

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 859**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/077 (2010.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2012** **PCT/EP2012/066793**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013** **WO13030243**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2012** **E 12753961 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019** **EP 2756075**

54 Título: **Método para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) y su uso**

30 Prioridad:

29.08.2011 EP 11306080

29.08.2011 US 201161528348 P

01.06.2012 EP 12305610

01.06.2012 US 201261654120 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.05.2020

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR;

CNRS (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) (25.0%);

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (25.0%) y

ASSOCIATION FRANÇAISE CONTRE LES MYOPATHIES (25.0%)

72 Inventor/es:

POURQUIE, OLIVIER y

CHAL, JÉRÔME

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 761 859 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 para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) y su uso

CAMPO DE LA INVENCION:

- 5 [0001] La presente invención se refiere a un método *ex vivo* para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM), donde dicho método comprende el paso de cultivo de células pluripotentes en un medio de cultivo apropiado que comprende una cantidad eficaz de un activador de la vía de señalización de Wnt y una cantidad eficaz de un inhibidor de la vía de señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION:

- 10 [0002] La investigación de células madre embrionarias (ES) ofrece un potencial sin precedentes para entender los procesos de desarrollo fundamentales, tal como la diferenciación de linajes. Las líneas de células madre embrionarias derivan de embriones tempranos y se caracterizan por su capacidad para autorrenovarse, es decir, para ser mantenidas indefinidamente en un estado proliferativo e indiferenciado en cultivo. Las células ES son también pluripotentes, lo que significa que retienen la capacidad para diferenciarse en los tres linajes embrionarios: ectodermo, mesodermo y endodermo más todos sus derivados (Chambers I., 2004). El desarrollo reciente de las
- 15 tecnologías de reprogramación permite generar ahora células madre similares a ES a partir de células somáticas, tales como fibroblastos. La introducción en células somáticas de un conjunto pequeño de factores de transcripción específicos -Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4 en el ratón (Takahashi y Yamanaka, 2006) y el ser humano (Park et al., 2008b; Takahashi et al., 2007), u Oct4, Sox2, Nanog y Lin28 en el ser humano (Yu et al., 2007)- puede reprogramar varios tipos de células diferenciadas hacia un estado de célula madre similar a ES (células madre pluripotentes inducidas o iPS). Esta estrategia permite ahora la generación de líneas celulares similares a ES a partir de pacientes
- 20 individuales y, así, ofrece la posibilidad de crear modelos *in vitro* altamente relevantes de enfermedades genéticas humanas. Tales líneas celulares reprogramadas ya se han generado a partir de pacientes con una variedad de enfermedades, tales como la distrofia muscular de Duchenne o la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y la diferenciación de las células reprogramadas hacia el tejido deficiente se ha conseguido para células iPS de
- 25 pacientes afectados con varias enfermedades tales como la ALS, demostrando así la posibilidad del enfoque (Dimos et al., 2008; Park et al., 2008a).

- [0003] Mientras que algunos linajes tales como los miocitos cardíacos o las neuronas se generan fácilmente *in vitro* a partir de células ES, la diferenciación de derivados del mesodermo paraxial tales como el músculo esquelético, la dermis, el cartílago o el hueso a partir de células ES o iPS ha demostrado ser un desafío. Dadas las promesas
- 30 ofrecidas por la terapia de sustitución celular para la cura de algunas enfermedades degenerativas musculares o para la cirugía ortopédica, el desarrollo de protocolos para la producción de precursores de linajes musculares y esqueléticos es de una importancia clave. En el embrión, los músculos, la dermis dorsal y el esqueleto axial del cuerpo derivan del mesodermo paraxial y más específicamente de precursores multipotentes que forman el mesodermo presomítico (PSM). Estos precursores se caracterizan por la expresión de los genes Brachyury (T), Tbx6 y Mesogenin1 (Msgn1) (Chapman et al., 1996; Yoon and Wold, 2000) y se diferencian en su mayoría hacia
- 35 linajes de músculos esqueléticos, dermis, esqueléticos, así como en una variedad de otros derivados, incluidos los adipocitos y las células endoteliales. En el embrión de ratón, Rspo3 (también llamada Cris1, Thsd2) se expresa fuertemente en el PSM y los somitas, así como después en células mesenquimales en condensación, (Kazanskaya et al., 2004; Nam et al., 2007). Las R-espondinas (genes Rspo1 a 4) son moléculas secretadas con un dominio de
- 40 trombospondina, que pueden activar la señalización canónica de Wnt y beta-catenina, a través del complejo de correceptores Fzd/LRP/Lgr4/Lgr5 (Carmon et al., 2011; de Lau et al., 2011; Kim et al., 2008; Nam et al., 2006), pero también se ha mostrado que se unen a Syndecan4 e inducen la señalización de Wnt/PCP (Ohkawara et al., 2011). De manera interesante, los ensayos bioquímicos muestran que Rspo2 y 3 son más potentes para activar la
- 45 señalización de Wnt que Rspo1 y 4 (Kim et al., 2008). También se ha demostrado que las R-espondinas están implicadas en la formación de hueso y la condrogénesis (Hankenson et al., 2010; Jin et al., 2011; Ohkawara et al., 2011), la miogénesis (Han et al., 2011; Kazanskaya et al., 2004) y la angiogénesis (Kazanskaya et al., 2008).

- [0004] Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) son moléculas secretadas de la superfamilia del TGFbeta que pueden dimerizar y activar la señalización de BMP y se unen a un complejo receptor constituido por un receptor de
- 50 BMP de tipo I y de tipo II (BMPI-I y -II). Más precisamente, BMPI-I puede consistir en una quinasa similar al receptor de activina (ALK)-2/3 y 6 (también conocidos como ActR-IA, BMPI-IA y BMPI-IB, respectivamente). De forma similar, BMPI-II puede consistir en BMPI-II, ActR- IIA y ActR-IIB. El complejo del receptor de BMP está formado por un complejo heterotetramérico de dos BMPI-I y dos BMPI-II. El receptor de BMP contiene un dominio de quinasa de serina/treonina intracitoplásmica que permite la fosforilación de Smad 1/5/8 tras la unión del dímero de BMP. Las Smad1/5/8 fosforiladas se asocian entonces a Smad4 y se transportan al núcleo para activar genes
- 55 diana, que incluyen los genes inhibidores de la unión de ADN (Id) 1/2/3 [Hollnagel A et al., 1999]. De manera importante, se han descrito numerosos agonistas y antagonistas secretados de BMP/TGFβ que regulan y ajustan

la señalización de BMP durante el desarrollo. En particular, la nogina, la cordina, la folistatina y la gremlina bloquean la señalización de BMP secuestrando la BMP secretada, lo que evita su unión al receptor. Se han implicado ligandos de BMP (preeminentemente BMP2, 4 y 7), receptores de BMP, Smads, Co-Smads y agonistas/antagonistas de BMP en la especificación del mesodermo y la organogénesis durante el desarrollo [Derynck Rik, 2008; Reshef R. et al., Gen Dev 1998; Wijgerde M. et al, 2005; McMahon JA et al, 1998; Stafford DA et al, 2011; Pourquie O. et al, 1996 y Tonegawa A. et al, 1997].

[0005] La diferenciación de células ES en el mesodermo paraxial y sus derivados es altamente ineficaz *in vitro*. La limitada diferenciación de músculo esquelético espontánea se ha descrito siguiendo el cultivo de cuerpos embrionarios de ratón y el tratamiento con DMSO (Dinsmore et al., 1996; Rohwedel et al., 1994) o el tratamiento con ácido retinoico (Kennedy et al., 2009). Se ha informado de dos estrategias diferentes para diferenciar *in vitro* células ES de ratón y humanas hacia el linaje muscular. La primera implica la clasificación de precursores usando marcadores de superficie. Por ejemplo, el grupo de Studer informó del aislamiento de precursores mesenquimales CD73+ derivados de células ES humanas y su diferenciación posterior en músculo esquelético después de un periodo de cultivo en medio que contenía suero (Barberi et al., 2007). El anticuerpo contra las células satélite SM/C-2.6 se usó también para aislar células miogénicas diferenciadas de células ES e iPS de ratón (Fukada et al., 2004; Mizuno et al., 2010). Por último, también se aislaron precursores del mesodermo diferenciados a partir de células ES de ratón en función de su expresión de otros marcadores de superficie tales como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa (PDGFR α) o el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2) (Sakurai et al., 2009; Sakurai et al., 2008) Sakurai H. et al., 2006; Takebe A. et al, 2006). Sin embargo, no se ha demostrado si esta combinación de marcadores es estrictamente específica de los precursores del mesodermo paraxial. La segunda estrategia se basa en la expresión forzada de los factores de transcripción Pax3 o MyoD, o del factor secretado factor de crecimiento insulínico 2 (IGF-2) en células ES de ratón (Darabi et al., 2008; Darabi et al., 2011; Dekel et al., 1992; Prella et al., 2000; Shani et al., 1992). A. G. Schroder describe la diferenciación del mesodermo paraxial en embrión de ratón usando un sistema *in vitro* que usa proteínas recombinantes de las vías de señalización de Wnt y Bmp (Schroder A.G., 2011). Sin embargo, estas estrategias o muestran una eficacia limitada o requieren la introducción de ADN exógeno en las células ES, lo que es un obstáculo importante para el desarrollo de terapias celulares seguras, y las células diferenciadas a menudo muestran un potencial limitado de proliferación y de injerto.

[0006] Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar mejores estrategias de diferenciación de células ES e iPS para producir células musculares y linajes derivados del mesodermo paraxial para el desarrollo de aplicaciones en medicina regenerativa.

[0007] La presente invención satisface esta necesidad proporcionando un método para preparar líneas celulares progenitoras multipotentes que expresan marcadores de los progenitores del mesodermo paraxial y denominadas células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas o iPAM para distinguirlas de las células progenitoras del mesodermo paraxial embrionarias naturales. Como sus homólogas *in vivo*, las células iPAM son capaces de dar lugar a linajes celulares del tejido muscular, esquelético (hueso y cartílago), dérmico y derivados tales como los adipocitos y el endotelio. Los inventores han demostrado que las células madre embrionarias o células reprogramadas pluripotentes (iPS) se pueden diferenciar en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) usando un número limitado de factores. En particular, los inventores han hecho el sorprendente hallazgo de que es posible obtener de manera eficaz células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) mediante el tratamiento con factores específicos, sin ninguna modificación genética de las células diana. Han demostrado que las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) obtenidas presentan características de células progenitoras del mesodermo paraxial endógenas. Según el conocimiento del solicitante, la invención es la primera descripción de un método para obtener cantidades ilimitadas de células adecuadas para el uso como células progenitoras para regenerar tejidos muscular, esquelético, adiposo o dérmico y endotelio derivado del mesodermo paraxial. Por lo tanto, la invención es muy útil en particular en medicina regenerativa.

RESUMEN DE LA INVENCION:

[0008] Así, la presente descripción se refiere a un método *ex vivo* para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM), donde dicho método comprende el paso de cultivo de células pluripotentes humanas en un medio de cultivo apropiado que comprende una cantidad eficaz de un activador de la vía de señalización de Wnt. En la presente invención, el activador de dicha vía de señalización de Wnt es un miembro de la familia de las R-espondinas o un inhibidor de GSK-3 β .

[0009] Particularmente, la presente descripción se refiere a un método *ex vivo* para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM), donde dicho método comprende el paso de cultivo de células pluripotentes humanas en un medio de cultivo apropiado que comprende una cantidad eficaz de un activador de la vía de señalización de Wnt y una cantidad eficaz de un inhibidor de la vía de señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP). En la presente invención, el activador de dicha vía de señalización de Wnt es un

miembro de la familia de las R-espondinas o un inhibidor de GSK-3 β y el inhibidor de la vía de señalización de BMP es un inhibidor del receptor de BMP de tipo I o un antagonista de BMP.

5 [0010] Más particularmente, la divulgación se refiere a un método *ex vivo* para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM), donde dicho método comprende el paso de cultivo de células pluripotentes humanas en un medio de cultivo apropiado que comprende una cantidad eficaz de un miembro de la familia de las R-espondinas y una cantidad eficaz de un inhibidor de la vía de señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP). En la presente invención, el inhibidor de la vía de señalización de BMP es un inhibidor del receptor de BMP de tipo I o un antagonista de BMP.

10 [0011] La divulgación también se refiere a un método alternativo que comprende el paso de cultivo de células pluripotentes humanas en un medio de cultivo apropiado que comprende una cantidad eficaz de un miembro de un inhibidor de la GSK-3 β y una cantidad eficaz de un inhibidor de la vía de señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP). En la presente invención, el inhibidor de la vía de señalización de BMP es un inhibidor del receptor de BMP de tipo I o un antagonista de BMP.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION:

15 Método para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM)

[0012] Un primer aspecto de la divulgación se refiere a un método *ex vivo* para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM), donde dicho método comprende el paso de cultivo de células pluripotentes humanas en un medio de cultivo apropiado que comprende una cantidad eficaz de un activador de la vía de señalización de Wnt.

20 [0013] En otro aspecto particular, la divulgación también se refiere a un método *ex vivo* para preparar una población de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM), donde dicho método comprende el paso de cultivo de células pluripotentes humanas en un medio de cultivo apropiado que comprende una cantidad eficaz de un activador de la vía de señalización de Wnt.

25 [0014] En un aspecto particular, la divulgación también se refiere a un método *ex vivo* para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM), donde dicho método comprende el paso de cultivo de células pluripotentes humanas en un medio de cultivo apropiado que comprende una cantidad eficaz de un activador de la vía de señalización de Wnt y una cantidad eficaz de un inhibidor de la vía de señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP).

30 [0015] En un aspecto particular, la divulgación se refiere a un método *ex vivo* para preparar una población de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM), donde dicho método comprende el paso de cultivo de células pluripotentes humanas en un medio de cultivo apropiado que comprende una cantidad eficaz de un activador de la vía de señalización de Wnt y una cantidad eficaz de un inhibidor de la vía de señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP).

35 [0016] Como se utiliza en este caso, el término "vía de señalización de Wnt" denota una vía de señalización que se puede dividir en dos vías: la "vía de señalización canónica de Wnt/beta catenina" y la "vía de señalización de Wnt/PCP". Como se utiliza en este caso, el término "vía de señalización canónica de Wnt/beta catenina" o "vía de señalización de Wnt/PCP", en su significado general, denota una red de proteínas y otras moléculas bioactivas (lípidos, iones, azúcares...) más conocidos por sus funciones en la embriogénesis y el cáncer, pero implicados también en procesos fisiológicos normales en animales adultos. La "vía de señalización canónica de Wnt/beta catenina" se caracteriza por una inhibición de Wnt dependiente de la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β), que conduce a una estabilización posterior de la β -catenina, que se transloca luego al núcleo para actuar como un factor de transcripción. La "vía de señalización de Wnt/PCP" no implica GSK-3 β o β -catenina, y comprende varias ramas de señalización, incluidas la señalización dependiente de calcio, moléculas de polaridad celular planar (PCP), GTPasas pequeñas y señalización de quinasas N-terminales C-Jun (JNK). Estas vías están bien descritas en
45 numerosas revisiones tales como (Clevers, 2006; Montcouquiol et al., 2006; Schlessinger et al., 2009).

[0017] En una forma de realización, la vía de señalización de Wnt es la vía de señalización canónica de Wnt/ β -catenina.

[0018] En otra forma de realización preferida, la vía de señalización de Wnt es la vía de señalización de Wnt/PCP.

50 [0019] En otra forma de realización preferida, la vía de señalización de Wnt es la vía de señalización canónica de Wnt/ β -catenina y la vía de señalización de Wnt/PCP.

[0020] Como se utiliza en este caso, el término "activador" denota una sustancia que mejora la actividad de señalización de Wnt. Por ejemplo, para la vía de señalización canónica de Wnt/ β -catenina, esta actividad se puede medir mediante la actividad indicadora de Wnt usando múltiplos establecidos de indicadores de sitios de unión LEF/TCF, y/o la inhibición de GSK-3 β , y/o la activación de genes diana canónicos de Wnt tales como T, Tbx6, Msgn1 o Axin2.

[0021] Como se utiliza en este caso, el término "células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas" o "iPAM" se refiere a células derivadas de cualquier tipo celular pero que muestran características de células progenitoras del mesodermo paraxial. En una forma de realización, las células iPAM se caracterizan por las siguientes propiedades:

- a) expresan biomarcadores característicos de las células progenitoras del mesodermo paraxial tales como los genes Tbx6, EphrinA1, EphrinB2, EPHA4, PDGFR α , Sall1, Sall4, Dll1, D113, Papc (Pcdh8), Lfng, Hes7, Ripply1, Ripply2, Brachyury (T), Cdx2, Cdx4, Evx1, Cxcr4, Il17rd, Fgf8, Fgf17, Gbx2, Wnt3a, Wnt5b, Rspo3, SP5, SP8, Has2, Dkk1, Dact1, Pax3, Pax7, Mesp1, Mesp2 o Msgn1. Preferentemente el gen Msgn1 medido, por ejemplo, con un ensayo indicador de genes que comprende el promotor de Msgn1, y;
- b) son células multipotentes, capaces de diferenciarse hacia al menos linajes de células esqueléticas, dérmicas o musculares;
- c) opcionalmente, pueden tener propiedades de autorrenovación a largo plazo, por ejemplo, se pueden mantener en cultivo más de 6 meses.

[0022] La multipotencia de dichas células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) se puede evaluar *in vitro*, por ejemplo, por diferenciación *in vitro* hacia linajes de células esqueléticas, dérmicas o musculares usando los protocolos descritos a continuación, y en particular en los ejemplos.

[0023] Como se utiliza en este caso, el término "multipotente" se refiere a células que pueden diferenciarse en más de un linaje celular en función de las condiciones ambientales y de cultivo. A diferencia de las células madre embrionarias que son pluripotentes y pueden diferenciarse en todos los tipos de linajes celulares somáticos, las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas de la presente invención tienen una capacidad de diferenciación limitada.

[0024] El término "células pluripotentes", como se utiliza en este caso, se refiere a células indiferenciadas de mamífero que pueden dar lugar a una variedad de linajes celulares diferentes. Normalmente, las células pluripotentes pueden expresar los siguientes marcadores: Oct4, SOX2, Nanog, SSEA 3 y 4, TRA 1/81, véanse las recomendaciones de la International Stem Cell Initiative, 2007.

[0025] Se incluye en la divulgación que las células pluripotentes son células pluripotentes de mamífero no humano.

[0026] En una forma de realización, las células pluripotentes son células madre.

[0027] Normalmente, dichas células madre son células madre embrionarias.

[0028] En otra forma de realización, las células pluripotentes son células madre embrionarias humanas (células hES). En la tabla siguiente se describen células de líneas celulares hES (Loser et al., 2010) tales como las descritas solo para referencia (líneas celulares de referencia):

Línea celular de referencia	cariotipo	pasaje disponible	país de origen	origen
SA01	46XY	25	Suecia	Cellartis AB
VUB01	46XY	73	Bélgica	AZ-VUB Bruxel
HUES 24	46XY	26	EE.UU.	Harvard
H1	46XY, 20q11.21	26	EE.UU.	Wicell research Institute
H9	46XX	27	EE.UU.	Wicell research Institute
WT3	46XY	35	Reino Unido	UKSCB
HUES1	46XX	33	EE.UU.	Harvard

[0029] En una forma de realización, las células pluripotentes son células madre embrionarias no humanas, tales como células madre de ratón, células madre de roedor o células madre de primate.

- 5 [0030] En una forma de realización, las células pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas (iPS). Las células madre pluripotentes inducidas (células iPS) son un tipo de células madre pluripotentes derivadas artificialmente a partir de una célula no pluripotente, normalmente somática adulta, induciendo una expresión "forzada" de determinados genes. Las células iPS se produjeron por primera vez en 2006 a partir de células de ratón (Takahashi y Yamanaka, 2006) y en 2007 a partir de células humanas (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007).
- [0031] En otra forma de realización, el activador de la vía de señalización canónica de Wnt/ β -catenina o la vía de señalización de Wnt/PCP según la invención es un miembro de la familia de las R-espondinas, que se origina a partir de una especie de vertebrado o modificado.
- 10 [0032] En otra forma de realización, el miembro de la familia de las R-espondinas es un miembro de la familia de las R-espondinas de mamífero.
- [0033] En una forma de realización particular, el miembro de la familia de las R-espondinas según la invención se selecciona del grupo consistente en R-espondina 1, R-espondina 2, R-espondina 3 y R-espondina 4.
- [0034] En una forma de realización particular, el miembro de la familia de las R-espondinas según la invención es R-espondina 3.
- 15 [0035] En una forma de realización particular, el miembro de la familia de las R-espondinas según la invención es R-espondina 2.
- [0036] Como se utiliza en este caso, el término "R-espondina3" o "R-espondina2" se refiere a miembros de la familia de proteínas secretadas en vertebrados que activan la vía de señalización de Wnt.
- 20 [0037] Una secuencia ejemplar para la proteína R-espondina3 humana está depositada en la base de datos bajo el número de registro NP_116173.2 (SEQ ID NO:1). Una secuencia ejemplar para la proteína R-espondina3 de ratón está depositada en la base de datos bajo el número de registro NP_082627.3 (SEQ ID NO:2). Una secuencia ejemplar para la proteína R-espondina2 humana está depositada en la base de datos bajo el número de registro NP_848660.3 (SEQ ID NO:3). Una secuencia ejemplar para la proteína R-espondina2 de ratón está depositada en la base de datos bajo el número de registro NP_766403.1 (SEQ ID NO:4).
- 25 [0038] Como se utiliza en este caso, el término "R-espondina3" abarca también cualquier variante funcional de la proteína R-espondina3 de tipo salvaje (de origen natural), siempre que tales variantes funcionales retengan las propiedades ventajosas del factor de diferenciación para el fin de la presente invención. En una forma de realización, dichas variantes funcionales son homólogos funcionales de la R-espondina3 que tienen al menos un 60%, un 80%, un 90% o al menos un 95% de identidad con la secuencia polipeptídica natural conocida de la R-espondina3 más estrechamente relacionada, por ejemplo, con el polipéptido de la R-espondina3 humana o de ratón de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, respectivamente, y que retiene sustancialmente la misma actividad de activación de Wnt que la proteína de tipo salvaje relacionada. En otra forma de realización, dichas variantes funcionales son fragmentos de la R-espondina3, por ejemplo, que comprenden al menos 50, 100 o 200 aminoácidos consecutivos de una proteína R-espondina3 de tipo salvaje, y que retienen sustancialmente la misma actividad de activación de Wnt. En otra
- 30 forma de realización, tal variante funcional puede consistir en isoformas del producto génico de la R-espondina3 como la isoforma 2 de la R-espondina3 humana como se describen bajo las ref. Q9BX4-2 y CAI20142.1 (SEQ ID NO:5).
- 35 [0039] Como se utiliza en este caso, el término "R-espondina2" abarca también cualquier variante funcional de la proteína R-espondina2 de tipo salvaje (de origen natural), siempre que tales variantes funcionales retengan las propiedades ventajosas de factor de diferenciación para el fin de la presente invención. En una forma de realización, dichas variantes funcionales son homólogos funcionales de la R-espondina2 que tienen al menos un 60%, un 80%, un 90% o al menos un 95% de identidad con la secuencia polipeptídica de la R-espondina2 natural conocida más estrechamente relacionada, por ejemplo, con el polipéptido de la R-espondina2 humana o de ratón de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4, respectivamente, y que retienen sustancialmente la misma actividad de activación de Wnt que la proteína de tipo salvaje relacionada. En otra forma de realización, dichas variantes funcionales son fragmentos de la R-espondina2, por ejemplo, que comprenden al menos 50, 100 o 200 aminoácidos consecutivos de una proteína R-espondina2 de tipo salvaje, y que retienen sustancialmente la misma actividad de activación de Wnt. En otra
- 40 forma de realización, dichas variantes funcionales pueden consistir en isoformas del producto génico de la R-espondina2 como la isoforma 2 o la isoforma 3 de la R-espondina2 humana tal como se describen respectivamente bajo la ref. Q6UXX9-2 (SEQ ID NO:6) o bajo la ref. Q6UXX9-3 (SEQ ID NO:7).
- 45
- 50 [0040] Como se utiliza en este caso, la identidad en porcentaje entre las dos secuencias de aminoácidos es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = n.º de

posiciones idénticas/n.º total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que necesitan ser introducidos para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación de la identidad en porcentaje entre dos secuencias se pueden realizar usando un algoritmo matemático, como se describe a continuación.

