

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 070**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2009 PCT/US2009/065062**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.05.2010 WO10059775**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2009 E 09759851 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2366021**

54 Título: **Cultivo de células madre pluripotentes en microportadores**

30 Prioridad:

20.11.2008 US 116447 P

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

15.11.2017

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

NELSON, SHELLEY

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 642 070 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).

Cultivo de células madre pluripotentes en microportadores**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se dirige a métodos para el crecimiento, expansión y diferenciación de células madre pluripotentes en microportadores.

10 ANTECEDENTES

Las células madre pluripotentes, tales como, por ejemplo, células madre embrionarias tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos de células de adultos. Como tales, las células madre embrionarias pueden ser una fuente de reemplazo de células y tejidos para los órganos que han sido dañados como resultado de una enfermedad, infección o anomalías congénitas. El potencial de las células madre embrionarias para ser empleadas como una fuente de células de reemplazo se ve obstaculizado por la dificultad de la propagación de las células *in vitro*, mientras que se mantiene su pluripotencia.

Los métodos actuales de células madre embrionarias no diferenciadas de cultivo requieren condiciones de cultivo complejas, tales como, por ejemplo, el cultivo de las células madre embrionarias en la presencia de una capa de células de alimentación. Alternativamente, los medios obtenidos por exposición a cultivos de células alimentadoras pueden usarse para cultivar células madre embrionarias. Los sistemas de cultivo que emplean estos métodos usan a menudo células obtenidas de una especie diferente a la de las células madre que se están cultivando (células xenogénicas). Además, estos sistemas de cultivo pueden complementarse con suero animal.

Las células madre embrionarias proporcionan un recurso potencial para la investigación y el cribado de fármacos. En la actualidad, el cultivo a gran escala de líneas de células madre embrionarias humanas es problemático y proporciona desafíos sustanciales. Los métodos actuales *in vitro* para propagar las células madre pluripotentes se llevan a cabo en matraces de tejidos sobre superficies planas pre-recubiertas con proteínas de la matriz extracelular (ECM) o células alimentadoras. Los cultivos planares también requieren frecuentes subcultivos debido a que su área superficial limitada no puede soportar el crecimiento a largo plazo de células madre pluripotentes. Los métodos basados en microportadores de cultivo de células madre pluripotentes pueden proporcionar una solución. Los microportadores tienen una alta relación de superficie-área-volumen y, por lo tanto, eliminan la restricción de área superficial de células madre pluripotentes en crecimiento sobre superficies planas.

Por ejemplo, Fok et al describen sistemas de cultivo de suspensión agitada durante la propagación de cultivos microportadores y agregados ESC indiferenciados (Stem Cells 23, 1333-1342 (2005)).

En otro ejemplo, Abranches et al describen el ensayo de Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ), un microportador microporoso compuesto por una matriz de dextrano con una capa de colágeno en la superficie por su capacidad para apoyar la expansión de la línea celular S25 ES de ratón en matraces giratorios (Biotechnol., Bioeng. 96, 1211 - 1221 (2007)).

En otro ejemplo, US20070264713 describe un procedimiento para el cultivo de células madre no diferenciadas en suspensión y en particular a un método para cultivar células madre en microportadores en los vasos.

En otro ejemplo, WO2006137787 describe una herramienta de detección, que comprende partículas o microportadores, tales como perlas, que se unen a un soporte sólido, tal como una placa de microtitulación, para el cultivo de células en dichos microportadores.

Phillips et al (Journal of Biotechnology, 138, 24-32 (2008) y WO2008102118 describen la unión y el crecimiento de células madre embrionarias humanas en microportadores. WO2007149182 describe métodos para la diferenciación y el enriquecimiento de las células de islotes como de células madre humanas pluripotentes que implican el uso de microportadores WO2008035110 describe el cultivo de células madre embrionarias en un medio que comprende inhibidor de ROCK. Watanabe et al describen que un inhibidor de ROCK permite la supervivencia de células madre embrionarias humanas disociadas (Nature Biotechnology 25, 681-686 2007)).

En otro ejemplo, WO2008004990 divulga un método para promover la unión, la supervivencia y/o proliferación de una célula madre en cultivo, comprendiendo el método el cultivo de una célula madre en una superficie de soporte cargada positivamente.

En otro ejemplo, WO2007012144 divulga un biorreactor, que comprende: una superficie de soporte, y un polipéptido de unión sintético unido a la superficie de apoyo en el que el polipéptido de unión sintético se caracteriza por una elevada afinidad de unión para una célula madre embrionaria o una célula multipotente.

RESUMEN

La presente invención proporciona métodos para el crecimiento, expansión y diferenciación de células madre pluripotentes en microportadores de acuerdo con las reivindicaciones.

En una realización, la presente invención proporciona un método para la propagación de células madre pluripotentes de acuerdo con las reivindicaciones, que comprende las etapas de:

- a. Unión de una población de células madre pluripotentes a un primer volumen de microportadores,
- b. Cultivo de las células madre pluripotentes en el primer volumen de microportadores,
- c. Extracción de las células madre pluripotentes del primer volumen de microportadores, y
- d. Fijación de la población de células madre pluripotentes a un segundo volumen de microportadores.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: El inhibidor de Rho-quinasa promueve la unión y el crecimiento de células madre embrionarias humanas a microportadores. Imágenes de células H9 cultivadas en cultivo estático durante 2 días en microportadores HILLEX®II (Solohill, MI). Las células se cultivaron en medio acondicionado de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF-CM) con o sin 10 μM de inhibidor Rho quinasa, Y27632 ((Sigma-Aldrich, MO) A y B, respectivamente).

Figura 2: Células H9 cultivadas en microportadores. Las células H9 se dejaron unir a varios microportadores y se colocaron sobre una plataforma basculante a 37°C. Se usaron microportadores de plástico, microportadores ProNectinF, microportadores HILLEX®II (Solohill, MI) y microportadores Plastic Plus (A, B, C, D, respectivamente). El crecimiento después de 3 días mostró células en HILLEX®II (Solohill, MI) con la mejor unión celular a los microportadores. Las flechas identifican las células que forman agregados sin fijación a los microportadores.

Figura 3: Proliferación de células H9 en microportadores. Las células H9 se unieron a microportadores HILLEX®II, microportadores ProNectinF, microportadores Plastic Plus y microportadores de plástico (Solohill, MI) y se colocaron en un plato de 6 pocillos en una plataforma basculante a 37°C en la presencia de 10 μM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO) y MEF-CM. La densidad inicial de siembra de células es el valor en el día 0. Se muestran los números de células del día 3 y el día 5.

Figura 4: Imágenes de células H1 después de la unión a microportadores. Las imágenes de células a los días 3, 5 y 7 se muestran unidas a microportadores ProNectinF, microportadores Plastic Plus y microportadores de plástico. Las células se cultivaron en MEF-CM con 10 μM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO) en una placa de 12 pocillos en una plataforma oscilante a 37°C. Las células formaron agregados independientes de la unión a los microportadores Plastic Plus y Plastic (flechas en G, H).

Figura 5: Imágenes de células H1 después de la unión a microportadores. Las imágenes de células a los días 3, 5 y 7 se muestran unidas a microportadores Cytodex 1®, microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) y microportadores HILLEX®II (Solohill, MI). Las células fueron cultivadas en MEF-CM con 10 μM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO) en una placa de 12 pocillos en una plataforma oscilante a 37°C.

Figura 6: Proliferación de células H1 en microportadores. Las células H1 se dejaron unir a microportadores HILLEX®II (Solohill, MI), microportadores Cytodex 1® (GE Healthcare Life Sciences, NJ), microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ), ProNectinF (Solohill, MI), microportadores de plástico (Solohill, MI) y microportadores de plástico (Solohill, MI) y se colocaron en un plato de 12 pocillos sobre una plataforma basculante a 37°C en presencia de 10 μM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO) y MEF-CM. La densidad inicial de siembra de células es el valor al día 0. Se muestran los números de células de los días 3, 5 y 7. La densidad inicial de siembra era 13.333 células/cm², como se indica por la línea.

Figura 7: La proliferación de células H9 en microportadores en diversas concentraciones de inhibidores de Rho quinasa. Las células se cultivaron en una placa de 12 pocillos en una plataforma oscilante y se contaron a los días 4 y 7 para determinar la velocidad de unión y proliferación. A. Células H9 fueron cultivadas en MEF-CM con 1, 2,5, 5, o 10 μM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO). B. Células H9 fueron cultivadas en MEF-CM con 0,5, 1, 2,5, o 5 μM glicilo-H 1152 dihidrocloruro (Tocris, MO).

Figura 8: Las células H1 se cultivaron en concentraciones decrecientes de inhibidores de Rho quinasa. Las células H1p38 se hicieron crecer en presencia de Y27632 (Sigma-Aldrich, MO) o glicilo-H 1152 dihidrocloruro (Tocris, MO) durante dos días a concentraciones decrecientes (10 μM /5 μM , 2,5 μM /0,5 μM o 1,0 μM /0,5 μM) o en 0,25 μM glicilo-H 1152 dihidrocloruro (Tocris, MO) de forma continua. Se permitió que las células se unieran a

HILLEX®II (Solohill, MI), Cytodex® o Cytodex® 3 ((GE Healthcare Life Sciences, NJ) A, B, C, respectivamente). Las células se contaron a los 3, 5 y 7 días después de la siembra.

5 Figura 9: Determinación de la unión celular a microportadores a diferentes densidades de siembra en matraces giratorios. Las células H1 se sembraron en microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) a las densidades listadas a la izquierda; baja ($0,4 \times 10^4$ células/cm²), media ($1,2 \times 10^4$ células/cm²) o alta (3×10^4 células/cm²). A los 3, 5 y 7 días se formaron imágenes de las células y se determinaron el porcentaje de microportadores con células unidas (incorporados en imagen).

10 Figura 10: El crecimiento celular en microportadores en matraces giratorios se ve afectado por las densidades iniciales de siembra. Células H1 se sembraron en microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) a las densidades listadas a la izquierda; baja ($0,4 \times 10^4$ células/cm²), media ($1,2 \times 10^4$ células/cm²) o alta (3×10^4 células/cm²). A los 3, 5 y 7 días, las células se disociaron de los microportadores y se contaron.

15 Figura 11: Determinación de la velocidad de crecimiento celular en microportadores a diferentes densidades de siembra en matraces giratorios. Las células H1 se sembraron en microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) a diferentes densidades (día 0); baja ($0,4 \times 10^4$ células/cm²), media ($1,2 \times 10^4$ células/cm²) o alta (3×10^4 células/cm²). A los 3, 5 y 7 días, las células se disociaron de los microportadores y se contaron. El aumento de veces en el número de células se muestra frente a la densidad de siembra inicial.

20 Figura 12: Las células H1 cultivadas en microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) se visualizaron después de 7 días en cultivo. Las células recibieron MEF-CM sin inhibidor de Rho quinasa a partir del día 3 en adelante. Las células permanecieron unidas a los microportadores.

25 Figura 13: Crecimiento de células H9 y disociación de células H9 en microportadores HILLEX®II (Solohill, MI). A, B 10x y 20x de células H9 cultivadas durante 6 días en microportadores HILLEX®II (Solohill, MI). C, 20 x imagen de células disociadas de microportadores HILLEX®II (Solohill, MI) durante 10 minutos con Tripsina/EDTA al 0,05%. D, imagen 20x de células disociadas de microportadores HILLEX®II (Solohill, MI) durante 10 minutos con TrypLE™ Express.

30 Figura 14: Disociación de células H9 de microportadores. Células H9 cultivadas en HILLEX® II (Solohill, MI) en una plataforma de oscilación, se disociaron con TrypLE™ Express o 0,05% Tripsina/EDTA. El número de células y su viabilidad se muestran, A y B, respectivamente.

35 Figura 15: Disociación de células H1 de microportadores. Las células H1 cultivadas en Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) en un matraz giratorio se disociaron con TrypLE™ Express (Invitrogen, CA), Accutase™ o Colagenasa (10 mg/ml). El número de células y su viabilidad se muestran, A y B, respectivamente.

40 Figura 16: Las células H9 cultivadas en microportadores HILLEX®II (Solohill, MI) no se transfieren entre microportadores.

Figura 17: H9 en el paso 43 se hicieron crecer durante 5 pasos en microportadores HILLEX®II (Solohill, MI) en un matraz giratorio. Se contaron las células cada 2 a 3 días y se pasaron cuando las células alcanzaron $1-2 \times 10^5$ células/cm².

45 Figura 18: Las células H9 en el paso 43 se hicieron crecer durante 5 pasos en microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) en un matraz giratorio. Se contaron las células cada 2 a 3 días y se pasaron cuando las células alcanzaron $1-2 \times 10^5$ células/cm².

50 Figura 19: La clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) muestra pluripotencia de células H9 cultivadas en matraces giratorios. A, La mayoría de las células H9 p43 cultivadas en microportadores HILLEX®II (Solohill, MI) expresan proteínas de pluripotencia. Pasagel y 3 células no se evaluaron para TRA-1-81. B, La mayoría de las células H9 p43 cultivadas en microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) expresan proteínas de pluripotencia. Las células de paso 1 no se evaluaron para TRA-1-81.

55 Figura 20: Las células p49 de H1 se hicieron crecer durante 5 pasos en microportadores Cytodex 1® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) en un matraz giratorio. Se contaron las células cada 2 a 3 días y se pasaron cuando las células alcanzaron $4-8 \times 10^4$ células/cm².

60 Figura 21: Las células H1 en el paso 49 se hicieron crecer durante 5 pasos en microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) en un matraz giratorio. Se contaron las células cada 2 a 3 días y se pasaron cuando las células alcanzaron $1-2 \times 10^5$ células/cm².

65 Figura 22: Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) muestra pluripotencia de células H1 cultivadas en matraces giratorios.

Figura 23: Doblaciones poblacionales de células H1 y H9 sobre microportadores. Los tiempos de duplicación de la población se calcularon desde el día 3 hasta el día del pasaje (día 5,6 ó 7).

Figura 24: Células H9 cultivadas en microportadores en medios definidos. Las células se cultivaron en HILLEX®II (HII, (Solohill, MI)) o Cytodex 3® (C3, (GE Healthcare Life Sciences, NJ)). Las células se cultivaron en microportadores en uno de los siguientes medios; MTESR (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá), StemPro o MEF-CM. 10 µM Y27632 (Y, (Sigma-Aldrich, MO)) o 2,5 µM glicilo-H 1152 dihidrocloruro de (H, (Tocris, MO)), se añadió a los medios. Se determinó la tasa de crecimiento a los 3, 5 y 7 días después de la siembra.

Figura 25: Las células H1 en el paso 38 se cultivaron sobre microportadores en medios definidos. Las células se cultivaron en microportadores HILLEX®II (HII, (Solohill, MI)) o Cytodex 3® (C3, (GE Healthcare Life Sciences, NJ)). Las células se cultivaron en microportadores en uno de los siguientes medios; MTESR (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá), StemPro y MEF-CM. 10 µM Y27632 (Y, (Sigma-Aldrich, MO)) o 2,5 µM glicilo-H 1152 dihidrocloruro (H, (Tocris, MO)), se añadió a los medios. Se determinó la tasa de crecimiento a los 3, 5 y 7 días después de la siembra.

Figura 26: Las células H1 en el paso 50 se cultivaron en microportadores HILLEX® II (Solohill, MI)) con medio definido en un matraz giratorio. A, Imágenes de células H1 p50 cultivadas en MEF-CM después de 3, 7 o 9 días en un matraz giratorio. B, Imágenes de células H1 p50 cultivadas en mTESR (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) después de 3, 7 o 9 días. Las flechas identifican los grupos de células no unidos a los microportadores.

Figura 27: Diferenciación de células madre embrionarias humanas pasadas cinco veces en matraces giratorios. Las células A, H9 en el paso 43 se pasaron cinco veces en microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ). B, células H1 en el paso 49 fueron pasadas cinco veces en microportadores Cytodex® (GE Healthcare Life Sciences, NJ). Ambos tipos de células se liberaron de los microportadores y se sembraron en placas revestidas de MATRIGEL (BD Biosciences, CA). A 80-90% de confluencia las células fueron expuestas a un protocolo que es capaz de diferenciar las células madre embrionarias a endodermo definitivo. A continuación, las células se analizaron mediante FACS para el porcentaje de células que expresan CXCR4, un marcador endodérmico definitivo. El porcentaje de células CXCR4 positivas está en la esquina superior derecha de la parcela.

Figura 28: Diferenciación de células H1 sobre microportadores a endodermo definitivo. Aquí las gráficas FACS muestran el porcentaje de células que expresan el marcador endodérmico definitivo CXCR4. Porcentaje positivo está en la esquina superior derecha. Las células se expandieron en microportadores en matraces giratorios antes del tratamiento. Las células A, H1 en el paso 40 se hicieron crecer sobre microportadores Cytodex 1® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) durante 6 días después del paso 5 antes de la diferenciación. Las células B, H1 en el paso 40 se hicieron crecer sobre microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) durante 8 días después del paso 1 antes de la diferenciación. Las células C, H1 en el paso 50 se hicieron crecer sobre microportadores HILLEX®II (Solohill, MI) durante 6 días después del paso 1 antes de la diferenciación.

