGGCAAC CATACATCACATTCCGAGTCGCTG	59 59	264 ARNm 1921 genómico	Este estudio
	<b>DACH1</b>			
<u>35</u> <u>36</u>	Directo Inverso GGGCCAAAGTGGCTTCCTTC CAGGAGACATGAGACCAGGGAC	60 60	363 ARNm 184374 genómico	Este estudio
	<b>EMX2</b>			
<u>37</u> <u>38</u>	Directo Inverso CGATATCTGGGTCATCGCTTCC GAGGTCACGTCTATTTCTCCG	58 58	368 ARNm 4574 genómico	Este estudio
	<b>GLI3</b>			
<u>39</u> <u>40</u>	Directo Inverso CAGCTCCACGACCACTGAA TCCATGGCAAACACCGTCC	58 59	318 ARNm 74979 genómico	Zhu et al. (2004) Cancer Letters
	<b>SHH</b>			
<u>11</u> <u>42</u>	Directo Inverso CCAATTACAACCCCGACATC CCGAGTTCTCTGCTTTCACC	54 56	339 ARNm 8173 genómico	Li et al. (2005) Nature Biotech.
	<b>NKX2.1</b>			
<u>13</u> <u>44</u>	Directo Inverso TACTGCAACGGCAACCTG GCCATGTTCTTGCTCACGTC	56 58	205 ARNm 1170 genómico	Zietlow et al, (2005) J. Anatomy
	<b>HOXA4</b>			
<u>45</u> <u>46</u>	Directo Inverso CGCTCTCGAACCGCCTACAC GCAGTTTGTGGTCTTTCTCCACT	61 59	181 en exón	Este estudio
	<b>HOXB4</b>			
<u>47</u> <u>48</u>	Directo Inverso CCCTGGATGCGCAAAGTTCAC GGTGTGGGCAACTTGTGGT	60 60	252 ARNm 1094 genómico	Este estudio
	<b>MAP2</b>			
<u>49</u> <u>50</u>	Directo Inverso GGCCAAGCTAAAGTTGGTTCTC GCAGTGACATCCTCAGCCAAAG	60 60	255 ARNm 474 genómico	Este estudio
	<b>SYT1</b>			
<u>51</u> <u>52</u>	Directo Inverso TCATCTGATGCAGAATGGTAAGAGG GTAGCCCACAAAGACTTTGCC	58 58	199 ARNm 4910 genómico	Este estudio
	<b>PSD95</b>			
<u>53</u> <u>54</u>	Directo Inverso GGGAGAAGCAGCTCAACTCCAATCC CCAGCAAGGCCTGGAAGAG	59 59	180 ARNm 371 genómico	Este estudio
	<b>GFAP</b>			
<u>55</u> <u>56</u>	Directo Inverso CCGCCACTTGCAAGGAGTACCAG TTCTGCTCGGGCCCCTCATGAG	63 65	324 ARNm 4041 genómico	Este estudio

Se citan las siguientes referencias:

- 5 Joannides A, et al. (2006) Automated mechanical passaging: A novel and efficient method for human embryonic stem cell expansion. Stem Cells 24:230-235  
 Kodama H, et al. (2006) Neurogenic potential of progenitors derived from human circulating CD14+ monocytes. Immunol Cell Biol 84:209-217.  
 Li XJ, et al. (2005) Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 23:215-221.



Yan Y, et al. (2005) Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23:781-790.

Zhu Y, et al. (2004) Functional Smoothed is required for expression of GL13 in colorectal carcinoma cells. *Cancer Lett* 207:205-214.

5 Zietlow R, et al. (2005) The survival of neural precursor cell grafts is influenced by *in vitro* expansion. *J Anat* 207:227-240.

### Ejemplo XIII.

#### 10 Los melanocitos se derivan de células madre pluripotentes humanas: LSB-melanocitos (LSB-Mel).

A continuación se describen composiciones y métodos a modo de ejemplo para proporcionar melanocitos para su uso en modelos de enfermedades relacionadas.

15 Se generó una línea informadora de células madre embrionarias humanas (hESC) del cromosoma bacteriano artificial (BAC) *Sox10::GFP* que permitió monitorizar la inducción de células de la cresta neural *in vitro* ya que esta línea celular responde al contacto con moléculas pequeñas. *Sox10* fue el marcador temprano más robusto de células madre de la cresta neural multipotentes y también se encontró expresado en algunos derivados de la cresta neural, incluidos los progenitores de melanocitos. Este sistema informador se usó para identificar y aislar prospectivamente las poblaciones  
20 de crestas neurales en el desarrollo de un esquema de diferenciación dirigida con el fin de producir cultivos de melanocitos con mayor pureza y números que los obtenidos con esquemas de maduración previos (figura 14, LSB-C).

25 En un protocolo de inhibición dual de SMAD (Chambers, et al. *Nat. Biotech.* (2009), las células madre pluripotentes humanas (hPSC) tratadas con dos moléculas pequeñas para inhibir la señalización de SMAD produjeron eficientemente tejidos neurales del SNC. Además, cuando se sembró en placas hESC a densidades más bajas, se observaron niveles bajos de inducción espontánea de células de la cresta neural (por ejemplo, se observaron aproximadamente un 3 % de células del tipo de la cresta neural *Sox10::GFP+*). Sin embargo, para su uso en investigación y estudios médicos, se necesitaban un mayor número de células del tipo de la cresta neural. Además,  
30 para la investigación de melanocitos, era necesaria una población más pura con un mayor número de células que no recibieran la diferenciación espontánea de bajo nivel.

Durante el desarrollo, los autores descubrieron métodos para optimizar el protocolo de inhibición dual de SMAD para la inducción de la cresta neural de una manera que produciría rendimientos muy puros de precursores de melanocitos,  
35 melanocitos en maduración y melanocitos maduros.

Específicamente, se desarrolló la siguiente línea temporal de cultivo que produjo melanocitos: Alimentación los días 0 y 1 con LDN y SB (usando los mismos intervalos de concentración que LDN y SB en los métodos que comprenden 3i); Alimentación el día 2 con LDN, SB, CHIR (usando los mismos intervalos de concentración que LDN, SB y CHIR  
40 en los métodos que comprenden 3i como se describe en el presente documento); En una realización, alimentación el día 3 con SB, CHIR (usando los mismos intervalos de concentración que SB y CHIR en los métodos que comprenden 3i como se describe en el presente documento), en otra realización alimentación el día 3 con LDN, SB, CHIR (usando los mismos intervalos de concentración que LDN, SB y CHIR en los métodos que comprenden 3i como se describe en el presente documento); Alimentación en el día 4 y 5 con CHIR (usando los mismos intervalos de concentración  
45 que CHIR en los métodos que comprenden 3i como se describe en el presente documento); Alimentación en los días 6 a 11 con CHIR, BMP4 y EDN3 (usando los mismos intervalos de concentración que CHIR en los métodos que comprenden 3i como se describe en el presente documento, véanse los intervalos de concentración a continuación para BMP4 y EDN3). El día 11, las células se pasaron y se alimentaron con medios MEL (incluido CHIR) hasta 8  
50 semanas.