- 5 [0041] La identidad en porcentaje entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988) que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de pesos de residuos PAM120, una penalización de longitud del espacio de 12 y una penalización del espacio de 4.
- 10 [0042] En otra forma de realización, el activador según la invención es una combinación de la R-espondina 3 y la R-espondina 2.
- [0043] En otra forma de realización, el activador según la invención puede ser la isoforma 2 de la R-espondina-3 humana de secuencia SEQ ID NO:5.
- [0044] En otra forma de realización, el activador según la invención puede ser la isoforma 2 de la R-espondina-2 humana de secuencia SEQ ID NO:6 o la isoforma 3 de la R-espondina-2 humana de secuencia SEQ ID NO:7.
- 15 [0045] En una forma de realización particular, la concentración de R-espondina3 usada para el cultivo de células pluripotentes es de entre 0,1 ng/ml y 500 ng/ml, preferiblemente entre 1 ng/ml y 500 ng/ml y más preferiblemente entre 5 ng/ml y 30 ng/ml.
- [0046] En una forma de realización particular, la concentración de R-espondina2 usada para el cultivo de células pluripotentes es de entre 1 ng/ml y 500 ng/ml, preferiblemente entre 5 ng/ml y 30 ng/ml.
- 20 [0047] En una forma de realización particular, la concentración de R-espondina3 o R-espondina2 es de 10 ng/ml. Con una concentración de 10 ng/ml, más del 50% hasta el 70% de las células pluripotentes se diferencian en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).
- 25 [0048] En otra forma de realización, las células pluripotentes se cultivan con R-espondina3 o R-espondina2 durante 1 a 15 días, o durante un período de tiempo más corto. En una forma de realización particular, las células pluripotentes se cultivan con R-espondina3 y/o R-espondina2 durante al menos 10 días con una concentración de 10 ng/ml.
- 30 [0049] Como se utiliza en este caso, el término "inhibidor de la vía de señalización de BMP" denota cualquier compuesto, natural o sintético, que resulta en una activación disminuida de la vía de señalización de BMP (proteína morfogenética ósea), que se caracteriza por la unión de un dímero de proteínas BMP a un heterocomplejo constituido por receptores de BMP de tipo I y tipo II, lo que resulta en una cascada de fosforilación que conduce a la fosforilación de Smad1/5/8 y que da como resultado la activación de genes diana, tales como los genes Id. Normalmente, un inhibidor de la vía de señalización de BMP provoca una reducción en los niveles de fosforilación de las proteínas Smad 1, 5 y 8 (Gazzerro y Minetti, 2007).
- 35 [0050] La persona experta en la técnica sabe cómo evaluar si un compuesto dado es un inhibidor de la vía de señalización de BMP. Normalmente, se considera que un compuesto es un inhibidor de la vía de señalización de BMP si, después de cultivar células en presencia de dicho compuesto, el nivel de Smad 1, 5 u 8 fosforilada disminuye en comparación con células cultivadas en ausencia de dicho compuesto. Los niveles de proteínas Smad fosforiladas se pueden medir por Western blot usando anticuerpos específicos para la forma fosforilada de dichas proteínas Smad.
- 40 [0051] La activación de genes diana, tales como los genes Id, puede medirse normalmente por producción directa de transcritos (ARNm) de Id1/2/3, mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) y los niveles de expresión se pueden comparar con la situación de control, en ausencia de dicho compuesto.
- 45 [0052] El inhibidor de la vía de señalización de BMP puede ser un antagonista de BMP, un compuesto químico que bloquea la actividad de receptores de BMP de tipo I y/o tipo II (inhibidor de receptor de BMP de tipo I/II), un inhibidor de la expresión génica de BMP de tipo I y/o tipo II, o una molécula que inhibe cualquier paso aguas abajo de la vía de señalización de BMP. El inhibidor de la señalización de BMP puede ser un compuesto natural o uno sintético. Cuando el inhibidor de la vía de señalización de BMP es una proteína, puede ser una proteína purificada o una proteína recombinante o una proteína sintética.

- [0053] En una forma de realización, el inhibidor de la vía de señalización de BMP es un inhibidor de los receptores de BMP de tipo I.
- 5 [0054] Se conocen muchos métodos para producir proteínas recombinantes en la técnica. A partir del conocimiento de la secuencia de una proteína dada o de la secuencia de nucleótidos codificante de dicha proteína, la persona experta puede producir fácilmente dicha proteína usando técnicas estándar de biología molecular y bioquímica.
- 10 [0055] En una forma de realización de la invención, el inhibidor de la vía de señalización de BMP se selecciona del grupo que consiste en nogina, cordina y proteínas relacionadas (similar a la cordina 1/2/3), follistatina y proteínas relacionadas (similar a la follistatina 1/2/3/4/5), proteínas de la familia Dan (incluidas Cerberus 1, gremlina 1 y 2, Cer1-2 (Coco), SOST (esclerostina), SOSTDC1 (Wise)) y variantes y fragmentos de las mismas que inhiben la vía de señalización de BMP.
- [0056] En otra forma de realización de la divulgación, el inhibidor de la vía de señalización de BMP se selecciona del grupo que consiste en proteínas BMP-1/similar a Tolloid, TWG1 (twisted gastrulation), TMEFF (tomorregulinas), biglicano, TSK (Tsukushi), BMPER (Crossveinless 2), Ogon (Sizzled), AMN (Amnionless), CTGF (factor de crecimiento de tejido conjuntivo) y HSPG (incluidas Glypican3 y Syndecan4).
- 15 [0057] En otra forma de realización, el inhibidor de la vía de señalización de BMP es nogina. La nogina puede ser murina (nogina de ratón ejemplificada por el número de registro de GenPept NP_032737, SEQ ID NO:10) o nogina humana (nogina humana ejemplificada por el número de registro de GenPept EAW94528, SEQ ID NO:11). Puede ser purificada o recombinante. Puede estar en la forma monomérica o dimérica.
- 20 [0058] En una forma de realización de la divulgación, el inhibidor de la vía de señalización de BMP es un compuesto que inhibe la cascada de transducción de señalización de BMP. En una forma de realización particular, el compuesto que inhibe la cascada de transducción de señalización de BMP es un compuesto sintético o uno químico.
- [0059] En otra forma de realización, el inhibidor de la vía de señalización de BMP es un inhibidor de receptores de BMP de tipo I.
- 25 [0060] Como se utiliza en este caso, el término "receptores de BMP de tipo I" para la "proteína morfogenética ósea" denota proteínas transmembrana con actividad de proteína quinasa de serina/treonina que media la adición de moléculas de fosfato en determinados aminoácidos serina y treonina en sustratos celulares particulares. Es bien conocido en la técnica que un inhibidor de receptores de BMP de tipo I puede bloquear la vía de señalización de BMP, véase, por ejemplo, Yu et al, Nat Chem Biol. 2008.
- 30 [0061] En una forma de realización preferida, el inhibidor de receptores de BMP de tipo I es la dorsomorfina, un compuesto químico o cualquier derivado generado por estudios de estructura-actividad [Cuny GD et al., 2008]. La dorsomorfina (6-[4-(2-piperidin-1-il-etoxi)fenil]-3-piridin-4-il-pirazolo[1,5-a]pirimidina, también conocida como compuesto C) inhibe específicamente receptores de BMP de tipo I (ALK2, 3 y 6) [Yu PB et al., 2008].
- [0062] La nogina recombinante se puede comprar de R&D Systems o Peprotech o se puede producir usando técnicas estándar como se ha descrito anteriormente.
- 35 [0063] Normalmente, el inhibidor de la vía de señalización de BMP se añade al medio de cultivo de la invención en una concentración que varía de 1 a 10000 ng/ml, preferiblemente de 5 a 1000 ng/ml, preferiblemente de 5 a 500 ng/ml, preferiblemente de 10 a 200 ng/ml, aún más preferiblemente a alrededor de 200 ng/ml.
- [0064] Normalmente, la nogina se añade al medio de cultivo de la invención en una concentración que varía de 1 a 1000 ng/ml, preferiblemente de 10 a 200 ng/ml, aún más preferiblemente a alrededor de 200 ng/ml.
- 40 [0065] Normalmente, la dorsomorfina se añade al medio de cultivo de la invención en una concentración que varía de 0,1 a 2 μ M, preferiblemente a 1 μ M.
- [0066] En una forma de realización, se cultivan células pluripotentes con el inhibidor de la vía de señalización de BMP durante 1 a 4 días.
- 45 [0067] En una forma de realización, el medio de cultivo usado en el método de la invención comprende un activador de Wnt y un inhibidor de la vía de señalización de BMP según la invención para mejorar la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

[0068] En una forma de realización, el activador de Wnt es la R-espondina3 y el inhibidor de la vía de señalización de BMP es la nogina.

5 [0069] En una forma de realización, el medio de cultivo comprende además DMSO (dimetilsulfóxido) para mejorar la diferenciación de células pluripotentes humanas en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

[0070] En el contexto de la divulgación, el medio de cultivo puede comprender además DMSO (dimetilsulfóxido) o un equivalente del DMSO para mejorar la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

10 [0071] Como se utiliza en este caso, el término "equivalente" significa una sustancia que exhibe las mismas propiedades que el DMSO, que es un solvente que disuelve tanto compuestos polares como no polares.

[0072] En otra forma de realización, el medio de cultivo según la invención comprende R-espondina 3, nogina y DMSO para mejorar la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

15 [0073] En otra forma de realización, el medio de cultivo según la invención comprende R-espondina 3 y DMSO para mejorar la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

[0074] En otra forma de realización, el medio de cultivo según la invención comprende R-espondina 2, nogina y DMSO para mejorar la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

20 [0075] En otra forma de realización, el medio de cultivo según la invención comprende R-espondina 2 y DMSO para mejorar la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

[0076] En otra forma de realización, el medio de cultivo según la invención comprende R-espondina 3, dorsomorfina y DMSO para mejorar la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

25 [0077] En otra forma de realización, el medio de cultivo según la invención comprende R-espondina 2, dorsomorfina y DMSO para mejorar la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

[0078] En otra forma de realización más, el medio de cultivo según la invención comprende R-espondina 3, R-espondina 2, nogina y DMSO para mejorar la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

30 [0079] En otra forma de realización más, el medio de cultivo según la invención comprende R-espondina 3, R-espondina 2 y DMSO para mejorar la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

35 [0080] En otra forma de realización más, el medio de cultivo según la invención comprende R-espondina 3, R-espondina 2, dorsomorfina y DMSO para mejorar la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

40 [0081] Las R-espondinas recombinantes de vertebrados se pueden comprar comercialmente o producir como medio de cultivo acondicionado. Esto implica la expresión de una construcción que contiene la secuencia codificante de una proteína R-espondina en células competentes, tales como células COS. La proteína R-espondina se secreta en el medio de cultivo. El medio acondicionado se puede aplicar directamente a las células pluripotentes o diluirse previamente en el medio basal.

[0082] En otra forma de realización, el activador de la vía de señalización de Wnt es un inhibidor de GSK-3 β .

[0083] Como se utiliza en este caso, el término "GSK-3 β " para la "quinasa de glucógeno-sintasa 3 beta" denota una proteína quinasa de serina/treonina que media la adición de moléculas de fosfato en determinados aminoácidos serina y treonina en sustratos celulares particulares. Es bien conocido en la técnica que un inhibidor de GSK-3 β

puede activar la vía de señalización de Wnt, véase, por ejemplo, (Cohen y Goedert, 2004; Sato et al., 2004; Taelman et al., 2010; Wu y Pan, 2010).

[0084] En una forma de realización preferida, el inhibidor de GSK-3 β es CHIR99021.

5 [0085] En otra forma de realización preferida de la divulgación, se pueden usar las siguientes alternativas para aumentar la actividad del factor R-espondina en el sistema:

1. aumentar la expresión endógena del gen que codifica dicho factor R-espondina o una forma modificada de R-espondina,
2. permitir la expresión ectópica de dicho factor R-espondina introduciendo un vector de expresión que comprende una secuencia codificante del factor R-espondina operativamente unida a secuencias de control en las células pluripotentes que se van a diferenciar, o introduciendo en las células ARN codificante del factor R-espondina,
3. introducir directamente en el entorno de las células una cantidad apropiada de factor R-espondina, por ejemplo, como factor R-espondina recombinante (familia de las R-espondinas 1, 2, 3 y 4) en el medio de cultivo, o medio acondicionado, o como recubrimiento de sustrato,
4. activar o inhibir la expresión endógena de un gen implicado en la señalización del factor R-espondina en dichas células diana; o
5. sobreexpresar las proteínas implicadas en el control del nivel de expresión del factor R-espondina, la maduración y la regulación general en dichas células diana.

20 [0086] En una forma de realización, el medio de cultivo según la invención comprende CHIR99021 y un inhibidor de la vía de señalización de BMP según la invención que es dorsomorfinina para mejorar la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

[0087] En una forma de realización, el medio de cultivo según la invención comprende CHIR99021, dorsomorfinina y DMSO para mejorar la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

25 [0088] En una forma de realización, el medio de cultivo según la invención comprende un activador de Wnt que es una combinación de R-espondina2, R-espondina3 y CHIR99021; y un inhibidor de la señalización de BMP según la invención que es una combinación de nogina y dorsomorfinina para mejorar la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

30 [0089] En otra forma de realización más, el medio de cultivo según la invención comprende R-espondina 3, R-espondina 2, CHIR99021, dorsomorfinina y DMSO para mejorar la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

[0090] En otra forma de realización más, el medio de cultivo según la invención comprende R-espondina 3, R-espondina 2, CHIR99021, nogina y DMSO para mejorar la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

35 [0091] En otra forma de realización, la introducción directa en el entorno de las células de una cantidad apropiada de un inhibidor farmacológico de GSK-3 β , por ejemplo, el compuesto químico CHIR99021, se usa como una alternativa para aumentar la actividad de la vía de señalización de Wnt en el sistema, solo o en combinación con R-espondina.

40 [0092] La divulgación se refiere a una composición para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) a partir de células pluripotentes donde dicha composición comprende una cantidad eficaz de un activador de la vía de señalización de Wnt según la invención y una cantidad eficaz de un inhibidor de la vía de señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP).

45 [0093] La divulgación también se refiere a una composición para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) a partir de células pluripotentes donde dicha composición comprende una cantidad eficaz de un activador de la vía de señalización de Wnt.

[0094] La divulgación también se refiere a un kit para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM), donde dicho kit comprende:

- a) un activador de la vía de señalización de Wnt

- b) un inhibidor de la vía de señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP)
- c) opcionalmente, instrucciones para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

[0095] La divulgación también se refiere a un kit para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM), donde dicho kit comprende:

- 5 a) un activador de la vía de señalización de Wnt
- b) opcionalmente, instrucciones para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

[0096] En una forma de realización preferida, el activador es un miembro de la familia de las R-espondinas.

[0097] En otra forma de realización, el activador se selecciona del grupo que consiste en R-espondina 1, R-espondina 2, R-espondina 3 y R-espondina 4.

- 10 [0098] En otra forma de realización preferida, el activador es la R-espondina 2 o la R-espondina 3.

[0099] En otra forma de realización preferida, el activador es un inhibidor de GSK-3 β tal como CHIR99021.

[0100] En otra forma de realización, el inhibidor según la invención es un antagonista secretado de la familia BMP/TGF β .

- 15 [0101] En otra forma de realización, el inhibidor de la vía de señalización de BMP se selecciona del grupo que consiste en nogina, cordina, similar a la cordina 1/2/3, folistatina, similar a la folistatina 1/2/3/4/5, un miembro de la familia Dan, incluidos Cerberus 1, gremlina 1/2.

[0102] En otra forma de realización preferida, el inhibidor es nogina o folistatina.

[0103] En otra forma de realización preferida, el inhibidor es un inhibidor químico de la señalización de BMP tal como la dorsomorfina.

- 20 [0104] En la divulgación, dicho kit para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) comprende:

- a) una composición que comprende miembros de la familia de las R-espondinas;
- b) una composición que incluye un inhibidor de la vía de señalización de BMP y
- c) DMSO o un equivalente.

- 25 [0105] En la divulgación, dicho kit para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) comprende:

- a) una composición que comprende miembros de la familia de las R-espondinas;
- b) DMSO o un equivalente.

- 30 [0106] En la divulgación, dicho kit para preparar células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) comprende:

- a) una composición que comprende un compuesto químico inhibidor de GSK-3 β ;
- b) una composición que comprende un compuesto químico inhibidor de receptores de BMP de tipo I y
- c) DMSO o un equivalente.

- 35 **Poblaciones que comprenden células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) obtenibles a partir de los métodos de la invención**

[0107] La invención se refiere además a poblaciones que comprenden células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) obtenibles a partir del método como se ha descrito anteriormente.

[0108] Estas poblaciones normalmente pueden comprender otros tipos celulares además de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM). En una forma de realización, las poblaciones de la invención se

caracterizan por el hecho de que comprenden al menos un 20%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60%, un 70%, un 80% y preferiblemente al menos un 90% de células que presentan una alta expresión del producto génico de Msgn1.

[0109] Otros biomarcadores característicos de células progenitoras del mesodermo paraxial incluyen, sin limitación, una o más de las siguientes proteínas: Tbx6, EphrinA1, EphrinB2, EPHA4, PDGFRalfa, Sall1, Sall4, Dll1, Dll3, Papc (Pcdh8), Lfng, Hes7, Ripply1, Ripply2, Brachyury (T), Cdx2, Cdx4, Evx1, Cxcr4, Il17rd, Fgf8, Fgf17, Gbx2, Wnt3a, Wnt5b, Rspo3, SP5, SP8, Has2, Dkk1, Dact1, Pax3, Pax7, Mesp1, Mesp2.

[0110] Se puede usar cualquiera de los métodos conocidos en la técnica para medir la expresión génica, en particular, métodos cuantitativos tales como la PCR cuantitativa en tiempo real o micromatrices, o métodos que usan la expresión de genes indicadores, donde dicho gen indicador comprende el promotor de Msgn1 como se describe en los ejemplos, o métodos cualitativos tales como la inmunotinción o métodos de clasificación de células que identifican células que presentan biomarcadores específicos, incluidos marcadores de la superficie celular.

[0111] Como se utiliza en este caso, el gen Msgn1 se refiere al gen que codifica la Mesogenin1. Ejemplos de una secuencia de nucleótidos de un gen que codifica la Mesogenin1 en ratón y el ser humano se dan en la SEQ ID NO:8 (NM_019544.1) y la SEQ ID NO:9 (NM_001105569.1), respectivamente.

[0112] En una forma de realización, la expresión de Msgn1 se considera alta si la expresión es detectable en un ensayo cuantitativo para la expresión génica. En otra forma de realización, es alta si el nivel de expresión es significativamente superior al nivel de expresión observado en las células pluripotentes originales, o en células que se diferencian bajo condiciones no específicas tales como medio de cultivo basal sin LIF (factor inhibidor de la leucemia) para células pluripotentes de ratón o sin FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) para células pluripotentes humanas. Los niveles de expresión entre las células de control y de prueba pueden ser normalizados usando genes expresados constitutivamente tales como GAPDH o beta actina.

[0113] Se pueden cultivar indefinidamente poblaciones que comprenden células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) bajo condiciones de crecimiento apropiadas. La persona experta en la técnica puede establecer las condiciones de crecimiento apropiadas basándose en las condiciones de crecimiento establecidas para las células madre embrionarias o las células madre pluripotentes inducidas (células iPS), por ejemplo, o como se describe en los ejemplos a continuación. Las condiciones de crecimiento pueden comprender ventajosamente, por ejemplo, el uso de medio de sustitución de suero, KSR (Gibco), ESGRO (Chemicon/Millipore) suplementado con factores de crecimiento como los FGF, los WNT, o compuestos químicos que modulan las respectivas vías de señalización.

[0114] Las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) se pueden purificar o las poblaciones se pueden enriquecer en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) seleccionando células que expresan marcadores específicos de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM). En una forma de realización, se pueden seleccionar marcadores específicos de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) para la purificación o el enriquecimiento de una población de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) de entre uno o más de los siguientes marcadores: Msgn1, Tbx6, EphrinA1, EphrinB2, EPHA4, PDGFRalfa, Sall1, Sall4, Dll1, Dll3, Papc (Pcdh8), Lfng, Hes7, Ripply1, Ripply2, Brachyury (T), Cdx2, Cdx4, Evx1, Cxcr4, Il17rd, Fgf8, Fgf17, Gbx2, Wnt3a, Wnt5b, Rspo3, SP5, SP8, Has2, Dkk1, Dact1, Pax3, Pax7, Mesp1, Mesp2, o se pueden seleccionar negativamente con marcadores de otros linajes/tipos celulares tales como el destino neural.

[0115] La purificación o el enriquecimiento de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) puede conseguirse usando tecnologías de clasificación celular, tales como la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o perlas magnéticas que comprenden ligantes específicos de dichos marcadores de la superficie celular de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM), o indicadores fluorescentes para marcadores de progenitores del mesodermo paraxial. Otro método consiste en aprovechar las propiedades de adhesión diferencial de las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM), mediante la adhesión selectiva en sustratos definidos.

[0116] Después de la purificación o el enriquecimiento, la población puede comprender así más de un 10%, un 20%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60%; un 70%, un 80%, un 90% o más de un 95% de las células con una alta expresión de un biomarcador característico de las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM), por ejemplo, el producto génico de Msgn1.

[0117] En otra forma de realización preferida, la divulgación se refiere a una composición que comprende una población de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) obtenibles a partir del método como se ha descrito anteriormente.

Métodos para preparar linajes celulares por diferenciación de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM)

[0118] Las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas pueden cultivarse ventajosamente bajo condiciones de diferenciación *in vitro* para generar células de músculo esquelético, hueso, cartílago, dérmicas, así como otros derivados del mesodermo paraxial incluidas, pero no restringidas a, adipocitos o células endoteliales.

[0119] Así, la invención se refiere a un método para preparar poblaciones que comprenden linajes de músculo esquelético, de hueso, de cartílago, de células dérmicas, de adipocitos o de células endoteliales, donde dicho método comprende los pasos de:

- (a) proporcionar una población que comprende células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas; y,
- (b) cultivar dicha población que comprende células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas, bajo condiciones apropiadas para su diferenciación en los linajes celulares deseados seleccionados entre los derivados del mesodermo paraxial, que incluyen los linajes de músculo esquelético, de hueso, de cartílago, de células dérmicas, de adipocitos o de células endoteliales.

[0120] La invención se refiere además a una composición para preparar poblaciones de linajes celulares que comprenden células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas según la invención y condiciones apropiadas para su diferenciación en los linajes celulares deseados.

[0121] En una forma de realización específica, la presente invención proporciona un método para preparar una población que comprende linajes celulares de músculo esquelético, donde dicho método comprende los pasos de

- (a) proporcionar una población que comprende células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas;
- (b) cultivar dicha población que comprende células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) células en presencia de un medio de diferenciación que comprende al menos los siguientes componentes:

- (i) un material de la matriz extracelular; y,
- (ii) compuestos que activan o inhiben las vías de señalización conocidos por controlar la diferenciación de dichos linajes que incluyen, pero no se restringen a, ácido retinoico, BMP, TGF β (factor de crecimiento transformante β), Hedgehog, Notch, FGF, Wnt, miostatina, insulina, PDGF, VEGF, MAPK, PI3K; y,

- (c) opcionalmente, cultivar dicha población obtenida a partir del paso (b) en un segundo medio de diferenciación que comprende al menos uno o más compuestos que activan o inhiben las vías de señalización de Wnt, FGF, HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), activina, EGF (factor de crecimiento epidérmico), insulina e IGF o compuestos conocidos por promover la diferenciación miogénica tal como el suero de caballo o la transferrina,

obteniendo así una población que comprende linajes celulares de músculo esquelético, que se puede identificar mediante marcadores tales como la desmina o la cadena pesada de la miosina.

[0122] El uso de matrices extracelulares o andamios tridimensionales diseñados se ha descrito ampliamente en la técnica (Metallo et al., 2007). En formas de realización específicas, el material de la matriz extracelular se selecciona del grupo que consiste en colágeno I, colágeno IV, fibronectina, laminina, gelatina, polilisina, PDMS y Matrigel.

[0123] La divulgación se refiere además a una composición para preparar linajes celulares de músculo esquelético a partir de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas, caracterizada por el hecho de que además comprende:

- i. un material de la matriz extracelular,
- ii. al menos uno o más compuestos que activan o inhiben las vías de ácido retinoico, BMP (proteína morfogenética ósea), TGF13, Hedgehog, Notch, FGF, Wnt, miostatina, insulina, PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), MAPK, PI3K. La composición comprende además al menos otro compuesto que activa o inhibe las vías de señalización de Wnt, FGF, HGF, activina, EGF, insulina e IGF o compuestos conocidos por promover la diferenciación miogénica, tal como el suero de caballo o la transferrina.