Figura 29: Diferenciación de las células H1 sobre microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) hasta endodermo definitivo. A, células H1 en el pasaje 40 se hicieron crecer sobre microportadores durante ocho días. B, células H1 en el paso 40 se cultivaron sobre microportadores durante 11 días. Ambas poblaciones de células se diferenciaron a endodermo definitivo en una plataforma oscilante a 37°C. Aquí las gráficas FACS muestran el porcentaje de células que expresan el marcador endodérmico definitivo CXCR4. El porcentaje positivo está en la esquina superior derecha.

Figura 30: Diferenciación de células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, cultivadas en microportadores hasta endodermo definitivo. Los resultados de FACS para el porcentaje de células CXCR4 positivas se muestran en el eje Y. Las células H1 se hicieron crecer en microportadores HILLEX® II, Cytodex 1® o Cytodex 3® antes y durante la diferenciación.

Figura 31: Diferenciación de células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 cultivadas en microportadores a células de endodermo pancreáticas. Los valores de CT se muestran en el eje Y para los marcadores endodérmicos pancreáticos, Ngn3, Nkx6.1 y Pdx1. Las células H1 se diferenciaron en microportadores HILLEX®II (HII), Cytodex® (C1) o Cytodex® (C3) en medio DMEM-Alta glucosa (HG) o DMEM-F12 (F12). El protocolo de diferenciación duró 13 días.

Figura 32: Diferenciación de células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 cultivadas en microportadores a células pancreáticas productoras de hormonas. El porcentaje de células positivas se determinó mediante FACS mostrado en el eje Y para marcadores celulares de hormonas pancreáticas, sinaptofisina, glucagon e insulina. Células H1 se sembraron a dos concentraciones diferentes de 10×10^5 (10) o 20×10^5 (20) sobre microportadores Cytodex 3® (C-3). Las células se diferenciaron en DMEM-Glucosa alta (HG) durante los días cuatro a nueve y se diferenciaron en los medios HG o DMEM-F12 (F12) de los días 10 a 24.

Figura 33: Diferenciación de células H1 sobre microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) a células endocrinas. Las células H1 se diferenciaron a células endocrinas pancreáticas a través de endodermo pancreático (Día 14), células endocrinas pancreáticas (Día 21) a células que expresan insulina (Día 28). Se midieron los niveles de expresión génica de Pdx1, Glucagón e Insulina (A, B, C, respectivamente). Se compararon las células H1 cultivadas y diferenciadas en microportadores Cytodex 3® (C3) con las cultivadas y diferenciadas en platos de 6 pocillos revestidos con MATRIGEL (BD Biosciences, CA). Los valores de expresión génica para células cultivadas en microportadores Cytodex 3® (GE Health Care Life Sciences, NJ) se realizaron por triplicado.

Figura 34: Las células H9 se diferenciaron en los microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) de endodermo definitivo (DE). Gráficos FACS de expresión CXCR4. Porcentaje de células positivas CXCR4 de marcador endodérmico definitivo se indica en la esquina superior derecha. A, células H9 en el paso 39 se cultivaron en placas de 6 pocillos revestidas con MATRIGEL (BD Biosciences, CA) y se diferenciaron a DE. B, C Se colocaron muestras duplicadas de células H9 en microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) de hiladoras en un plato de 12 pocillos y se incubaron sobre una plataforma basculante.

Figura 35: Diferenciación de células H9 en microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) a células que expresan insulina. Las células H9 se diferenciaron a células endocrinas pancreáticas a través de endodermo pancreático (Día 14), células endocrinas (Día 22) a células que expresan insulina (Día 29). Se midió el nivel de expresión génica de Pdx1, Glucagón e Insulina (A, B, C, respectivamente). Se compararon células H9 cultivadas y diferenciadas en microportadores Cytodex 3® (C3) con las cultivadas y diferenciadas en placas de 6 pocillos revestidas con MATRIGEL (BD Biosciences, CA).

Figura 36: Mantenimiento de la pluripotencia en células madre embrionarias humanas cultivadas durante 5 pases sobre microportadores Cytodex 3®, luego transferidas y cultivadas sobre los sustratos planos indicados y cultivados en presencia de un inhibidor de Rho quinasa. El panel A representa la expresión de los marcadores de pluripotencia CD9, SSEA3, SSEA4, Tra-160 y Tra-181 detectados por citometría de flujo. El panel B representa la expresión de los marcadores de pluripotencia Nanog, Pou5F1, SOX2 y ZFP42 y marcadores de diferenciación: FOXA2, FOXD3, GATA2, GATA4 y Brachyury como se detectó por PCR en tiempo real.

Figura 37: Formación de endodermo definitivo por células madre embrionarias humanas cultivadas durante 5 pases en microportadores Cytodex 3®, luego transferidas y cultivadas sobre los sustratos planos indicados y cultivados en presencia de un inhibidor de Rho quinasa. El panel A representa la expresión de CXCR4 como se detecta por citometría de flujo. El panel B representa la expresión de los marcadores indicados detectados por PCR en tiempo real.

Figura 38: Formación de endodermo definitivo por células madre embrionarias humanas cultivadas durante 5 pases sobre microportadores Cytodex 3®, transferidas y cultivadas sobre un sustrato plano PRIMARIA™. La expresión de los genes indicados se determinó por citometría de flujo.

Figura 39: Las células madre embrionarias humanas cultivadas sobre sustratos planos mantienen la pluripotencia. Muestras ARNm de células ES humanas H1 pasadas de TrypLE™, Accutase™, o Colagenasa fueron recogidas y ensayadas para expresión génica de pluripotencia ARNm. Se cultivaron las células para un pasaje durante 4 días en cultivo sobre MATRIGEL en medio condicionado MEF (A) o un paso sobre Primaria™ en medio condicionado MEF suplementado con Rock Inhibitor (B), o dos pasajes sobre Primaria™ en medios acondicionados MEF suplementados con Rock Inhibitor (C).

Figura 40: Células madre embrionarias humanas H1 cultivadas por más de 7 pases en PRIMARIA (mayor que p45) pasadas con Accutase™ o TrypLE™ a relaciones de división 1:4, 1:8 o 1:16 en PRIMARIA en presencia de inhibidor de Rho Quinasa Glycyl-H 1152 diclorhidrato se sometió a pruebas de pluripotencia (A), y la capacidad de diferenciarse a Endodermo Definitivo (B). El control es células madre embrionarias humanas H1p48 cultivadas a 1:30 MATRIGEL pasadas con colagenasa. 10mA = pasada con 10 minutos de exposición a Accutase™. 10mT = pasada con 10 minutos de exposición a TrypLE™. 1:4, 1:8, o 1:16 indican la proporción de paso. P (X) indica el número de pasaje desde el traslado de los alimentadores MEF al plástico Primaria™.

Figura 41: Se ensayaron células madre embrionarias humanas H1 cultivadas para más de 7 pasos con PRIMARIA (superior a p45) pasadas con Accutase™ o TrypLE™ a razón de 1:4 en PRIMARIA en presencia de diclorhidrato de Rho Quinasa Glicilo-H 1152 dihidrocloruro para determinar la expresión de ARNm de pluripotencia y marcadores de diferenciación. El control es la población inicial de células en el paso 37. 10 min Accutase™ = pasada con 10 minutos de exposición a Accutase™. P (X) indican el número de paso desde el movimiento de los alimentadores MEF al plástico PRIMARIA™.

Figura 42: Se ensayaron células troncales embrionarias humanas H1 cultivadas para más de 7 pases en PRIMARIA™ (mayor que p45) pasadas con Accutase™ o TrypLE™ a razón de 1:8 en PRIMARIA en presencia de diclorhidrato de Rho Quinasa Glycyl-H 1152 dihidrocloruro para determinar la expresión de ARNm de

pluripotencia y marcadores de diferenciación. El control es la población inicial de células en el paso 37. 10 min Accutase™ pasado con 10 minutos de exposición a Accutase™. P (X) indican el número de paso desde el movimiento de los alimentadores MEF al plástico PRIMARIA™.

5 Figura 43: Se ensayaron células madre embrionarias humanas H1 cultivadas para más de 7 pasajes en PRIMARIA™ (superior a p45) pasadas con Accutase™ o TrypLE™ en una relación de 1:16 en PRIMARIA en presencia de inhibidor de Rho Quinasa Glicilo-H 1152 dihidrocloruro para expresión de ARNm de pluripotencia y marcadores de diferenciación. El control es la población inicial de células en el paso 37. 10 min Accutase™ =
10 pasada con 10 minutos de exposición a Accutase™.

P (X) indican el número de paso desde el movimiento de los alimentadores MEF al plástico PRIMARIA™.

15 Figura 44: Las imágenes de células H1 cultivadas sobre sustratos planares Primaria™ (n° de catálogo 353846, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) se transfirieron después a microportadores 3 días después de la siembra. Las células A-C H1 se sembraron en microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ). Se sembraron células D-F sobre microportadores HILLEX®II (Solohill, MI). A, D Las células H1 se pasaron sobre placas de sustrato plano Primaria™ (n° de cat. 353846, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) con 10 minutos de tratamiento TrypLE™ Express (Invitrogen, CA) antes de transferencia a microportadores. A, E Las células H1 se pasaron sobre placas de sustratos planares Primaria™ (n° de cat. 353846, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) con 10 minutos de tratamiento con Accutase™ antes de transferencia a microportadores. C, F Las células H1 en el paso 46 se pasaron sobre placas revestidas con colagenasa (1 mg/ml) de MATRIGEL (BD Biosciences, CA) antes de transferirlas a microportadores.

25 Figura 45: Pluripotencia de células H1 cultivadas sobre sustratos planares Primaria™ (n° de catálogo 353846, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) luego se transfirieron a Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) y microportadores HILLEX®II. El análisis FACS muestra la expresión de proteínas de superficie celular pluripotentes. Las células se trataron con Accutase™ o TrypLE™ Express (Invitrogen, CA) durante 3 a 10 minutos durante el paso en Primaria™ (n° de catálogo 353846, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

30 Figura 46: Diferenciación de las células H1 propagadas sobre Primaria™ (n° de catálogo 353846, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y luego se transfirieron a microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ). El análisis FACS de la expresión de la superficie celular de CXCR4, marcador endodérmico definitivo. Las células se trataron con Accutase™ o TrypLE™ Express (Invitrogen, CA) durante 3 a 10 minutos durante el paso en Primaria™ (n° de catálogo 353846, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

35 Figura 47: Análisis FACS de células madre embrionarias humanas cultivadas sobre sustratos planares que consisten en ésteres mixtos de celulosa antes del cultivo en microportadores.

40 Figura 48: Análisis FACS de la expresión de marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo a partir de células madre embrionarias humanas cultivadas sobre sustratos planares constituidos por ésteres mixtos de celulosa antes del cultivo y diferenciación sobre microportadores.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 Para mayor claridad de descripción, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las siguientes subsecciones que describen o ilustran ciertas características, realizaciones o aplicaciones de la presente invención.

Definiciones

50 Las células madre son células no diferenciadas definidas por su capacidad en el nivel de células individuales tanto de auto-renovarse como diferenciarse para producir células de progenie, incluyendo progenitores de auto-renovación, progenitores de no renovación, y células terminalmente diferenciadas. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de diversos linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, si no todos tejidos después de la inyección en blastocistos.

60 Las células madre se clasifican por su potencial de desarrollo como: (1) totipotentes, es decir, capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias; (2) pluripotentes, es decir, capaces de dar origen a todos los tipos de células embrionarias; (3) multipotentes, es decir, capaces de dar lugar a un subconjunto de linajes celulares, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir progenie que incluye HSC (auto-renovación), progenitores oligopotentes restringidos de células sanguíneas y todos los tipos y elementos celulares (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre); (4) oligopotentes, lo que significa que puede dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes celulares que las células madre multipotentes; y (5) unipotentes, es decir,
65

capaces de dar lugar a un solo linaje celular (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

La diferenciación es el proceso por el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, tales como, por ejemplo, una célula nerviosa o una célula muscular. Una célula diferenciada o inducida por diferenciación es aquella que ha adquirido una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término "comprometido", cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha procedido en la vía de diferenciación hasta un punto en el que, en circunstancias normales, continuará diferenciándose en un tipo de célula o subconjunto específico de tipos celulares, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o volver a un tipo de célula menos diferenciada. La diferenciación se refiere al proceso mediante el cual una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Tal como se usa en este documento, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células proceden y de qué células pueden dar lugar. El linaje de una célula sitúa la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un marcador específico de linaje se refiere a una característica específicamente asociada con el fenotipo de células de un linaje de interés y puede usarse para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida con el linaje de interés.

Varios términos se utilizan para describir las células en cultivo. "Mantenimiento" se refiere generalmente a células colocadas en un medio de crecimiento en condiciones que facilitan el crecimiento y/o división celular que pueden o pueden no resultar en una población mayor de las células. El pasaje se refiere al proceso de extracción de las células de un recipiente de cultivo y su colocación en un segundo recipiente de cultivo en condiciones que facilitan el crecimiento y/o la división celular.

Una población específica de células, o una línea celular, se refiere a veces o se caracteriza por el número de veces que se ha pasado. Por ejemplo, una población de células cultivadas que ha sido pasada diez veces puede denominarse un cultivo P10. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo que sigue al aislamiento de células del tejido, se designa P0. Después del primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (P1 o paso 1). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (P2 o paso 2), y así sucesivamente. Los expertos en la técnica entenderán que puede haber muchas duplicaciones de población durante el periodo de paso; por lo tanto el número de duplicaciones de población de un cultivo es mayor que el número de pasaje. La expansión de las células (es decir, el número de duplicaciones de la población) durante el periodo entre pasajes depende de muchos factores, incluyendo pero no limitado a la densidad de siembra, sustrato, medio, las condiciones de crecimiento, y el tiempo entre los pasajes.

"Linajes de células β " se refiere a las células con expresión génica positiva para el factor de transcripción PDX-1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN-3, NKX2.2, Nkx6.1, NeuroD, Isl-1, HNF-3 beta, MAFA, Pax4 o Pax6. Las células que expresan marcadores característicos del linaje de células β incluyen células β .

"Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo" como se usa en el presente documento se refieren a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX-17, GATA-4, HNF-3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox de tipo mezcla, FGF4 CD48, eomesodermina (Eomes), DKK4, FGF17, GATA-6, CXCR4, C-Kit, CD99, o OTX2. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo incluyen células precursoras de estría primitiva, células de estría primitiva, células de mesendodermo y células de endodermo definitivo.

"Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático", como se usa en el presente documento se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: PDX-1, HNF-1beta, PTF-1 alfa, HNF-6, o HB9. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático incluyen células del endodermo pancreático.

"Células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático", como se usa en el presente documento se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: NGN-3, NeuroD, Islote-1, PDX-1, Nkx6.1, Pax-4 o PTF-1 alfa. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático incluyen células pancreáticas endocrinas, células que expresan la hormona pancreática, y células secretoras de la hormona pancreática, y células del linaje de células β .

"Endodermo definitivo", como se usa aquí se refiere a células que llevan las características de las células derivadas del epiblasto durante la gastrulación y que forman el tracto gastrointestinal y sus derivados. Células de endodermo definitivo expresan los siguientes marcadores: CXCR4, HNF-3 beta, GATA-4, SOX-17, Cerberus, OTX2, gooseoid, c-Kit, CD99, y MIX11.

"Endodermo extraembrionario" tal como se utiliza aquí se refiere a una población de células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX-7, AFP, o SPARC.

"Marcadores", como se usa en este documento, son moléculas de ácido nucleico o de polipéptidos que se

expresan diferencialmente en una célula de interés. En este contexto, la expresión diferencial significa un aumento del nivel de un marcador positivo y una disminución del nivel de un marcador negativo. El nivel detectable del marcador de ácido nucleico o polipéptido es suficientemente más alto o más bajo en las células de interés en comparación con otras células, de tal manera que la célula de interés puede identificarse y distinguirse de otras células utilizando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica.

"Célula de mesendoderma" tal como se utiliza aquí se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: CD48, eomesodermina (Eomes), SOX-17, DKK4, HNF-3 beta, GSC, FGF17, o GATA-6.

"Célula endocrina pancreática" o "célula que expresa hormona pancreática" tal como se utiliza aquí se refiere a una célula capaz de expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

"Célula que secreta hormona pancreática" tal como se utiliza aquí se refiere a una célula capaz de secretar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

"Célula de estría pre-primitiva" tal como se utiliza aquí se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: Nodal, o FGF8.

"Célula de estría primitiva" tal como se usa aquí se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: brachyury, proteína homeobox de tipo mezcla, o FGF4.

Microportadores

"Microportadores" se refiere a partículas, perlas, o gránulos útiles para la unión y crecimiento de células dependientes de anclaje en cultivo. Los microportadores tienen las siguientes propiedades: (a) Son lo suficientemente pequeño para que puedan ser utilizados en cultivos de suspensión (con una velocidad de agitación que no cause un daño significativo de cizallamiento a los microportadores o las células); (b) Son sólidos, o tienen un núcleo sólido con un revestimiento poroso en la superficie; y (c) Sus superficies (superficie exterior e interior en el caso de los portadores porosos) pueden estar cargadas positivamente o negativamente. En un aspecto, los microportadores tienen un diámetro de partícula global entre aproximadamente 150 y 350 μM , y tienen una densidad de carga positiva de entre aproximadamente 0,8 y 2,0 meq/g. Microportadores útiles incluyen, sin limitación, Cytodex 1®, Cytodex 2®, o Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ).