Los medios MEL enriquecieron los melanocitos de tal manera que a las 8 semanas los cultivos celulares mostraron hasta el 100 % de una población pura. Así, este método/protocolo LSB-MEL tenía una alta eficiencia en la producción de melanocitos. Los autores también descubrieron durante el desarrollo de los melanocitos, que el ácido linoleico era al menos un ingrediente requerido en el medio MEL (véase la figura 16).  
55

Durante el desarrollo de los melanocitos, se observaron múltiples fases precursoras en el siguiente orden: células madre de la cresta neural, células madre embrionarias gliales-de melanoblastos, células madre de melanocitos adultos, melanocitos, véase, esquemas a modo de ejemplo en la figura 13.

60 Figura 13. Especificación y aislamiento de progenitores de melanocitos/melanoblastos. El protocolo LSB-C de 11 días soportó la derivación de *Sox10::GFP*, MITF coexpresando progenitores de melanocitos (A, panel derecho). Se observaron poblaciones positivas únicas de MITF (A, panel izquierdo). c-Kit fue identificado como un marcador potencial de progenitores de melanocitos. Se observó un bajo porcentaje de células que coexpresan *Sox10::GFP*, c-kit después de la diferenciación de LSB-C (B, población naranja). El análisis por qRT-PCR confirmó el enriquecimiento de los marcadores de melanocitos MITFM (una proteína básica de hélice-bucle-hélice-cremallera de leucina) y Dct (dopacromo tautomerasa (dopacromo delta-isomerasa, proteína relacionada con la tirosina 2)) en la población doble  
65

positiva (C). El tratamiento con BMP4 y EDN3 ("LSB-Mel") mejoró la inducción de la población de progenitores de melanocitos supuestos positivos dobles Sox10::GFP, c-kit (D). Las células doble positivas Sox10::GFP, c-kit aisladas después del tratamiento con LSB-Mel exhibieron niveles significativamente más altos de marcadores de melanocitos MITFM y Dct (E). Las barras de error representan s.e.m. \* p<0,05.

5 Figura 14. Expansión y maduración de precursores de melanocitos.

Resumen de condiciones de diferenciación (A). Después de la especificación en condiciones de LSB-C con BMP4 y EDN3 (LSB-Mel) las células se clasificaron el día 11 y se volvieron a sembrar en placas. Las células post-clasificación (PS) se mantuvieron en medios de maduración que contenían ligando c-kit (SCF), endotelina 3 (EDN3), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y activadores de Wnt. Las células pigmentadas observadas por microscopía de campo claro en el día 6 PS fueron positivas para el marcador de melanocitos MITF pero parecían haber regulado negativamente el indicador Sox10::GFP (B). Todas las poblaciones, excepto las doble negativas Sox10::GFP, c-kit eventualmente dieron lugar a células que expresan MITF y grupos pigmentados macroscópicos, pero a tasas diferentes (C). El tratamiento con BMP4 y cAMP mejoró la diferenciación en células pigmentadas que exhiben una morfología similar a un huso típica de los melanocitos (D).

Figura 15. Caracterización de melanocitos maduros.

20 Las poblaciones puras de melanocitos maduros derivados del protocolo LSB-Mel mantienen la expresión de marcadores de melanocitos comunes, incluyendo MITF, Sox10, Tyrp1 (proteína relacionada con la tirosinasa 1) y HMB45 después de más de 8 semanas en cultivo (A). Los melanocitos conservan su fenotipo pigmentado oscuro durante varias semanas en pase (B). Se sedimentaron  $1 \times 10^6$  células y se fotografiaron para evaluar los niveles de pigmentación. caracterización ultraestructural microscópica electrónica de melanocitos maduros (C, D). La presencia de numerosos melanosomas de pigmentación oscura en el citoplasma de los melanocitos derivados de LSB-Mel se observó por MET (C). Obsérvese la presencia y el depósito progresivo de pigmento de melanina con la maduración de las vesículas de melanosomas de las fases I a IV (D).

30 Por lo tanto, los autores demostraron que un protocolo de inhibición dual de SMAD, LSB, generó rápida y eficientemente poblaciones de cresta neural que expresan Sox10::GFP a partir de células madre embrionarias humanas. Este protocolo modificado apoyó la inducción de niveles bajos de progenitores de melanocitos, que se identificaron y aislaron prospectivamente mediante la expresión de c-kit. La inducción de estas células se mejoró aún más mediante el tratamiento con BMP4 y EDN3. Los progenitores de melanocitos se maduraron posteriormente a un estado pigmentado después de un cultivo adicional in vitro en presencia de BMP4 y cAMP.

35

<b>Medio celular para LSB-MEL: Medios Mel-1:</b>			
NeuroBasal	Invitrogen 21103049	50 %	
DMEM bajo en glucosa	Invitrogen 11885	30 %	
MCDB201	Sigma M6770	20 %	
B27	Invitrogen 17504-044	2 %	
ITS	Sigma I314	1 %	
Ácido linoleico-BSA	Sigma L9530	1 %	
L-glut	Gibco 25030-164	250	nM
Dexametasona	Sigma D2915	0,05	uM
Toxina colérica	Sigma C8052	50	ng/ml
L-AA	Sigma A5960	100	uM
SCF	Peptotech 300-07	50	ng/ml
EDN3	American Peptide Company 88-5-10B	100	nM
FGF2	R&D 233-FB-001MG/CF	4	ng/ml
cAMP	Sigma D-0260	500	uM
BMP4	R&D 314-bp	25	ng/ml
Chir	Stemgent 04-0004	3	uM

<b>Día 6-11:</b>			
BMP4	R&D 314-bp	25	ng/ml
EDN3	American Peptide Company 88-5-10B	100	nM

Intervalos de concentración para BMP4 de R&D: se usan entre 10 ng/ml y 100 ng/ml (en una realización a 25 ng/ml), y se usa EDN de American Peptide Company a 25-300 nM (en una realización a 100 nM).

40 Figura 16. Muestra una formulación a modo de ejemplo de medio LSB-MEL que requirió ácido linoleico para el

crecimiento de melanocitos. El componente de medio que se muestra por encima de las vistas microscópicas representa el componente de medio que queda fuera de la formulación; Ph = contraste de fase; BF = campo claro. Un esquema a modo de ejemplo muestra marcadores progenitores de melanocitos usados para identificar células.

- 5 Así, los autores descubrieron y desarrollaron un protocolo rápido y definido para la inducción de la cresta neural *in vitro*. Además, los autores usaron este protocolo rápido y definido para la inducción de células de la cresta neural *in vitro* para desarrollar composiciones y métodos para la diferenciación dirigida de estas células en melanocitos. Estos melanocitos fueron únicos en su capacidad para el cultivo a largo plazo y la producción continua de eumelanina.