- 5 [0124] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un método para preparar una población que comprende linajes celulares dérmicos, donde dicho método comprende los pasos de cultivo de una población que comprende células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas en presencia de una cantidad eficaz de al menos uno o más compuestos que activan o inhiben las vías de BMP, TGF β , Wnt, FGF, EGF, ácido retinoico, Notch y Hedgehog. Las células dérmicas se pueden identificar usando marcadores tales como Dermo-1.
- [0125] La divulgación se refiere además a una composición para preparar linajes celulares dérmicos a partir de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas, caracterizada por el hecho de que comprende además al menos uno o más compuestos que activan o inhiben las vías de BMP, TGF β , Wnt, FGF, EGF, ácido retinoico, Notch y Hedgehog.
- 10 [0126] En otra forma de realización específica, la presente invención proporciona un método para preparar una población que comprende linajes celulares de hueso o de cartílago, que comprende el paso de cultivo de una población que comprende células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas en presencia de una cantidad eficaz de al menos uno o más compuestos que activan o inhiben las vías de ácido retinoico, Wnt, Hedgehog, PTHrP, TGF β , BMP, o compuestos conocidos por promover la diferenciación ósea o de cartílago tales como la dexametasona, el ácido ascórbico, la vitamina D3 y el betaglicerofosfato. Las células de cartílago se pueden identificar mediante tinción tradicional tal como con azul alcian y las células óseas con rojo de alizarina o tinción de Von Kossa.
- 15 [0127] La divulgación se refiere además a una composición para preparar linajes celulares de hueso o de cartílago a partir de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas, caracterizada por el hecho de que comprende además al menos uno o más compuestos que activan o inhiben las vías de ácido retinoico, Wnt, Hedgehog, PTHrP, TGF β , BMP, o compuestos conocidos por promover la diferenciación ósea o de cartílago tales como la dexametasona, el ácido ascórbico, la vitamina D3 y el beta-glicerofosfato.
- 20 [0128] En otra forma de realización más, la presente invención proporciona un método para preparar una población que comprende adipocitos, donde dicho método comprende los pasos de cultivo de la población que comprende células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas en presencia de una cantidad eficaz de al menos uno o más compuestos conocidos por promover la diferenciación de adipocitos, incluidos la dexametasona, la isobutilxantina y la insulina. Los adipocitos se pueden detectar mediante tinción OilRedO.
- 25 [0129] La divulgación se refiere además a una composición para preparar adipocitos a partir de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas, caracterizada por el hecho de que comprende además al menos un compuesto conocido por promover la diferenciación de adipocitos, incluidos la dexametasona, la isobutilxantina y la insulina.
- 30 [0130] En otra forma de realización más, la presente invención proporciona un método para preparar una población que comprende células endoteliales, donde dicho método comprende los pasos de cultivo de la población que comprende células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas en presencia de una cantidad eficaz de al menos uno o más compuestos que activan o inhiben las vías de VEGF o FGF. El endotelio se puede detectar mediante inmunotinción de PECAM-1 (CD31).
- 35 [0131] La divulgación se refiere además a una composición para preparar células endoteliales a partir de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas, caracterizada por el hecho de que comprende además al menos uno o más compuestos que activan o inhiben las vías de VEGF o FGF.
- 40 [0132] Varios ejemplos de condiciones adecuadas para la diferenciación de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) en células de cartílago, músculos o endoteliales se describen en los ejemplos a continuación.
- [0133] En otra forma de realización, la presente invención proporciona poblaciones que comprenden linajes de músculo esquelético, de hueso, de cartílago, de células dérmicas, de adipocitos o de células endoteliales, así como otros derivados que derivan de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas.
- 45 [0134] En una forma de realización preferida, la presente invención proporciona poblaciones que comprenden linajes de músculo esquelético, de hueso, de cartílago, de células dérmicas, de adipocitos o de células endoteliales, así como otros derivados que derivan de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas obtenidas con una composición según la divulgación.

[0135] En otra forma de realización, la divulgación se refiere a una composición que comprende linajes de músculo esquelético, de hueso, de cartílago, de células dérmicas, de adipocitos o de células endoteliales obtenibles por un método según la invención.

Células iPAM, población de células derivadas de células iPAM y usos de las mismas

- 5 [0136] Otro aspecto de la divulgación se refiere al uso de dichas poblaciones que comprenden células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas, o dichas poblaciones que comprenden linajes celulares de músculo esquelético, de hueso, de cartílago o dérmicos derivados a partir de la diferenciación de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas, pero también derivados de tejido adiposo y mesodermo paraxial endotelial, denominados de aquí en adelante como las Poblaciones de la divulgación.
- 10 [0137] Las Poblaciones de la divulgación se pueden usar en una variedad de aplicaciones, en particular, en el campo de la investigación o terapéutico.
- [0138] Un campo principal de aplicación es la terapia celular o la medicina regenerativa. Por ejemplo, las células obtenidas de un paciente que sufre un defecto genético se pueden cultivar y corregir genéticamente según métodos conocidos en la técnica y, posteriormente, reprogramar en células iPS y diferenciar en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) o sus derivados para volver a administrárselas al paciente.
- 15 [0139] De forma similar, la medicina regenerativa se puede usar para curar potencialmente cualquier enfermedad que resulte de un tejido que funciona mal, dañado o defectuoso ya sea regenerando los tejidos dañados *in vivo* por implantación *in vivo* directa de una población que comprende células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) o sus derivados que comprenden progenitores o linajes celulares apropiados.
- 20 [0140] Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación se refiere a las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas o sus derivados o las Poblaciones de la Invención para el uso como un producto de terapia celular para la implantación en un mamífero, por ejemplo, un paciente humano.
- [0141] En una forma de realización específica, la divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende una población de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas obtenidas según la invención. En otra forma de realización preferida, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una población de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas que incluye, por ejemplo, al menos 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 o al menos 10^9 células que expresan Msn1. En otra forma de realización, esta composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 [0142] En una forma de realización específica, las Poblaciones de la divulgación se usan para el tratamiento de un trastorno genético muscular, por ejemplo, la distrofia muscular de Duchenne o cualquier otra distrofia muscular genética.
- 30 [0143] En una forma de realización, las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) se cocultivan con varios tipos celulares para inducir su diferenciación hacia el linaje deseado. En otra forma de realización, las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) se injertan directamente en un huésped receptor. Para fines de medicina regenerativa, las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) se pueden injertar después de la corrección genética por métodos conocidos en la técnica.
- 35 [0144] En otra forma de realización específica, las Poblaciones de la divulgación se usan en cirugía ortopédica para el tratamiento de daños articulares o del cartílago o de hueso causados por envejecimiento, enfermedad o por esfuerzo físico, tal como ocurre a través de lesiones o un esfuerzo repetitivo.
- 40 [0145] En otra forma de realización específica, las Poblaciones de la divulgación también se pueden usar ventajosamente para la producción de tejidos dérmicos, por ejemplo, tejidos de la piel, para usar en medicina regenerativa o en investigación, en particular en la industria cosmética o para el tratamiento de quemaduras y cirugía plástica.
- 45 [0146] En otra forma de realización preferida, la divulgación se refiere a una composición que comprende las Poblaciones de la divulgación. La composición que comprende la población de la divulgación se puede usar en terapia celular o medicina regenerativa.
- [0147] La invención se ilustrará adicionalmente mediante las figuras y los ejemplos siguientes. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

FIGURAS y TABLAS:

[0148]

Tabla 1: secuencias de la invención.

Proteínas	Número de referencia del banco	SEQ ID	Secuencias
hRespondina 3	NP-116173.2 (CAI20141.1) o Q9BXY 4-1	SEQ ID NO:1	MHLRLISWLF IILNFMHEYIG SQNASRGRRQ RRMHPNVSQG CQGGCATCSD YNGCLSCCKPR LFFALERIGM KQIGVCLSSC PSGYYGTRY P DINKCTKCKA DCDTCFNKNF CTKCKSGFY L HLGKCLDNCP EGLEANNHTM ECVSIVHCEV
			SEWNPWSPCT KKGKTCGFKR GTETRVREII QHPSAKGNLC PPTNETRKCT VQRKKCQKGE RGKKGRERKR KKPKNKESKE AIPDSKSLES SKEIPEQREN KQQQKKRKVQ DKQKSVSVST VH
mRespondina 3	NP-082627.3	SEQ ID NO:2	MHLRLISCFE IILNFMHEYIG SQNASRGRRQ RRMHPNVSQG CQGGCATCSD YNGCLSCCKPR LFFVLERIGM KQIGVCLSSC PSGYYGTRY P DINKCTKCKV DCDTCFNKNF CTKCKSGFY L HLG KCLDSCP EGLEAN NHTM ECVSIVH CEA SEWSPWSPCM KKGKTCGFKR GTETRV RDIL QHPSAKGNLC PPTSETRTCI VQRKKCSKGE RGKKGRERKR KKLNKEERKE TSSSSDSKGL ESSIETPDQQ ENKERQQQQK RRARDKQQKS VSVSTVH
hRespondina 2	NP-848660.3 o Q6UXX9-1	SEQ ID NO:3	MQFRLFSFAL IILNCMDYSH CQGNRWRRSK RASYVSNPIC KGCLSCSKDN GCSRCQQKLF FFLRREGMRQ YGECLHSCPS GYYGHRAPDM NRCARCRIEN CDSCFSKDFC TKCKVGFY LH RGRCFDECPD GFAPLEETME CVEGCEVGHW SEWGTC SRNN RTCGFKWGLE TRTRQIVKKP VKDTILCPTI AESRRCKMTM RHCPGGKRTP KAKEKRNKKK KRKLIERAQE QHSVFLATDR ANQ

mRespondina 2	NP-766403.1	SEQ ID NO:4	MRFCFLFSFAL IILNCMDYSQ CQGNRWRRNK RASYVSNPIC KGCLSCSKDN GCSRCQQKLF FFLRREGMRQ YGECLHSCPS GYYGHRAPDM NRCARCRIEN CDSCFSKDFC TKCKVGFYLH RGRCFDECPD GFAPLDETME CVEGCEVGHW SEWGTCSRNN RTCGFKWGLE TRTRQIVKKP AKDTIPCPTI AESRRCKMAM RHCPGGKRTP KAKEKRNKKK RRKLIERAQE QHSVFLATDR VNQ
isoforma 2 de hRespondina 3	CA120142.1 o Q9BXY 4-2	SEQ ID NO:5	MHLRLISWLF IILNFMHEYIG SQNASRGRRQ RRMHPNVSQG CQGGCATCSD YNGCLSCCKPR LFFALERIGM KQIGVCLSSC PSGYYGTRYR DINKCTKCKA DCDTCFNKNF CTKCKSGFYL HLGKCLDNCP EGLEANNHTM ECVSIVHCEV SEWNPWSPCT KKGKTCGFKR GTETRVREII QHPSAKGNLC PPTNETRKCT VQRKKCQKGE RGKKGRERKR KKPKNKESKE AIPDSKSLES SKEIPEQREN KQQQKKRKVQ DKQKSGIEVT LAEGLTSVSQ RTQPTPCRRR YL
isoforma 2 de hRespondina 2	Q6UXX9.2	SEQ ID NO:6	MRQYGECLHS CPSGYYGHRA PDMNRCARCR IENCDSFSK DFCTKCKVGF YLHRGRCFDE CPDGFAPLEE TMECVGCEV GHWSEWGTCS RNNRTCGFKW GLETRTRQIV KKPVKDTILC PTIAESRRCK MTMRHCPGGK RTPKAKEKRN KKKKRKLIER AQEQHSVFLA TDRANQ
isoforma 3 de hRespondina 2	Q6UXX9-3	SEQ ID NO:7	FRLFSFAL IILNCMDYSH CQGNRWRRSK RGCRIENCDS CFSKDFCTKC KVGfYlHRGR CFDECPDGFA PLEETMECVG CEVGHWSEWG TCSRNNRTCG FKWGLETRTR QIVKKPVKDT ILCPTIAESR RCKMTMRHCP G GKRTPKAKE KRNKKKKRKL IERAQEQHSV FLATDRANQ

mMsgn1	NM.019544.1	SEQ ID NO:8	ATGGACAACC TGGGTGAGAC CTTCTCAGC CTGGAGGATG GCCTGGACTC TTCTGACACC GCTGGTCTGC TGGCCTCCTG GGAAGTGGAAA AGCAGAGCCA GGCCCTTGGA GCTGGTCCAG GAGTCCCCCA CTCAAAGCCT CTCCCCAGCT CCTTCTCTGG AGTCCTACTC TGAGGTCGCA CTGCCCTGCG GGCACAGTGG GGCCAGCACA GGAGGCAGCG ATGGCTACGG CAGTCACGAG GCTGCCGGCT TAGTCGAGCT GGATTACAGC ATGTTGGCTT TTCAACCTCC CTATCTACAC ACTGCTGGTG GCCTCAAAGG CCAGAAAGGC AGCAAAGTCA AGATGTCTGT CCAGCGGAGA CGGAAGGCCA GCGAGAGAGA GAAACTCAGG ATGCGGACCT TAG CCGATGC CCTCCACACG CTCCGGAATT ACCTGCCGCC TGTCTACAGC CAGAGAGGCC AACCGCTCAC CAAGATCCAG AACTCAAGT ACACCATCAA GTACATCGGG GAACTCACAG ACCTCCTCAA CAGCAGCGGG AGAGAGCCCA GGCCACAGAG TGTGTGA
--------	-------------	-------------------	--

hMsgn1	NM001105569. 1	SEQ ID NO:9	ATGGACAACC TGCGCGAGAC TTTCCTCAGC CTCGAGGATG GCTTGGGCTC CTCTGACAGC CCTGGCCTGC TGTCTTCCTG GGACTGGAAG GACAGGGCAG GGCCCTTTGA GCTGAATCAG GCCTCCCCCT CTCAGAGCCT TTCCCCGGCT CCATCGCTGG AATCCTATTC TTCTTCTCCC TGTCCAGCTG TGGCTGGGCT GCCCTGTGAG CACGGCGGGG CCAGCAGTGG GGGCAGCGAA GGCTGCAGTG TCGGTGGGGC CAGTGGCCTG GTAGAGGTGG ACTACAATAT GTTAGCTTTC CAGCCCACCC ACCTTCAGGG CGGTGGTGGC CCCAAGGCCC AGAAGGGCAC CAAAGTCAGG ATGTCTGTCC AGCGGAGGCG GAAAGCCAGC GAGAGGGAGA AGCTCAGGAT GAGGACCTTG GCAGATGCCC TGCACACCCT CCGGAATTAC CTGCCACCTG TCTACAGCCA GAGAGGCCAG CCTCTCACCA AGATCCAGAC ACTCAAGTAC ACCATCAAGT ACATCGGGGA ACTCACAGAC CTCCTTAACC GCGGCAGAGA GCCCAGAGCC CAGAGCGCGT GA
mNogina	NP_032737	SEQ ID NO:10	MERCPSLGVT LYALVVVLGL RAAPAGGQHY LHIRPAPSDN LPLVDLIEHP DPIFDPKEKD LNETLLRSLL GGHYDPGFMA TSPPEDRPGG GGGPAGGAED LAELDQLLRQ RPSGAMPSEI KGLEFSEGLA QGKKQRLSKK LRRKLQMWLW SQTFCPVLYA WNDLGSRFWP RYVKVGSCFS KRSCSVPEGM VCKPSKSVHL TVLRWRCQRR GGQRCGWIP I QYPI ISECKC SC

hNogina	EAW94528	SEQ ID NO:11	MERCPSLGVT LYALVVVLGL RATPAGGQHY LHIRPAPSDN LPLVDLIEHP DPIFDPKEKD LNETLLRSLL GGHYDPGFMA TSPPEDRPGG GGGAAGGAED LAELDQLLRQ RPSGAMPSEI KGLEFSEGLA QGKKQRLSKK LRRKLQMWLW SQTFCPVLYA WNDLGSRFWP RYVKVGSCFS KRSCSVPEGM VCKPSKSVHL TVLRWRCQRR GGQRCGWIP I QYPI ISECKC SC
---------	----------	--------------------	--

Figura 1: R-espondina induce el destino de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

(A) Comparación de la activación del indicador fluorescente *Msgn1* (células positivas para YFP (células YFP+)) después de 4 días de diferenciación de células mES (*Msgn1RepV*), bajo condiciones de cultivo estándar en medio con FBS al 15% o KSR al 15%, con o sin *Rspo3* recombinante de ratón (10 ng/ml). Canal YFP, 50X. (B) Robustez de la inducción de células iPAM en respuesta a *Rspo3* de ratón en medio con FBS al 15%. Mediciones de pocillos por triplicado por citometría de flujo. La barra de error es e.e.m.

Figura 2: análisis de citometría de flujo de la inducción de la población *Msgn1*-YFP+ (células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM)) tras el tratamiento con *Rspo3*.

(A) Análisis de citometría de flujo en las células mES *Msgn1RepV* en el día 0 de diferenciación en medio con FBS al 15%. La población YFP+ representa menos del 1%. (B) Análisis de citometría de flujo en el día 4 de diferenciación en medio con FBS al 15% suplementado con 10 ng/ml de *R-espondina3*. La población YFP+ representa más del 70% de la población total.

Figura 3: caracterización de progenitores del mesodermo paraxial (células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM)).

(A) Diferenciación de células mES indicadoras *Msgn1RepV* de ratón en células iPAM después de 4 días en cultivo marcadas con un anticuerpo anti-YFP y teñidas junto con Hoechst, x10. (B) Análisis de qRT-PCR de la población iPAM positiva para YFP clasificada por FACS para los genes específicos de los progenitores del mesodermo paraxial *Msgn1* y *Tbx6*, expresión relativa normalizada respecto al nivel de expresión de la población no iPAM YFP negativa (múltiplo de enriquecimiento).

Figura 4: actividad de R-espondina en células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) mediada por señalización canónica de Wnt.

(A) Comparación del efecto de diferentes dosis de *Rspo3* en la inducción de iPAM (% de células positivas para YFP) después de 4 días de diferenciación en medio con FBS al 15% en presencia o ausencia del inhibidor de Wnt canónico *Dkk1*. Concentraciones en ng/ml. (B) Comparación de la eficacia de los cuatro miembros de la familia *Rspo* recombinantes en la inducción de iPAM (% de células positivas para YFP) después de 4 días en medio de diferenciación con FBS al 15%. Concentraciones en ng/ml. (C) Detección de luciferasa en células mES indicadoras *Msgn1RepV* transfectadas con una construcción indicadora *BatLuc* para la activación de la señalización canónica de Wnt y cultivadas en presencia de medio con *Rspo3* (10 ng/ml), *Dkk1* (50 ng/ml) y LiCl (5 mM) en poco suero (FBS al 1%). El tratamiento con *Rspo3* activa fuertemente la respuesta canónica de Wnt en células ES en diferenciación.

Figura 5: La actividad de R-espondina puede ser imitada por el inhibidor de GSK3beta CHIR99021.

Comparación de la eficacia de *Rspo3* y CHIR99021 en la inducción de iPAM (% de células positivas para YFP) después de 3 y 4 días en medio de diferenciación con FBS al 15%. Las concentraciones están en ng/ml para la *Rspo3* o en μ M para el CHIR99021.

Figura 6: El DMSO tiene un efecto positivo en la inducción de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

Inducción de iPAM después de 4 días de diferenciación en medio con FBS al 15% con DMSO al 0,5%. La inducción de iPAM óptima se obtiene combinando *R-espondinas* y DMSO. Concentraciones en ng/ml.

Figura 7: actividad de *Rspo2* y *3* en medio definido.

Análisis del efecto de la *R-espondina 2* y *3* recombinante de ratón y humana en la inducción de iPAM (% de células positivas para YFP) después de 4 días de diferenciación en medios con FBS al 1% (A) o KSR al 15% (B). Concentraciones en ng/ml.

Figura 8: caracterización de Poblaciones de la invención en el día 18 de diferenciación.

Del día 0 al día 4, células ES de ratón se diferenciaron en presencia de Rspo3, seguido de medio con FBS al 15% hasta el día 18. Se identificaron los tipos celulares por tinción con anticuerpos específicos del tejido, es decir, músculo (desmina, verde), endotelio (PECAM1/CD31, verde) y cartilago (azul alcian).

Figura 9: diferenciación dérmica y miogénica de las células iPAM después de 5 días de cultivo.

Las células ES se cultivaron durante 4 días en FBS al 15%, DMSO al 0,5% y 10 ng/ml de Rspo3 y luego cambiadas a FBS al 15% o FBS al 1% o FBS al 1% más Sonic Hedgehog (Shh) y ácido retinoico (F1ShhRA) o más Shh, nogina y LiCl (FISNLI). Las células se cosecharon el día siguiente y se analizaron por qRT-PCR para el marcador dérmico Dermo1 (A) y el marcador muscular Myf5 (B). Los gráficos muestran múltiplos de enriquecimiento.

Figura 10: R-espondina induce el destino iPAM en células ES humanas.

Comparación de la expresión de marcadores de progenitores del mesodermo paraxial Brachyury (A), PDGFRa (B), Tbx6 (C), Msgn1 (D) medida por Q RT-PCR en células de la línea celular de referencia HUES1 indiferenciada o cultivada en medio con FBS al 15% con o sin Rspo3 durante hasta 10 días. Se muestra la expresión relativa con respecto a las células indiferenciadas de la línea celular de referencia HUES1 (múltiplos de inducción).

Figura 11: la nogina promueve el destino iPAM contrarrestando la actividad de BMP4.

Expresión de BMP4 en el día 3 (d3) y el día 4 (d4) de diferenciación en presencia de 10 ng/ml de Rspo3 y DMSO al 0,5%, con (RDN) o sin (RD) adición de nogina (200 ng/ml). Los datos se muestran como valor de expresión normalizado. El punto de datos coloreado de gris se considera no significativo. Los puntos de datos son las medias de muestras biológicas por triplicado.

Figura 12: caracterización molecular de etapas tempranas de diferenciación del mesodermo paraxial.

(A). Diagrama de Venn que compara listas de firmas genéticas (método GSL) de dominios del PSM posterior y anterior y de las células ES positivas para Venus Msgn1RepV diferenciadas *in vitro* cosechadas en el día 3 y 4, respectivamente, en presencia de 10 ng/ml de Rspo3, DMSO al 0,5% y 200 ng/ml de nogina. Los genes de firma clave compartidos entre el PSM *in vivo* y las células ES positivas para Venus *in vitro* (células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM)) están destacados (cajas negras). La flecha roja muestra el cambio de firma genética entre el día 3 y el día 4 de diferenciación de las células ES.

(B) Genes representativos de las listas de firmas genéticas comunes al PSM y a las células Msgn1RepV diferenciadas *in vitro* para los días 3 y 4 (células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM)). Los genes mostrados se validaron como expresados fuertemente y específicos del mesodermo paraxial por hibridación *in situ* (datos no mostrados). Mientras que los genes activados en el día 3 eran en su mayoría específicos del PSM posterior, los genes activados en el día 4 mostraron claramente la adquisición de la identidad del PSM anterior.

Figura 13: los progenitores del PSM Pax3-positivos diferenciados a partir de células ES *in vitro* pueden generar fibras musculares *in vivo*.

(A) músculos tibiales anteriores se recogieron después de 1 mes postrasplante con células positivas para Pax3 diferenciadas *in vitro* (células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM)) marcadas con un lentivirus CAG-GFP (sección transversal). El área de control (Ctrl, área no injertada) y la injertada se tiñeron (rojo) con anticuerpos contra la distrofina (DYS) y la laminina (LAMA1). Los progenitores injertados producen grandes áreas de fibras musculares que expresan distrofina y laminina. Los núcleos están contrateñidos con Hoechst. Barra de escala, 100 µm.

(B) Músculo tibial anterior recogido después de 1 mes postrasplante (sección transversal). El área de control (Ctrl) y el área injertada se tiñeron con anticuerpos contra la miogenina (MYOG) y PAX7 (rojo). Los núcleos están contrateñidos con Hoechst. Para los paneles de PAX7, los paneles insertados muestran la distribución de GFP. Barra de escala, 100 µm.

(C) Las células injertadas expresan la miosina embrionaria MyHCemb, MyHCI (lenta) y MyHCperi/MyHC II (rápida) (panel de la izquierda), y la superposición con la contratinción GFP/Hoechst correspondiente se muestra en el panel de la derecha. Para cada anticuerpo, se muestra el tejido injertado en la parte superior y el tejido de control se muestra debajo. Barra de escala, 200 µm.

EJEMPLOS:

Material y métodos

Cultivo celular

[0149] Las células ES de ratón indiferenciadas Msgn1RepV (derivadas de E14) se mantuvieron en placas recubiertas de gelatina en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 15% (FBS; de PAA), penicilina, estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato de sodio, β -mercaptoetanol al 0,2% y 1.500 U/ml de LIF. Las células ES se cocultivaron con MEF inactivados con mitomicina (alimentadores). Las células ES humanas indiferenciadas se cultivaron en placas recubiertas con matrigel (BD Biosciences) en medio mTeSR (STEMCELL Technologies). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora en CO₂ al 5% a 37°C.

Diferenciación de células ES

[0150] Las células ES se tripsinizaron y se sembraron con varias densidades en placas de 24 pocillos recubiertas de gelatina, sin alimentadores, directamente en condiciones a base de suero (FBS al 15%) o de sustitución de suero (KSR al 15%, Invitrogen) suplementadas con factores, y DMSO (Sigma). Las proteínas recombinantes se obtuvieron comercialmente (R&D) y las soluciones madre se prepararon según recomendación del fabricante. El inhibidor de GSK-3 β CHIR99021 y el inhibidor de receptores de BMP de tipo I dorsomorfin se compraron de Stemgent y se prepararon según las recomendaciones del fabricante. El análisis de indicadores fluorescentes y la adquisición de imágenes se hicieron en un sistema Zeiss Axiovert.