En otro aspecto, el microportador es un portador sólido. Los portadores sólidos son particularmente adecuados para células de adhesión, por ejemplo, células dependientes de anclaje. La partícula de soporte también puede ser un microportador poroso.

"Microportadores porosos" se refiere a partículas útiles para la unión y crecimiento de células dependientes de anclaje en cultivo. Los microportadores porosos tienen las siguientes propiedades: (a) que son lo suficientemente pequeños para que puedan ser utilizados en cultivos de suspensión (con una velocidad de agitación que no cause un daño significativo de cizallamiento a los microportadores o las células); (b) tienen poros y espacios interiores de tamaño suficiente para permitir que las células migren a los espacios interiores de la partícula y (c) sus superficies (exterior e interior) puede ser cargadas positivamente o negativamente. En una serie de formas de realización, los portadores (a) tienen un diámetro de partícula global entre aproximadamente 150 y 350 μM ; (b) tienen poros que tienen un poro promedio de diámetro de apertura de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40 μM ; y (c) tienen una densidad de carga positiva de entre aproximadamente 0,8 y 2,0 meq/g. En algunas realizaciones, la carga positiva está provista de grupos DEAE (N,N,-dietilaminoetil). Microportadores porosos útiles incluyen, sin limitación, Cytopore 1® y Cytopore 2® (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway NJ). Microportadores pueden tener cualquier forma, pero son típicamente aproximadamente de forma esférica, y pueden ser macro o micro porosos, o sólidos.

Tipos de portadores de micro-partículas tanto porosos como sólidos están disponibles comercialmente de proveedores. Ejemplos de microportadores comercialmente disponibles incluyen Cytodex 1® y Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ), que son microportadores de GE Healthcare Life Sciences basados ambos en dextrano. Microportadores porosos en el mercado incluyen productos de Cytoline así como Cytopore también de GE Healthcare Life Sciences. Biosilon (NUNC) y Cultispher (Percell Biolytica) también están disponibles comercialmente. En un aspecto adicional, los microportadores pueden estar compuestos de, o recubiertos con policarbonato o ésteres de celulosa mixtos.

Microportadores adecuados para su uso en la presente invención pueden estar compuestos de materiales naturales o derivados sintéticamente. Los ejemplos incluyen microportadores a base de colágeno, microportadores a base de dextrano, o microportadores a base de celulosa, así como vidrio, cerámica, polímeros o metales. El microportador puede ser libre de proteínas o recubierto de proteína, por ejemplo, con el colágeno. En un aspecto adicional, el microportador puede estar compuesto de, o recubierto con, los compuestos que potencian la unión de la célula al microportador y mejoran la liberación de la célula del microportador, incluyendo, pero no limitado a,

poli(ácido cosuccínico de monoestearoilglicérido), poli-D,L-lactida-co-glicólido, hialuronato de sodio, colágeno, fibronectina, laminina, elastina, lisina, N-isopropilo acrilamida, vitronectina.

Microportadores para el cultivo celular

5 El cultivo de microportadores es una técnica, que hace posible el cultivo de alto rendimiento práctico de células dependientes de anclaje, por ejemplo, las células madre embrionarias humanas. Microportadores han sido desarrollados específicamente para el cultivo de células, tales como células madre embrionarias humanas, en volúmenes de cultivo que van desde unos pocos mililitros hasta más de mil litros. El microportador es biológicamente inerte y proporciona un sustrato fuerte pero no rígido para cultivos de microportadores agitados. Los microportadores pueden ser transparentes, lo que permite el examen microscópico de las células unidas. Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) consiste en una fina capa de colágeno desnaturalizado acoplado químicamente a una matriz de dextrano reticulada. La capa de colágeno desnaturalizado en Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) es susceptible a la digestión por una variedad de proteasas, incluyendo la tripsina y la colagenasa, y proporciona la capacidad de eliminar las células de los microportadores, manteniendo la máxima viabilidad celular, la función y la integridad.

20 Microportadores libres de proteína pueden ser utilizados para células madre embrionarias humanas de cultivo. Por ejemplo, los microportadores para uso en la fabricación y de laboratorio o de investigación vendidos bajo el nombre comercial HILLEX® (SoloHill Engineering, Inc., MI.) Se modifican perlas de poliestireno con amonio de trimetilo catiónico unido a la superficie para proporcionar una superficie cargada positivamente al microportador. El diámetro de la perla varía de aproximadamente 90 a aproximadamente 200 micras de diámetro.

25 Los métodos basados en microportador de cultivo celular proporcionan muchas ventajas, incluyendo la facilidad de procesamiento aguas abajo en muchas aplicaciones. Microportadores son típicamente aproximadamente de forma esférica, y pueden ser porosos o sólidos. El uso de microportadores para la fijación celular facilita el uso de tanque agitado y reactores relacionados para el crecimiento de células dependientes de anclaje. Las células se adhieren a los microportadores fácilmente en suspensión. El requisito de capacidad de suspensión limita los parámetros físicos de los microportadores. Por lo tanto, microportadores tienen comúnmente un diámetro medio en el rango de 50-2000 micras. En algunas aplicaciones microportadores de tipo sólido van desde aproximadamente 100 a aproximadamente 250 micras mientras que microportadores de tipo poroso varían desde aproximadamente 250 a aproximadamente 2500 micras. Estos intervalos de tamaño permiten la selección de microportadores, que son suficientemente grandes para acomodar muchas células dependientes de anclaje, suficientemente pequeñas como para formar suspensiones con propiedades adecuadas para su uso en reactores agitados.

40 Entre los factores considerados en el uso de microportadores y similares son: la eficiencia de unión, la inmunogenicidad, la biocompatibilidad, capacidad de biodegradarse, tiempo para alcanzar la confluencia, los parámetros de crecimiento de células unidas incluyendo densidad alcanzable máxima por unidad de superficie, las técnicas de separación donde se requiera, y la eficiencia de la separación, la escalabilidad de las condiciones de cultivo, así como la homogeneidad del cultivo en condiciones ampliadas, la capacidad para ampliar con éxito los procedimientos de separación, y si los microportadores serán utilizados para la implantación. Estas consideraciones pueden ser influenciadas por las propiedades superficiales del microportador, así como por la porosidad, diámetro, densidad, y propiedades de manipulación del microportador.

45 Por ejemplo, la densidad de los microportadores es una consideración. La densidad excesiva puede causar que los portadores de microorganismos se asienten fuera de la suspensión, o tiendan a permanecer completamente hacia la parte inferior del recipiente de cultivo, y por lo tanto pueden resultar en una mala mezcla mayor de las células, medio de cultivo y fases gaseosas en el reactor. Por otra parte, una densidad que es demasiado baja puede dar lugar a flotado excesivo del microportador. Una densidad de 1,2 a 1,15 g/cm³ es típica de muchos microportadores.

50 El pequeño diámetro de microportadores y el volumen de las partículas que se pueden añadir a un reactor permite que los microportadores contribuyen área superficial sustancial en gran exceso a la encontrada en botellas de rodillos u otros métodos de cultivo de células dependientes de anclaje, por ejemplo en placas. Microportadores porosos proporcionan aún mayor área de superficie por unidad de volumen o peso. Estos microportadores porosos poseen grandes cavidades que están disponibles para el crecimiento de células dependientes de anclaje. Estas cavidades incrementan el área de superficie en gran medida, y pueden proteger las células de los efectos mecánicos perjudiciales, tales como tensión de cizallamiento, por ejemplo a partir de la mezcla o de burbujeo de gas.

60 La superficie microportadora puede ser de textura para mejorar la fijación y proliferación celular. La textura de la superficie microportadora puede conseguirse mediante técnicas incluyendo, pero no limitado a, moldeo, fundición, extracción y grabado. La resolución de las características de la superficie texturizada puede estar en la nanoescala. La superficie con textura se puede utilizar para inducir una alineación celular específica en la superficie microportadora. La superficie de los poros dentro de los microportadores porosos también puede ser texturada para mejorar la fijación y proliferación celular. La textura de superficie de poros puede lograrse mediante técnicas tales

como, pero no limitado a piezas de fundición, moldeo, extracción y grabado.

La superficie microportadora puede estar recubierta con plasma para impartir una carga específica a las superficies microportadoras. Estas cargas pueden mejorar la fijación y proliferación celular.

En otras realizaciones, los microportadores están compuestos por, o revestidos con, polímeros termosensibles tales como poli-N-isopropilacrilamida, o tienen propiedades electromecánicas.

Tipos tanto porosos como sólidos de portadores de micropartículas están disponibles comercialmente de proveedores. Ejemplos de microportadores sólidos comercialmente disponibles incluyen Cytodex 1® y Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ), que son ambos microportadores basados en dextrano de GE Healthcare Life Sciences. Microportadores porosos en el mercado incluyen productos de Cytoline así como Cytopore también de GE Healthcare Life Sciences. Biosilon (NUNC) y Cultispher (Percell Biolytica) también están disponibles comercialmente.

Microportadores también pueden contener un agente bioactivo. El microportador también puede contener un agente bioactivo que puede regular el crecimiento o la función de las células o el medio de tejido estos factores pueden incluir, pero no se limitan a factores de crecimiento de fibroblastos, eritropoyetina, factores de crecimiento de células endoteliales vasculares, factores de crecimiento derivados de plaquetas, proteínas morfogénicas óseas, transformando los factores de crecimiento, factores de necrosis tumoral, factores de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento similares a la insulina. Factores completos, miméticos o fragmentos activos de los mismos pueden ser utilizados.

Los microportadores se pueden inocular con un segundo tipo de células y co-cultivadas con las células madre pluripotentes. En una realización, los dos (o más) tipos de células pueden ser adherentes a un microportador individual en proporciones iguales o no iguales. Los dos o más tipos de células pueden ser inoculados en el microportador en el mismo punto de tiempo o pueden inocularse en diferentes momentos. Los microportadores pueden ser tratados de tal manera que se adhieran preferentemente tipos de células específicas en regiones específicas del microportador. En una realización adicional, el microportador con tipos de células individuales o múltiples adherentes puede ser co-cultivadas en un recipiente de cultivo con un segundo tipo de células cultivadas en suspensión.

Segundos tipos de células pueden incluir, por ejemplo, las células epiteliales (por ejemplo, células de la mucosa oral, tracto gastrointestinal, el epitelio nasal, el epitelio de las vías respiratorias, el epitelio vaginal, el epitelio corneal), células de médula ósea, adipocitos, células madre, queratinocitos, melanocitos, fibroblastos dérmicos, queratinocitos, células endoteliales vasculares (por ejemplo, células endoteliales aórticas, células endoteliales de arteria coronaria, células endoteliales de arteria pulmonar, células endoteliales de arteria ilíaca, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de la arteria umbilical, células endoteliales de la vena umbilical, y células endoteliales nerviosas progenitoras (por ejemplo, CD34 +, CD34 +/CD117 + células)), mioblastos, miocitos, hepatocitos, células musculares lisas, células musculares estriadas, células estromales, y otras células de tejidos blandos o células progenitoras, condrocitos, osteoblastos, células de los islotes, incluyendo pero no limitado a las neuronas, astrocitos, células de Schwann, células gliales entéricas, oligodendrocitos.

Células madre pluripotentes

Caracterización de células madre pluripotentes

Las células madre pluripotentes pueden expresar uno o más de los antígenos embrionarios específicos de la etapa (SSEA) 3 y 4, y marcadores detectables usando anticuerpos designados con Tra-1-60 y Tra-1-81 (Thomson et al, Science 282: 1145, 1998). Diferenciación de células madre pluripotentes en los resultados in vitro en la pérdida de expresión SSEA-4, Tra- 1-60 y Tra-1-81 (si está presente) y aumento de la expresión de SSEA-1. Las células madre pluripotentes no diferenciadas tienen típicamente actividad de la fosfatasa alcalina, que se puede detectar mediante la fijación de las células con paraformaldehído al 4% y luego en desarrollo con Vector Red como sustrato, como se describe por el fabricante (Vector Laboratories, Burlingame Calif.). Células madre pluripotentes no diferenciadas también típicamente expresan OCT4 y de TERT, según lo detectado mediante RT-PCR.

Otro fenotipo deseable de células madre pluripotentes propagadas es un potencial de diferenciarse en células de las tres capas germinales: tejidos de endodermo, mesodermo y ectodermo. Pluripotencia de las células madre se puede confirmar, por ejemplo, mediante la inyección de células en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID), fijando los teratomas que se forman usando 4% de paraformaldehído, y examinándolos histológicamente para la evidencia de tipos de células de las tres capas germinales. Alternativamente, la pluripotencia se puede determinar mediante la creación de cuerpos embrioides y la evaluación de los cuerpos embrioides para la presencia de marcadores asociados con las tres capas germinales.

Las líneas de células madre pluripotentes pueden ser reproducidas en cariotipo utilizando una técnica de bandejo G estándar y se compararon con cariotipos publicados de las especies de primates correspondientes. Es deseable obtener células que tienen un "cariotipo normal", que significa que las células son euploides, en las que

todos los cromosomas humanos están presentes y no notablemente alterados.

Fuentes de células madre pluripotentes

5 Se contempla en el presente documento el uso de las composiciones de la presente divulgación durante el establecimiento inicial o estabilización de tales células, en cuyo caso las células de origen serían células pluripotentes primarias tomadas directamente de los tejidos de origen. También son adecuadas las células tomadas de una población de células madre pluripotentes ya cultivadas en ausencia de células alimentadoras. También son adecuadas las células madre pluripotentes derivadas de células no pluripotentes, tales como, por ejemplo, células somáticas adultas.

Fijación de células madre pluripotentes a los microportadores adecuados para uso en la presente invención

15 Las células madre pluripotentes pueden ser cultivadas en un sustrato plano mediante cualquier método en la técnica, antes de unirse a microportadores. Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden cultivar en sustratos planos, tratados con una proteína de matriz extracelular (por ejemplo MATRIGEL). Alternativamente, las células madre pluripotentes se pueden cultivar en sustratos planos sembrados con una capa de células de alimentación.

20 En una realización, las células madre pluripotentes son las células madre embrionarias. En una realización alternativa, las células madre embrionarias son humanas.

25 En un aspecto de la presente invención, las células madre pluripotentes se liberan a partir de un sustrato plano mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes con una proteasa que libera las células del sustrato planar. La proteasa puede ser, por ejemplo, colagenasa, TrypLE™ Express, Accutase™, tripsina, y similares.

30 En una realización, las células madre pluripotentes son liberadas desde el sustrato de microportador mediante el tratamiento de las células con Accutase™ durante aproximadamente cinco a aproximadamente diez minutos.

35 En una realización, las células madre pluripotentes son liberadas desde el sustrato de microportador mediante el tratamiento de las células con 0,05% de tripsina/EDTA durante aproximadamente diez a aproximadamente veinte minutos.

40 En una realización, las células madre pluripotentes son liberadas desde el sustrato de microportador mediante el tratamiento de las células con TrypLE™ Express para aproximadamente cinco a aproximadamente veinte minutos.

45 En una realización, las células madre pluripotentes son liberadas desde el sustrato de microportador mediante el tratamiento de las células con 10 mg/ml de colagenasa durante aproximadamente cinco a aproximadamente diez minutos.

50 Se añaden las células pluripotentes liberadas al medio que contiene microportadores a una densidad específica. En una realización, las células madre pluripotentes se sembraron a aproximadamente 4.000 a aproximadamente 30.000 células por cm² de microportadores.

55 Se añaden las células pluripotentes liberadas al medio que contiene microportadores. En una realización, la unión de las células madre pluripotentes se ve reforzada por el tratamiento de las células madre pluripotentes con un inhibidor de la Rho quinasa. El inhibidor de Rho quinasa puede ser Y27632 (Sigma-Aldrich, MO). Alternativamente, el inhibidor de Rho quinasa es dihidrocloruro glicilo-H 1,152.

60 En una realización, las células madre pluripotentes son tratadas con Y27632 a una concentración de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 10 μM. En una realización, las células madre pluripotentes se tratan con Y27632 en una concentración de aproximadamente 10 μM.

65 En una realización, las células madre pluripotentes son tratadas con dihidrocloruro glicilo-H 1152 a una concentración de aproximadamente 0,25 μM a aproximadamente 5 μM. en una realización, las células madre pluripotentes se tratan con dihidrocloruro de glicilo-H 1152 en una concentración de aproximadamente 2,5 μM.

El medio que contiene los microportadores puede ser agitado. La agitación, como se usa en la presente invención puede ser el movimiento del medio de cultivo. Tal agitación puede lograrse manualmente, o, alternativamente, mediante el uso de aparato, tal como, por ejemplo, una plataforma oscilante, un matraz de agitación, y similares. En una realización, el medio que contiene los microportadores se agita por el uso de movimiento manual. El plato que contiene los microportadores y las células se mueven hacia atrás y adelante por menos de 30 segundos.

El medio que contiene los microportadores puede ser agitado. En una realización, el medio que contiene los microportadores se agita mediante el uso de un matraz de agitación. El matraz de agitación (Corning, Lowell, MA) se coloca sobre una placa de agitación a 30-70 RPM dependiendo del tipo de grano.