**REIVINDICACIONES**

1. Un kit para inducir la diferenciación dirigida de una célula madre a una célula madre de la cresta neural, que comprende:
  - 5 un primer inhibidor de la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ)/Activina-Nodal, un segundo inhibidor de la señalización de Small Mothers Against Decapentaplegic (SMAD), un tercer inhibidor de glucógeno sintasa cinasa 3β (GSK3β), y
  - 10 un cuarto inhibidor que reduce la señalización de la familia del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), en donde dicha señalización de la familia del receptor de FGF comprende receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y receptores de tirosina cinasa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).
2. El kit de la reivindicación 1, en el que dicho primer inhibidor es una molécula pequeña seleccionada del grupo que consiste en SB431542, derivados de la misma y mezclas de los mismos.
3. El kit de la reivindicación 1, en el que dicho primer inhibidor es SB431542.
4. El kit de la reivindicación 1, en el que dicho segundo inhibidor es una molécula pequeña seleccionada del grupo que consiste en LDN193189, derivados de la misma y mezclas de los mismos.
- 20 5. El kit de la reivindicación 1, en el que el segundo inhibidor es LDN193189.
6. El kit de la reivindicación 1, en el que dicho tercer inhibidor se selecciona del grupo que consiste en CHIR99021 y derivados del mismo.
7. El kit de la reivindicación 1, en el que el tercer inhibidor es CHIR99021.
8. El kit de la reivindicación 1, en el que dicho cuarto inhibidor se selecciona del grupo que consiste en SU5402 y derivados del mismo.
- 30 9. El kit de la reivindicación 1, en el que el cuarto inhibidor es SU5402.
10. El kit de la reivindicación 1, que comprende además un quinto inhibidor capaz de disminuir la señalización de Notch, opcionalmente en donde dicho quinto inhibidor se selecciona del grupo que consiste en N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster (DAPT) y sus derivados.
- 35 11. El kit de la reivindicación 1, en el que dicho quinto inhibidor es N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster (DAPT).
- 40 12. El kit de la reivindicación 1, que comprende además anticuerpos usados para la detección de la expresión de proteínas seleccionadas del grupo que consiste en nestina, OCT4, PAX6, TUJ1, SOX10, NTRK1, ISLI, POU4F1 (BRN3A), NEUROG2, NEUROGI, MAP2, OTX2, DLKI, DKKI, CUZDI, MSXI, ID2, AP2B, ETSI, FOXD3, NGNI, DCX, TUBB3, SYT4, STMN2, INA, GAP43, TACI, VGLUT2, SLC15A3 y TRPV1.
- 45 13. El kit de la reivindicación 1, que comprende además una célula madre humana.
14. El kit de la reivindicación 13, en el que dicha célula madre humana es una célula madre pluripotente humana (hPSC) con cromosoma artificial bacteriano (BAC) *SOX10::GFP* transgénico.
- 50 15. Un método para inducir la diferenciación dirigida de una célula madre, que comprende
  - a) proporcionar:
    - 55 i) un cultivo celular que comprende una célula madre humana; y ii) un primer inhibidor, un segundo inhibidor y un tercer inhibidor, en donde dicho primer inhibidor es un inhibidor de la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ)/Activina-Nodal, dicho segundo inhibidor es un inhibidor de la señalización de Small Mothers Against Decapentaplegic (SMAD) y dicho tercer inhibidor es un inhibidor de la glucógeno sintasa cinasa 3β (GSK3β);
    - b) poner en contacto *in vitro* dicha célula madre con dicho primer y dicho segundo inhibidores durante hasta 96 horas; y
    - 60 c) poner en contacto dicha célula madre con dicho tercer inhibidor durante hasta 240 horas; para producir una célula madre diferenciada seleccionada del grupo que consiste en una célula madre de la cresta neural, una célula del linaje de la cresta neuronal y una célula del linaje neuronal.
- 65 16. El método de la reivindicación 15, en el que dicho primer inhibidor es una molécula pequeña seleccionada del grupo que consiste en SB431542, derivados de la misma y mezclas de los mismos.

17. El método de la reivindicación 15, en el que dicho segundo inhibidor es una molécula pequeña seleccionada del grupo que consiste en LDN193189, derivados de la misma y mezclas de los mismos.
- 5 18. El método de la reivindicación 15, en el que dicho tercer inhibidor se selecciona del grupo que consiste en CHIR99021 y derivados del mismo.
- 10 19. El método de la reivindicación 15, que comprende además poner en contacto dicha célula con un cuarto inhibidor y un quinto inhibidor, en donde dicho cuarto inhibidor se selecciona del grupo que consiste en SU5402 y derivados del mismo, en donde dicho quinto inhibidor se selecciona del grupo que consiste en N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster (DAPT) y derivados del mismo para la diferenciación dirigida de una célula de linaje neuronal en una célula nociceptora peptidérgica.
- 15 20. El método de la reivindicación 19, en el que dicha célula nociceptora peptidérgica expresa un marcador seleccionado del grupo que consiste en OCT4, DLK1, PAX6, SOX10, POU4F1 (BRN3A), ISL1, NEUROG2, NEUROG1, NTRK1, RET, RUNX1, VGLUT2, TAC1 y TRPV1.
- 20 21. El método de la reivindicación 19, en el que dicha célula nociceptora peptidérgica expresa un marcador seleccionado del grupo que consiste en ISL1, POU4F1 (BRN3A), RET, RUNX1 y NTRK1.
22. El método de la reivindicación 15, en el que dicha célula madre es una célula madre pluripotente humana (hPSC).
- 25 23. El método de la reivindicación 22, en el que dicha hPSC es una célula madre embrionaria humana o una célula madre pluripotente inducida humana (hiPSC).
24. El método de la reivindicación 15, en el que el primer inhibidor es SB431542.
25. El método de la reivindicación 15, en el que el segundo inhibidor es LDN193189.
- 30 26. El método de la reivindicación 15, en el que el tercer inhibidor es CHIR99021.
- 35 27. El método de la reivindicación 15, que comprende además poner en contacto dicha célula madre con un cuarto inhibidor que es SU5402 y un quinto inhibidor que es DAPT, en donde se produce una célula del linaje de la cresta neural.
- 40 28. El método de la reivindicación 27, en el que dicha célula del linaje de la cresta neural es una célula nociceptora peptidérgica.
- 40 29. Un método de cribado de un agente biológico *in vitro*, que comprende,
- 45 a) proporcionar:
- i) un cultivo celular que comprende una célula madre humana; y ii) un primer inhibidor, un segundo inhibidor y un tercer inhibidor, en donde dicho primer inhibidor es un inhibidor de la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ )/Activina-Nodal, dicho segundo inhibidor es un inhibidor de la señalización de Small Mothers Against Decapentaplegic (SMAD) y dicho tercer inhibidor es un inhibidor de la glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ );
- 50 b) poner en contacto *in vitro* dicha célula madre con dicho primer y dicho segundo inhibidores durante hasta 96 horas; y
- c) poner en contacto dicha célula madre con dicho tercer inhibidor durante hasta 240 horas para producir una célula nociceptora;
- d) proporcionar un compuesto de ensayo; y
- e) poner en contacto dicha célula nociceptora con dicho compuesto de ensayo y medir la función nociceptora, en donde dicha función es la medición de un potencial de acción.
- 55 30. El método de la reivindicación 29, en el que dicha célula madre humana es una célula madre pluripotente humana (hPSC).
- 60 31. El método de la reivindicación 30, en el que dicha hPSC es una célula madre embrionaria humana o una célula madre pluripotente inducida humana (hiPSC).