Análisis FACS y clasificación de células

[0151] Los cultivos celulares se disociaron mediante tripsinización, se analizaron por citometría de flujo en un FACScalibur (BD Biosciences) conforme a la expresión de YFP. Los datos se analizaron posteriormente con el software MoFlo (Beckman Coulter) y el software FlowJo.

Micromatrices de ADN

[0152] Los PSM embrionarios de ratón E9.5 se microseccionaron y procesaron tal y como se ha descrito anteriormente (Krol et al, 2011), y las muestras preparadas se corrieron en matrices Affymetrix GeneChip. Para cultivos celulares diferenciados, las iPAM se clasificaron por citometría de flujo en función de su expresión Msgn1-YFP+, y se prepararon muestras para las micromatrices. Los experimentos se realizaron en triplicados biológicos. Los conjuntos de datos se procesaron usando Affymetrix Microarray Suite (MAS) 5.0.

Método de listas de firmas genéticas

[0153] Se creó una referencia de expresión génica usando todas las micromatrices de tejidos de ratón de tipo salvaje depositados en GEO correspondientes a Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Arrays (id. de plataforma GEO GPL1261). La normalización se hizo calculando los valores medios para cada micromatriz. Se determinaron los valores medios para la distribución de aquellos valores medios a través de todas las micromatrices. Esta media se usa luego como un factor de escala para cada valor en cada micromatriz. Una vez que todas las micromatrices se han normalizado, el valor de expresión medio para cada conjunto de sondas se define como el valor de referencia. Se generó una lista de firmas genéticas específica para una condición experimental normalizando los datos de la micromatriz correspondiente como el conjunto de datos de referencia. El conjunto de sondas cuyo valor de expresión normalizado es 10 veces superior al valor de referencia correspondiente se considera que es un gen de firma de esa condición.

RT-PCR cuantitativa

[0154] El ARN total se extrajo de cultivos celulares ES usando Trizol (Invitrogen) o con el mini-kit Rnaeasy plus (Qiagen). La RT-PCR se realizó sobre 5 ng de ARN total usando el kit QuantiFast SYBR Green RT-PCR (Qiagen), cebadores apropiados y se corrieron en un LightCycler 480II (Roche). Se usó GAPDH como el control interno.

Fenotipado del cultivo diferenciado

[0155] Los cultivos celulares se fijaron con PFA al 4% durante toda la noche a 4°C. Las células se incubaron 20 minutos con una solución de bloqueo compuesta por suero bovino fetal al 1% y Tritón al 0,1% en solución salina tamponada con Tris (TBS). La incubación con anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche a 4°C y las diluciones de trabajo de los anticuerpos fueron como sigue: anti-GFP (Abcam) fue de 1:1.000, anti-desmina (DSHB)

fue de 1:100; anti-CD31 (BD Pharmingen) fue de 1:100. Después de los lavados con TBS, las células se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor488 (Molecular probes) a 1:500 durante 30 minutos y se contratiñeron con Hoechst. La tinción de azul alcian se hizo según el protocolo estándar.

Preparación de las células y trasplantes en músculos tibiales anteriores lesionados

- 5 [0156] Los cultivos celulares ES Msgn1RepV se tripsinizaron después de 4 días de diferenciación, y las iPAM se clasificaron en función de la fluorescencia YFP usando un FACS Aria, o Moflow Astrios (BD). Las iPAM se marcaron permanentemente por transducción durante toda la noche con un lentivirus CAG-GFP (MOI de 20-30). Para eliminar las partículas virales no integradas, las células se lavaron varias veces y se reincubaron, 1 hora en medio antes de la preparación para el trasplante. Los músculos injertados se recogieron después de 1 mes y se procesaron para la inmunohistoquímica. Los músculos tibiales anteriores seccionados se prepararon para criosecciones (12 µm) como se ha descrito previamente [B. Gayraud-Morel B. *et al.*, 2012]. Los anticuerpos usados en este estudio son anti-distrofina (Sigma), anti-laminina (Sigma), miogenina (Dako), Pax7 (DSHB) y GFP (Abcam). Se han descrito anticuerpos para isoformas de miosinas en (S.J.Mathew Dev 138, 371 (2011)). Las secciones de tejido se incubaron durante toda la noche con anticuerpos primarios. Los anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor (Molecular probes) se usaron a 1:500. La captura de imágenes se realizó en un Zeiss Axio Observer y las imágenes se procesaron con Adobe Photoshop.

Resultados

Ejemplo 1: uso de un activador de la vía de señalización de Wnt.

Producción de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) *in vitro*.

- 20 [0157] Primero nos dirigimos a identificar actores moleculares clave que promuevan la diferenciación del linaje del mesodermo paraxial a partir de células ES. Primero, investigamos el transcurso temporal de la inducción del mesodermo paraxial durante la diferenciación de células ES de ratón después de la formación de cuerpos embrionarios, en medio a base de DMEM suplementado con suero bovino fetal al 15% (FBS al 15%). La diferenciación en células progenitoras del mesodermo paraxial estaba caracterizada por la activación de los marcadores *Brachyury/T*, *Tbx6* y *Msgn1* detectados por PCR. Nuestros datos sugieren que entre el día 1 y 4 de cultivo, algunas células diferenciadas están en una etapa presomítica similar al mesodermo.

Caracterización de la línea ES indicadora Msgn1RepV.

- 30 [0158] Para seguir la diferenciación de las células ES hacia la primera etapa de la diferenciación del mesodermo paraxial (es decir, destino presomítico), que representa el primer paso de diferenciación del músculo esquelético después de la adquisición de una identidad mesodérmica, generamos una línea celular ES de ratón transgénica que contenía un indicador fluorescente expresado específicamente en los progenitores del mesodermo paraxial. Usamos el promotor de *Msgn1* de ratón, un gen específico del mesodermo presomítico, para impulsar la expresión de Venus (una YFP modificada). La línea celular ES de ratón transgénica Msgn1RepV (Mesogenin1 Reporter Venus) se validó posteriormente usando el método de agregación tetraploide para generar embriones derivados totalmente de las células ES transgénicas. Como se esperaba, los embriones de ratón transgénicos presentan tejido de mesodermo paraxial marcado con fluorescencia, validando así la especificidad de tejido de la expresión de Venus en la línea celular ES transgénica.

Identificación de R-espondinas.

- 40 [0159] Para optimizar las condiciones de diferenciación para progenitores del mesodermo paraxial, desarrollamos un ensayo de cribado manual, probando factores de crecimiento candidatos y fármacos que interfieren con varias vías de señalización en células ES. Las células indicadoras Msgn1RepV se sembraron con una densidad definida en placas de 24 pocillos recubiertas con gelatina (0,1%). Se seleccionaron dos medios de cultivo basal: un medio a base de DMEM con suero bovino fetal al 15% (FBS, alta cantidad de suero) y un medio definido sin suero con KSR al 15% (Invitrogen/Gibco). Estos medios basales se suplementaron con factores candidatos en el día 0 de diferenciación. Las condiciones de control y experimentales se cultivaron en paralelo. Se dejaron que las células se diferenciaran durante tres a cuatro días cambiando el medio en el día 2 o 3. Los cultivos celulares se analizaron en el día 3 y 4 de diferenciación visualmente y por citometría de flujo para la cuantificación de la población YFP+.

- 50 [0160] Después de 4 días de diferenciación, la diferenciación de control en FBS al 15% resulta en una inducción baja y variable de células YFP+ (normalmente de un 1 a un 15% del cultivo), y la diferenciación en el medio definido con KSR al 15% (Invitrogen) resulta en una inducción aún más baja (normalmente de un 1%). Entre el conjunto de candidatos evaluados, identificamos la proteína R-espondina3 secretada como capaz de aumentar drásticamente

la inducción de células YFP+. En nuestro ensayo, la R-espondina3 a 10 ng/ml es suficiente para aumentar significativamente la inducción de células YFP+ tanto en medio a base de FBS como en medio a base de KSR, hasta el 70% (figura 1, 2 y 7). La respuesta de R-espondina3 saturó entre 30 y 100 ng/ml. Mientras que en el día 0, la población YFP+ es <1% de las células, en el medio de diferenciación suplementado con R-espondina3, la población YFP+ puede representar más del 50%, hasta el 70% de las células en el día 4 (figura 2B). En células ES humanas, se observa la inducción de los marcadores de progenitores del mesodermo paraxial, Brachyury, PDGFR α , Tbx6 y Msgn1 después de 3 a 10 días de cultivo en medio con FBS al 15% cuando se tratan las células de la línea celular de referencia huES1 con R-espondina3 (figura 10).

Caracterización de los progenitores del mesodermo paraxial.

[0161] Para confirmar la inducción de un destino celular de progenitores del mesodermo paraxial tras la diferenciación de células ES *in vitro*, clasificamos la población celular YFP+ después de cuatro días de diferenciación en presencia de R-espondina3 (figura 3A) y analizamos las células YFP+ frente a las YFP- por qRT-PCR para los marcadores clave del mesodermo paraxial *Msgn1* y *Tbx6* (figura 3B). Confirmamos que la población YFP+ expresa fuertemente el gen endógeno *Msgn1*, así como *Tbx6*, lo que demuestra que somos capaces de generar progenitores del mesodermo paraxial (iPAM) *in vitro*.

Familia de las R-espondinas y señalización de Wnt.

[0162] A continuación preguntamos si otros miembros de la familia de las R-espondinas pueden inducir células iPAM progenitoras del mesodermo paraxial (progenitoras del mesodermo paraxial *Msgn1*-YFP+). Las células de la línea celular ES de referencia se cultivaron en medio con proteínas R-espondina recombinantes (R-espondinas 1-4) suplementadas con FBS al 15% y se dejaron que se diferenciaron durante 4 días (figura 4B). Dos miembros de la familia, la R-espondina2 y la R-espondina3, presentan actividades comparables y aumentan significativamente el número de células YFP+. La actividad de las proteínas de la familia de las R-espondinas ha sido asociada a la señalización canónica de Wnt/beta catenina (Kim et al., 2008; Nam et al., 2006) y más recientemente con la señalización de Wnt/PCP (Ohkawara et al., 2011). Analizamos el efecto de la inhibición de la señalización canónica de Wnt en la diferenciación dependiente de R-espondinas usando el inhibidor secretado Dkk1, (figura 4A). La suplementación del medio con el antagonista de Wnt extracelular Dkk1 resulta en una reducción aguda de la inducción de YFP+. Además, la adición de Dkk1 a medio con FBS bloquea el efecto de la R-espondina3, lo que sugiere que el efecto de la R-espondina3 está mediado por la vía canónica de Wnt. También analizamos la expresión de luciferasa a partir de un plásmido dirigido por un promotor que responde a la señalización canónica de Wnt (BAT-luc) transfectado en células ES tratadas o no con R-espondina3, y con Dkk1 o con el compuesto LiCl que puede activar la vía de Wnt (figura 4C). La luciferasa fue activada fuertemente por el tratamiento con R-espondina3, lo que sugiere que activa la vía canónica de Wnt en este contexto.

[0163] Para probar adicionalmente si el efecto de la R-espondina3 está mediado por la vía canónica de Wnt, evaluamos el efecto de CHIR99021, un inhibidor de GSK-3 β bien descrito (Ring et al., 2003). La figura 5 muestra que, después de 4 días, CHIR99021 es tan eficaz como Rspo-3 en la inducción de células YFP+, lo que sugiere que el efecto de la R-espondina3 está mediado por la activación de la vía canónica de Wnt.

[0164] Se ha demostrado que el dimetilsulfóxido (DMSO) promueve la diferenciación de varios tipos celulares, sobre todo mesodermo a partir de la línea celular de carcinoma embrionario (EC) P19 (McBurney et al., 1982; Skerjanc, 1999). El mecanismo exacto de acción del DMSO en cultivo celular no se conoce, y se ha hipotetizado que el DMSO modifica las propiedades de la membrana plasmática, haciendo a las células más sensibles a las señales extracelulares presentes en el medio de diferenciación. La adición de un 0,5% de DMSO a un medio con FBS, resulta en un aumento de células YFP+ después de 4 días en cultivo (figura 5, 6 y 7), aunque este aumento es modesto en comparación con el aumento debido a la adición de R-espondina2 o R-espondina3, o ambos. De manera interesante, la adición de R-espondinas y DMSO actúa de forma sinérgica para mejorar la diferenciación de los progenitores del mesodermo paraxial (figura 5, 6 y 7). Las condiciones óptimas para la diferenciación del mesodermo paraxial se observaron cuando tanto el DMSO como la R-espondina 2 y/o 3 se combinaron (figura 5, 6 y 7). De manera importante, este efecto se observa también en un medio definido sin suero a base de KSR (figura 7B).

Potencial de diferenciación de los progenitores del mesodermo paraxial

[0165] A continuación exploramos el potencial de diferenciación de la población celular iPAM. *In vivo*, las células progenitoras del mesodermo paraxial están destinadas a convertirse en músculos esqueléticos, tejidos vertebrales (cartílago, hueso), dermis dorsal, endotelio y otros tejidos tales como los tejidos adiposos.

[0166] Así, realizamos protocolos de diferenciación secuencial, primero con el objetivo de generar células iPAM, y después diferenciándolas adicionalmente en medio con FBS al 15% o aplicando varios protocolos de diferenciación descritos (véase a continuación), en particular los medios «miogénico» y «condrogénico».

5 [0167] Por ejemplo, entre el día 0 y el día 4, las células ES se expusieron a condiciones de diferenciación optimizadas (es decir, 10 ng/ml de R-espondina3, DMSO al 0,5%, en medio basal con FBS al 15%). En el día 4, el medio de cultivo se cambió y las células se expusieron a medios de diferenciación específicos hasta el día 18, con sustitución del medio cada 3 días. En el día 18, los cultivos celulares se fijaron y analizaron por tinción histoquímica o inmunofluorescencia específicas de tejido (figura 8). Bajo condiciones de diferenciación optimizadas, los cultivos
10 celulares fueron positivos para cartílago (nódulos positivos de azul alcian), músculos (fibras positivas para desmina) y endotelio (CD31/PECAM1). Alternativamente, después de 4 días en condiciones de diferenciación (es decir, Rspo3 10 ng/ml, DMSO al 0,5%, en medio basal con FBS al 15%), las células se cambiaron a FBS al 15% o FBS al 1% o FBS al 1% más Sonic Hedgehog (Shh) y ácido retinoico (F1ShhRA) o más Shh, nogina y LiCl (F1SNLi). Las células se cosecharon el día siguiente y se analizaron por qRT-PCR para el marcador dérmico Dermo1 y el marcador muscular Myf5 (figura 9). Se observó la activación significativa de estos marcadores, lo que indica la
15 diferenciación de las células iPAM hacia los linajes dérmicos y musculares respectivamente.

Protocolo miogénico:

[0168] Alternativamente, las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) se pueden diferenciar en cultivo bidimensional en células musculares usando medio SFO3 complementado con BMP4, ActivinaA e IGF-1 durante 3 días, seguido de 3 días de medio SFO3 complementado con LiCl y Shh.

20 [0169] Las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) se pueden cultivar en una gota colgante durante 3 días con 800 células/20uL en medio de diferenciación, compuesto por DMEM suplementado con suero fetal de ternera (FCS) al 10%, suero de caballo al 5% (Sigma), 0,1 mM de 2-mercaptoetanol, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales y 50 ug/ml de penicilina/estreptomicina. Después de 3 días, el medio se cambia y los agregados celulares se transfieren sobre una placa de baja adhesión. En el día 6, las células se siembran y se
25 cultivan en medio de diferenciación en placas recubiertas con Matrigel (BD Bioscience, Bedford, MA, EE.UU.). La diferenciación miogénica se consigue retirando el FBS de las células confluentes y la adición de 10 ug/ml de insulina, 5 ug/ml de transferrina y suero de caballo al 2%.

[0170] Las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) también pueden cultivarse durante 3 semanas en Skeletal Muscle Cell Medium (Lonza, Chemicon) complementadas con EGF, insulina, fetuína,
30 dexametasona y bFGF (100 ng/ml).

Protocolo osteogénico:

[0171] Para los linajes esqueléticos, las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) se exponen a 200 ng/ml de BMP4 recombinante humana o de ratón o una combinación de 1 uM de ácido retinoico y 10 mM de cloruro de litio. Alternativamente, las células se siembran en placas recubiertas de gelatina con una densidad de 1-
35 3×10^3 por pocillo (placa de 24 pocillos) y se cultivan durante 28 días en medio de diferenciación ósea (DMEM, FBS al 10%, 2 mM de 1-glutamina, $1 \times$ penicilina/estreptomicina (P/S), 0,1 μ M de dexametasona, 50 μ M de ácido ascórbico 2-fosfato, 10 mM de β -glicerofosfato, 10 ng/ml de BMP4) para observar células que expresan marcadores específicos de hueso o que secretan matriz extracelular positiva para azul alcian. Los linajes celulares esqueléticos diferenciados se identifican usando tinciones específicas para componentes de la matriz extracelular de hueso y
40 cartílago incluidos el azul alcian o el rojo de alizarina, así como por inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos de condrocitos y/o de osteocitos.

[0172] Las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) también pueden diferenciarse en el linaje de hueso usando el siguiente medio de diferenciación compuesto por DMEM, FBS al 10%, 2 mM de L-glutamina, $1 \times$ P/S, 0,1 mM de dexametasona, 50 mM de ácido ascórbico 2-fosfato, 10 mM de beta-glicerofosfato, y 10 ng/ml de
45 BMP4, y vitamina D3 durante 20 días, cambiando el medio cada 3 días. La formación de hueso se puede confirmar tiñendo el cultivo en diferenciación con rojo de alizarina, bien conocido en la técnica que resulta que tiñe el hueso diferenciado en rojo. La acumulación extracelular de calcio puede visualizarse también por tinción de von Kossa. Alternativamente, las células en diferenciación se pueden lisar y evaluar la actividad ALP usando el reactivo BBTP. Alternativamente, las células en diferenciación se pueden analizar para la expresión de marcadores del linaje de

osteoblastos, por ejemplo, Osterix (Osx) y Cbfa1/Runx2, fosfatasa alcalina, colágeno de tipo I, osteocalcina y osteopontina.

Protocolo condrogénico:

[0173] Para la diferenciación celular condrogénica, las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) se siembran con una densidad de 8×10^4 por pocillo (placa de 24 pocillos) y se cultivan durante 30 minutos en una incubadora de 37°C en medio de diferenciación de cartílago (α MEM, FBS al 10%, 2 mM de L-glutamina, 1×10^{-6} M de dexametasona, 170 μ M de ácido ascórbico 2-fosfato). A continuación, se añade al pocillo una cantidad igual de medio de diferenciación de células de cartílago con 10 ng/ml de TGF β 3. Después de una semana, el medio se sustituye con medio de diferenciación de cartílago suplementado con 10 ng/ml de Bmp2. Después de 21 días, se pueden observar nódulos cartilaginosos que secretan matriz extracelular. Las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) también pueden diferenciarse en células de cartílago usando un medio de diferenciación basado en α MEM, FBS al 10%, 2 mM de L-glutamina, 1×10^{-6} M de dexametasona y 170 mM de ácido ascórbico 2-fosfato o DMEM suplementado con 0,1 mM de dexametasona, 0,17 mM de ácido ascórbico, 1,0 mM de piruvato de sodio, 0,35 mM de L-prolina, 1% de insulina-transferrina sodio, 1,25 mg/ml de albúmina de suero bovino, 5,33 μ g/ml de ácido linoleico y 0,01 μ g/ml de factor de crecimiento transformante β , así como TGF β 3 o BMP2. Las células se cultivan durante varias semanas, cambiando el medio cada 3 días. La diferenciación puede realizarse también a alta densidad en un andamio 3D tal como perlas de alginato en un medio a base de DMEM con FBS al 10% y antibiótico suplementado con 100 ng/ml de proteína morfogenética ósea-2 (BMP-2) humana recombinante y 50 mg de ácido ascórbico. La formación de cartílago se puede confirmar por tinción de azul alcian del cultivo en diferenciación, bien conocido en la técnica que resulta en la tinción de muco-glicoproteínas en azul. Alternativamente, puede realizarse una tinción con safranina O.

Protocolo de fibroblastos dérmicos:

[0174] Las células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) se pueden diferenciar en fibroblastos dérmicos cultivándolos en un andamio de colágeno en medio con un factor de crecimiento de fibroblastos tal como el bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico) o un miembro de la familia Wnt de factores de crecimiento.

[0175] A continuación, para confirmar que la R-espondina induce también células progenitoras del mesodermo paraxial (iPAM) a partir de la diferenciación de células ES humanas, se sembraron células de la línea celular de referencia HUES1 como células individuales y se diferenciaron en medio con FBS al 15% con o sin Rspo3. Se realizó un análisis qRT-PCR del curso temporal para la expresión de marcadores de progenitores del mesodermo paraxial (figura 10). La activación fuerte de *Msgn1* y *Tbx6* durante la diferenciación de las células o la línea celular de células hES de referencia en presencia de R-espondina3, demuestra que las células iPAM se pueden diferenciar a partir de células de la línea celular de células hES de referencia.

Ejemplo 2: uso de un activador de la vía de señalización de Wnt y un inhibidor de la vía de señalización de BMP.

Caracterización de la población celular *Msgn1*-YFP+.

[0176] Usando proteínas R-espondina y DMSO, somos capaces de producir en un único paso un 70% de células *Msgn1*-YFP+ (figura 2B). Para comparar directamente el transcriptoma de *Msgn1*-YFP+ con su homólogo *in vivo* (es decir, el mesodermo presomítico, PSM), usamos micromatrices para generar un perfil del transcriptoma global de fragmentos consecutivos de ratón que representan etapas progresivamente más maduras de diferenciación (datos no mostrados). Los fragmentos de PSM abarcaron desde el nivel del nacimiento de la cola hasta la región somítica donde el programa miogénico se activa primero. Sobre la base de esta serie de micromatrices, fuimos capaces de definir conjuntos de genes de firma que definen la etapa de maduración progresiva de las células desde el nacimiento de la cola (epiblasto) hasta el mesodermo presomítico y las etapas somíticas. En paralelo, diferenciamos células ES en presencia de R-espondina3 y DMSO (RD), clasificamos la población celular *Msgn1*-YFP+ y generamos micromatrices de esta población en el día 3 y el día 4 de diferenciación respectivamente. Se compararon los transcriptomas globales y los conjuntos de genes de firma entre el PSM *in vivo* y las células *Msgn1*-YFP+ diferenciadas *in vitro* (datos no mostrados).

[0177] Confirmamos que las células *Msgn1*-YFP+ expresan un número de marcadores del mesodermo paraxial clave ya validados por Q-PCR tales como *Msgn1* y *Tbx6* (figura 3B). Notamos que, a diferencia de las células PSM nativas, la población *Msgn1*-YFP+ también activa marcadores cardíacos y angiogénicos, que son una firma de derivados del mesodermo más ventral/lateral. También, descubrimos que la señalización TGF β /BMP tiende a estar regulada hacia arriba en la *Msgn1*-YFP+. De forma imprevista, descubrimos que la población celular *Msgn1*-YFP+ expresa BMP4 a un nivel significativo mientras que la BMP4 solo se detecta a un nivel muy bajo *in vivo* en el PSM.

Esto fue problemático porque se ha demostrado que la BMP4 evita que las células adquieran un destino de mesodermo paraxial a expensas de los destinos de la placa lateral (Pourquié O et al, 1996, Tonegawa A et al, 1997).

Nogina para contrarrestar la señalización de BMP4

- 5 [0178] Para contrarrestar esta actividad de BMP4, evaluamos el efecto de la adición de proteína nogina (Nog) recombinante, conocida por inhibir la BMP4, al medio de diferenciación. Descubrimos que la adición de nogina desde el día 0 o el día 1 de diferenciación, las células Msgn1-YFP+ reprimen de manera eficaz la expresión de BMP4 en comparación con las células cultivadas en medio de diferenciación carente de nogina. Además, definimos la concentración y el momento óptimos de adición de nogina. La nogina no cambia el número total de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) Msgn1-YFP+ (eficacia de producción) o el número total de células en cultivo, sino que cambia la maduración de las Msgn1-YFP+ (eficacia de maduración). Para caracterizar mejor el impacto de la nogina en las células Msgn1-YFP+, realizamos micromatrices sobre la población de progenitores del mesodermo paraxial inducidos (iPAM) Msgn1-YFP+ en el día 3 y 4 de diferenciación (figura 11, compárense las condiciones RDN y RD).
- 10
- 15 [0179] Mostramos que la adición de nogina al medio reprime la expresión de BMP4 en las células Msgn1-YFP+, lo que conduce a la regulación hacia arriba de varios marcadores específicos del PSM, incluidos Tbx6, Pcdh8, Pax3, Foxc1, Raldh2 y Ripply2 (figura 12B y datos no mostrados).