5 En una realización alternativa, el medio que contiene los microportadores es agitado por el uso de una plataforma oscilante (Vari-mix, Barnstead, Dubuque, Iowa). La velocidad de plataforma oscilante es de aproximadamente una rotación en 2 segundos.

Diferenciación de células madre pluripotentes en microportadores

10 En una realización, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo sobre microportadores. Alternativamente, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en microportadores. Alternativamente, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático en microportadores.

15 En una realización alternativa, las células madre pluripotentes se pueden propagar en microportadores, a continuación, diferenciadas en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo sobre superficies planas. Alternativamente, las células madre pluripotentes se pueden propagar en microportadores, a continuación, se diferenciaron en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en superficies planas. Alternativamente, las células madre pluripotentes se pueden propagar en microportadores, a continuación, se diferenciaron en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático en superficies planas.

20 Las células madre pluripotentes tratadas de acuerdo con los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en una variedad de otros tipos de células por cualquier método adecuado en la técnica. Por ejemplo, las células madre pluripotentes tratadas de acuerdo con los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en células neurales, células cardíacas, hepatocitos, y similares.

25 Por ejemplo, las células madre pluripotentes tratadas de acuerdo con los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en progenitores neurales y cardiomiocitos de acuerdo con los métodos descritos en WO2007030870.

30 En otro ejemplo, las células madre pluripotentes tratadas de acuerdo con los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en hepatocitos de acuerdo con los métodos descritos en la patente de EE.UU 6.458.589.

Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo

35 Las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodermo definitivo por cualquier método en la técnica.

40 Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los procedimientos revelados en D'Amour et al, Nature Biotechnology 23, 1534-1541 (2005).

45 Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos descritos en Shinozaki et al, Desarrollo 131, 1651-1662 (2004).

50 Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos descritos en McLean et al, Stem Cells 25, 29 - 38 (2007).

55 Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los procedimientos revelados en D'Amour et al, Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006).

60 Los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se seleccionan del grupo que consiste en SOX17, GATA4, HNF-3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox de tipo mezcla, FGF4, CD48, eomesodermina (Eomes), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99, y OTX2. Adecuada para uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una célula precursora de línea primitiva. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una célula de mesendodermo. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una

célula de endodermo definitivo.

En otro ejemplo, las células madre pluripotentes tratadas según los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en medio que contiene activina A en ausencia de suero, a continuación, cultivo de las células con activina A y suero, y luego el cultivo de las células con activina A y suero de una concentración diferente. Un ejemplo de este método se describe en Nature Biotechnology 23, 1534-1541 (2005).

En otro ejemplo, las células madre pluripotentes tratadas según los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en medio que contiene activina A en ausencia de suero, a continuación, el cultivo de las células con activina A con suero de otra concentración. Un ejemplo de este método se describe en D'Amour et al, Nature Biotechnology, 2005.

En otro ejemplo, las células madre pluripotentes tratadas según los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el cultivo de las células pluripotentes en medio que contiene activina A y un ligando Wnt en ausencia de suero, retirando el ligando Wnt y el cultivo de las células con activina A con suero madre. Un ejemplo de este método se describe en Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006).

En otro ejemplo, las células madre pluripotentes tratadas según los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/736.908, asignada a LifeScan, Inc.

En otro ejemplo, las células madre pluripotentes tratadas según los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/779.311, asignada a LifeScan, Inc.

Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático

Las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático por cualquier método en la técnica.

Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático de acuerdo con los métodos descritos en D'Amour et al, Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006).

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con un factor de crecimiento de fibroblastos y el inhibidor de vía de señalización hedgehog KAAD-ciclopamina, retirando el medio que contiene el factor de crecimiento fibroblástico y KAAD-ciclopamina y, posteriormente, cultivando las células en medio que contiene ácido retinoico, un factor de crecimiento de fibroblastos y KAAD-ciclopamina. Un ejemplo de este método se describe en Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006).

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con un factor de crecimiento de fibroblastos de ácido retinoico durante un período de tiempo, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° de Ser. 11/736.908, asignada a LifeScan, Inc.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con ácido retinoico (Sigma-Aldrich, MO) y la exendina 4, retirando el medio que contiene DAPT (Sigma-Aldrich, MO) y la exendina 4 y cultivando posteriormente las células en medio que contiene exendina 1, IGF-1 y HGF. Un ejemplo de este método se describe en Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006).

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el cultivo de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene exendina 4, retirando el medio que contiene exendina 4 y, posteriormente, cultivando las células en medio que contiene exendina

1, IGF-1 y HGF. Un ejemplo de este método se describe en D' Amour et al, Nature Biotechnology, 2006.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el cultivo de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene DAPT (Sigma-Aldrich, MO) y la exendina 4. Un ejemplo de este método se describe en D' Amour et al, Nature Biotechnology, 2006.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el cultivo de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene exendina 4. Se describe un ejemplo de este método en D' Amour et al, Nature Biotechnology, 2006.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenidas de acuerdo con los métodos de la presente invención son diferenciadas además en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la vía de señalización de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° de Ser. 11/736.908, asignada a LifeScan, Inc.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la vía de señalización de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° de Ser. 11/779.311, asignada a LifeScan, Inc.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la vía de señalización de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° de Ser. 11/736.908, asignada a LifeScan, Inc.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la vía de señalización de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° de Ser. 11/779.311, asignada a LifeScan, Inc.

Los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo que consiste en Ngn3, NeuroD, ISL1, PDX1, Nkx6.1, PAX4, Ngn3, y PTF-1 alfa. En una realización, una célula endocrina pancreática es capaz de expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático. Adecuada para uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endocrino pancreático es una célula endocrina pancreática. La célula endocrina pancreática puede ser una célula que expresa hormona pancreática. Alternativamente, la célula endocrina pancreática puede ser una célula que secreta hormonas pancreáticas.

En un aspecto de la presente invención, la célula endocrina pancreática es una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células β . Una célula que expresa los marcadores característicos del linaje de células β expresa PDX1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: Ngn3, NKX2.2, Nkx6.1, NeuroD, ISL1, HNF-3 beta, MAFA, PAX4, o PAX6. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células β es una célula β .

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero no está limitada por los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo de Referencia 1: Unión y proliferación de células madre embrionarias humanas en microportadores

Para determinar si células madre humanas embrionarias pueden unirse y proliferar en microportadores, las células H9 pasaje 52 fueron liberadas de placas recubiertas de MATRIGEL™ (BD Biosciences, CA) con TrypLE™ Express. Se incubaron entonces con microportadores y MEF-CM. Las suspensiones de ProNectinF (PN), plástico

(P), PlasticPlus (PP), HILLEX®II (H), colágeno (Col) y microportadores FACT III (SoloHill, MI) se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 2 días a 37°C, la **Tabla 1** describe la unión y el crecimiento de las células H9 en los microportadores basados en imágenes diarias. Pocas células se unieron y/o se proliferaron en la mayoría de los microportadores ensayados. Las células H9 no se unieron y proliferaron en microportadores HILLEX®II (Solohill, MI), pero las imágenes mostraron un menor número de agregados de células-perlas después de 2 días en cultivo estático (**Figura 1B**).

Para mejorar la fijación y proliferación de células madre embrionarias humanas en microportadores, un inhibidor de molécula pequeña de bobina en espiral asociada a Rho, formando quinasa de proteína serina/treonina, se añadió inhibidor de Rho quinasa a los medios. Específicamente, se utilizó Y27632, Y, (Sigma-Aldrich, MO). MEF-CM más 10 µM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO) se cambió diariamente. En presencia de 10 µM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO) las células H9 se unieron y formaron agregados con todos los microportadores ensayados (**Tabla 2**). Por análisis de las imágenes, las células madre embrionarias humanas cultivadas en microportadores HILLEX®II (Solohill, MI) parecieron fijar y proliferar mejor las células madre embrionarias humanas en otros microportadores ensayados. Además, las células H9 se unieron mejor a HILLEX®II (Solohill, MI) en presencia del inhibidor de la Rho quinasa (**Figura 1A** en comparación con **1B**).

La expansión de células madre embrionarias humanas para una aplicación de terapia celular es necesaria para satisfacer la demanda del producto. Actualmente las mejores técnicas para la expansión incluyen matraces rotativos y biorreactores. Ambas técnicas requieren movimiento físico de los microportadores en suspensión. Para determinar el efecto de movimiento sobre el crecimiento de las células madre embrionarias humanas en microportadores, 6 o 12 placas de pocillos se colocaron en una plataforma oscilante en un incubador a 37°C. Después de crecimiento durante 3 días, los agregados de células comenzaron a liberar a partir de algunos de los microportadores. **Figura 2 A, B, D** ilustra que los agregados de células se disociaron de microportadores de Plastic Plus, plástico, o pronectina. En contraste, las células permanecieron unidas a los microportadores de HILLEX®II (Solohill, MI) y se proliferaron **Figura 2C. Ejemplo 4** describe el método de disociación utilizado antes de recuento celular en un Guava PCA-96 con ViaCount Flex (Guava Technologies, Hayward, CA). La medición de la tasa de crecimiento de las células en microportadores revela un baño en el número de células en el día 3 en comparación con el número de partida en la siembra. Esto es probablemente debido a la mala unión inicial de las células a los microportadores seguido de una expansión después hasta que el experimento se terminó en el día 5. Las células H9 en microportadores HILLEX®II (Solohill, MI) han comparado la tasa de proliferación más alta a los otros tipos de talón, probablemente debido a una mejor unión de las células a los microportadores de HILLEX®II (Solohill, MI) (**Figuras 2, 3**). Esto demuestra que los microportadores de HILLEX®II (Solohill, MI) pueden apoyar el crecimiento de células H9 en suspensión. Este fue validado aún más después de pases repetidos, véase **Ejemplo 5**.

La línea de células de embriones humanos H1 también se ensayó para el crecimiento en microportadores para la expansión a gran escala. Debido a que un inhibidor de Rho quinasa, Y27632 (Sigma-Aldrich, MO), era necesario para la unión de la línea celular H9, también se suponía que era necesario para las células H1. Microportadores de Cytodex 1®, Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, Nueva Jersey), HILLEX®II, plástico, ProNectinF, Plastic Plus (SoloHill Ann Arbor, MI) se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células madre embrionarias humanas H1 en el paso 47 se sembraron a aproximadamente 13.333 células/cm² de microportadores en MEF-CM más 10 µM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO). Las células y los microportadores se colocaron en una placa tratada con cultivo de no tejido de 12 pocillos en 15 cm² por 12 pocillos en una plataforma oscilante a 37°C para permitir el movimiento de los microportadores y medio. Después de 3, 5 y 7 días, un pocillo fue visualizado, recogido, y contado. La capacidad de las células para unirse dependía del tipo de cordón. Se observaron resultados similares con la línea H1 como con la línea H9. Específicamente, las células se sembraron sobre microportadores de plástico, Plastic Plus o ProNectinF no se unieron ni se proliferaron bien (**Figura 4**). Las células sembradas sobre microportadores de HILLEX®II (Solohill, MI), Cytodex 1®, o Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) se unieron y se proliferaron bien (**Figura 5**). Se separaron las células de acuerdo con el **Ejemplo 4** y se contaron para el rendimiento. Las células cultivadas en microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) exhibieron el número de células más alto después de 7 días en cultivo (**Figura 6**).

Ejemplo de Referencia 2: Concentraciones óptimas de Y27632 y otros inhibidores de Rho quinasa para la unión celular y el crecimiento

Para determinar la concentración de inhibidor Rho quinasa que mejor soporta la unión y el crecimiento de las células madre embrionarias humanas en microportadores, se realizaron los siguientes experimentos.

Una parte alícuota inicial de 13.333 células/cm² células H9 en el paso 44 se sembraron en 15 cm² de microportadores en un solo pocillo de una placa tratada con cultivo no de tejido de 12 pocillos. Las células se colocaron a 37°C durante al menos 60 minutos antes de colocarse sobre una plataforma oscilante a 37°C. Antes de añadir las células, los microportadores de HILLEX®II (Solohill, MI) y Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) se prepararon como se indica por el fabricante. Las células se cultivaron en MEF-CM además de una gama de concentraciones de inhibidor de Rho quinasa, Y27632 en 10, 5, 2,5 ó 1 µM, o (S)-(+)-4-glicilo-2-metilo-1-[(4-metilo-5-isoquinolinilo)sulfonilo]dihidrocloruro de hexahidro-1H-1,4-diazepina (glicilo-H 1152 dihidrocloruro (H), Tocris, MO) a 5, 2,5, 1 o 0,5 µM). El medio se cambió a diario y un pocillo de células se contó a los 4 y 7 días después de la

siembra para el rendimiento y la viabilidad (**Figura 7, A y B**). En general, 10 o 5 μM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO) mostraron la mejor proliferación celular (día 7), mientras que 2,5 y 1,0 μM parecía tener la mejor fijación (día 4). Las concentraciones de 1 y 0,5 μM Glicilo-H 1152 dihidrocloruro (Tocris, MO) mostraron la mejor proliferación celular (día 7), mientras que 5 μM parecía tener la mejor fijación (día 4).

A continuación, un ajuste de la dosis del inhibidor de Rho quinasa se intentó ya que se ha caracterizado como una apoptosis de promoción. Las células H1 en el paso 48 se disociaron de placas recubiertas con MATRIGEL™ (BD Biosciences, CA) con TrypLE™ Express. Después las células se sembraron en 15 cm^2 de microportadores en un único pocillo de una placa tratada con cultivo de no tejido de 12 pocillos. Microportadores de HILLEX®II (Solohill, MI), Cytodex 1® o Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) se ensayaron con cantidades decrecientes de inhibidor de Rho quinasa: 10 μM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO) fue utilizado en el día uno, seguido de 0,5 μM el día dos (Y10/5 μM); 2,5 μM se utilizó glicilo-H 1152 dihidrocloruro (Tocris, MO) en el día uno, seguido de 0,5 μM el día dos (H2.5/0,5 μM); 1 μM se utilizó glicilo-H 1152 dihidrocloruro (Tocris, MO) en el día uno, seguido de 0,5 μM glicilo-H 1152 dihidrocloruro (Tocris, MO) el día dos (H1/0,5 μM); o la adición continua de 0,25 μM se aplicó glicilo-H 1152 dihidrocloruro (Tocris, MO) a diario en MEF-CM (H0,25 μM). Células H1 y microportadores se agitaron cada 45 minutos durante 3 horas a 37°C antes de colocarse en una plataforma oscilante a 37°C. Las células se contaron después de 3, 5 y 7 días en la plataforma oscilante a 37°C (**Figura 8**). En general, la mejor concentración de glicilo-H 1152 dihidrocloruro (Tocris, MO) fue 1-2,5 μM en un día y 0,5 μM en el día 2 seguido de la retirada del compuesto. Las células exhiben tasas de crecimiento similares a estas concentraciones de glicilo-H 1152 dihidrocloruro (Tocris, MO) en comparación con 10 μM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO) para todos los microportadores ensayados. El mantenimiento de las células en 0,25 μM glicilo-H 1152 dihidrocloruro (Tocris, MO) dio lugar a poco rendimiento celular. Mediante el uso de una cantidad mínima de inhibidor de la Rho-quinasa también ayuda a reducir los costes para el proceso y puede ser beneficioso para la proliferación celular. Estos datos también muestran que las células madre embrionarias humanas no requieren inhibidor de la Rho quinasa con el fin de permanecer unidas a microportadores y para proliferar.

Ejemplo de Referencia 3: Efecto de la densidad celular en unión y el crecimiento de microportadores

La mejora de la densidad de siembra es un método para reducir el número total de células necesarias. Para determinar la densidad de siembra apropiada, se contó el número de microportadores por campo de objetivo de 4x. Las células H1 se sembraron a 0,4x10⁴ células/cm² (bajas), 1,2 x10⁴ células/cm² (medias), o 3x10⁴ células/cm² (altas) densidades en una placa de 10 cm con microportadores de Cytodex 3 (GE Healthcare Life Sciences, NJ) en MEF-CM más 10 μM de Y27632 (Sigma-Aldrich, MO). La placa después se agita cada 45 minutos durante 6 horas a 37°C. Las células y microportadores se transfirieron a un matraz de agitación (descrito en el **Ejemplo 5**) a 37°C a 30 rpm en 50 ml MEF-CM más 10 μM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO). Después de 24 horas, 25 ml de MEF-CM con 5 μM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO) se añadió. Después de 24 horas se aumentó la velocidad de rotación a 40 rpm. En el día 3 y 5 de cultivo, 50 ml de 75 ml se retiró y se reemplazó con MEF-CM. Las imágenes fueron tomadas de una alícuota a partir de los matraces de agitación a las 6 horas, 3 días, 5 días y 7 días. El porcentaje de microportadores con células unidas se afirma en la esquina inferior derecha en la **Figura 9** las imágenes. A los 3 días después de la siembra, el número de microportadores recubiertos con células corresponde a la densidad de siembra original, pero en los días 5 y 7 el número de microportadores recubiertos con células no aumentó para las células inferiores de densidad de sembrado. Esto sugiere que 0,4x10⁴ células/cm² no es un número suficiente de células para permitir la incorporación de microportadores en los agregados. En 3x10⁴ células/cm² el número de microportadores con células unidas es similar a 1,2x10⁴ células/cm² sembrados a días 5 y 7 (**Figura 9**). Al mirar el número de células, está claro que más células están asociadas a microportadores de la siembra de células de alta densidad (**Figura 10**). El análisis del cambio en comparación con el número de inicio de células de siembra revela un mayor número de células unidas a los 3 y 5 días en los cultivos sembrados de alta densidad (**Figura 11**). Por día 7, los cultivos de control y de alta densidad sin semillas tienen factor de cambio similar en el número de células a partir de su densidad de siembra de partida. A partir de estos datos, se concluye que 1,2x10⁴ células/cm² es el número de células mínimo para la fijación eficiente y el crecimiento de las células H1 en microportadores. El pasar a densidades de siembra más altas puede ayudar a disminuir el número de días requeridos para la expansión celular.