Figura 1

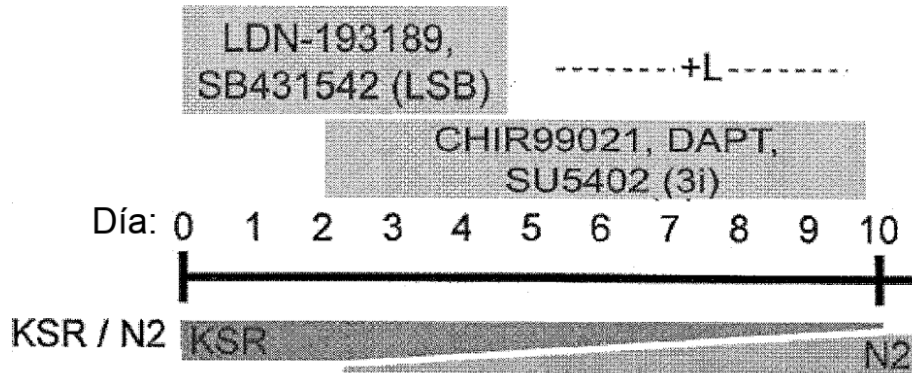


Figura 2

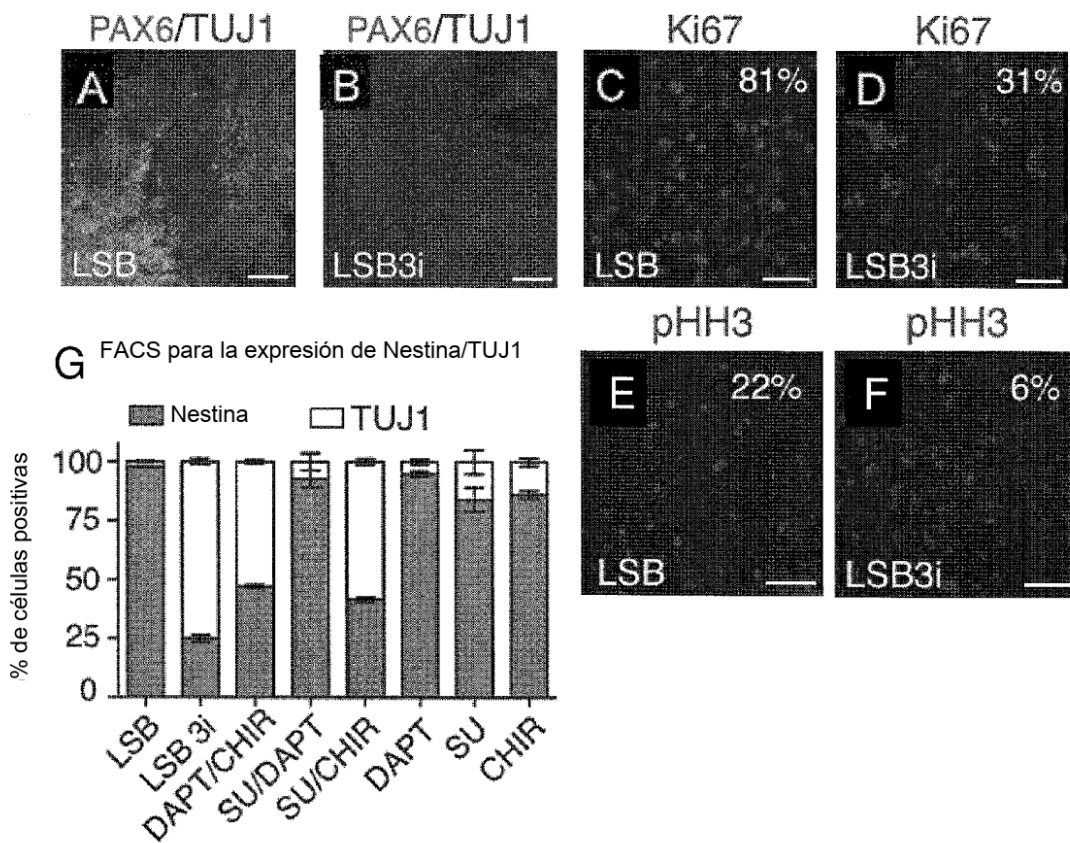


Figura 3

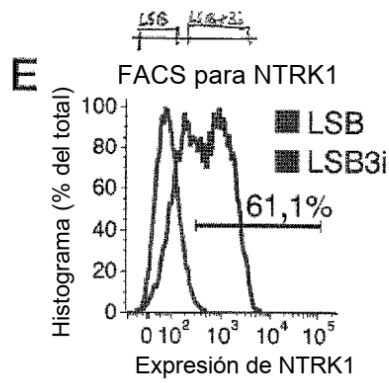
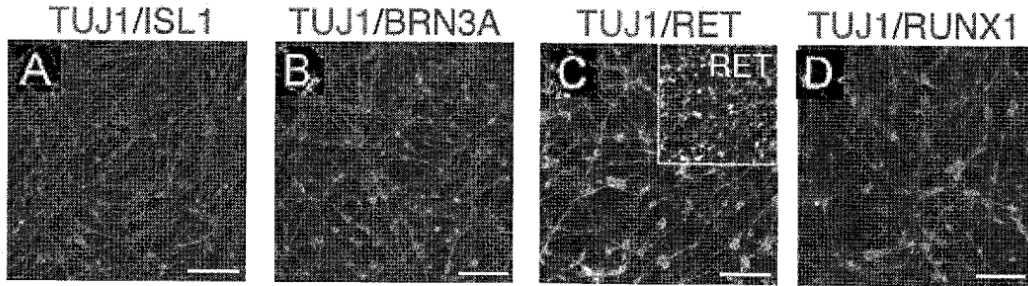


Figura 4

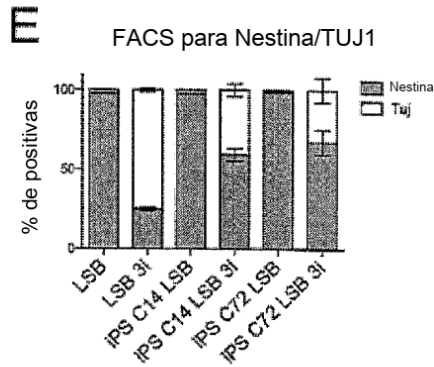
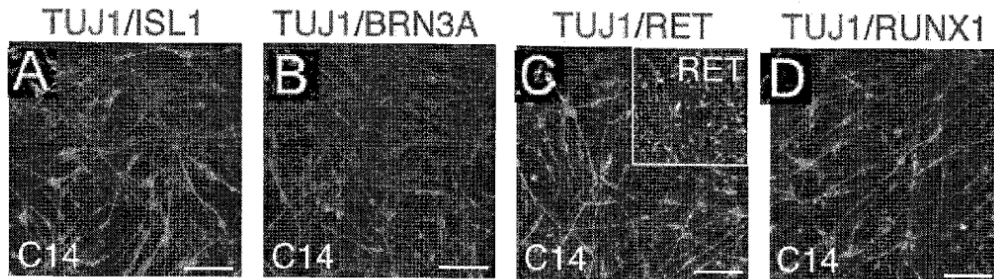


Figura 5

SOX10::GFP (Día 8)