Inhibidores de BMP y señalización de BMP

- 20 [0180] Detectamos una fuerte regulación hacia arriba de los inhibidores de BMP folistatina (Fst) y Cerberus (Cer1) en la serie de micromatrices de PSM de ratón y otros inhibidores de BMP tales como la cordina, la nogina y la gremlina1 se conocen por ser expresados por los tejidos adyacentes durante el desarrollo [McMahon JA et al, 1998; Stafford DA et al, D2011 y Scott IC et al, 2000]. Esto sugiere que, *in vivo*, el PSM requiere la inhibición de BMP para madurar debidamente, y que, *in vitro*, también se requiere la inhibición de BMP para la maduración apropiada de las células iPAM.
- 25 [0181] Cribamos un conjunto de inhibidores de BMP, incluidos las proteínas recombinantes nogina (Nog), cordina (Chd), similar a la cordina 1 (Chdl1), folistatina (Fst), similar a la folistatina 1 (Fstl1), proteína de la familia Dan incluidas Cerberus 1 (Cerberus) y gremlina 1 (Grem1); en un rango de concentración variable (10-200 ng/ml), y varias ventanas temporales (día 0-4; día 1-4) y analizamos el impacto sobre la BMP4 y la expresión del marcador del PSM Tbx6. Adicionalmente, evaluamos el compuesto químico dorsomorfina (compuesto C), un inhibidor específico del receptor de BMP de tipo I, en varias concentraciones (0,1-1 μ M) y varias ventanas temporales (día 0-4, día 1-4). La adición de los inhibidores de BMP no afecta el número de células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) o el número total de células en cultivo (datos no mostrados). Entre el conjunto de candidatos evaluados, identificamos en particular la nogina (Nog), la folistatina (Fst) y la dorsomorfina como promotoras de la maduración de los progenitores del mesodermo paraxial inducidos (iPAM) contrarrestando a la BMP4 y activando la expresión de Msgn1 y Tbx6 (datos no mostrados).
- 30
- 35
- [0182] Para controlar la identidad de PSM de las células Msgn1RepV diferenciadas *in vitro*, las purificamos por FACS después de tanto 3 como 4 días de diferenciación en presencia de R-espondina3 y nogina. El análisis qRT-PCR confirmó que la población clasificada expresa fuertemente Msgn1 y Tbx6, como se esperaba para las células PSM (figura 3B). Para un análisis más sistemático, se generaron firmas genéticas para ambos puntos de tiempo como se ha descrito anteriormente. La comparación de la firma genética de las ES diferenciadas del día 3 con la de los dominios transcripcionales del PSM revelaron que las células ES diferenciadas expresaron un gran número de genes del PSM posterior, incluidos T, Rspo3 y Fgf8 (figura 12A-B). Así, las células que expresan el indicador Msgn1 tienen una estrecha similitud molecular respecto a sus homólogos *in vivo*.
- 40
- 45 [0183] Luego preguntamos si el proceso de maduración podría ser continuado adicionalmente *in vitro*. Sorprendentemente, se descubrió que las células ES diferenciadas en el día 4 pero no en el día 3 activan genes específicos para el PSM anterior tales como Mesp2, Ripply2 o Foxc1, lo que indica que estas células han adquirido una identidad del PSM anterior (figura 12B). En particular, estas células en el día 4 regulaban hacia arriba significativamente el gen Pax3. Pax3 regula la diferenciación del linaje miogénico y, recientemente, se demostró que la sobreexpresión de Pax3 en células ES induce músculo [Darabi, R et al., 2008]. Esto sugirió que, a lo largo del tiempo, el tratamiento con R-espondina3 y nogina puede transformar células ES indiferenciadas en progenitores de músculo positivos para Pax3 auténticos sin manipulación genética.
- 50

[0184] En conclusión, estos resultados demuestran el uso potencial y el efecto sinérgico de un activador de la vía de señalización de Wnt como la R-espondina3 y de un inhibidor de la vía de señalización de la proteína

morfogenética ósea (BMP) como la nogina para obtener células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM).

Ejemplo 3: generación del linaje miogénico *in vivo*.

[0185] Para impulsar adicionalmente la diferenciación terminal de estos precursores, tomamos a continuación un enfoque *in vivo*. Las células positivas para Pax3 obtenidas después de 4 días de diferenciación en medio con R-espondina3 y nogina se transdujeron con un lentivirus con expresión de GFP para marcarlas permanentemente. Luego se inyectaron en el músculo tibial anterior de ratones adultos inmunocomprometidos Rag2^{-/-}:yc^{-/-} que habían sido lesionados por inyección intramuscular del veneno de serpiente cardiotoxina [Gayraud-Morel B. et al., 2012]. El examen de los músculos trasplantados después de 1 mes mostró que las células con expresión de GFP injertadas reconstituyeron grandes áreas rellenas con fibras musculares con expresión de laminina y distrofina (n=3; figura 13A). Las fibras expresaban altos niveles del marcador de diferenciación miogenina, tenían un diámetro pequeño y no estaban alineadas como en el músculo adulto, lo que sugiere que pueden corresponder a fibras primarias embrionarias (figura 13B) [Gayraud-Morel B. et al., 2009]. Esto se confirmó mostrando que estas fibras expresaban isoformas embrionarias y perinatales de la cadena pesada de la miosina (figura 13C). Notablemente, se observó una población significativa de células con expresión del marcador específico de células satélite Pax7 en el área injertada en regeneración, lo que sugiere que las células ES diferenciadas también fueron capaces de producir un grupo de progenitores de células de músculo (figura 13B). Así, cuando se trasplantan *in vivo* en músculos lesionados, las células positivas para Pax3 derivadas *in vitro* son capaces de continuar su diferenciación hacia el linaje miogénico.

REFERENCIAS:

[0186] En toda esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

- Barberi, T., Bradbury, M., Dincer, Z., Panagiotakos, G., Socci, N. D. y Studer, L. (2007). Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Nat Med* 13, 642-8.
- Carmon, K. S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A. y Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/ β -catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11452-7.
- Chal, J. y Pourquie, O. (2009). Patterning and Differentiation of the Vertebrate Spine. En *The Skeletal System*, (ed. O. Pourquie), pp. 41-116: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Chambers, I. (2004). The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 6, 386-91.
- Chapman, D. L., Agulnik, I., Hancock, S., Silver, L. M. y Papaioannou, V. E. (1996). Tbx6, a mouse T-Box gene implicated in paraxial mesoderm formation at gastrulation. *Dev Biol* 180, 534-42.
- Clevers, H. (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-80.
- Cohen, P. y Goedert, M. (2004). GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 3, 479-87.
- Cuny GD, Yu PB, Laha JK, Xing X, Liu JF, Lai CS, Deng DY, Sachidanandan C, Bloch KD, Peterson RT. Structure-activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008 Aug 1;18(15):4388-92. Epub 2008 Jun 27.
- Darabi, R., Gehlbach, K., Bachoo, R. M., Kamath, S., Osawa, M., Kamm, K. E., Kyba, M. y Perlingeiro, R. C. (2008). Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med* 14, 134-43.
- Darabi, R., Santos, F. N., Filareto, A., Pan, W., Koene, R., Rudnicki, M. A., Kyba, M. y Perlingeiro, R. C. (2011). Assessment of the Myogenic Stem Cell Compartment Following Transplantation of Pax3/Pax7-Induced Embryonic Stem Cell-Derived Progenitors. *Stem Cells*.
- de Lau, W., Barker, N., Low, T. Y., Koo, B. K., Li, V. S., Teunissen, H., Kujala, P., Haegerbarth, A., Peters, P. J., van de Wetering, M. et al. (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*.
- Dekel, I., Magal, Y., Pearson-White, S., Emerson, C. P. y Shani, M. (1992). Conditional conversion of ES cells to skeletal muscle by an exogenous MyoD1 gene. *New Biol* 4, 217-24.
- Derynck Rik, 2008. The TGF- β Family. CSHL. Kohei Miyazono Editors).
- Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R. et al. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218-21.
- Dinsmore, J., Ratliff, J., Deacon, T., Pakzaban, P., Jacoby, D., Galpern, W. e Isacson, O. (1996). Embryonic stem cells differentiated in vitro as a novel source of cells for transplantation. *Cell Transplant* 5, 131-43.
- Fukada, S., Higuchi, S., Segawa, M., Koda, K., Yamamoto, Y., Tsujikawa, K., Kohama, Y., Uezumi, A., Imamura, M., Miyagoe-Suzuki, Y. et al. (2004). Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody. *Exp Cell Res* 296, 245-55.
- Gayraud-Morel B. et al., *J Cell Sci* 125, 1738 (Abr 1, 2012).

- Gayraud-Morel B., F. Chretien, S. Tajbakhsh, Regen Med 4, 293 (Mar, 2009).
- Gayraud-Morel B. et al. J Cell Sci 125, 1738 (Abr 1, 2012).
- Han, X. H., Jin, Y. R., Seto, M. y Yoon, J. K. (2011). A WNT/beta-catenin signaling activator, R-spondin, plays positive regulatory roles during skeletal myogenesis. J Biol Chem 286, 10649-59.
- 5 Hankenson, K. D., Sweetwyne, M. T., Shitaye, H. y Posey, K. L. (2010). Thrombospondins and novel TSR-containing proteins, R-spondins, regulate bone formation and remodeling. Curr Osteoporos Rep 8, 68-76.
- Hirsinger, E., Jouve, C., Dubrulle, J. y Pourquie, O. (2000). Somite formation and patterning. Int Rev Cytol 198, 1-65.
- Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Ruther U, Nordheim A. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. J Biol Chem. 1999 Jul 9;274(28):19838-45.
- 10 Jin, Y. R., Turcotte, T. J., Crocker, A. L., Han, X. H. y Yoon, J. K. (2011). The canonical Wnt signaling activator, R-spondin2, regulates craniofacial patterning and morphogenesis within the branchial arch through ectodermal-mesenchymal interaction. Dev Biol 352, 1-13.
- Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barco Barrantes, I., Stannek, P., Niehrs, C. y Wu, W. (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis. Dev Cell 7, 525-34.
- 15 Kazanskaya, O., Ohkawara, B., Herault, M., Wu, W., Maltry, N., Augustin, H. G. y Niehrs, C. (2008). The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development. Development 135, 3655-64.
- Kennedy, K. A., Porter, T., Mehta, V., Ryan, S. D., Price, F., Peshdary, V., Karamboulas, C., Savage, J., Drysdale, T. A., Li, S. C. et al. (2009). Retinoic acid enhances skeletal muscle progenitor formation and bypasses inhibition by bone morphogenetic protein 4 but not dominant negative beta-catenin. BMC Biol 7, 67.
- 20 Kim, K. A., Wagle, M., Tran, K., Zhan, X., Dixon, M. A., Liu, S., Gros, D., Korver, W., Yonkovich, S., Tomasevic, N. et al. (2008). R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. Mol Biol Cell 19, 2588-96.
- Krol AJ, Roellig D, Dequeant ML, Tassy O, Glynn E, Hattem G, Mushegian A, Oates AC, Pourquie O. Evolutionary plasticity of segmentation clock networks. lopment. 2011 Jul;138(13):2783-92.
- 25 Loser, P., Schirm, J., Guhr, A., Wobus, A. M. y Kurtz, A. (2010). Human embryonic stem cell lines and their use in international research. Stem Cells 28, 240-6.
- McBurney, M. W., Jones-Villeneuve, E. M., Edwards, M. K. y Anderson, P. J. (1982). Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. Nature 299, 165-7.
- 30 McMahon JA, Takada S, Zimmerman LB, Fan CM, Harland RM, McMahon AP. Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. Genes Dev. 1998 May 15;12(10):1438-52.
- Metallo, C. M., Mohr, J. C., Detzel, C. J., de Pablo, J. J., Van Wie, B. J. y Palecek, S. P. (2007). Engineering the stem cell microenvironment. Biotechnol Prog 23, 18-23.
- 35 Mizuno, Y., Chang, H., Umeda, K., Niwa, A., Iwasa, T., Awaya, T., Fukada, S., Yamamoto, H., Yamanaka, S., Nakahata, T. et al. (2010). Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. FASEB J 24, 2245-53.
- Montcouquiol, M., Crenshaw, E. B., 3rd y Kelley, M. W. (2006). Noncanonical Wnt signaling and neural polarity. Annu Rev Neurosci 29, 363-86.
- 40 Nam, J. S., Turcotte, T. J., Smith, P. F., Choi, S. y Yoon, J. K. (2006). Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. J Biol Chem 281, 13247-57.
- Nam, J. S., Turcotte, T. J. y Yoon, J. K. (2007). Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development. Gene Expr Patterns 7, 306-12.
- 45 Ohkawara, B., Glinka, A. y Niehrs, C. (2011). Rspo3 binds syndecan 4 and induces Wnt/PCP signaling via clathrin-mediated endocytosis to promote morphogenesis. Dev Cell 20, 303-14.
- Park, I. H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K. y Daley, G. Q. (2008a). Disease-specific induced pluripotent stem cells. Cell 134, 877-86.
- Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W. y Daley, G. Q. (2008b). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature 451, 141-6.
- 50 Pourquie O, Fan CM, Coltey M, Hirsinger E, Watanabe Y, Breant C, Francis-West P, Brickell P, Tessier-Lavigne M, Le Douarin NM. Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4. Cell. 1996 Feb 9;84(3):461-71.
- Prelle, K., Wobus, A. M., Krebs, O., Blum, W. F. y Wolf, E. (2000). Overexpression of insulin-like growth factor-II in mouse embryonic stem cells promotes myogenic differentiation. Biochem Biophys Res Commun 277, 631-8.
- 55 Reshef R, Maroto M, Lassar AB. Regulation of dorsal somitic cell fates: BMPs and Noggin control the timing and pattern of myogenic regulator expression. Genes Dev. 1998 Feb 1;12(3):290-303.
- Ring, D. B., Johnson, K. W., Henriksen, E. J., Nuss, J. M., Goff, D., Kinnick, T. R., Ma, S. T., Reeder, J. W., Samuels, I., Slabick, T. et al. (2003). Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo. Diabetes 52, 588-95.
- 60 Rohwedel, J., Maltsev, V., Bober, E., Arnold, H. H., Hescheler, J. y Wobus, A. M. (1994). Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. Dev Biol 164, 87-101.

- Sakurai, H., Inami, Y., Tamamura, Y., Yoshikai, T., Sehara-Fujisawa, A. e Isobe, K. (2009). Bidirectional induction toward paraxial mesodermal derivatives from mouse ES cells in chemically defined medium. *Stem Cell Res* 3, 157-69.
- 5 Sakurai, H., Okawa, Y., Inami, Y., Nishio, N. e Isobe, K. (2008). Paraxial mesodermal progenitors derived from mouse embryonic stem cells contribute to muscle regeneration via differentiation into muscle satellite cells. *Stem Cells* 26, 1865-73.
- Sakurai H, Era T, Jakt LM, Okada M, Nakai S, Nishikawa S, Nishikawa S. In vitro modeling of paraxial and lateral mesoderm differentiation reveals early reversibility. *Stem Cells*. 2006 Mar;24(3):575-86. Epub 2005 Dic 9.
- 10 Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. y Brivanlou, A. H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10, 55-63.
- Schlessinger, K., Hall, A. y Tolwinski, N. (2009). Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes Dev* 23, 265-77.
- 15 Schroder, A.G., (2011). Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus zu paraxialem Mesoderm in vitro. Universitätsbibliothek der Freien Universität Berlin. 1-105.
- Scott IC, Steiglitz BM, Clark TG, Pappano WN, Greenspan DS. Spatiotemporal expression patterns of mammalian chordin during postgastrulation embryogenesis and in postnatal brain. *Dev Dyn*. 2000 Apr;217(4):449-56.
- 20 Shani, M., Faerman, A., Emerson, C. P., Pearson-White, S., Dekel, I. y Magal, Y. (1992). The consequences of a constitutive expression of MyoD1 in ES cells and mouse embryos. *Symp Soc Exp Biol* 46, 19-36.
- Skerjanc, I. S. (1999). Cardiac and skeletal muscle development in P19 embryonal carcinoma cells. *Trends Cardiovasc Med* 9, 139-43.
- 25 Stafford DA, Brunet LJ, Khokha MK, Economides AN, Harland RM. Cooperative activity of noggin and gremlin 1 in axial skeleton development. *Development*. 2011 Mar;138(5):1005-14.
- Taelman, V. F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J. L., Fuentealba, L. C., Vorwald, P. P., Gumper, I., Sabatini, D. D. y De Robertis, E. M. (2010). Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* 143, 1136-48.
- 30 Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. y Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-72.
- Takahashi, K. y Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-76.
- Takebe A, Era T, Okada M, Martin Jakt L, Kuroda Y, Nishikawa S. Microarray analysis of PDGFR alpha+ populations in ES cell differentiation culture identifies genes involved in differentiation of mesoderm and mesenchyme including ARID3b that is essential for development of embryonic mesenchymal cells. *Dev Biol*. 2006 May 1;293(1):25-37. Epub 2006 Mar 13.
- 35 Tonegawa A, Funayama N, Ueno N, Takahashi Y. Mesodermal subdivision along the mediolateral axis in chicken controlled by different concentrations of BMP-4. *Development*. 1997 May;124(10):1975-84.
- Wijgerde M, Karp S, McMahon J, McMahon AP. Noggin antagonism of BMP4 signaling controls development of the axial skeleton in the mouse. *Dev Biol*. 2005 Oct 1;286(1):149-57.
- 40 Wittler, L., Shin, E. H., Grote, P., Kispert, A., Beckers, A., Gossler, A., Werber, M. y Herrmann, B. G. (2007). Expression of *Msgn1* in the presomitic mesoderm is controlled by synergism of WNT signalling and *Tbx6*. *EMBO Rep* 8, 784-9.
- 45 Wu, D. y recipiente, W. (2010). GSK3: una quinasa multifacética en señalización Wnt. *Tendencias Sci de Biochem* 35,161-8.
- Yoon, J. K. y Wold, B. (2000). The bHLH regulator pMesogenin1 is required for maturation and segmentation of paraxial mesoderm. *Genes Dev* 14, 3204-14.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R. et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-20.
- 50 Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babbitt JL, Deng DY, Hoynig SA, Lin HY, Bloch KD, Peterson RT. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol*. 2008 Ene;4(1):33-41. Epub 2007 Nov 18.

LISTADO DE SECUENCIAS

55 [0187]

<110> INSERT

<120> MÉTODO PARA PREPARAR CÉLULAS PROGENITORAS DEL MESODERMO PARAXIAL INDUCIDAS (IPAM) Y SU USO

<130> BIO12155 POURQUIE

<160> 11

<170> versión de PatentIn 3.3

<210> 1

<211> 272

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met His Leu Arg Leu Ile Ser Trp Leu Phe Ile Ile Leu Asn Phe Met
1 5 10 15

Glu Tyr Ile Gly Ser Gln Asn Ala Ser Arg Gly Arg Arg Gln Arg Arg
20 25 30

Met His Pro Asn Val Ser Gln Gly Cys Gln Gly Gly Cys Ala Thr Cys
35 40 45

Ser Asp Tyr Asn Gly Cys Leu Ser Cys Lys Pro Arg Leu Phe Phe Ala
50 55 60

Leu Glu Arg Ile Gly Met Lys Gln Ile Gly Val Cys Leu Ser Ser Cys
65 70 75 80

Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Asn Lys Cys Thr
85 90 95

Lys Cys Lys Ala Asp Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr
100 105 110

Lys Cys Lys Ser Gly Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn
115 120 125

Cys Pro Glu Gly Leu Glu Ala Asn Asn His Thr Met Glu Cys Val Ser
130 135 140

Ile Val His Cys Glu Val Ser Glu Trp Asn Pro Trp Ser Pro Cys Thr
145 150 155 160

Lys Lys Gly Lys Thr Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val
165 170 175

ES 2 761 859 T3

Arg Glu Ile Ile Gln His Pro Ser Ala Lys Gly Asn Leu Cys Pro Pro
180 185 190

Thr Asn Glu Thr Arg Lys Cys Thr Val Gln Arg Lys Lys Cys Gln Lys
195 200 205

Gly Glu Arg Gly Lys Lys Gly Arg Glu Arg Lys Arg Lys Lys Pro Asn
210 215 220

Lys Gly Glu Ser Lys Glu Ala Ile Pro Asp Ser Lys Ser Leu Glu Ser
225 230 235 240

Ser Lys Glu Ile Pro Glu Gln Arg Glu Asn Lys Gln Gln Gln Lys Lys
245 250 255

Arg Lys Val Gln Asp Lys Gln Lys Ser Val Ser Val Ser Thr Val His
260 265 270

<210> 2

<211> 277

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 2

ES 2 761 859 T3

Met	His	Leu	Arg	Leu	Ile	Ser	Cys	Phe	Phe	Ile	Ile	Leu	Asn	Phe	Met			
1				5					10					15				
Glu	Tyr	Ile	Gly	Ser	Gln	Asn	Ala	Ser	Arg	Gly	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg			
			20					25					30					
Met	His	Pro	Asn	Val	Ser	Gln	Gly	Cys	Gln	Gly	Gly	Cys	Ala	Thr	Cys			
		35					40					45						
Ser	Asp	Tyr	Asn	Gly	Cys	Leu	Ser	Cys	Lys	Pro	Arg	Leu	Phe	Phe	Val			
	50					55					60							
Leu	Glu	Arg	Ile	Gly	Met	Lys	Gln	Ile	Gly	Val	Cys	Leu	Ser	Ser	Cys			
65					70					75					80			
Pro	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Arg	Tyr	Pro	Asp	Ile	Asn	Lys	Cys	Thr			
				85					90					95				
Lys	Cys	Lys	Val	Asp	Cys	Asp	Thr	Cys	Phe	Asn	Lys	Asn	Phe	Cys	Thr			
			100					105					110					
Lys	Cys	Lys	Ser	Gly	Phe	Tyr	Leu	His	Leu	Gly	Lys	Cys	Leu	Asp	Ser			
		115					120					125						

ES 2 761 859 T3

Cys Pro Glu Gly Leu Glu Ala Asn Asn His Thr Met Glu Cys Val Ser
130 135 140

Ile Val His Cys Glu Ala Ser Glu Trp Ser Pro Trp Ser Pro Cys Met
145 150 155 160

Lys Lys Gly Lys Thr Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val
165 170 175

Arg Asp Ile Leu Gln His Pro Ser Ala Lys Gly Asn Leu Cys Pro Pro
180 185 190

Thr Ser Glu Thr Arg Thr Cys Ile Val Gln Arg Lys Lys Cys Ser Lys
195 200 205

Gly Glu Arg Gly Lys Lys Gly Arg Glu Arg Lys Arg Lys Lys Leu Asn
210 215 220

Lys Glu Glu Arg Lys Glu Thr Ser Ser Ser Asp Ser Lys Gly Leu
225 230 235 240

Glu Ser Ser Ile Glu Thr Pro Asp Gln Gln Glu Asn Lys Glu Arg Gln
245 250 255

Gln Gln Gln Lys Arg Arg Ala Arg Asp Lys Gln Gln Lys Ser Val Ser
260 265 270

Val Ser Thr Val His
275

<210> 3

<211> 243

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Gln Phe Arg Leu Phe Ser Phe Ala Leu Ile Ile Leu Asn Cys Met
1 5 10 15

Asp Tyr Ser His Cys Gln Gly Asn Arg Trp Arg Arg Ser Lys Arg Ala
20 25 30

Ser Tyr Val Ser Asn Pro Ile Cys Lys Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys
35 40 45

Asp Asn Gly Cys Ser Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Phe Leu Arg
50 55 60

ES 2 761 859 T3

Arg Glu Gly Met Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser
65 70 75 80

Gly Tyr Tyr Gly His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys
85 90 95

Arg Ile Glu Asn Cys Asp Ser Cys Phe Ser Lys Asp Phe Cys Thr Lys
100 105 110

Cys Lys Val Gly Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys
115 120 125

Pro Asp Gly Phe Ala Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu Gly
130 135 140

Cys Glu Val Gly His Trp Ser Glu Trp Gly Thr Cys Ser Arg Asn Asn
145 150 155 160

Arg Thr Cys Gly Phe Lys Trp Gly Leu Glu Thr Arg Thr Arg Gln Ile
165 170 175

Val Lys Lys Pro Val Lys Asp Thr Ile Leu Cys Pro Thr Ile Ala Glu
180 185 190

Ser Arg Arg Cys Lys Met Thr Met Arg His Cys Pro Gly Gly Lys Arg
195 200 205

Thr Pro Lys Ala Lys Glu Lys Arg Asn Lys Lys Lys Lys Arg Lys Leu
210 215 220

Ile Glu Arg Ala Gln Glu Gln His Ser Val Phe Leu Ala Thr Asp Arg
225 230 235 240

Ala Asn Gln

<210> 4

<211> 243

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 4

Met Arg Phe Cys Leu Phe Ser Phe Ala Leu Ile Ile Leu Asn Cys Met
1 5 10 15

Asp Tyr Ser Gln Cys Gln Gly Asn Arg Trp Arg Arg Asn Lys Arg Ala
20 25 30

ES 2 761 859 T3

Ser Tyr Val Ser Asn Pro Ile Cys Lys Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys
35 40 45

Asp Asn Gly Cys Ser Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Phe Leu Arg
50 55 60

Arg Glu Gly Met Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser
65 70 75 80