Ejemplo de Referencia 4: Disociación de células de los microportadores

Con el fin de determinar las tasas de crecimiento era necesario disociar las células de los microportadores. La eliminación del inhibidor de Rho quinasa Y27632 (Sigma-Aldrich, MO) no causó las células H1 a disociar de los microportadores (**Ejemplo 2, Figura 12**). Células H9 en microportadores de HILLEX®II (Solohill, MI) se obtuvieron imágenes a 10x y 20x antes de la disociación de las células de los microportadores (**Figura 13 A, B** respectivamente). El tratamiento enzimático de las células H9 en microportadores de HILLEX®II (Solohill, MI) permitidos para el desprendimiento de células viables (**Figura 13 C, D y 14**). Las células H9 se cultivaron durante 6 días en una placa de 6 pocillos con microportadores de HILLEX®II (Solohill, MI) en una plataforma oscilante a 37°C. Las células unidas a microportadores se colocaron en un tubo cónico de 15 ml y se aspiró el medio después de permitir que los microportadores se asienten. Los microportadores asentados se lavaron tres veces con 4 ml de PBS (sin iones de magnesio y calcio) permitiendo que los microportadores se asienten por sedimentación por gravedad. El PBS se aspiró y se añadió 1 ml de PBS. Los microportadores con células se transfirieron a un solo pocillo de una placa tratada de cultivo de no tejido de 12 pocillos. La placa se dejó en reposo en un ángulo para permitir que los

microportadores se asienten. El PBS se aspiró y 1 ml TrypLE™ Express (Invitrogen, CA) o 0,05% de Tripsina/EDTA se añadió al pocillo. La placa se colocó a 37°C en la plataforma de agitación durante 10 o 20 minutos. La placa se retiró y 3 ml DMEM/F 12 o MEF-CM se añadió al pocillo. El medio se pipeteó vigorosamente, la liberación de las células (**Figura 13 C, D**). La observación de los microportadores bajo un microscopio determinó el desprendimiento de las células de los microportadores. Las células se centrifugaron a 200 xg durante 5 minutos. El medio se aspiró y el sedimento se resuspendió en 1 ml de DMEM/F12 o medio MEF-CM. Después las células se contaron en Guava PCA-96 (Guava Technologies, Hayward, CA) con el tinte ViaCount. Específicamente, un 200 µl de volumen de células en la dilución apropiada de medio, se incubó con 2 µl de ViaCount durante 10 minutos. El número y la viabilidad celular se determinó (**Figura 14**). Tanto TrypLE™ Express como Tripsina/EDTA disociaron las células con eficacia de microportadores.

Ya que TrypLE™ Express liberó las células de los microportadores y está disponible como un producto de GMP, se ensayó frente a otros agentes de disociación posibles, específicamente colagenasa y Accutase™ (Sigma-Aldrich, MO). Células H1 p48 se hicieron crecer en un matraz de agitación (**Ejemplo 5**) durante 10 días. Los microportadores se recogieron entonces y se transfirieron a un tubo cónico de 50 ml. Las células se lavaron en PBS como anteriormente y se transfirieron a una placa de 12 pocillos. PBS se aspiró y se añadió 1 ml de TrypLE™ Express, Accutase™ o colagenasa (10 mg/ml) al pocillo y se colocó en una plataforma oscilante a 37°C durante 5 o 10 minutos. Las células/microportadores se resuspendieron vigorosamente en DMEM/F12, y luego se pasaron las células disociadas y microportadores a través de un colador celular de 40 µm sobre un tubo cónico de 50 ml. El pocillo se lavó con un medio adicional de 2 ml, también añadido al colador antes de centrifugarse a 200 xg durante 5 minutos. Las células se resuspendieron después en 1 ml de DMEM/F12 y se diluyeron para el recuento celular, como anteriormente. La viabilidad celular fue similar con todas las enzimas ensayadas. Accutase™ y TrypLE™ Express liberaron el número similar de células a 5 y 10 incubaciones (**Figura 15**). Esto ilustra la idoneidad de Accutase™ y TrypLE™ Express como reactivos de disociación celular para las células madre embrionarias humanas en microportadores.

Ejemplo de Referencia 5: La propagación de células madre indiferenciadas pluripotentes en microportadores

Con el fin de expandir las células en microportadores, las células deben ser capaces de separar o disociar enzimáticamente a partir de los microportadores y vuelva a conectar a nuevos microportadores. Los métodos típicos de propagación celular en microportadores se basan en la propiedad de las células para separar y volver a conectar. El siguiente experimento mostró que este no era una característica de las células madre embrionarias humanas. Específicamente, se sembraron células H9 p43 en microportadores HILLEX®II (Solohill, MI) y se incubaron en un matraz de agitación de 125 ml (véase abajo). El fenol rojo estaba presente en el medio y se recogió por los microportadores de HILLEX®II (Solohill, MI). Después de 8 días de crecimiento, una parte alícuota de 10 ml de las células sobre microportadores se colocó en un nuevo matraz de centrifugación que contiene rojo fenol libre de MEF-CM, 440 mg de microportadores de HILLEX®II, y 5 µM de Y27632 (Sigma-Aldrich, MO). Después de 5 días de incubación a 37°C con rotación de 30 rpm, los microportadores se retiraron y las imágenes fueron adquiridas (**Figura 16**). Los microportadores oscuros mostrados son los microportadores cubiertos de células H9 cultivadas en medio que contiene rojo de fenol. Los microportadores de luz son los microportadores recién añadidos. Se esperaba que las células H9 se desprenderían y volverían a conectar a nuevos microportadores, sin embargo, en lugar de las células agregadas con los nuevos microportadores formados. Ningún microportador ligero tenía células unidas que no son también en agregados con los microportadores oscuros, lo que sugiere que las células no fueron capaces de separar y volver a conectar a microportadores. Con el fin de propagar las células cultivadas en microportadores, las células deben disociarse enzimáticamente de los microportadores (véase **Ejemplo 4**).

Puesto que se ha establecido cómo las células madre embrionarias humanas pueden ser propagadas en microportadores, se ha de determinar cómo células madre humanas embrionarias se propagan en matraces de agitación a mayor escala. Matraces giratorios permiten la expansión de células en sistemas de alta densidad. Esto conserva espacio y se considera el primer paso para la expansión de las células en biorreactores. Para probar la capacidad de las células madre embrionarias humanas para proliferar en matraces de agitación, Células H9 paso 43 fueron sembradas en matraces de agitación de 125 ml. Las células se unen inicialmente a los microportadores en una placa de 10 cm antes de transferirse al matraz giratorio. Específicamente, las células H9 fueron liberadas de los dos platos de seis pocillos por cinco minutos de incubación con TrypLE™ Express en 37°C. Antes de pases con TrypLE™ Express las células se habían pasajeado con colagenasa (1 mg/ml) y se sembraron en 1:30 de placas recubiertas de Factor de Crecimiento Reducido MATRIGEL™ (BD Biosciences, CA). Las células se resuspendieron en DMEM/F 12 y se contaron en un instrumento Guava con ViaCount. Después de la centrifugación, 3x10⁶ células fueron sembradas en una placa de 10 cm que contiene MEF-CM más 10 µM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO) y 250 cm² de microportadores de HILLEX®II (Solohill, MI), preparados de acuerdo con el fabricante de instrucciones. El plato se colocó a 37°C y suavemente gira y se agita una vez cada 45 minutos durante 4,5 horas. A continuación, las células, los microportadores y el medio se transfirieron a un matraz giratorio 125ml. Después, el matraz giratorio se llenó hasta 50 ml con MEF-CM más 10 µM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO) y se coloca en una placa de agitación a 37°C a 40 rpm. Al día siguiente se cambió el medio y se llenó a 75 ml con MEF-CM más 5 µM de Y27632 (Sigma-Aldrich, MO). La velocidad de agitación se aumentó a 70 rpm. El medio se cambió cada dos días sin la adición de compuesto Y27632 (Sigma-Aldrich, MO). Las células se pasaron de acuerdo con los métodos descritos en el **Ejemplo 4**, y 3x10⁶ se volvieron a sembrar células sobre 250 cm² de nuevos microportadores. Los cultivos se

sometieron a pases cuando alcanzaron una confluencia del $1-2 \times 10^5$ células/cm². Esto se llevó a cabo durante 5 pasajes (**Figura 17**). Se evaluó cada expresión de marcador pluripotente de paso mostrando que 80-95% de las células expresaron los marcadores de pluripotencia CD9, SSEA4, SSEA3, Tra-1-60 y Tra-1-81 (**Figura 19A**). Un experimento similar se realizó con células H9 p43 en microportadores de Cytodex 3® ((GE Healthcare Life Sciences, NJ), **Figura 18, 19b**). En general, las células proliferaron bien tanto en microportadores HILLEX®II (Solohill, MI) como Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) y permanecieron pluripotentes. Análisis cariotípico se llevó a cabo después de 5 pasajes en matraces de agitación y mostró una trisomía anormal en cromosoma 12 en 1,5% de las células. Puesto que estas células se acercaban a paso 50 en la conclusión del experimento, observar tales anomalías puede ser una ocurrencia común. A partir de un número inferior de pases de células puede permitir que esta premisa se ensaye.

Se realizaron experimentos similares con la línea H1 en p49 y p48. Todos los parámetros se mantuvieron igual, excepto la velocidad de rotación y la densidad de siembra. La velocidad de rotación para el matraz de agitación fue de 30 rpm durante la noche en el día 1 y se aumentó a 40 rpm para todos los días adicionales. La densidad de siembra para microportadores de Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) fue de alrededor de 11.000 células/cm² mientras que la densidad de siembra para microportadores de Cytodex 1® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) fue de alrededor de 7000 células/cm². El número de células sembrado se mantuvo constante a 3×10^6 células por matraz de agitación. El peso de microportadores se mantuvo constante a 100 mg para Cytodex 1® y Cytodex 3®. Una ventaja de Cytodex 1® y Cytodex 3® sobre microportadores de HILLEX®II es su área de superficie más grande. **Las figuras 20 y 21** muestran la expansión de las células H1 en Cytodex 1® y Cytodex 3® respectivamente. Las células se mantuvieron pluripotentes durante los cinco pasajes (**Figura 22**). El análisis del cariotipo de las células H1 en microportadores de Cytodex 3® reveló la duplicación del cromosoma Y en el 10% de las células ensayadas. Estas células H1 se pasaron sobre microportadores en p48 y se analizaron 5 pasajes más tarde. Las células H1p55 cultivadas en MATRIGEL™ (BD Biosciences, CA) sobre una superficie plana tenían un cariotipo normal. El análisis de las tasas de duplicación de estas células entre el día 3 y el día de pases (días 5, 6 o 7) no mostró cambio global en los tiempos de duplicación (**Figura 23**). Células H1 cultivadas en microportadores de Cytodex 1® y H9 cultivadas en microportadores de HILLEX®II (Solohill, MI) mostraron los tiempos de duplicación más consistentes (**Tabla 3**).

Ejemplo de Referencia 6: proliferación de células madre embrionarias humanas en microportadores en medio definido

Para fabricar un producto terapéutico, es deseable eliminar cualquier componente de origen animal del medio de cultivo de células madre humanas embrionarias. Actualmente células madre embrionarias humanas se mantienen en MATRIGEL™ (BD Biosciences, CA) en medio condicionado utilizando fibroblastos embrionarios de ratón (MEF-CM). Tanto MATRIGEL™ (BD Biosciences, CA) como MEF-CM se derivan de células de ratón. Además, MEF-CM es un medio caro y consume mucho tiempo para generar. Para determinar si las células madre embrionarias humanas se pueden sostener en microportadores con medio definido, se sembraron células H9 en microportadores de Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) y HILLEX®II (Solohill, MI) en presencia de inhibidores de Rho quinasa, 10 μ M Y27632 (Sigma-Aldrich, MO) o 2,5 μ M glicilo-H 1152 dihidrocloruro (Tocris, MO) en Stem Pro (Invitrogen, CA), mTESR (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) o MEF-CM. Las células se colocaron en una placa de 12 pocillos en una plataforma oscilante a 37°C. Las células se contaron en los días 3, 5 y 7. Las células H9 p39 cultivadas en MEF-CM en ambos tipos de perlas mostraron características de expansión típicas (**Figura 24**). Células similares cultivadas en mTESR (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) se proliferaron bien en microportadores de Cytodex 3® en presencia de 10 μ M Y27632 (Sigma-Aldrich, MO), pero mostraron una tasa de crecimiento lento en microportadores de HILLEX®II. Las células de la línea H9 de células madre embrionarias humanas en el paso 64 (H9p64) que había sido aclimatadas al medio StemPro durante más de 20 pasajes se proliferaron bien tanto en HILLEX®II como Cytodex 3® en presencia de 10 μ M Y27632 (Sigma-Aldrich, MO). Sorprendentemente, estas células no se proliferaron bien en presencia de 2,5 μ M glicilo-H 1152 dihidrocloruro (Tocris, MO) en microportadores de Cytodex 3®. Por lo tanto el tipo de microportador, inhibidor de Rho quinasa, y medio juegan un papel en la determinación de la capacidad de las células madre embrionarias humanas para proliferarse.

Las células madre embrionarias humanas H1 en el paso 38 se sembraron en cualquiera de microportadores de Cytodex 3® o de HILLEX®II en la presencia de inhibidores de Rho quinasa, 10 μ M Y27632 (Sigma-Aldrich, MO) o 2,5 μ M glicilo-H 1,152 dihidrocloruro en mTESR (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) o MEF-CM en una placa de 12 pocillos. Las células se colocaron en una plataforma oscilante a 37°C. Las células se contaron en los días 3, 5 y 7. Las células cultivadas en MEF-CM en ambos tipos de microportadoras mostraron características de expansión típicas en presencia de Y27632 (Sigma-Aldrich, MO), pero exhibieron crecimiento pobre con glicilo-H 1152 dihidrocloruro (Tocris, MO) en Cytodex 3® (**Figura 25**). medio mTESR (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) permitió que las células H1 a proliferan en microportadores de HILLEX®II en la presencia de ambos inhibidores de Rho quinasa pero exhibieron baja tasa de crecimiento en microportadores de Cytodex 3®.

Dado que las células H1 p50 se proliferaron bien en mTESR (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) en microportadores de HILLEX®II, 3×10^6 células se sembraron sobre 250 cm² microportadores de HILLEX®11. Las células se incubaron a 37°C en un plato de 10 cm² durante 5 horas con agitación a mano cada 45 minutos. mTESR

(StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) más 10 μ M Y27632 (Sigma-Aldrich, MO) se cambian cada dos días. Esto se llevó a cabo en paralelo con las células cultivadas en MEF-CM (**Ejemplo 5**). A diferencia de las células cultivadas en MEF-CM, las células cultivadas en medio mTESR (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) comenzaron a desprenderse de los microportadores de HILLEX®II después de 7 días (**Figura 26A vs. 26B**). Esto indica que suplementos adicionales se han de añadir a mTESR (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) a fin de que las células madre embrionarias humanas permanezcan unidas y se proliferan en microportadores de HILLEX®II (Solohill, MI).

Ejemplo de Referencia 7: Diferenciación de células madre embrionarias humanas en microportadores

Dado que las células madre embrionarias humanas se pueden expandir en microportadores, el potencial de diferenciación de estas células debe ser determinado. Las células de la línea H9 de células madre embrionarias humanas en el paso 43 se pasaron cinco veces en microportadores de Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ). En el paso 5, se cultivaron las células durante 6 días en los microportadores antes de ser disociados de los microportadores con TrypLE™ Express (véase **Ejemplo 4**). Después las células se sembraron en placas de 1:30 MATRIGEL™: placas recubiertas DMEM/F12. Después las células se convirtieron en 80 a 90% de confluencia en las placas que fueron expuestas a agentes de diferenciación. La diferenciación de las células madre embrionarias humanas a endodermo definitivo se llevaron a cabo mediante el tratamiento de las células durante 2 días con 2% de fracción albúmina bovina V de ácido graso libre (FAF BSA, MP Biomedicals, Ohio) en RPMI más 100 ng/ml de activina A (PeproTech, NJ), 20 ng/ml de Wnt3a (R&D Biosciences, MN) y 8 ng/ml de bFGF (PeproTech, NJ). Las células se trataron durante 2 días adicionales en 2% BSA FAF en RPMI más 100 ng/ml de activina A (PeproTech, NJ) y 8 ng/ml de bFGF (PeproTech, NJ). El medio se cambió diariamente. El análisis FACS realizado para el definitivo marcador de superficie celular de endodermo CXCR4, mostró que el 87% de las células expresó la proteína (**Figura 27A**). Un experimento similar se realizó con células de la línea H1 de células madre embrionarias humanas en el paso 49 cultivado en microportadores de Cytodex 1® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) durante 5 pasajes, revelando que el 91% de las células diferenciadas en microportadores expresan CXCR4 (**Figura 27B**). Esto demuestra que las células cultivadas en microportadores son capaces de diferenciarse en endodermo definitivo, el primer paso para convertirse en células productoras de insulina.