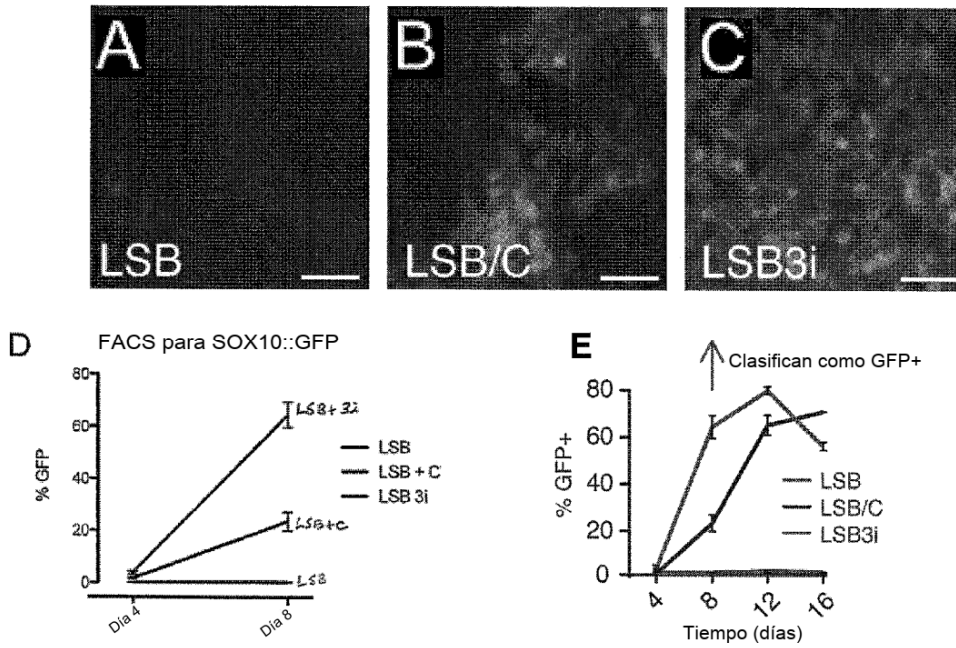
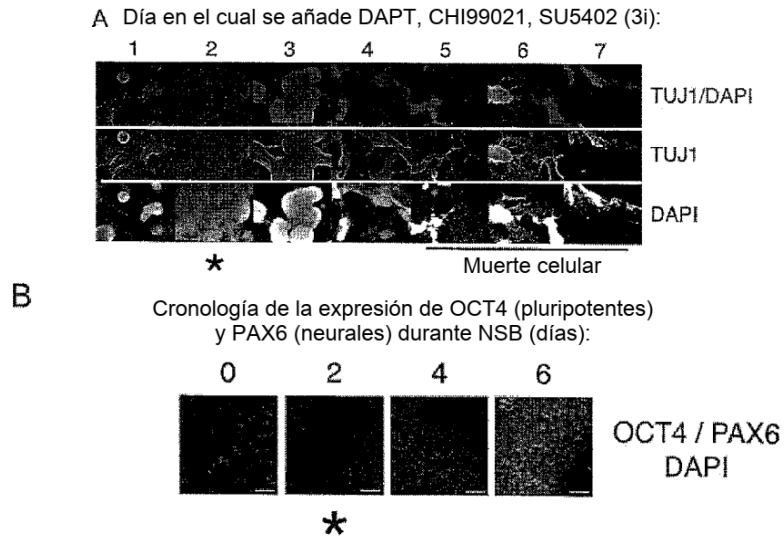
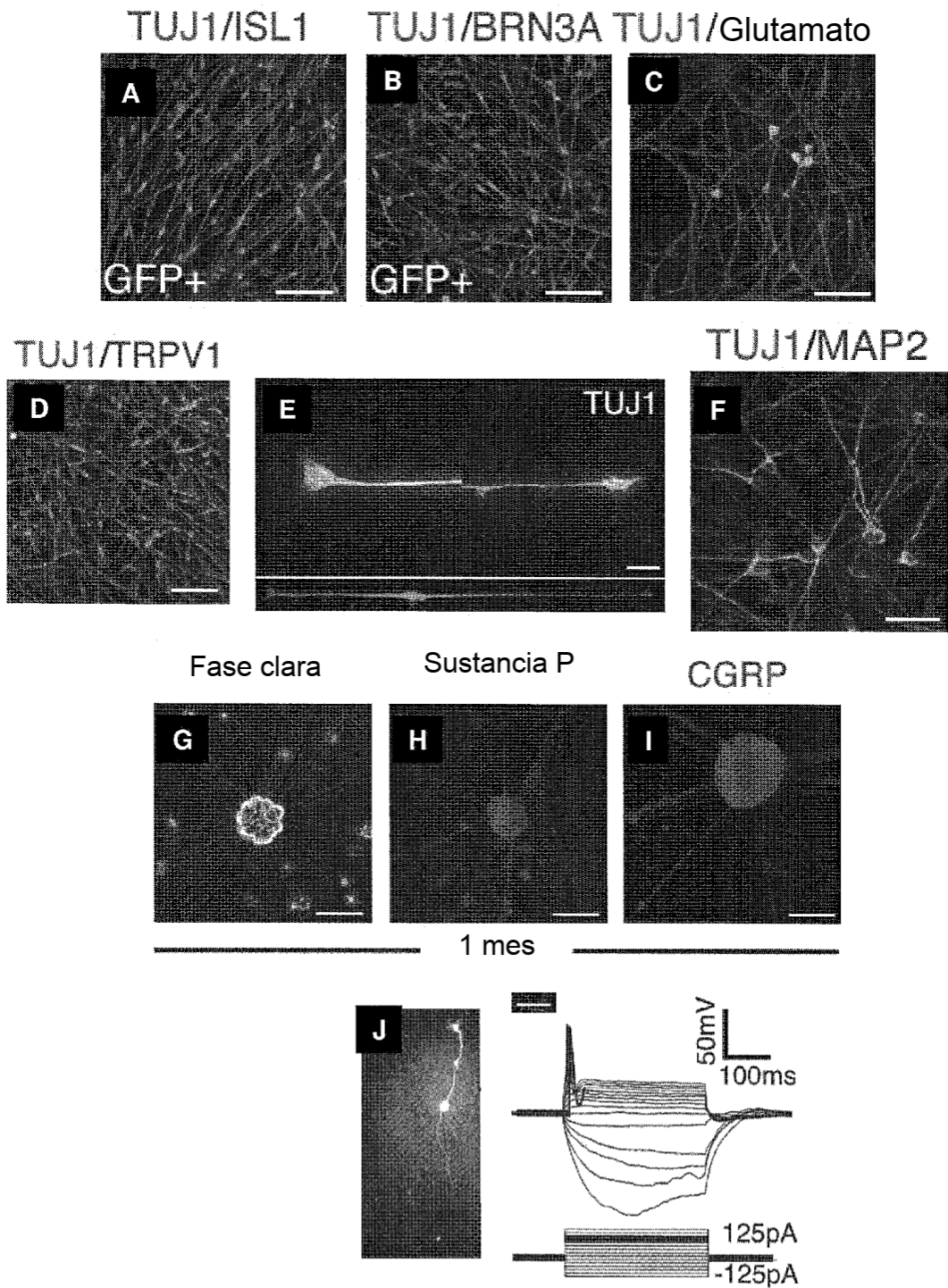