Gly Tyr Tyr Gly His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys
85 90 95

Arg Ile Glu Asn Cys Asp Ser Cys Phe Ser Lys Asp Phe Cys Thr Lys
100 105 110

Cys Lys Val Gly Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys
115 120 125

Pro Asp Gly Phe Ala Pro Leu Asp Glu Thr Met Glu Cys Val Glu Gly
130 135 140

Cys Glu Val Gly His Trp Ser Glu Trp Gly Thr Cys Ser Arg Asn Asn
145 150 155 160

Arg Thr Cys Gly Phe Lys Trp Gly Leu Glu Thr Arg Thr Arg Gln Ile
165 170 175

Val Lys Lys Pro Ala Lys Asp Thr Ile Pro Cys Pro Thr Ile Ala Glu
180 185 190

Ser Arg Arg Cys Lys Met Ala Met Arg His Cys Pro Gly Gly Lys Arg
195 200 205

Thr Pro Lys Ala Lys Glu Lys Arg Asn Lys Lys Lys Arg Arg Lys Leu
210 215 220

Ile Glu Arg Ala Gln Glu Gln His Ser Val Phe Leu Ala Thr Asp Arg
225 230 235 240

Val Asn Gln

<210> 5

<211> 292

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 761 859 T3

Met 1	His	Leu	Arg	Leu 5	Ile	Ser	Trp	Leu	Phe 10	Ile	Ile	Leu	Asn	Phe 15	Met
Glu	Tyr	Ile	Gly 20	Ser	Gln	Asn	Ala	Ser 25	Arg	Gly	Arg	Arg	Gln 30	Arg	Arg
Met	His	Pro 35	Asn	Val	Ser	Gln	Gly 40	Cys	Gln	Gly	Gly	Cys 45	Ala	Thr	Cys
Ser	Asp 50	Tyr	Asn	Gly	Cys	Leu 55	Ser	Cys	Lys	Pro	Arg 60	Leu	Phe	Phe	Ala
Leu 65	Glu	Arg	Ile	Gly	Met 70	Lys	Gln	Ile	Gly	Val 75	Cys	Leu	Ser	Ser	Cys 80
Pro	Ser	Gly	Tyr 85	Tyr	Gly	Thr	Arg	Tyr	Pro 90	Asp	Ile	Asn	Lys	Cys 95	Thr
Lys	Cys	Lys	Ala 100	Asp	Cys	Asp	Thr	Cys 105	Phe	Asn	Lys	Asn	Phe 110	Cys	Thr
Lys	Cys	Lys 115	Ser	Gly	Phe	Tyr	Leu 120	His	Leu	Gly	Lys	Cys 125	Leu	Asp	Asn
Cys	Pro 130	Glu	Gly	Leu	Glu	Ala 135	Asn	Asn	His	Thr	Met 140	Glu	Cys	Val	Ser
Ile 145	Val	His	Cys	Glu	Val 150	Ser	Glu	Trp	Asn	Pro 155	Trp	Ser	Pro	Cys	Thr 160
Lys	Lys	Gly	Lys	Thr 165	Cys	Gly	Phe	Lys	Arg 170	Gly	Thr	Glu	Thr	Arg 175	Val
Arg	Glu	Ile	Ile 180	Gln	His	Pro	Ser	Ala 185	Lys	Gly	Asn	Leu	Cys 190	Pro	Pro
Thr	Asn 195	Glu	Thr	Arg	Lys	Cys	Thr 200	Val	Gln	Arg	Lys	Lys 205	Cys	Gln	Lys
Gly	Glu 210	Arg	Gly	Lys	Lys	Gly 215	Arg	Glu	Arg	Lys	Arg 220	Lys	Lys	Pro	Asn
Lys 225	Gly	Glu	Ser	Lys	Glu 230	Ala	Ile	Pro	Asp	Ser 235	Lys	Ser	Leu	Glu	Ser 240
Ser	Lys	Glu	Ile 245	Pro	Glu	Gln	Arg	Glu	Asn 250	Lys	Gln	Gln	Gln	Lys 255	Lys

ES 2 761 859 T3

Arg Lys Val Gln Asp Lys Gln Lys Ser Gly Ile Glu Val Thr Leu Ala
260 265 270

Glu Gly Leu Thr Ser Val Ser Gln Arg Thr Gln Pro Thr Pro Cys Arg
275 280 285

Arg Arg Tyr Leu
290

<210> 6

<211> 176

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser Gly Tyr Tyr
1 5 10 15

Gly His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys Arg Ile Glu
20 25 30

Asn Cys Asp Ser Cys Phe Ser Lys Asp Phe Cys Thr Lys Cys Lys Val
35 40 45

Gly Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys Pro Asp Gly
50 55 60

Phe Ala Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu Gly Cys Glu Val
65 70 75 80

Gly His Trp Ser Glu Trp Gly Thr Cys Ser Arg Asn Asn Arg Thr Cys
85 90 95

Gly Phe Lys Trp Gly Leu Glu Thr Arg Thr Arg Gln Ile Val Lys Lys
100 105 110

Pro Val Lys Asp Thr Ile Leu Cys Pro Thr Ile Ala Glu Ser Arg Arg
115 120 125

Cys Lys Met Thr Met Arg His Cys Pro Gly Gly Lys Arg Thr Pro Lys
130 135 140

Ala Lys Glu Lys Arg Asn Lys Lys Lys Lys Arg Lys Leu Ile Glu Arg
145 150 155 160

Ala Gln Glu Gln His Ser Val Phe Leu Ala Thr Asp Arg Ala Asn Gln
165 170 175

ES 2 761 859 T3

<210> 7
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 7

Phe	Arg	Leu	Phe	Ser	Phe	Ala	Leu	Ile	Ile	Leu	Asn	Cys	Met	Asp	Tyr
1				5					10					15	
Ser	His	Cys	Gln	Gly	Asn	Arg	Trp	Arg	Arg	Ser	Lys	Arg	Gly	Cys	Arg
			20					25					30		
Ile	Glu	Asn	Cys	Asp	Ser	Cys	Phe	Ser	Lys	Asp	Phe	Cys	Thr	Lys	Cys
		35					40					45			
Lys	Val	Gly	Phe	Tyr	Leu	His	Arg	Gly	Arg	Cys	Phe	Asp	Glu	Cys	Pro
	50					55					60				
Asp	Gly	Phe	Ala	Pro	Leu	Glu	Glu	Thr	Met	Glu	Cys	Val	Gly	Cys	Glu
65					70					75					80
Val	Gly	His	Trp	Ser	Glu	Trp	Gly	Thr	Cys	Ser	Arg	Asn	Asn	Arg	Thr
				85					90					95	
Cys	Gly	Phe	Lys	Trp	Gly	Leu	Glu	Thr	Arg	Thr	Arg	Gln	Ile	Val	Lys
			100					105					110		
Lys	Pro	Val	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Cys	Pro	Thr	Ile	Ala	Glu	Ser	Arg
		115					120					125			
Arg	Cys	Lys	Met	Thr	Met	Arg	His	Cys	Pro	Gly	Gly	Lys	Arg	Thr	Pro
	130					135					140				
Lys	Ala	Lys	Glu	Lys	Arg	Asn	Lys	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Leu	Ile	Glu
145					150				155						160
Arg	Ala	Gln	Glu	Gln	His	Ser	Val	Phe	Leu	Ala	Thr	Asp	Arg	Ala	Asn
				165					170					175	

Gln

<210> 8
 <211> 567
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

10

<400> 8

ES 2 761 859 T3

```

atggacaacc tgggtgagac cttcctcagc ctggaggatg gcctggactc ttctgacacc      60
gctgggtctgc tggcctcctg ggactggaaa agcagagcca ggcctttgga gctgggtccag    120
gagtccccca ctcaaagcct ctccccagct ccttctctgg agtcctactc tgagggtcgca    180
ctgccctgcg ggcacagtgg ggccagcaca ggaggcagcg atggctacgg cagtcacgag      240
gctgccgggt tagtcgagct ggattacagc atgttggctt ttcaacctcc ctatctacac    300
actgctggtg gcctcaaagg ccagaaaggc agcaaagtca agatgtctgt ccagcggaga      360
cggaaggcca gcgagagaga gaaactcagg atgcggacct tagccgatgc cctccacacg      420
ctccggaatt acctgccgcc tgtctacagc cagagaggcc aaccgctcac caagatccag      480
aactcaagt acaccatcaa gtacatcggg gaactcacag acctcctcaa cagcagcggg      540
agagagccca ggccacagag tgtgtga                                           567

```

<210> 9
 <211> 582
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5

<400> 9

```

atggacaacc tgcgcgagac tttcctcagc ctcgaggatg gcttgggctc ctctgacagc      60
cctggcctgc tgtcttcctg ggactggaag gacagggcag ggccttttga gctgaatcag    120
gcctccccct ctcagagcct ttccccggct ccatcgctgg aatcctattc ttcttctccc    180
tgtccagctg tggctgggct gccctgtgag cacggcgggg ccagcagtgg gggcagcgaa    240
ggctgcagtg tcggtggggc cagtggcctg gtagagggtg actacaatat gttagctttc    300
cagcccaccc accttcaggg cgggtggtgg cccaaggccc agaagggcac caaagtcagg      360
atgtctgtcc agcggaggcg gaaagccagc gagagggaga agctcaggat gaggaccttg      420
gcagatgccc tgcacaccct ccggaattac ctgccacctg tctacagcca gagaggccag      480
cctctacca agatccagac actcaagtac accatcaagt acatcgggga actcacagac      540
ctccttaacc gcggcagaga gccagagcc cagagcgcgt ga                                           582

```

<210> 10
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10

<400> 10

```

Met Glu Arg Cys Pro Ser Leu Gly Val Thr Leu Tyr Ala Leu Val Val
1           5           10           15

```

```

Val Leu Gly Leu Arg Ala Ala Pro Ala Gly Gly Gln His Tyr Leu His
          20           25           30

```

ES 2 761 859 T3

Ile Arg Pro Ala Pro Ser Asp Asn Leu Pro Leu Val Asp Leu Ile Glu
35 40 45

His Pro Asp Pro Ile Phe Asp Pro Lys Glu Lys Asp Leu Asn Glu Thr
50 55 60

Leu Leu Arg Ser Leu Leu Gly Gly His Tyr Asp Pro Gly Phe Met Ala
65 70 75 80

Thr Ser Pro Pro Glu Asp Arg Pro Gly Gly Gly Gly Gly Pro Ala Gly
85 90 95

Gly Ala Glu Asp Leu Ala Glu Leu Asp Gln Leu Leu Arg Gln Arg Pro
100 105 110

Ser Gly Ala Met Pro Ser Glu Ile Lys Gly Leu Glu Phe Ser Glu Gly
115 120 125

Leu Ala Gln Gly Lys Lys Gln Arg Leu Ser Lys Lys Leu Arg Arg Lys
130 135 140

Leu Gln Met Trp Leu Trp Ser Gln Thr Phe Cys Pro Val Leu Tyr Ala
145 150 155 160

Trp Asn Asp Leu Gly Ser Arg Phe Trp Pro Arg Tyr Val Lys Val Gly
165 170 175

Ser Cys Phe Ser Lys Arg Ser Cys Ser Val Pro Glu Gly Met Val Cys
180 185 190

Lys Pro Ser Lys Ser Val His Leu Thr Val Leu Arg Trp Arg Cys Gln
195 200 205

Arg Arg Gly Gly Gln Arg Cys Gly Trp Ile Pro Ile Gln Tyr Pro Ile
210 215 220

Ile Ser Glu Cys Lys Cys Ser Cys
225 230

<210> 11

<211> 232

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

Met Glu Arg Cys Pro Ser Leu Gly Val Thr Leu Tyr Ala Leu Val Val
1 5 10 15

ES 2 761 859 T3

Val	Leu	Gly	Leu	Arg	Ala	Thr	Pro	Ala	Gly	Gly	Gln	His	Tyr	Leu	His	20	25	30
Ile	Arg	Pro	Ala	Pro	Ser	Asp	Asn	Leu	Pro	Leu	Val	Asp	Leu	Ile	Glu	35	40	45
His	Pro	Asp	Pro	Ile	Phe	Asp	Pro	Lys	Glu	Lys	Asp	Leu	Asn	Glu	Thr	50	55	60
Leu	Leu	Arg	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	His	Tyr	Asp	Pro	Gly	Phe	Met	Ala	65	70	75
Thr	Ser	Pro	Pro	Glu	Asp	Arg	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	85	90	95
Gly	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Glu	Leu	Asp	Gln	Leu	Leu	Arg	Gln	Arg	Pro	100	105	110
Ser	Gly	Ala	Met	Pro	Ser	Glu	Ile	Lys	Gly	Leu	Glu	Phe	Ser	Glu	Gly	115	120	125
Leu	Ala	Gln	Gly	Lys	Lys	Gln	Arg	Leu	Ser	Lys	Lys	Leu	Arg	Arg	Lys	130	135	140
Leu	Gln	Met	Trp	Leu	Trp	Ser	Gln	Thr	Phe	Cys	Pro	Val	Leu	Tyr	Ala	145	150	155
Trp	Asn	Asp	Leu	Gly	Ser	Arg	Phe	Trp	Pro	Arg	Tyr	Val	Lys	Val	Gly	165	170	175
Ser	Cys	Phe	Ser	Lys	Arg	Ser	Cys	Ser	Val	Pro	Glu	Gly	Met	Val	Cys	180	185	190
Lys	Pro	Ser	Lys	Ser	Val	His	Leu	Thr	Val	Leu	Arg	Trp	Arg	Cys	Gln	195	200	205
Arg	Arg	Gly	Gly	Gln	Arg	Cys	Gly	Trp	Ile	Pro	Ile	Gln	Tyr	Pro	Ile	210	215	220
Ile	Ser	Glu	Cys	Lys	Cys	Ser	Cys									225	230	

REIVINDICACIONES

1. Método *ex vivo* para preparar una población que comprende células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas, donde dicho método comprende el paso de cultivo de células pluripotentes humanas tales como células madre embrionarias humanas o células iPS humanas en un medio de cultivo apropiado que comprende una cantidad eficaz de un activador de la vía de señalización de Wnt, donde el activador de dicha vía de señalización de Wnt es un miembro de la familia de las R-espondinas o un inhibidor de GSK-3 β .
2. Método *ex vivo* según la reivindicación 1, donde dicho medio de cultivo comprende además una cantidad eficaz de un inhibidor de la vía de señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP), donde dicho inhibidor de la vía de señalización de BMP es un inhibidor de un receptor de BMP de tipo I o un antagonista de BMP.
3. Método *ex vivo* según la reivindicación 1 o 2, donde dicho miembro de la familia de las R-espondinas se selecciona del grupo que consiste en la R-espondina 3, la R-espondina 2 y una combinación de dichas R-espondina 3 y R-espondina 2.
4. Método *ex vivo* según la reivindicación 3, **caracterizado por el hecho de que** dicha R-espondina 3 es la R-espondina 3 humana de secuencia SEQ ID NO: 1 o la isoforma 2 de la R-espondina 3 humana de secuencia SEQ ID NO: 5.
5. Método *ex vivo* según la reivindicación 3, **caracterizado por el hecho de que** dicha R-espondina 2 es la R-espondina 2 humana de secuencia SEQ ID NO: 3, la isoforma 2 de la R-espondina 2 humana de secuencia SEQ ID NO: 6 o la isoforma 3 de la R-espondina 2 humana de secuencia SEQ ID NO: 7.
6. Método *ex vivo* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho medio de cultivo apropiado comprende además DMSO o un equivalente.
7. Población que comprende células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas **caracterizada por el hecho de que** al menos un 20% de las células en dicha población expresa el producto génico de Msgn1 que es un biomarcador característico de las células progenitoras del mesodermo paraxial, obtenible por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Método para preparar una población que comprende linajes humanos de músculo esquelético, de hueso, de cartílago, de células dérmicas, de adipocitos o de células endoteliales, donde dicho método comprende los pasos de:
 - (a) cultivar células pluripotentes humanas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para obtener una población que comprende células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas; y
 - (b) cultivar dicha población que comprende células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM), bajo condiciones apropiadas para su diferenciación en los linajes celulares deseados seleccionados entre los derivados del mesodermo paraxial que incluyen los linajes de músculo esquelético, de hueso, de cartílago, de células dérmicas, de adipocitos o de células endoteliales.
9. Método según la reivindicación 8, para preparar una población que comprende linajes de células humanas de músculo esquelético, donde dicho método comprende los pasos de:
 - (a) cultivar células pluripotentes humanas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para obtener una población que comprende células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas;
 - (b) cultivar dicha población que comprende células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) en presencia de un medio de diferenciación que comprende al menos los componentes siguientes:
 - i. un material de matriz extracelular; y
 - ii. compuestos que activan o inhiben las vías de señalización conocidos por controlar la diferenciación de dichos linajes que incluyen, pero no se restringen a, ácido retinoico, BMP, TGF β (factor de crecimiento transformante β), Hedgehog, Notch, FGF, Wnt, miostatina, insulina, PDGF, VEGF, MAPK, PI3K; y
 - (c) opcionalmente, cultivar dicha población obtenida a partir del paso (b) en un segundo medio de diferenciación que comprende al menos uno o más compuestos que activan o inhiben las vías de señalización de Wnt, FGF, HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), activina, EGF (factor de crecimiento epidérmico), insulina e IGF o compuestos conocidos por promover la diferenciación miogénica tales como el suero de

caballo o la transferrina, obteniendo así una población que comprende linajes de células humanas de músculo esquelético, que se pueden identificar por marcadores tales como la desmina o la cadena pesada de miosina.

5 10. Método según la reivindicación 8 para preparar una población que comprende linajes de células dérmicas, donde dicho método comprende los pasos de cultivo de una población que comprende células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas en presencia de una cantidad eficaz de al menos uno o más compuestos que activan o inhiben las vías de BMP, TGF β , Wnt, FGF, EGF, ácido retinoico, Notch y Hedgehog.

10 11. Método según la reivindicación 8 para preparar una población que comprende linajes de células de hueso o cartílago, que comprende el paso de cultivo de una población que comprende células progenitoras del mesodermo paraxial inducidas (iPAM) humanas en presencia de una cantidad eficaz de al menos uno o más compuestos que activan o inhiben las vías de ácido retinoico, Wnt, Hedgehog, pTHRP, TGF β , BMP, o compuestos conocidos por promover la diferenciación ósea o de cartílago tal como la dexametasona, el ácido ascórbico, la vitamina D3 y el beta-glicerofosfato.

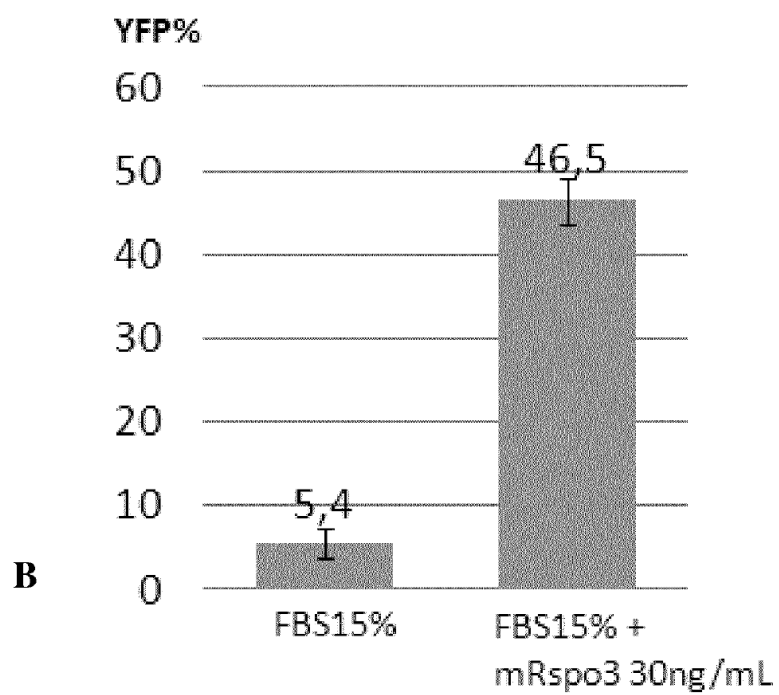
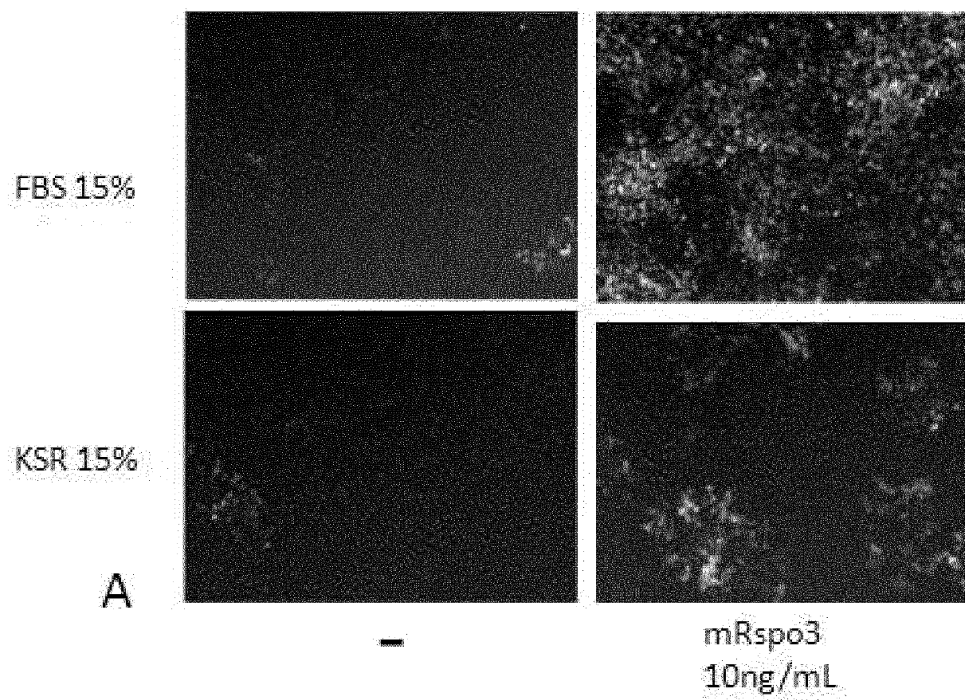


Figura 1

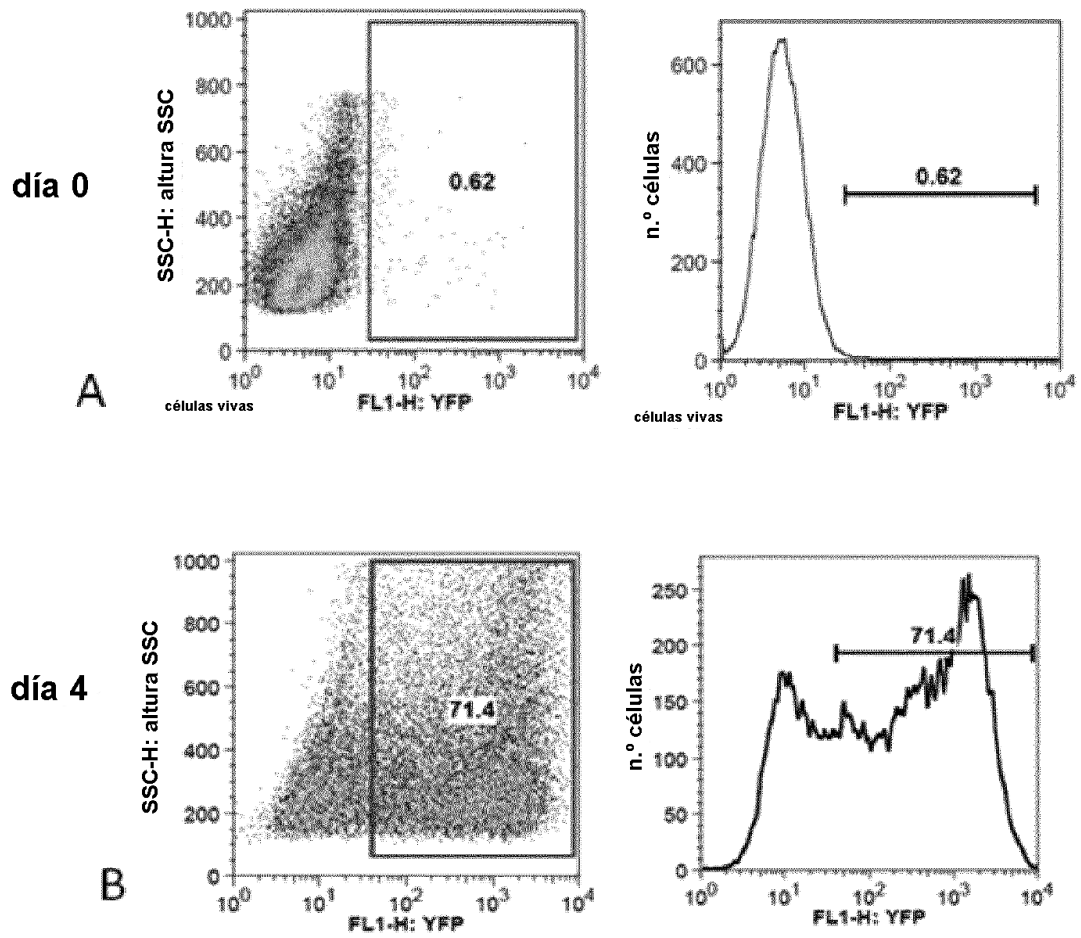
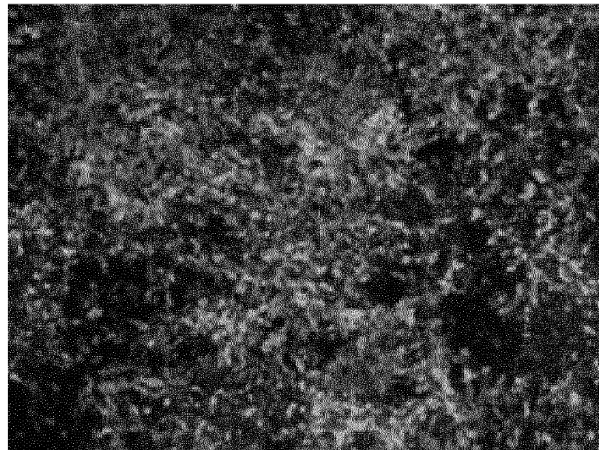