Tres tipos de microportadores, Cytodex 1®, Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) y HILLEX®II (Solohill, MI), permiten la unión y crecimiento de células H1. Se llevó a cabo la diferenciación de las células H1 en estos tres microportadores. Las células fueron cultivadas en estos microportadores en matraces de agitación (**Ejemplo 5**) para diversos números de paso (1 a 5). De seis a ocho días después de las últimas alícuotas de paso de los microportadores más células en suspensión se transfirieron a 6 o 12 placas de pocillos. Un total de 15 cm² de microportadores más células por placa de 12 pocillos o 30cm² microportadores se transfirieron más células por placa de 6 pocillos. A continuación, se añadió medio de diferenciación para los pocillos de la placa y la placa se colocó en una plataforma oscilante a 37°C. La diferenciación de las células madre embrionarias humanas a endodermo definitivo se llevó a cabo mediante el tratamiento de las células durante 2 días con 2% de fracción albúmina bovina V de ácido graso libre (MP Biomedicals, Ohio) en RPMI más 100 ng/ml de activina A (PeproTech, NJ), 20 ng/ml Wnt3a (R&D Biosciences, MN) y 8 ng/ml de bFGF (PeproTech, NJ). Las células se trataron durante 2 días adicionales en 2% BSA FAF en RPMI más 100 ng/ml de activina A (PeproTech, NJ) y 8 ng/ml de bFGF (PeproTech, NJ). El medio se cambió diariamente. El análisis FACS se llevó a cabo para el marcador definitivo de superficie celular de endodermo CXCR4 (**Figura 28**). Las células cultivadas en microportadores Cytodex 1®, y Cytodex 3® apoyaron diferenciación de endodermo definitivo (87% y 92% respectivamente, mientras que microportadores de HILLEX®II no apoyaban la diferenciación en cuanto a la misma medida que los otros microportadores probados en este experimento (42%).

Para determinar si la densidad celular afecta a la diferenciación de las células en microportadores, las células de la línea H1 de células madre embrionarias humanas en el paso 40 se cultivaron en microportadores de Cytodex 3® en un matraz de agitación, ya sea para 8 días o 11 días. A continuación, el equivalente de aproximadamente 15 cm² de microportadores más células se colocó en una placa de 6 pocillos y se colocó en una plataforma oscilante. Después las células se incubaron en medio diferenciador de endodermo definitivo como anteriormente. Después de 4 días las células se analizaron por FACS para la expresión de CXCR4. 87% de las células cultivadas durante 6 días en matraz de agitación expresaron CXCR4 mientras que el 56% de las células cultivadas durante 11 días en el matraz giratorio expresaron CXCR4 (**Figura 29**). Esto demuestra que el número de días que las células están en el cultivo es importante antes de la diferenciación, específicamente, si la densidad celular es demasiado alta puede que no permite que las células se diferencien de manera eficiente.

Para determinar si las células madre embrionarias humanas podrían diferenciarse en células del endodermo pancreático en los tres tipos de microportadoras determinados suficientes para la unión y el crecimiento, las células de la línea H1 de células madre embrionarias humanas en el paso 41 (H1p41) se sembraron a Cytodex 1®, microportadores de Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) y microportadores de HILLEX®II (Solohill, MI) (véase el **Ejemplo 1**). Microportadores se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 30 cm² de microportadores fueron transferidos a placas de pocillos de baja unión 6. Las células H1 se disociaron a partir de dos placas de 10cm² con TrypLE™ Express según las instrucciones del fabricante. Las células se sembraron a 5x10⁵ células por pocillo. La unión de las células a las perlas se llevó a cabo de acuerdo con los métodos descritos en el

Ejemplo 3. Brevemente, se incubaron las células y microportadores en MEF medio acondicionado con 10 μM Y27632 a 37°C durante cuatro horas con agitación breve cada hora. Las células en microportadores de HILLEX®II y Cytodex 1® se colocaron en una plataforma oscilante. Las células se dejaron en microportadores de Cytodex 3® para sentarse durante la noche sin molestias. El medio se cambió al diario y ya no se incluye Y27632.

Debido a la mala fijación en este experimento, la mayoría de las células en la placa de Cytodex 1® fueron ya no unidas a los microportadores. Sin embargo, un mayor tiempo de unión y/o más lenta velocidad de oscilación puede mejorar la unión de las células. Después de 7 días, las células se diferenciaron a endodermo definitivo con ácido graso 2% libres (FAF) BSA (Proliant, IA) en medio RPMI y los siguientes factores de crecimiento: bFGF (8NG/ml, (PeproTech, NJ)), activina A (100 ng/ml, (PeproTech, NJ)), Wnt3a (20 ng/ml, (R&D Biosciences, MN)). Para el segundo hasta el cuarto día de diferenciación, las células se trataron con los mismos medios que carecen de Wnt3a. El análisis FACS de muestras por duplicado después de 4 días reveló niveles de CXCR4 de las células positivas 77-83%. La expresión de endodermo definitivo fue equivalente entre las células cultivadas en los diferentes microportadores. Véase la **Figura 30**.

Las células fueron entonces diferenciadas adicionalmente durante 2 días con FGF7 (50 ng/ml, (R&D Systems, MN)), KAAD-Ciclopamina (0,25 μM , (Calbiochem, NJ)) en DMEM/F12 o DMEM-HG más 2% de FAF BSA (Proliant, IA). Esto fue seguido por cuatro días de tratamiento con Noggin (100 ng/ml, (R&D Biosciences, MN)), FGF7 (50 ng/ml, (R&D Systems, MN)), el ácido retinoico (2 μM , (Sigma-Aldrich, MO)), y KAAD-ciclopamina (0,25 μM , (Calbiochem, NJ)) en DMEM/F12 o DMEM-HG con 1% de suplemento de B-27 (Invitrogen, CA). Después las células se diferenciaron durante tres días con Noggin (100 ng/ml, (R&D Biosciences, MN)), DAPT (1 μM , (Sigma-Aldrich, MO)), inhibidor de Alk5 II (1 μM , (Axxora, CA)) en DMEM/F12 o DMEM-HG con 1% de suplemento B-27 (día 13, endodermo pancreático, (Invitrogen, CA)). La **Figura 31** muestra el nivel de expresión por Q-PCR para genes específicos al páncreas, Nkx6.1, PDX1 y Ngn3. Valores de CT muestran claramente que las células diferenciadas en microportadores de HILLEX®II no diferencian de manera eficiente para expresar los marcadores de células precursoras de células beta necesarias. Aunque las células diferenciadas de manera eficiente para endodermo definitivo sobre los tres tipos de microportadoras, la diferenciación adicional a progenitores pancreáticos no es eficiente en microportadores de HILLEX®II.

Para determinar si las células madre embrionarias humanas podrían diferenciarse adicionalmente en células productoras de insulina, las células H1 p45 fueron cultivadas en microportadores de Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) y diferenciadas de modo similar a lo descrito anteriormente. Brevemente, las células H1 se disociaron de placas de 10cm² con TrypLE™ urgente según instrucciones del fabricante. Las células también fueron sembradas a 1 o 2x10⁶ células por placa de 6 pocillos. La unión de las células a las perlas se describe en el **Ejemplo 3**. Brevemente, las células y los microportadores se incubaron en medio acondicionado de MEF con 10 μM Y27632 a 37°C durante cuatro horas con agitación breve cada hora. Las células luego se dejaron incubarse durante la noche sin molestias. En el día 2 se reemplazó el medio con medio de MEF acondicionado más 5 μM Y27632 y las placas se colocaron en una plataforma oscilante. El medio se cambió cada día subsiguiente sin Y27632. En el quinto día, el medio se reemplazó con medio de diferenciación del endodermo definitivo, ácido graso de 2% libre (FAF) BSA (Proliant, IA) en medio RPMI con los siguientes factores de crecimiento: bFGF (8NG/ml, (PeproTech, NJ)), la activina A (100 ng/ml, (PeproTech, NJ)), Wnt3a (20 ng/ml, (R&D Biosciences, MN)). Para el segundo y tercer día de diferenciación, las células se trataron con los mismos medios que carecen de Wnt3a. El análisis FACS de muestras por duplicado después de 3 días reveló niveles de CXCR4 de las células positivas 97-98%. Después las células se diferenciaron adicionalmente durante 2 días con FGF7 (50 ng/ml, (R&D Systems, MN)), KAAD-ciclopamina (0,25 μM , (Calbiochem, NJ)) en DMEM-Alta Glucosa (HG) más 2% de FAF BSA (Proliant, IA). Esto fue seguido por cuatro días de tratamiento con Noggin (100 ng/ml, (R&D Biosciences, MN)), FGF7 (50 ng/ml, (R&D Systems, MN)), el ácido retinoico (2 μM , (Sigma-Aldrich, MO)), y KAAD-ciclopamina (0,25 μM , (Calbiochem, NJ)) en DMEM-HG con 1% de suplemento de B-27 (Invitrogen, CA). Después las células se diferenciaron durante tres días con Noggin (100 ng/ml, (R&D Biosciences, MN)), DAPT (1 μM , (Sigma-Aldrich, MO)), inhibidor de Alk5 II (1 μM , (Axxora, CA)) en DMEM-HG o DMEM-F12 con 1% de suplemento de B-27 (Invitrogen, CA). Esto fue seguido por la diferenciación en DMEM-HG o DMEM-F12 con inhibidor Alk5 II (1 μM , (Axxora, CA)) durante siete días. La diferenciación final fue durante cinco días en DMEM-HG o DMEM-F12 respectivamente. Esto es un total de 24 días de diferenciación que conduce a la expresión de hormonas endocrinas pancreáticas. La **Figura 32** muestra los resultados del análisis FACS de las células en este punto final. Las células con la más alta densidad de siembra y diferenciadas en DMEM-HG de días 6 a 24 tenían los más altos niveles de expresión de insulina (**Figura 32**).

Alternativamente, para determinar si las células madre embrionarias humanas podrían diferenciarse en células productoras de insulina, se cultivaron células H1 p44 en un matraz de agitación durante 7 días en microportadores de Cytodex 3® (véase el **Ejemplo 5**). Las células más microportadores se transfirieron a una placa de 12 pocillos en 15 cm²/pocillo y se colocaron en una plataforma oscilante a 37°C. Las células se diferenciaron a endodermo definitivo del modo anterior pero con DMEM/F12 en lugar de RPMI. El análisis FACS después de 4 días reveló niveles de CXCR4 de las células positivas 75 a 77% en un análisis por triplicado. Después las células se diferenciaron más con 3 días de tratamiento con FGF7 (50 ng/ml, (R&D Systems, MN)), KAAD-ciclopamina (0,25 μM , (Calbiochem, NJ)) en DMEM/F12 más 2% fracción de albúmina bovina V libre de ácido graso. Esto fue seguido por cuatro días de tratamiento con Noggin (100 ng/ml, (R&D Biosciences, MN)), FGF7 (50 ng/ml, (R&D Systems, MN)), el ácido retinoico (2 μM , (Sigma-Aldrich, MO)), y KAAD-ciclopamina (0,25 μM , (Calbiochem, NJ)) en

DMEM/F12 con 1% de suplemento de B-27 (Invitrogen, CA). Después las células se diferenciaron durante tres días con Noggin (100 ng/ml, (R&D Biosciences, MN)), Netrin4 (100 ng/ml, (R&D Biosciences, MN)), DAPT (1 μ M, (Sigma-Aldrich, MO)), inhibidor de Alk5 II (1 μ M, (Axxora, CA)) en DMEM/F12 con 1% de suplemento de B-27 (día 15, endodermo pancreático, (Invitrogen, CA)). Esto fue seguido por seis días de tratamiento con inhibidor de Alk5 II (1 μ M, (Axxora, CA)) en DMEM/F12 con 1% de suplemento de B-27 (día 21, células endocrinas pancreáticas, (Invitrogen, CA)). El tratamiento final durante siete días era DMEM/F12 con 1% de suplemento de B-27 (día 28, células que expresan insulina, (Invitrogen, CA)). La **Figura 33** muestra el nivel de expresión por Q-PCR para los genes específicos de páncreas, insulina, Pdx1 y glucagón. Los datos sobre microportadores se compararon con los datos anteriores de células H1 p42 diferenciadas en una superficie plana recubierta de MATRIGEL™ (BD Biosciences, CA). El nivel de expresión de estos genes específicos del páncreas es similar o mejor para células diferenciadas con microportador en comparación con las células diferenciadas en superficies planas.

Se realizaron experimentos similares con células H9p38 a pases en microportadores de Cytodex 3® y expandidas en un matraz de agitación. Una parte alícuota de 15 cm² de microportadores más células se colocó en una placa de 12 pocillos y se colocó en una plataforma oscilante con medio de diferenciación. Esto se comparó con células cultivadas en placas en una placa de 6 pocillos recubierta con MATRIGEL™ (BD Biosciences, CA). Se logró la diferenciación de las células a endodermo definitivo en RPMI y suplementos, con un promedio de 83% de las células que expresan CXCR4 (muestras por duplicado) en comparación con 72% de células que expresan CXCR4 sobre un sustrato plano (**Figura 34**). Además diferenciación a endodermo pancreático (día 15), células pancreáticas-endocrinas (día 22) y las células que expresan insulina (día29) mostraron niveles de expresión similares de insulina y glucagón entre las células cultivadas en microportadores a los que se cultivan sobre un sustrato plano (**Figura 35**). Los componentes del medio fueron idénticos a los enumerados para el experimento de diferenciación H1 anterior con un día adicional en componentes diferenciadores de células endocrinas. En la etapa de expresan la insulina que, las células mostraron una sorprendente disminución en la expresión de insulina en comparación con días 22. Dado que la disminución se observó tanto en muestras microportadoras como planas, probablemente no se debe al sustrato de fijación. Esto muestra que las células H9 también se pueden diferenciar con éxito a las células endocrinas pancreáticas al menos en microportadores.

En general, dos líneas diferentes de células madre embrionarias humanas, H1 y H9, pueden diferenciarse a células endocrinas pancreáticas en microportadores de Cytodex 3®, lo que ilustra el potencial para expandir y diferenciar estas células en un sistema de cultivo a gran escala (**Figuras 17, 21, 33, y 35**). Las células madre embrionarias fueron capaces de unir y proliferar a por lo menos tres tipos de perlas microportadoras y las células podrían diferenciarse a al menos endodermo definitivo (**Figuras 28**). Estos resultados ilustran un método por el que las células madre embrionarias humanas pueden expandirse y diferenciarse para usos terapéuticos.

Ejemplo de Referencia 8: Las células madre embrionarias a pases como células individuales en un cultivo a base de microportadores 3D se pueden transferir al cultivo en una superficie libre de ECM mientras que se mantiene la pluripotencia

Las células madre embrionarias humanas H1 fueron cultivadas en microportadores de acuerdo con los métodos descritos en el **Ejemplo 5**. Las células se retiran de microportadores y se sembraron a Nunc4, Nunc13, CELLBIND™, o PRIMARIA™ de superficies planas de poliestireno de cultivo de tejidos (TCPS) con MEFCM16 suplementado con 3 μ M glicilo-H 1152 dihidrocloruro. Las células se sembraron a una densidad de 100.000 células/cm² en placas de seis pocillos y después se cultivaron durante un paso adicional en la superficie respectiva. Las células fueron entonces o bien levantadas con TrypLE y ensayadas mediante citometría de flujo para los marcadores de pluripotencia, o lisadas en el pozo con RLT para la purificación de ARNm y QRT-PCR, o diferenciadas para endodermo definitivo. Se indujo la diferenciación mediante el tratamiento de las células con medio RPMI suplementado con 2% de BSA, 100 ng/ml de activina A, 20 ng/ml de Wnt3a, 8 ng de bFGF/ml, y 3 μ M glicilo-H 1152 dihidrocloruro durante 24 horas. El medio se cambió a continuación a medio RPMI complementado con 2% de BSA, 100 ng/ml de activina A, 8 ng/ml bFGF, y 3 μ M glicilo-H 1152 dihidrocloruro durante 48 horas adicionales con cambio de medio cada día.

Como medida por marcadores de pluripotencia, utilizando citometría de flujo o qRT-PCR, las células cultivadas en microportadores y se transfiere al cultivo en Nunc4, Nunc13, CellBIND, o superficies planas de poliestireno de cultivo primario de tejidos (TCPS) mantuvieron la pluripotencia después de dos pasos sobre la superficie plana correspondiente (**Figura 36**). Además, las células mantuvieron la capacidad de diferenciarse a un endodermo definitivo tal como se mide por citometría de flujo o QRT-PCR (**Figura 37**). Resultados similares se obtuvieron también en las pruebas de lado a lado de las células madre embrionarias humanas H1 y H9 a pases en microportadores de Cytodex 3® y diferenciadas a endodermo definitivo (**Figura 38**).