Figura 6

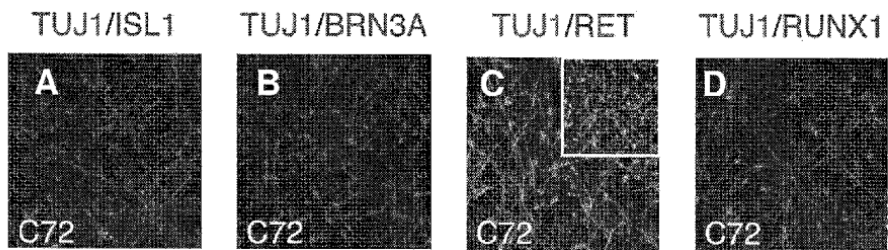




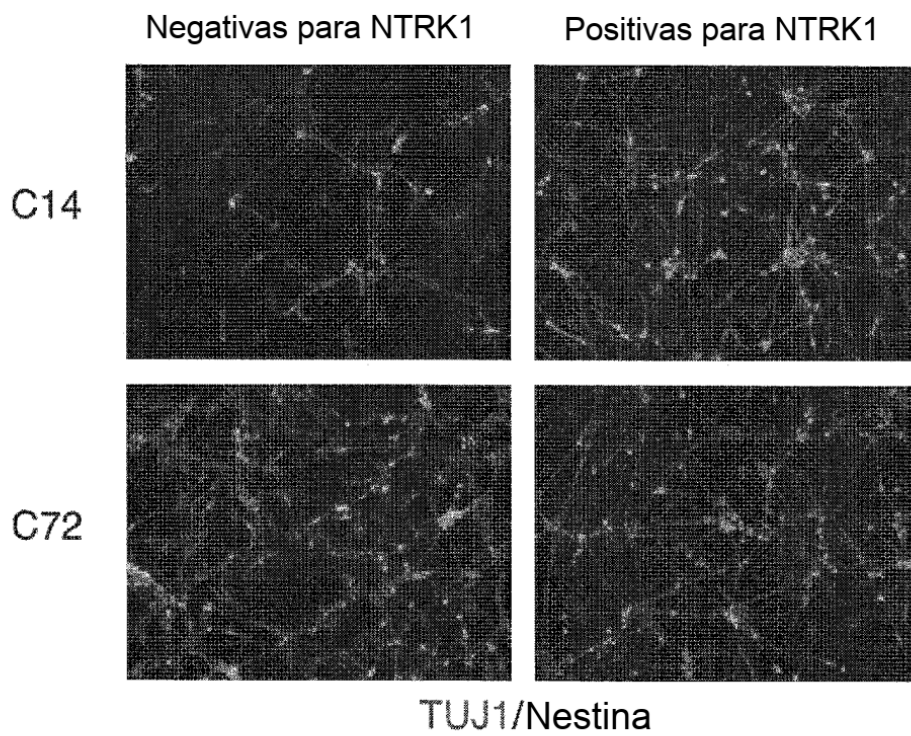
### Figura 7



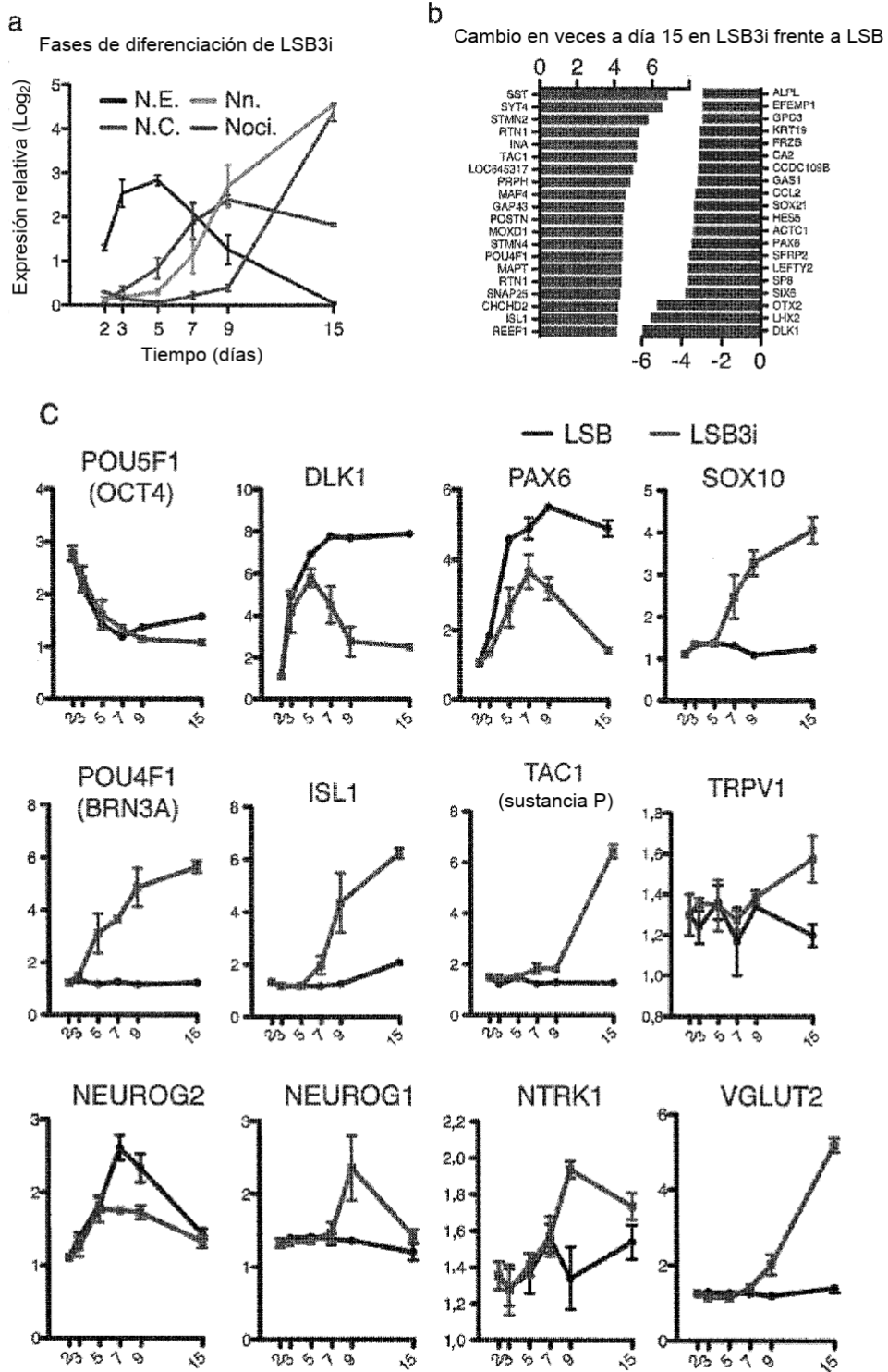
**Figura 8**



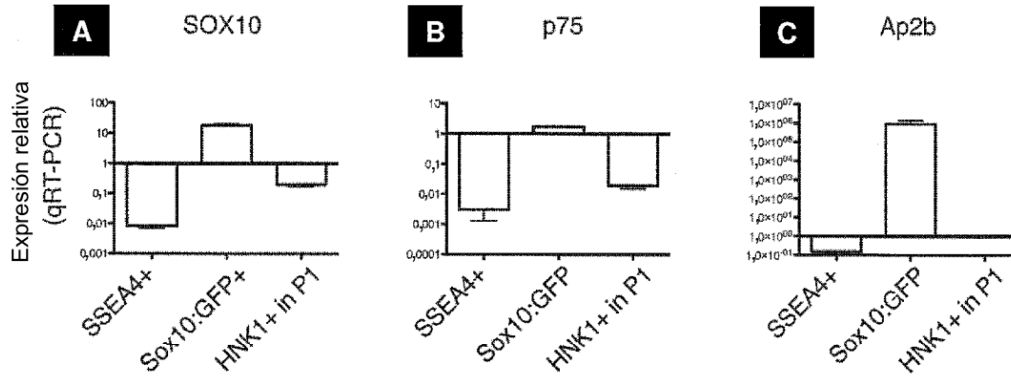