Figura 2



A

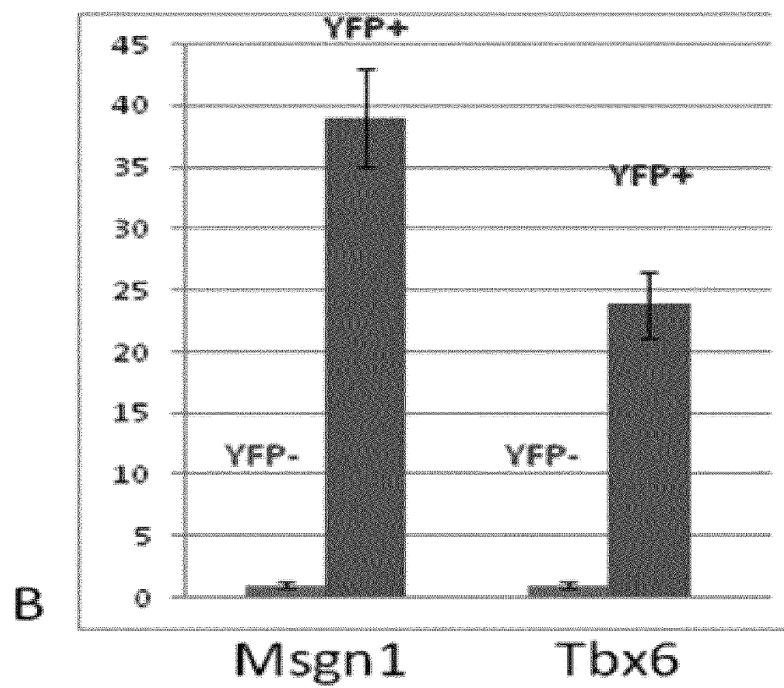


Figura 3

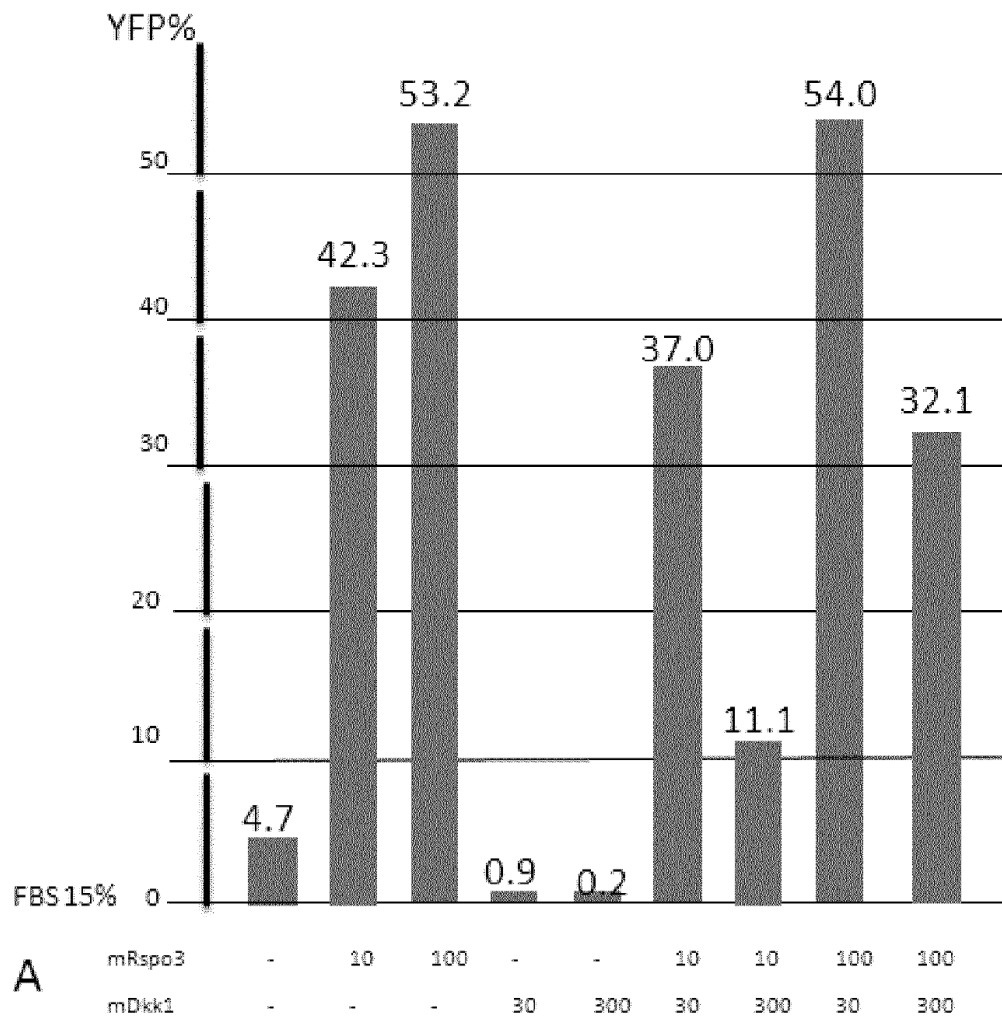


Figura 4 A

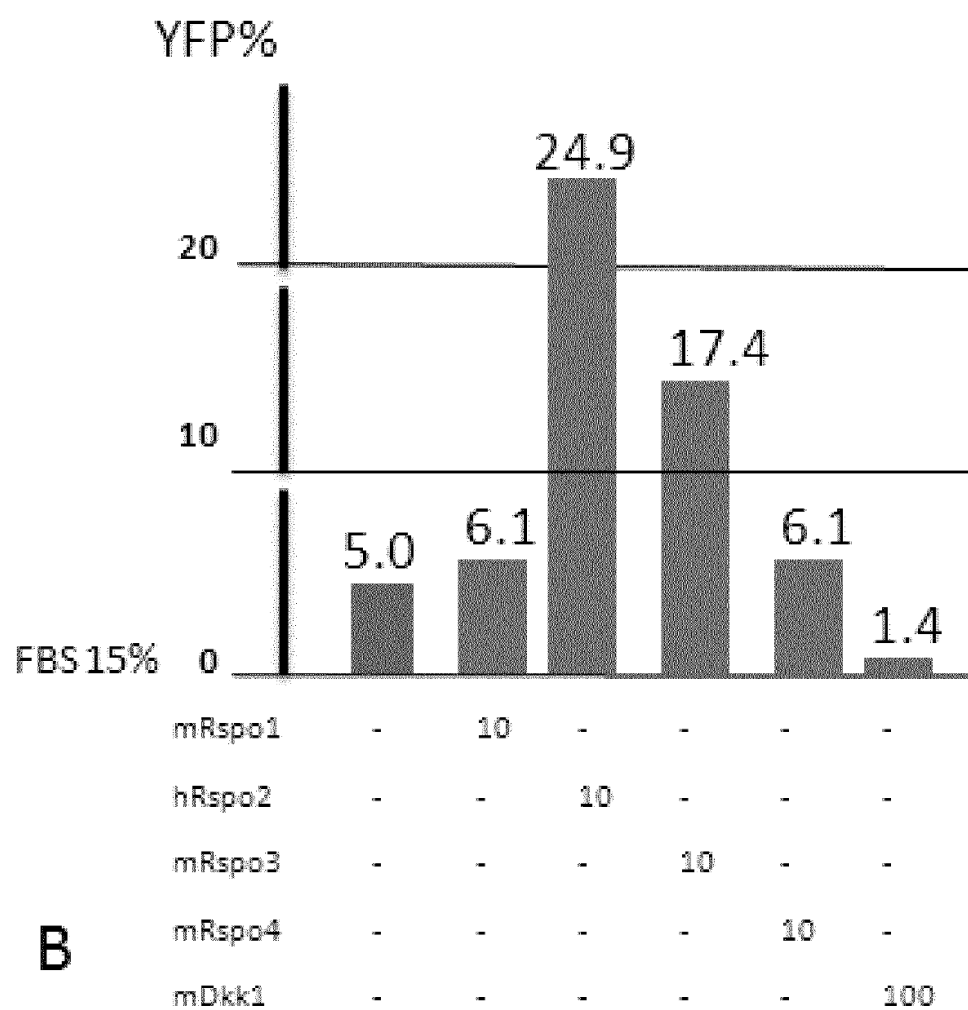


Figura 4 B

Ensayo BATLuc

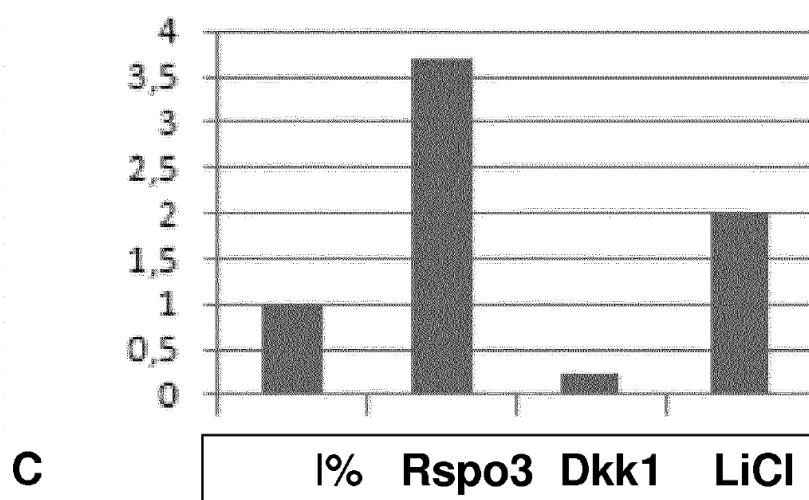


Figura 4 C

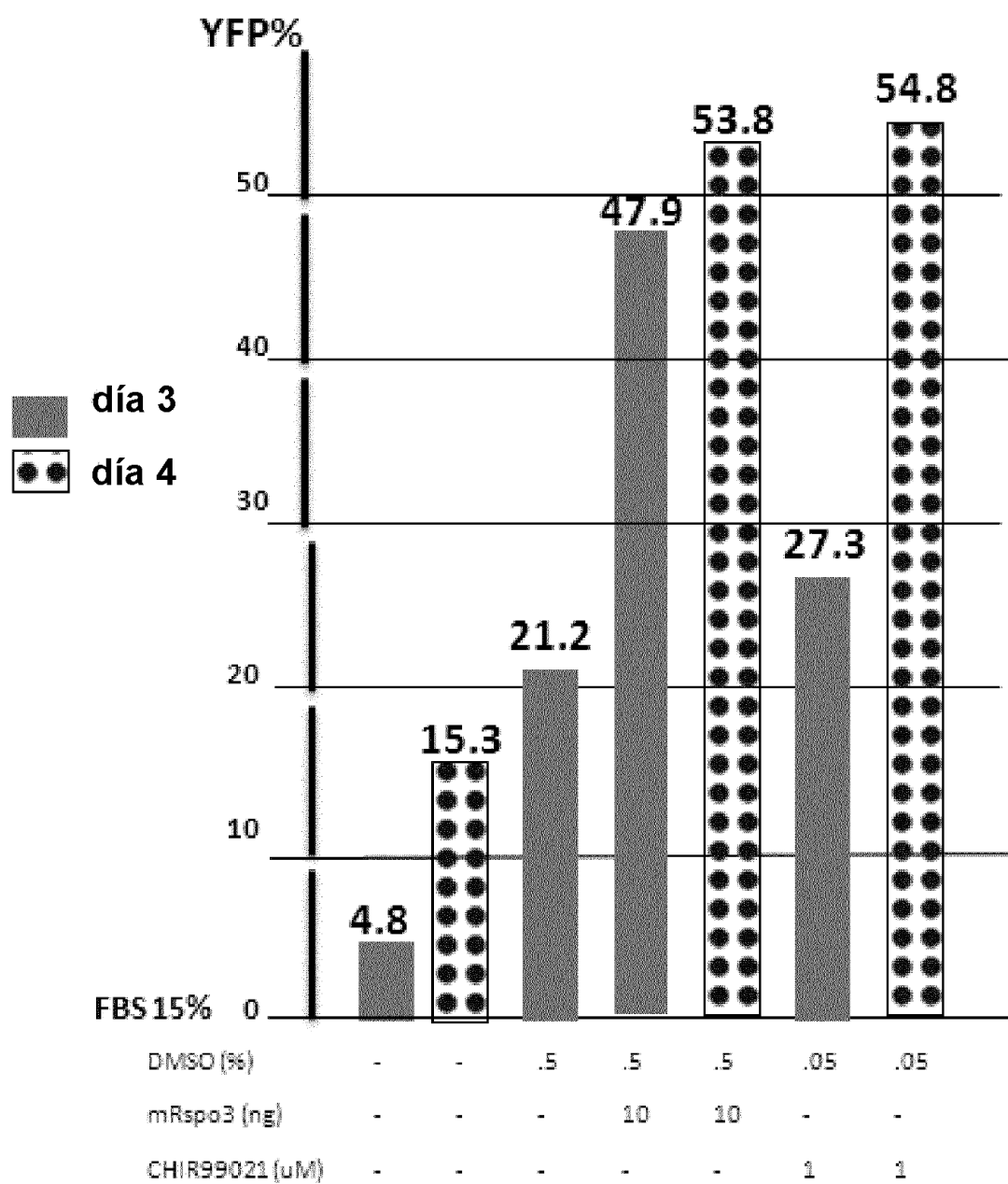


Figura 5

Efecto del DMSO

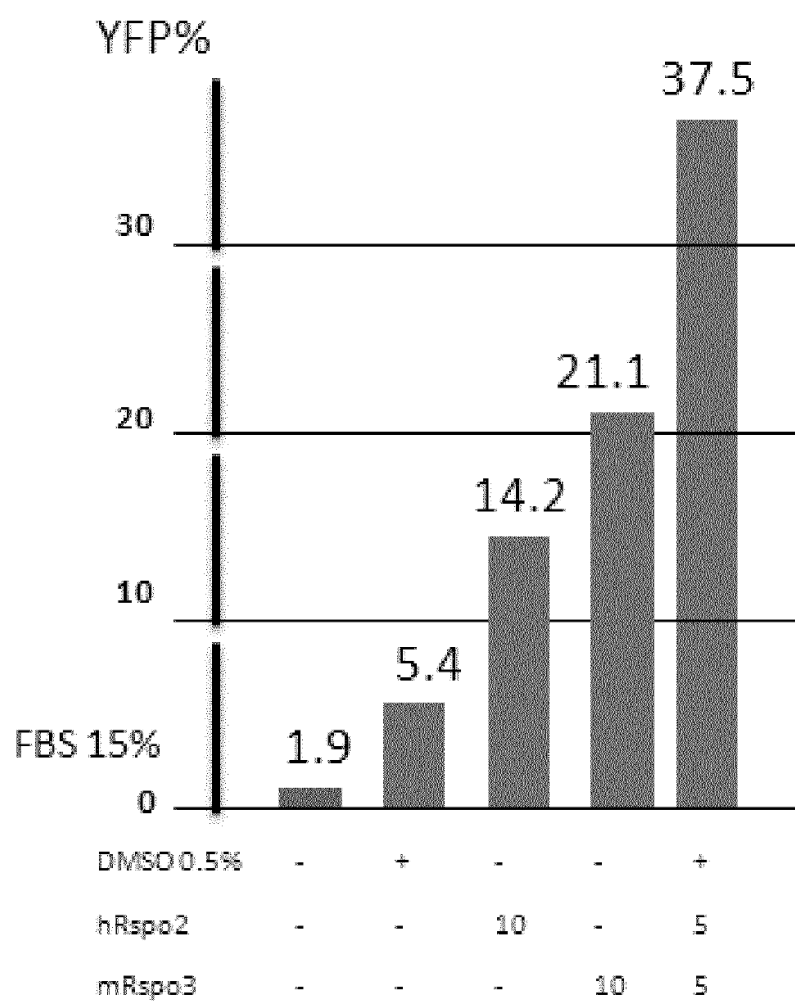


Figura 6

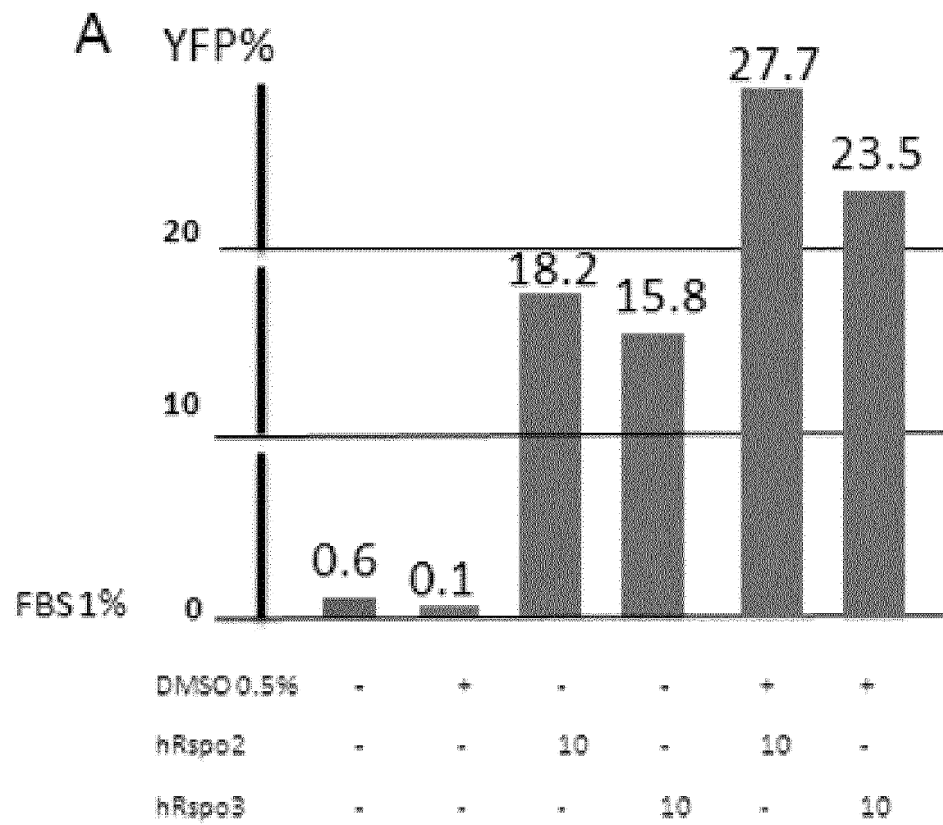


Figura 7 A

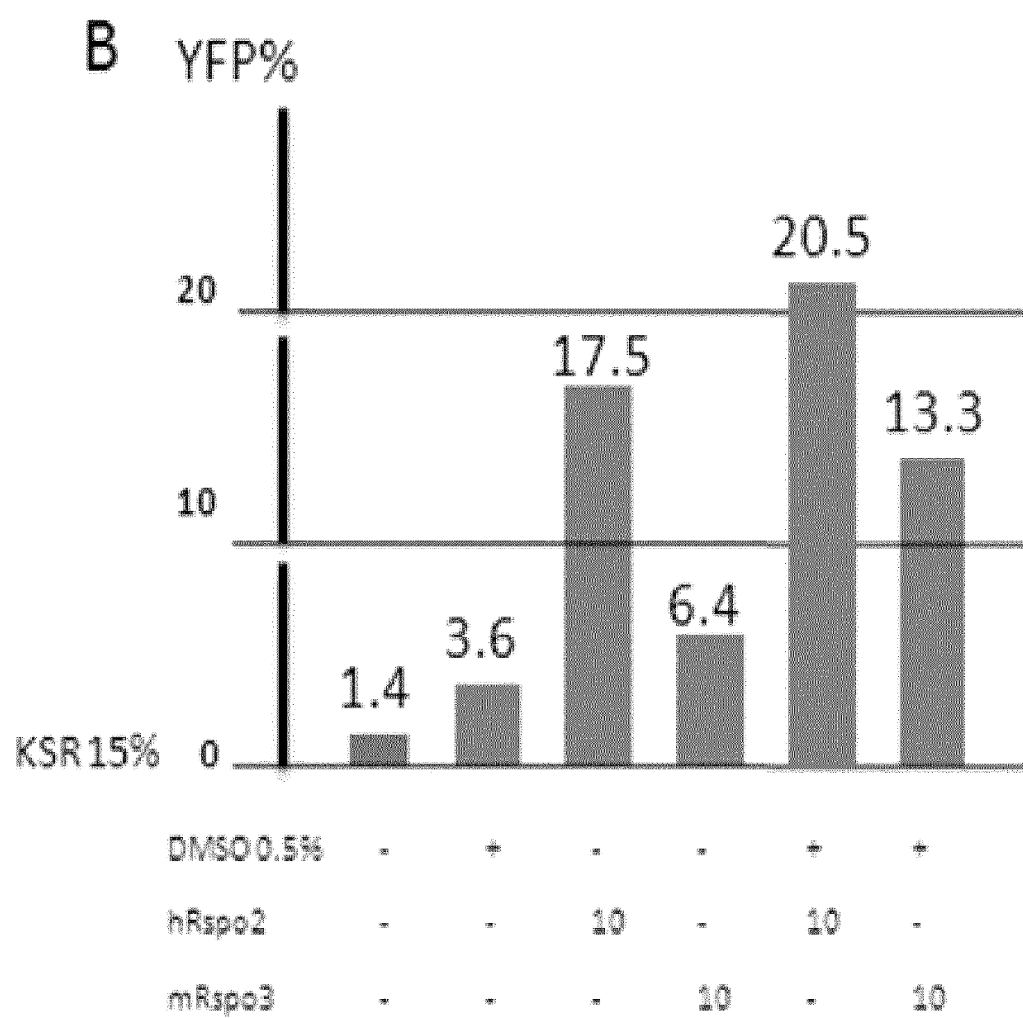
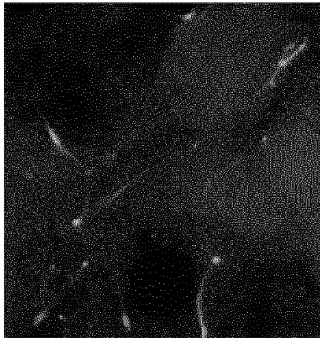
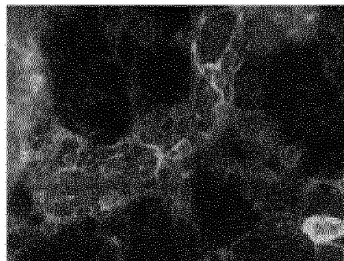
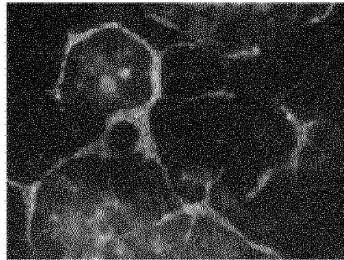
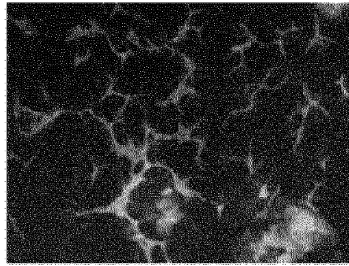


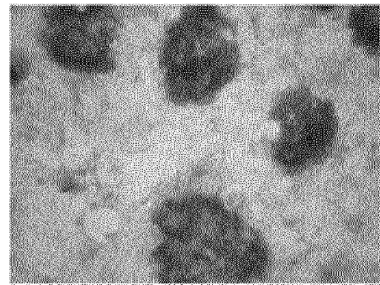
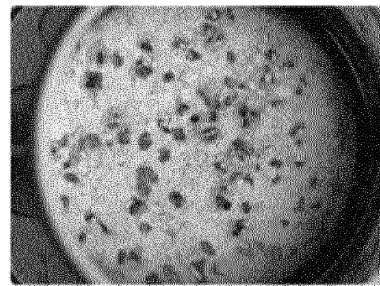
Figura 7 B