Estos resultados indican que las células madre embrionarias humanas se pueden pasar en microportadores y posteriormente cultivarse en otra superficie mientras que se mantiene la pluripotencia. Las células también pueden ser transferidas a otra superficie y se indujeron de manera eficiente para diferenciarse.

Ejemplo de Referencia 9: Las células madre embrionarias pueden ser transferidas directamente de un cultivo de estilo cluster/colonia en alimentadores de fibroblastos mitóticamente inactivados al cultivo como células

individuales en las superficies libres de ECM durante al menos 10 pases sin pérdida de pluripotencia y sin la extracción manual de los alimentadores de fibroblastos.

Líneas de células madre embrionarias humanas están actualmente derivadas usando un método que promueve un crecimiento de las colonias de una sola célula o un grupo de unas pocas células de un blastocisto. Este crecimiento de las colonias entonces se pasa en serie y se propaga hasta que suficientes clústeres/colonias de células están disponibles que constituyen una línea celular. Una vez que una línea celular ha sido derivada, a fin de mantener las características pluripotentes y cariotípicamente estables de células madre embrionarias humanas, el estándar actual en la técnica de alta calidad, el cultivo reproducible de células madre embrionarias humanas consiste en mantener los grupos/colonias de células madre humanas embrionarias en una capa alimentadora de fibroblastos mitóticamente inactivos y para pasar las células por medio de la interrupción manual o paso mayor enzimático suave con colagenasa o proteasa neutra o una mezcla de los mismos. Estos métodos de paso mantienen racimos de células madre embrionarias humanas y promueven el crecimiento de estilo de colonia de células madre embrionarias humanas. Después de que se estableció una línea de células madre embrionarias humanas estable las células pueden ser la transición a un sustrato de matriz extracelular (ECM) tales como MATRIGEL™. Sin embargo, si las células se cultivan en alimentadores de fibroblastos o sobre un sustrato de ECM, el método de pasaje recomendado para células madre embrionarias humanas específicamente instruye técnicos para que no disocien completamente colonias madre embrionarias humanas.

La corriente de las mejores prácticas para el cultivo a gran escala de células de mamíferos es el uso de un recipiente de cultivo de 3 dimensiones que mantiene condiciones uniformes homeostáticas y puede incorporar microportadores para el apoyo de las células dependientes de adhesión. Sin embargo, los métodos estándar actuales usados para el crecimiento de cultivo de células madre humanas embrionarias en alimentadores de fibroblastos o un sustrato ECM y cultivo de estilo de racimo/colonia plantean un obstáculo técnico al crecimiento con éxito y mantenimiento de un cultivo de células madre embrionarias humanas pluripotentes en microportadores, ya que estos métodos no son fácilmente transferibles a cultivo a gran escala en microportadores. Con el fin de cultivar eficazmente células madre embrionarias humanas en microportadores, el cultivo de células madre de embriones humanos debe ser capaz de pasar como células individuales, y no como colonias o agrupaciones, como es actualmente el estándar en la técnica. Además, las células madre embrionarias humanas deben ser capaces de crecer sin una capa de células alimentadoras o sustrato ECM.

Un método que se ocupa de estos obstáculos técnicos se describe a continuación. Se demuestra cómo convertir cultivos de células madre embrionarias humanas a partir de racimos/colonias sobre una capa alimentadora de fibroblastos mitóticamente inactivos directamente a un sistema de cultivo celular único que no requiere una capa de alimentación de fibroblastos subyacente o una superficie recubierta con MATRIGEL u otro que un sustrato de matriz extracelular. Este método utiliza paso grueso de células madre de embriones humanos sin ninguna extracción manual de células alimentadoras de fibroblastos o selección de células pluripotentes a partir de la población total de células para convertir el cultivo directamente del cultivo basado en alimentador de fibroblastos de estilo colonia, a cultivo libre de alimentador/libre de matriz sobre PRIMARIA en la presencia del inhibidor de Rho quinasa (ROCK), glicilo-H 1152 dihidrocloruro. Este método se puede completar en un recipiente sellado para adherirse a los requisitos reglamentarios y produce un cultivo madre de embriones humanos altamente homogéneo que retiene la pluripotencia y la capacidad de diferenciarse para endodermo definitivo, y que no contiene una población de células de fibroblastos.

Método: Las células se pasaron rutinariamente mediante la aspiración de los medios de comunicación, el lavado con PBS, y luego tratando las células con una enzima de disociación (colagenasa, Accutase™, o TrypLE). La colagenasa se utilizó a concentración de 1 mg/ml; Accutase™ o TrypLE se utilizaron a concentración madre I X. Todas las enzimas se utilizaron después de alcanzar la temperatura ambiente. Se añadió una solución de 2% de BSA en DMEM/F12 a cada pocillo y las células se suspendieron de manera uniforme en la solución después de tratar las células con la enzima. Las células se centrifugaron después durante 5 minutos a 200 g, se añadió el sedimento celular y 2% de BSA adicional en solución DMEM/F12 para resuspender las células y la suspensión celular se distribuyó a tres tubos cónicos estériles de 50 ml y se centrifugaron durante 5 min a 200 g.

El uso de un método secuencial, los alimentadores de fibroblastos fueron retirados por el paso de alta densidad de células madre embrionarias humanas de estilo racimo/colonia a una superficie primaria por tratamiento del cultivo a base de MEF con Accutase™, TrypLE™, o colagenasa. En el primer pasaje, las células se sembraron a matraces T-25 revestidos con una dilución 1:30 de MATRIGEL™ en medio condicionado (CM) de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) o las células se sembraron a matraces T-25 PRIMARIA™ de cultivo en MEF-CM más 3 µM glicilo-H 1152 dihidrocloruro. Todas las células se sembraron a una relación de división de 1 a 3,5 y las células fueron expuestas a la enzima durante 10 minutos. El número de células para las células levantadas con TrypLE™ o Accutase™ se determinó contando las células teñidas de azul de tripano con un hemocitómetro. Después de sembrar las células se cambió el medio a diario, y las células se sembraron en MEF-CM + 3 µM glicilo-H 1152 dihidrocloruro fueron alimentadas diariamente con MEF-CM + 1 µM glicilo-H 1152 dihidrocloruro y las muestras se ensayaron para la expresión de marcadores de ARNm de la pluripotencia y la diferenciación. hESCs se pasaron dos veces como células individuales bajo condiciones libres de Matriz mantuvieron expresión génica de genes de pluripotencia e inhibió la expresión de genes de diferenciación (**Figura 39**).

2º paso: Las células se pasaron a una relación de 1 a 4 usando una exposición de 10 minutos a TrypLE™ o Accutase™. Un tiempo de exposición a enzima más corto, que se determina empíricamente por el tratamiento de las células y el seguimiento de desprendimiento, se introdujo también. Se observó que una exposición de 3 minutos a TrypLE™ y exposición de 5 minutos a Accutase™ era suficiente para levantar las células. Después de tratar las células con enzima, se pasaron las células como se describió anteriormente y se tomaron alícuotas de ARNm de células de qRT-PCR en el momento de pases.

3º paso: Al llegar a las células de confluencia se lavaron con PBS, se interrumpieron con la enzima durante 3 o 10 minutos (TrypLE™) o 5 o 10 minutos (Accutase™), se suspendieron en 2% de BSA en DMEM/F12 y se centrifugaron, se lavaron de nuevo con 2% de BSA en DMEM/F12, se centrifugaron, y después se resuspendieron y se sembraron en sus respectivos medios de comunicación. En este pasaje se sembraron las células a razón de 1:4 y también en 2 relaciones escindidas adicionales 1:8 y 1:16. Se tomaron alícuotas de ARNm de células de QRT-PCR en cada pasaje.

4 pasajes+: Las condiciones adoptadas para el tiempo de exposición a la enzima y la relación de paso en los pasajes 2 y 3 se mantuvieron desde el paso 4 en adelante. Cada vez que el cultivo creció hasta la confluencia, las células se lavaron con PBS, se rompieron con la enzima durante el tiempo especificado, se suspendieron en 2% de BSA en DMEM/F12 y se centrifugaron, se lavaron de nuevo con 2% de BSA en DMEM/F 12, se centrifugaron, y después se resuspendieron en sus respectivos medios de comunicación en la relación de chapado especificado. Los medios para células cultivadas en placas de PRIMARIA fueron suplementados con 3µM glicilo-H 1152 dihidrocloruro en el momento de la siembra. Después de la siembra, el medio se cambió a diario y las células sembradas en MEF-CM + 3µM glicilo-H 1152 dihidrocloruro fueron alimentadas a diario con MEF-CM + 1µ glicilo-H 1152 dihidrocloruro. Se tomaron alícuotas de ARNm de células para qRT-PCR en el momento de pases.

En la realización de más de 8 pasajes, se analizaron las células para la pluripotencia por citometría de flujo para marcadores de superficie de pluripotencia (**Figura 40**) y por qRT-PCR para los marcadores de pluripotencia y diferenciación (**Figuras 41, 42, y 43**). Las células también se diferenciaron a endodermo definitivo mediante el tratamiento de las células con medio RPMI suplementado con 2% de BSA, 100 ng/ml de activina A, 20 ng/ml de Wnt3a, 8 ng/ml de bFGF, y 3 µM glicilo-H 1152 dihidrocloruro durante 24 horas. El medio se cambió a continuación a medio RPMI suplementado con 2% de BSA, 100 ng/ml de activina A, 8 ng/ml bFGF, y 3 µM de glicilo-H 1152 dihidrocloruro durante 48 horas adicionales con cambio de medio cada día. Las muestras diferenciadas a endodermo definitivo se ensayaron entonces para la presencia del marcador de endodermo definitivo CXCR4 por citometría de flujo (**Figura 40**).

Estos resultados indican que el paso a granel de estilo de colonia, cultivo a base de alimentador de fibroblastos a los enlaces libres de cultivo libre/matriz sobre PRIMARIA en presencia del inhibidor de Rho quinasa (ROCK), glicilo-H 1152 de dihidrocloruro resulta en un cultivo de células madre humanas embrionarias altamente homogéneas que mantiene la pluripotencia y la capacidad de diferenciarse para endodermo definitivo, y que no contiene una población de células de fibroblastos.

Ejemplo de Referencia 10: células madre embrionarias humanas transferidas de cultivo de tejidos de plástico para microportadores

Las células H1 se cultivaron en placas de cultivo de tejido (método en el **Ejemplo 9**) PRIMARIA™ (nº de cat. 353846, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y se liberaron por el tratamiento con TrypLE™ Express durante 3-5 minutos y se sembraron en placas tratadas de cultivo no de tejido de 6 pocillos con microportadores de Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) o HILLEX®II (Solohill, MI) en MEF-CM más 10 µM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO). Como control, las células de H1p46 cultivadas en placas recubiertas de MATRIGEL (BD Biosciences, CA) y paseadas con colagenasa (1 mg/ml) se liberaron y sembraron sobre microportadores de una manera similar. Las placas se incubaron a 37°C durante 5 horas, agitándose a mano cada 45 minutos. Las placas se colocaron a continuación en una plataforma oscilante a 37°C. El medio se cambió cada día con MEF-CM más 10 µM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO). Las imágenes muestran una buena unión de las células a los microportadores a los 3 días (**Figura 44**). Después de 7 días se liberaron las células (descritas en el **Ejemplo 4 infra**) y se analizaron por FACS para los marcadores de pluripotencia CD9, SSEA-4, SSEA- 3, TRA-1-60, TRA-1-81 (**Figura 45**). La mayoría de los marcadores de pluripotencia se expresaron en el 90-100% de las células. No hay diferencias claras entre las células a pases con Accutase™ (Millipore, MA) y TrypLE™ Express (Invitrogen, CA), ni entre el crecimiento de los microportadores Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) y HILLEX®II (Solohill, MI). En general, las células permanecieron pluripotentes cuando se transfirieron desde PRIMARIA™ (nº de cat. 353846, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) de plástico de cultivo de células en microportadores.

A continuación estas células H1 en los microportadores se diferenciaron a endodermo definitivo. El método se describe en el **Ejemplo 7**. Después de 4 días de diferenciación, las células H1 fueron liberadas de los microportadores y se sometieron a análisis FACS que muestra más que 82% de las células que expresan CXCR4. Véase la **Figura 46**. Las células se diferenciaron eficientemente en endodermo definitivo independientemente del tipo de microportador o enzima de pase en PRIMARIA™ (nº de cat. 353846, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Esto demuestra la flexibilidad del sistema de expansión y permite para que las células se cultiven sin matriz en

plástico y microportadores.

Ejemplo de Referencia 11: células madre embrionarias humanas transferidas desde sustratos planares que consisten en ésteres mixtos de celulosa de microportadores

5 Las células H1 se cultivaron en sustratos planos que constan de ésteres de celulosa mixtos para 12 pasajes, de acuerdo con los métodos descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 61/116.452. Las células se liberaron del sustrato plano mediante tratamiento con TrypLE™ Express para 3-5 minutos y se sembraron en placas tratadas con cultivo no de tejido de 6 pocillos con microportadores de Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, NJ) o HILLEX®II (Solohill, MI) en MEF-CM plus 10 mM Y27632 (Sigma-Aldrich, MO). Como control, las células H1p44 cultivadas en placas recubiertas de MATRIGEL™ (BD Biosciences, CA), a pases con colagenasa (1 mg/ml) fueron liberadas y sembradas sobre microportadores de una manera similar. Las placas se incubaron a 37°C durante 5 horas, agitándose a mano cada 45 minutos. Las placas se colocaron a continuación en una plataforma oscilante a 37°C. El medio se cambió diariamente. Después de 7 días se liberaron las células (descritas en el **Ejemplo 4**) y se analizaron por FACS para los marcadores de pluripotencia CD9, SSEA-4, SSEA-3, Tra-1-60, Tra-1-81 (**Figura 47**). La mayoría de los marcadores de pluripotencia se expresaron en más de un 90% de las células. No hubo diferencias claras entre las células cultivadas en Cytodex 3® y microportadores de HILLEX®II. Células de control H1p44 no se ensayaron para determinar la pluripotencia después de un crecimiento en microportadores de HILLEX®II, ya que la pluripotencia había sido confirmada por otros experimentos (véase el **Ejemplo 5**). En general, las células mantuvieron la pluripotencia cuando se transfirieron a partir de sustratos planares que consisten en ésteres de celulosa mezclados sobre microportadores.

A continuación, las células H1 en los microportadores se diferenciaron a endodermo definitivo, de acuerdo con los métodos descritos en el **Ejemplo 7**. Después de 4 días de diferenciación, las células H1 fueron liberadas de los microportadores y se sometieron a análisis FACS mostrando que más que 65% de las células expresan CXCR4 (**Figura 48**). Las células fueron eficientemente diferenciadas en endodermo definitivo independientemente del tipo microportador. No parece haber un menor número de células que se diferencian en endodermo definitivo sobre microportadores de HILLEX®II (Solohill, MI). La capacidad de las células para diferenciarse demuestra la flexibilidad del sistema de expansión. Además las células se pueden hacer crecer y diferenciarse directamente sobre las membranas y los microportadores, eliminando cualquier necesidad de una matriz de componente animal.

Tabla 1: unión de las células H9 a perlas microportadoras en MEF-CM en cultivos estáticos.

Perlas	empresa	revestimiento de superficie	unión 0-5
ProNectin F	SoloHill™ -poliestireno	fibronectina recombinante	0
Plastico	SoloHill™ -poliestireno	ninguna	0
Plastic Plus	SoloHill™ -poliestireno	catiónica	0
HillexII	SoloHill™ -poliestireno	trimetilo amonio catiónico	2
Colágeno	SoloHill™ -poliestireno	colágeno porcino	0
FACTIII	SoloHill™ -poliestireno	colágeno porcino catiónicos	0
Cristal	SoloHill™ -poliestireno	Vidrio de alta sílice	0
Cytodex 1	GE -dextrano		0
Cytodex 3	GE -dextrano	colágeno desnaturalizado	0
	* 5 es la unión celular más eficiente		

Tabla 2: unión de las células H1 y H9 a perlas de microportadoras en MEF-CM con inhibidor de Rho quinasa de 10 µM, Y27632.

Perlas	empresa	revestimiento de superficie	unión 0-5
ProNectin F	SoloHill™ -poliestireno	Fibronectina recombinante	1
Plástico	SoloHill™ -poliestireno	ninguno	1
Plastic Plus	SoloHill™ -poliestireno	Catiónico	1
HillexII	SoloHill™ -poliestireno	Amonio de trimetilo catiónico	4
Colágeno	SoloHill™ -poliestireno	Colágeno porcino	1
FACTIII	SoloHill™ -poliestireno	Colágeno porcino catiónico	1
Cristal	SoloHill™ -poliestireno	Vidrio de alta sílice	1
Cytodex 1	dextrano GE		4
Cytodex 3	dextrano GE	colágeno desnaturalizado	4
	* 5 es la unión celular más eficiente		

Tabla 3: Las duplicaciones de la población de células H1 y H9 cultivadas 5 pasajes en Cytodex 1®, Cytodex 3®, o HILLEX®II.