**Figura 9**



# Figura 10



**Figura 11**



**Figura 12**

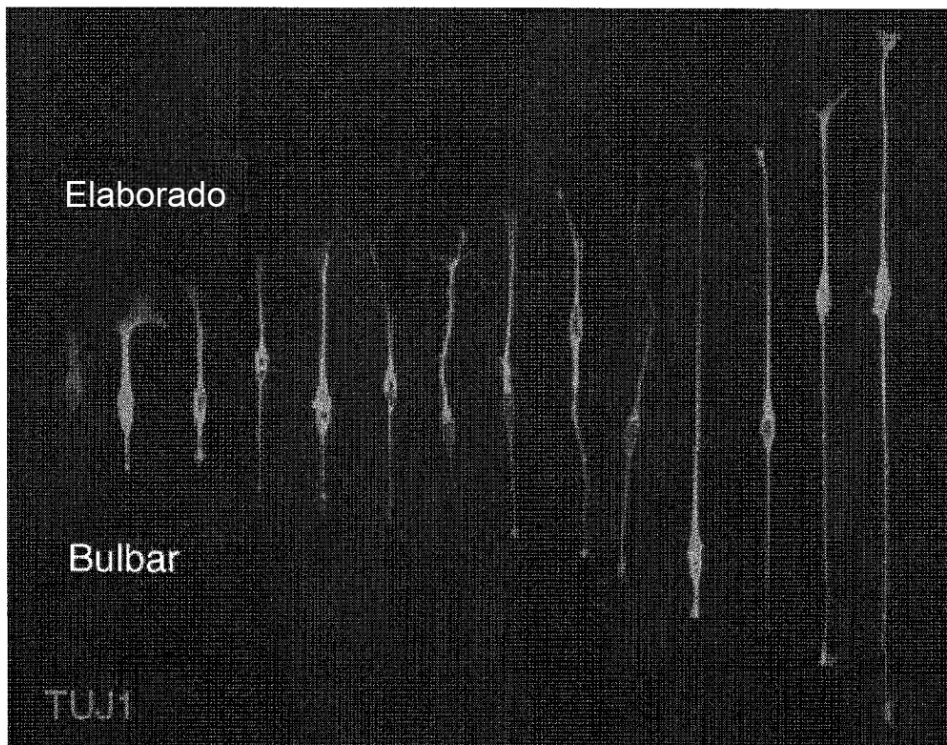
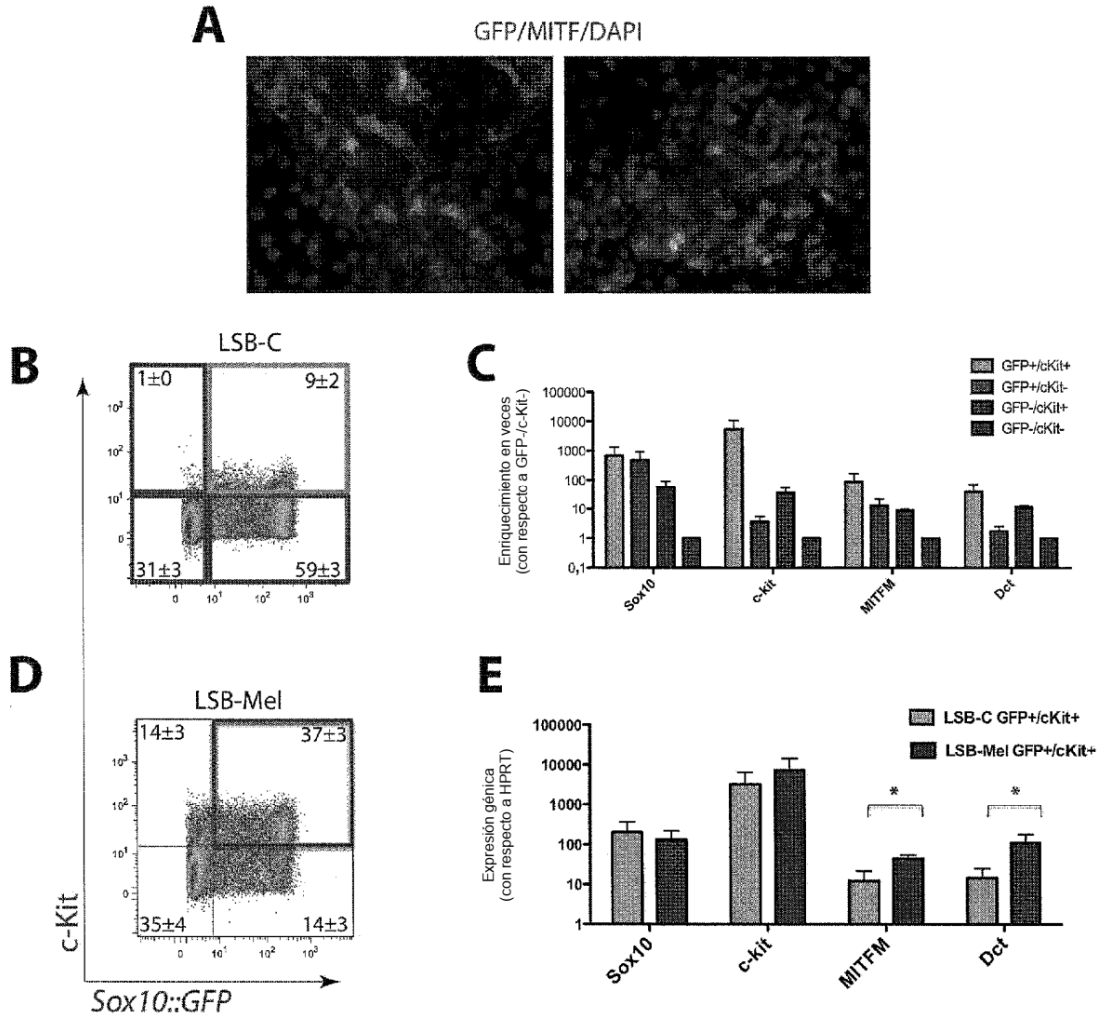
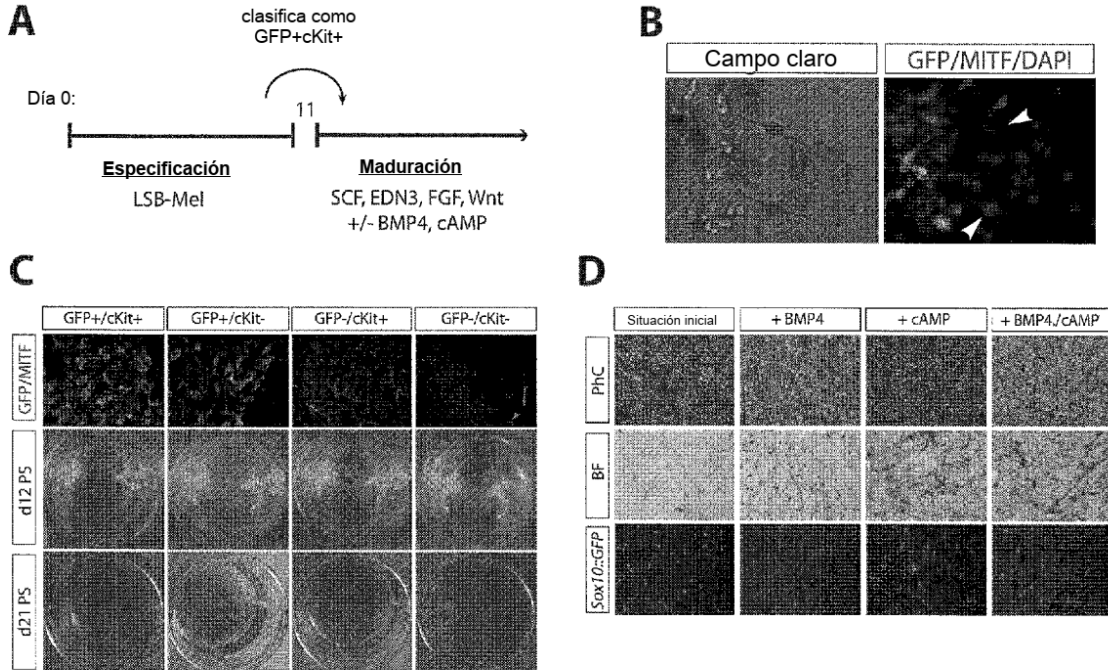