Desmina (día 18)



PECAM1 (CD31) (día 18)



Azul alcian (día 18)

Figura 8

Dermo-1

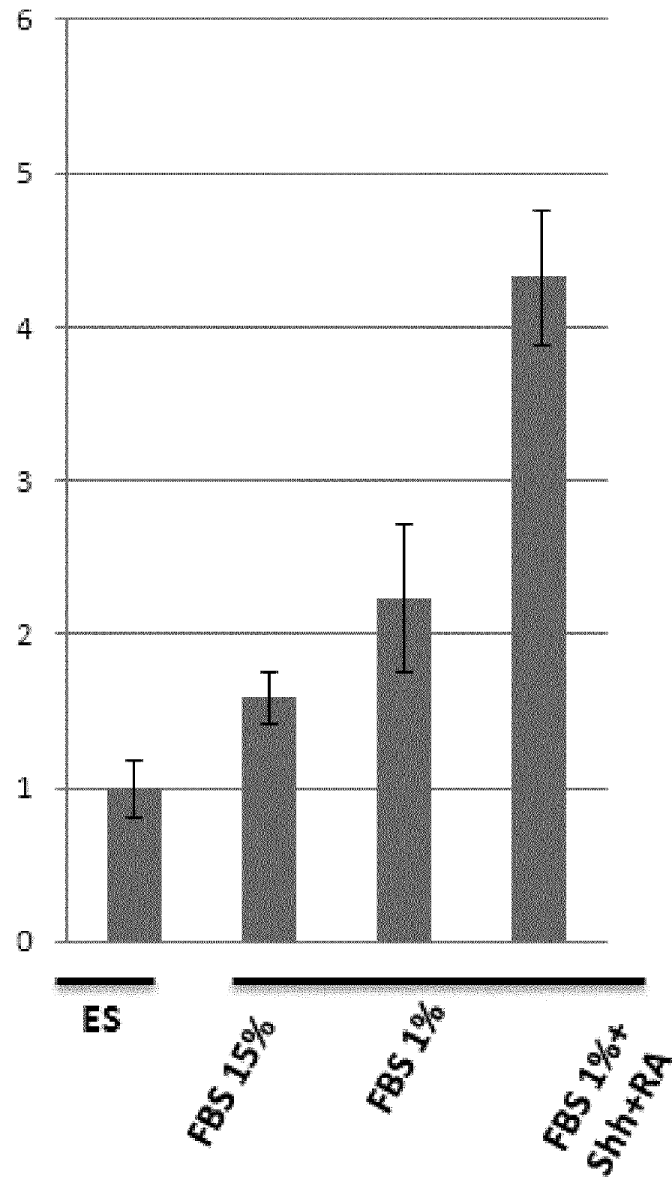


Figura 9 A

Myf5

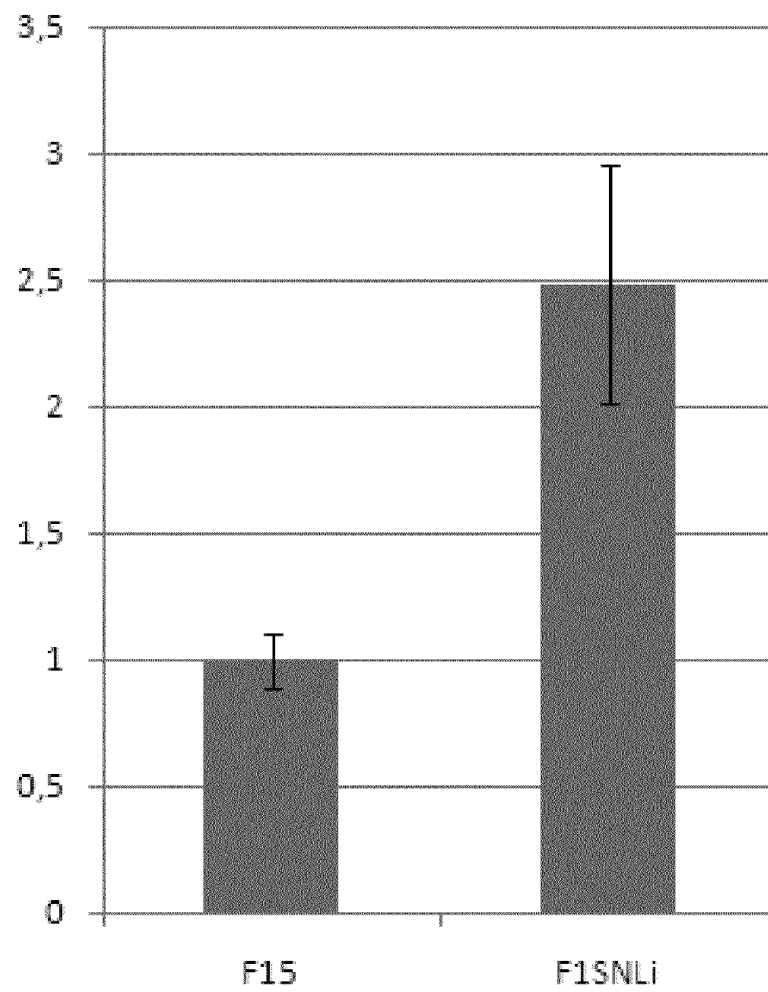


Figura 9 B

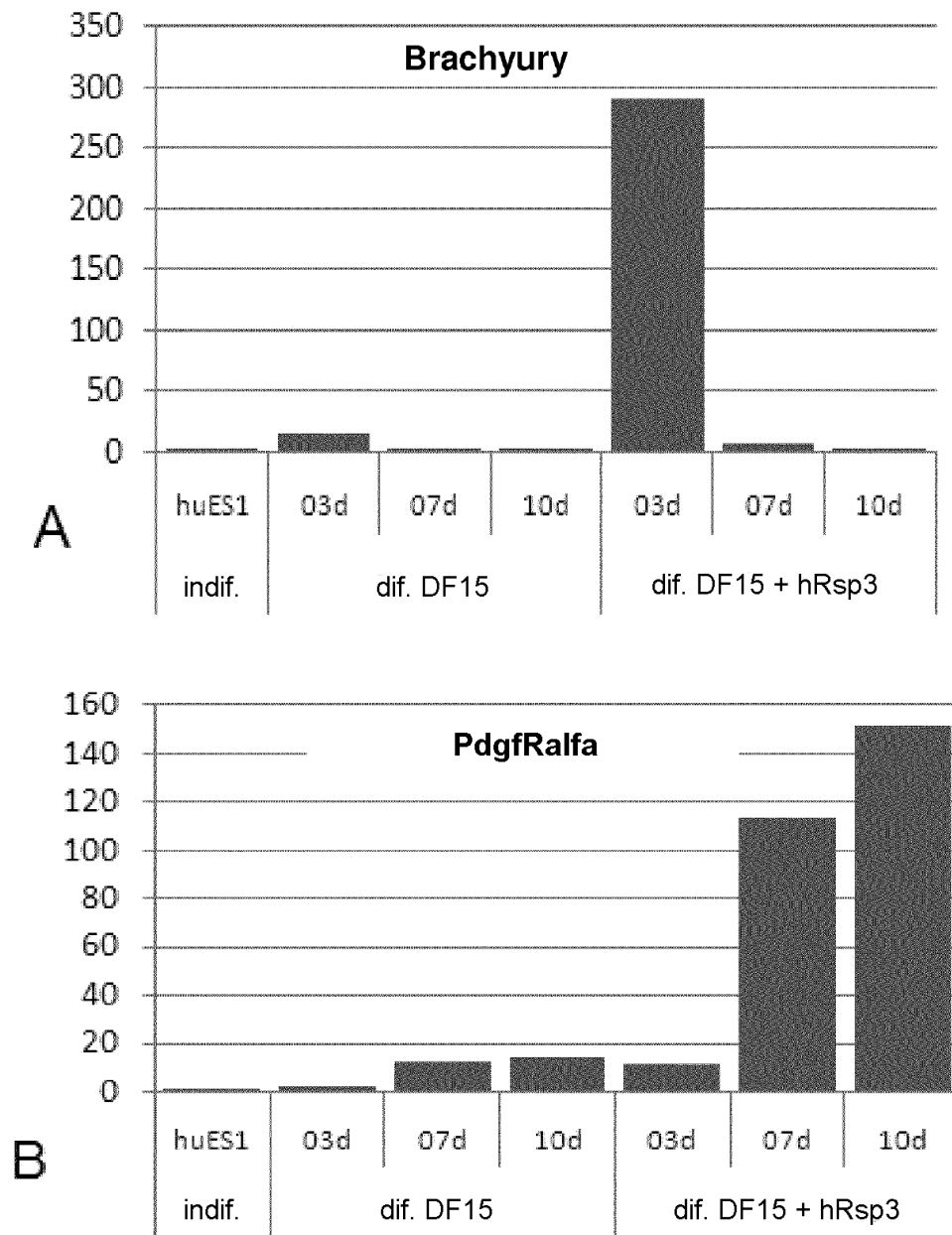
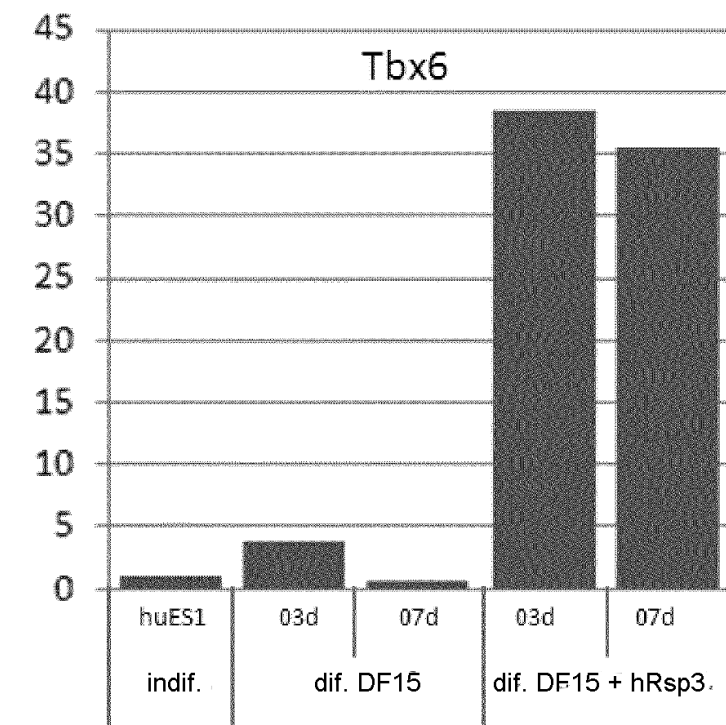
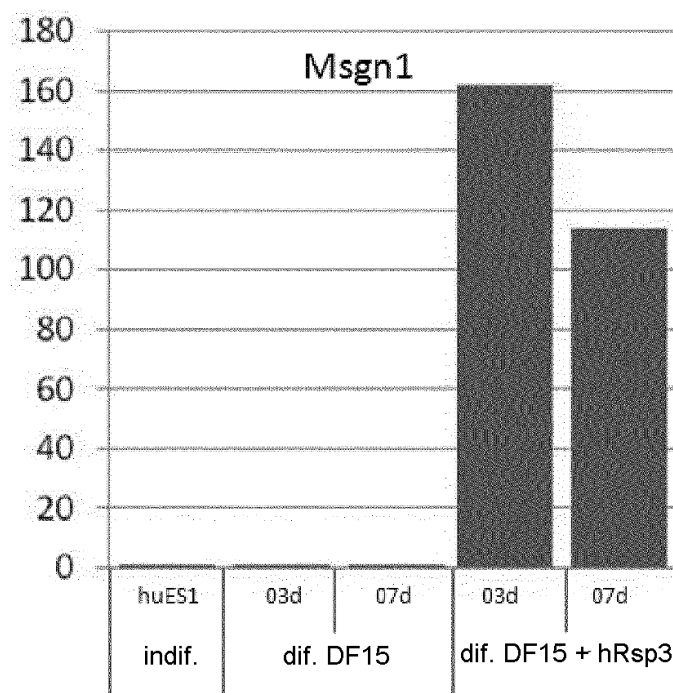


Figura 10 A y B



C



D

Figura 10 C y D

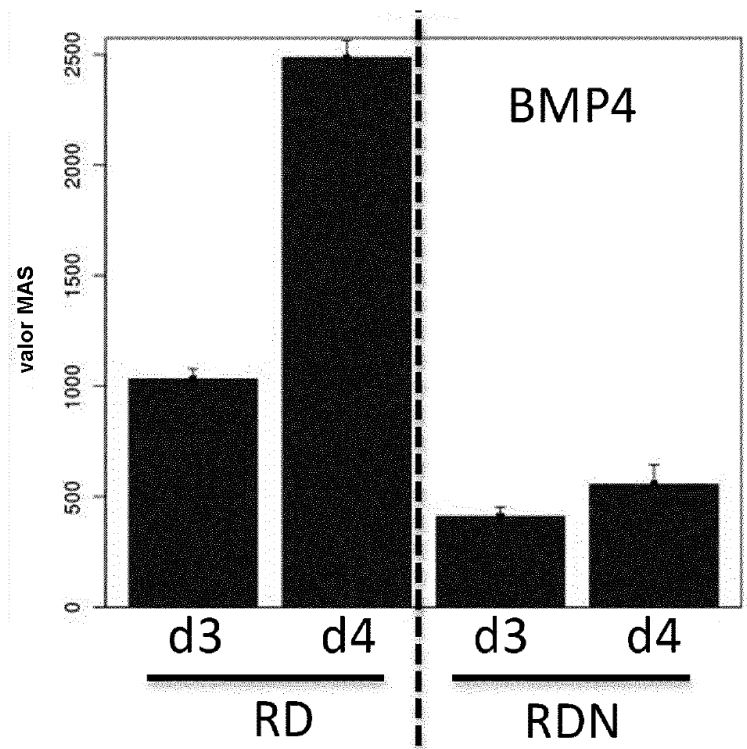
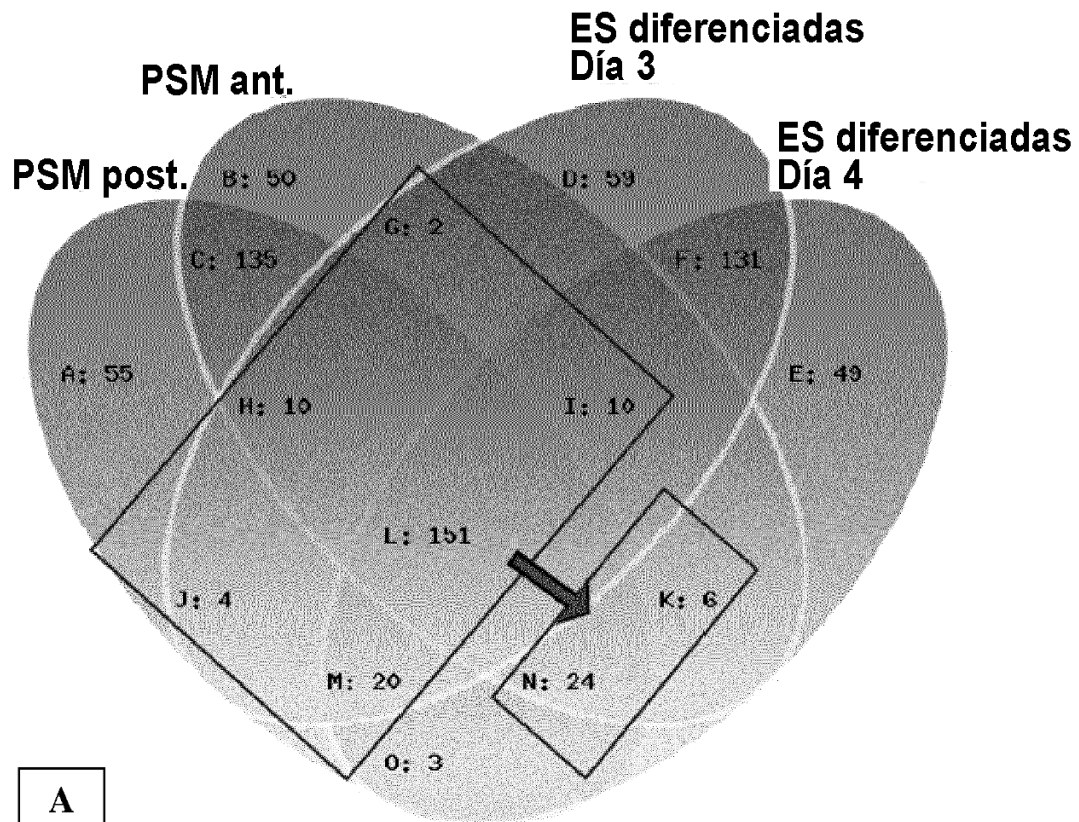


Figura 11



Día 3

Pcdh8	Sulf1
Sal1/3	Lef1
Lin28	Gpc3
T	Sp5/8
Zic2/3/5	Lrig3
Rspo3	Arid3b
Adamts20	Gli3
Dll3	Acvr2b
Gad1	Dkk1
Cited1	Fgf8
Epha4	Cdx2
Six4	Spred1
Il17rd	S1pr5
Has2	Gbx2
Wnt5a/b	Etv4
Ror2	Evx1

Día 4

Ripply2
Mesp2
Foxc1/2
Pax3
Odz4
Meis2
Pdgfra
Pcsk5

B

Figura 12 A y B

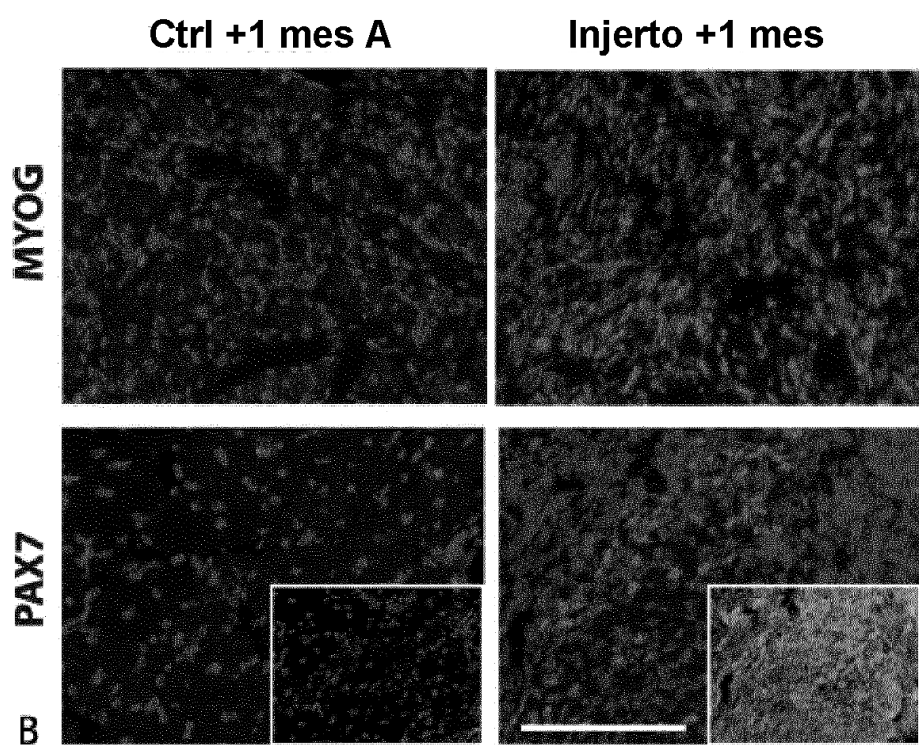
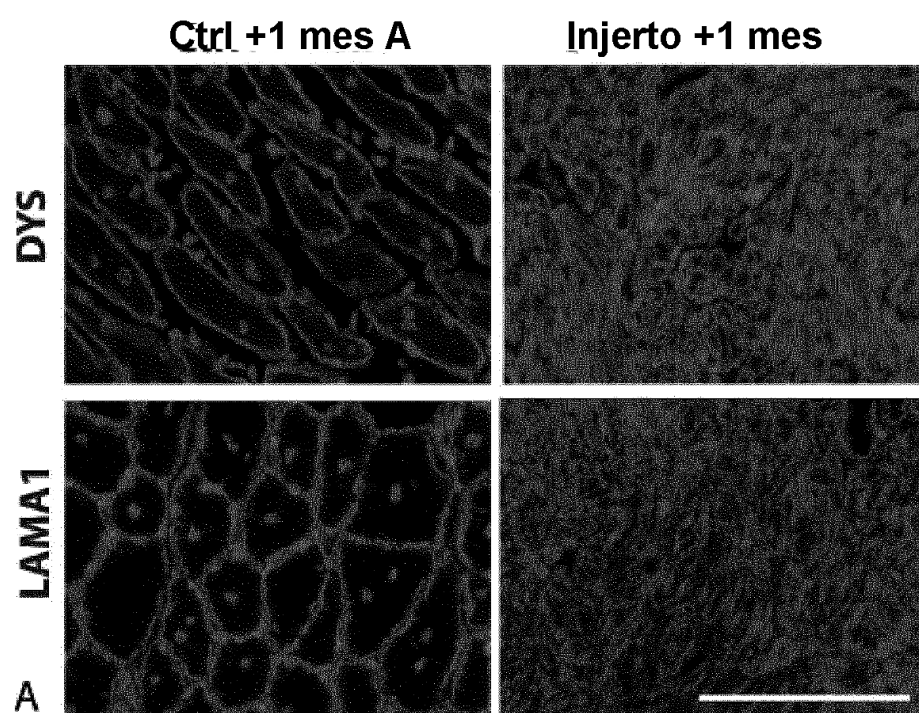


Figura 13 A y B

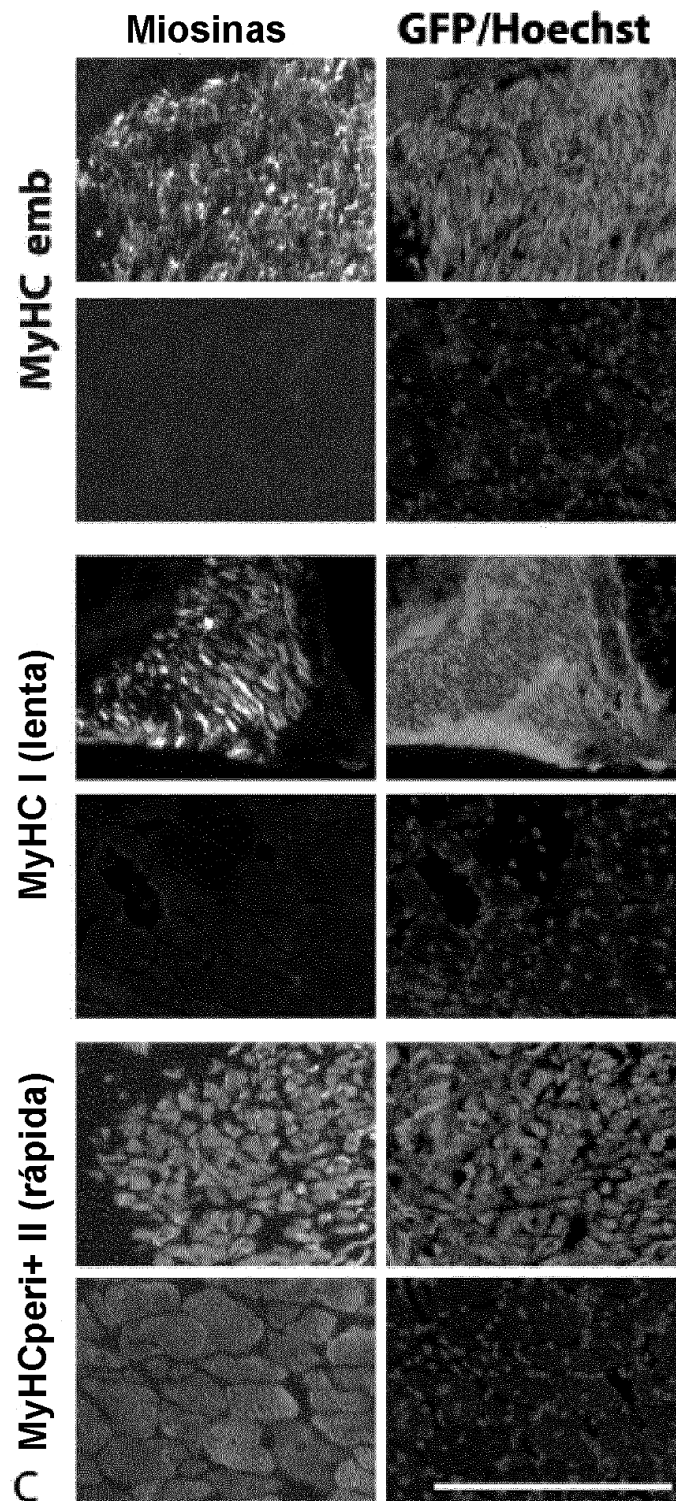


Figura 13 C