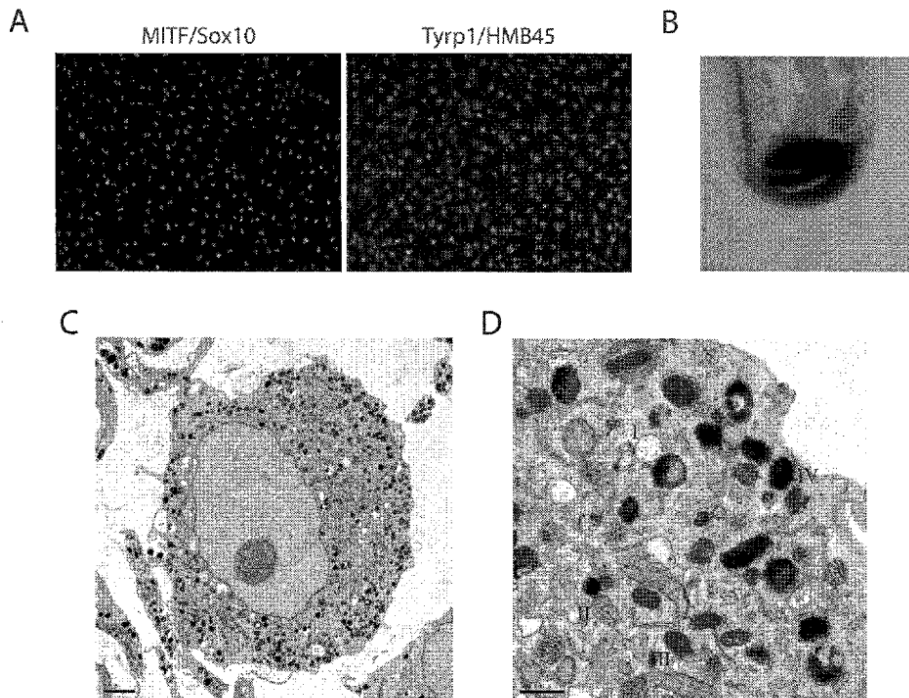
Figura 13



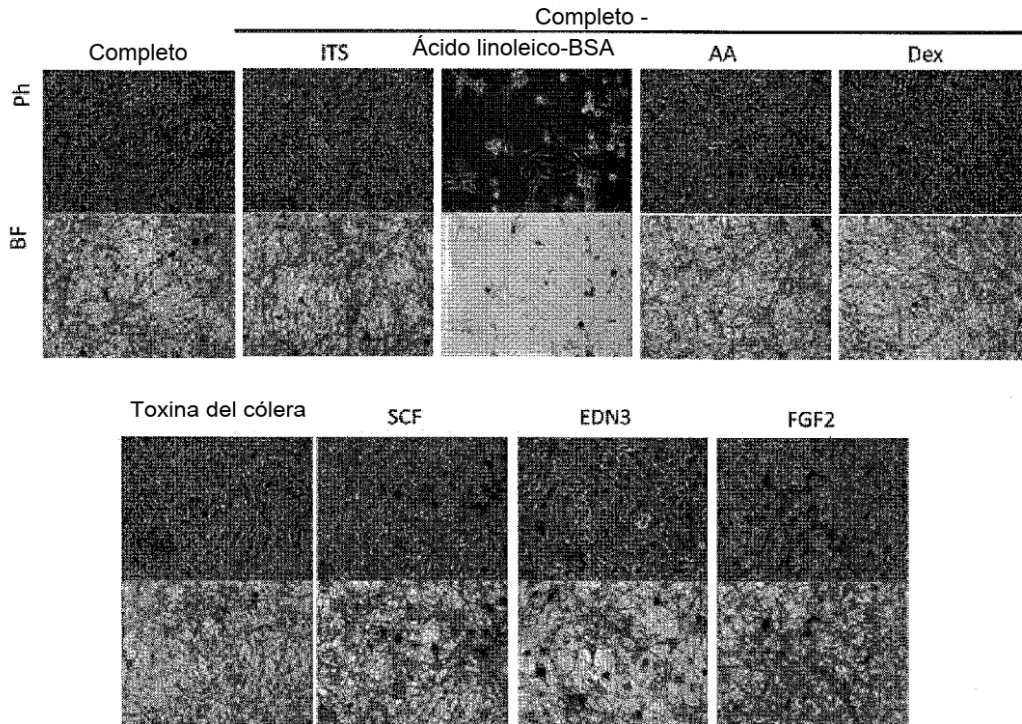
**Figura 14**



**Figura 15**



**Figura 16**



Marcadores de progenitores de melanocitos

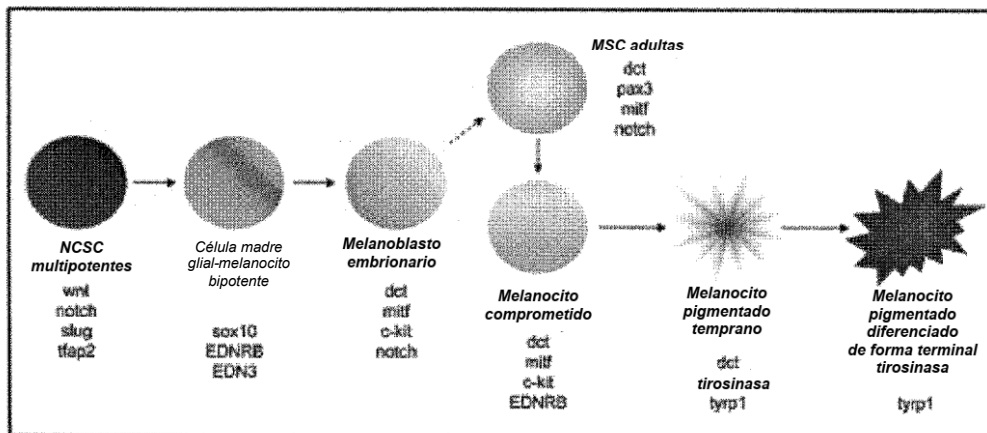


Figura 17