5	Línea de células- microportador	Duplicación de la población	Desviación estándar
	H9-HII	27h	4,1
	H9-C3	32,4h	12,8
	H1-C1	20,3h	3,7
10	H1-C3	25h	12,8

Reivindicaciones

1. Un método para la propagación in vitro de células madre pluripotentes, que comprende las etapas de
- 5 a. Unión de una población de células madre pluripotentes a un primer volumen de microportadores,
 b. Cultivo de las células madre pluripotentes en el primer volumen de microportadores,
 c. Extracción de las células madre pluripotentes a partir del primer volumen de microportadores, y
 d. Unión de la población de células madre pluripotentes a un segundo volumen de microportadores,
- 10 en el que las células madre pluripotentes se unen al primer volumen de microportadores y/o al segundo volumen de microportadores en medio que contiene un inhibidor de Rho quinasa.
2. El método de la reivindicación 1, en el que las etapas de cultivo, extracción y unión de las células madre pluripotentes en microportadores se repiten usando volúmenes posteriores de microportadores.
- 15 3. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el primer volumen de microportadores se selecciona entre el grupo que consiste en microportadores de dextrano y microportadores de poliestireno.
4. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el segundo volumen de microportadores se selecciona entre el grupo que consiste en microportadores de dextrano y microportadores de poliestireno.
- 20 5. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que las células madre pluripotentes se eliminan del primer volumen de los portadores de microorganismos mediante tratamiento enzimático.
- 25 6. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que las células madre pluripotentes se retiran del segundo volumen de microportadores mediante tratamiento enzimático.
7. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el primer volumen de microportadores se elimina de las células madre pluripotentes antes de fijar las células al segundo volumen de microportadores.
- 30 8. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el método comprende además la etapa de diferenciar las células madre pluripotentes en células que expresan marcadores del linaje endodérmico definitivo sobre microportadores o sobre superficies planas.

Figura 1

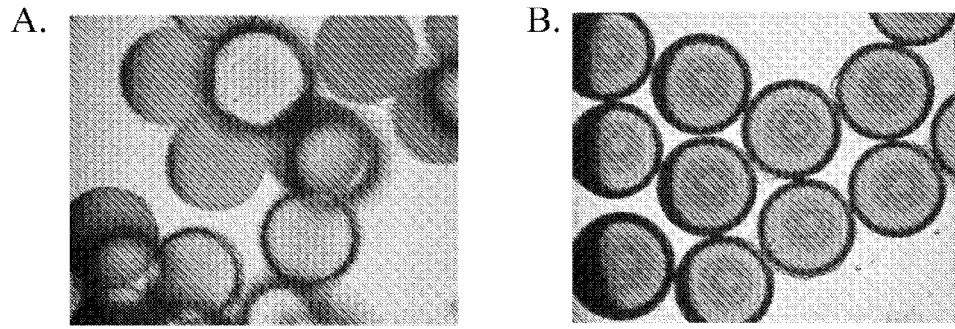


Figura 2

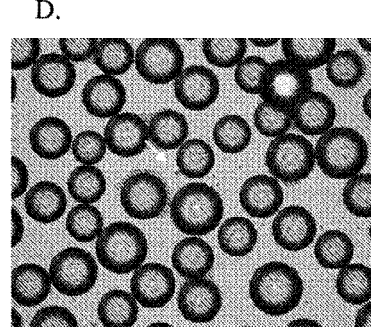
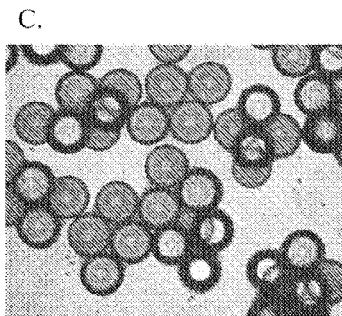
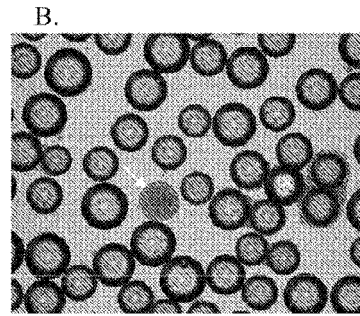
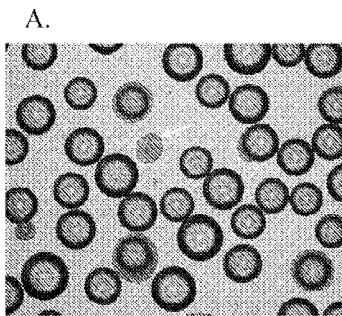


Figura 3

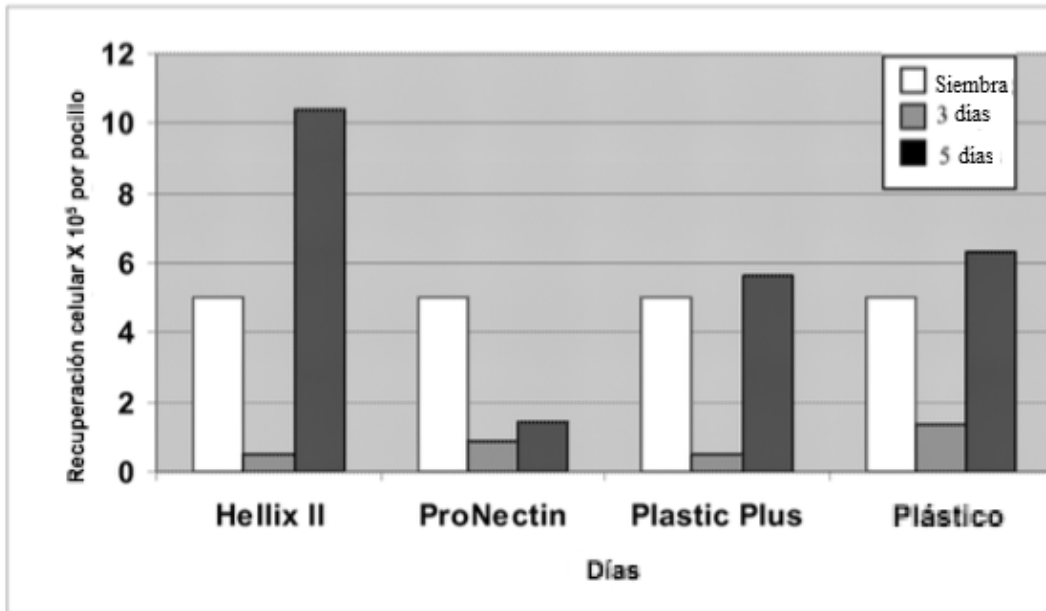


Figura 4

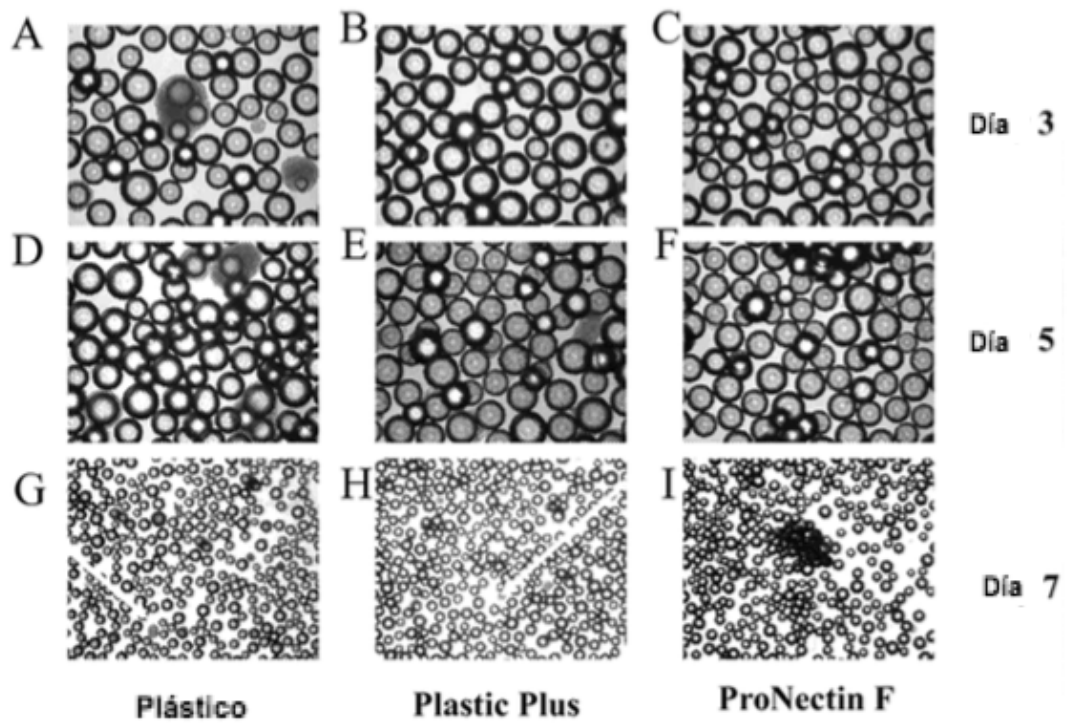


Figura 5

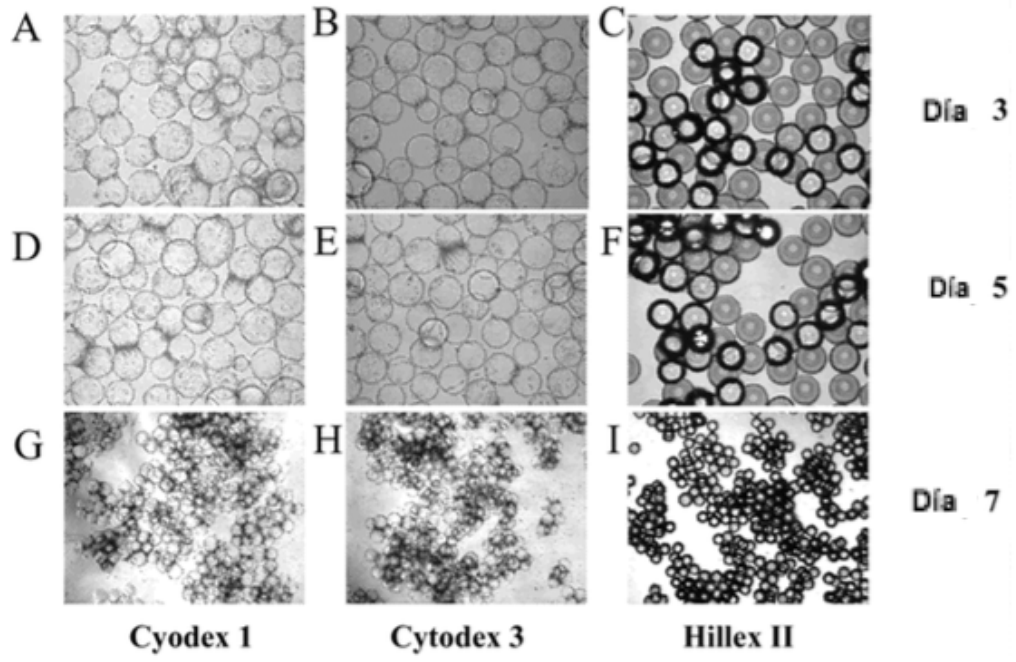


Figura 6

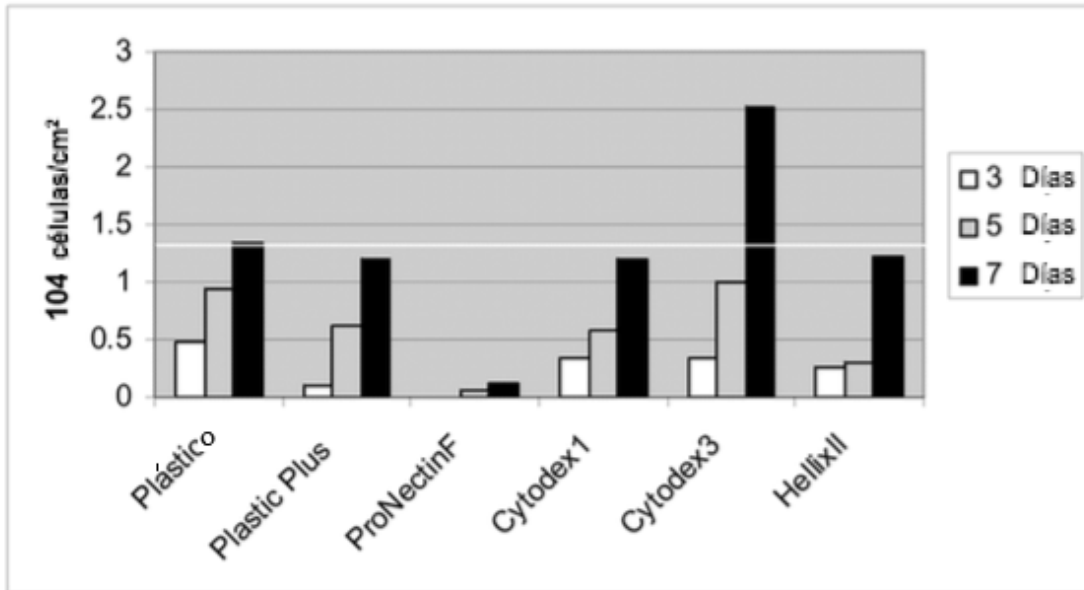


Figura 7

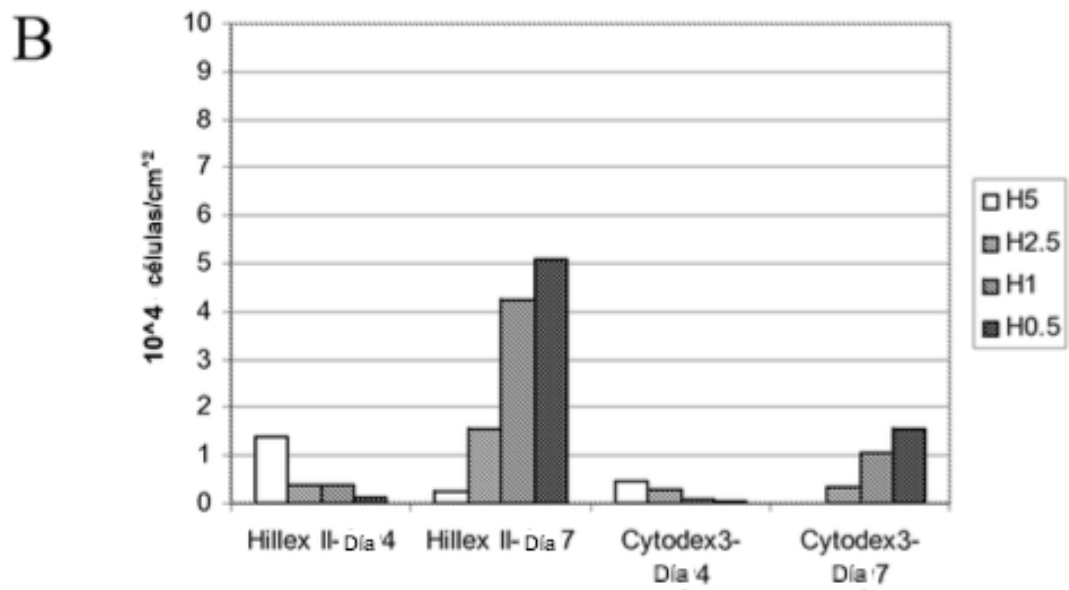
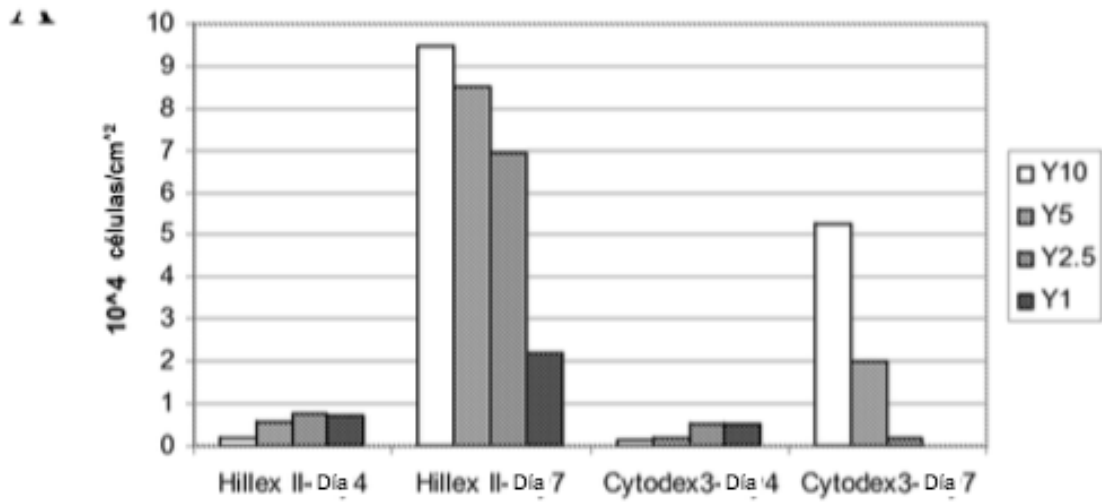


Figura 8

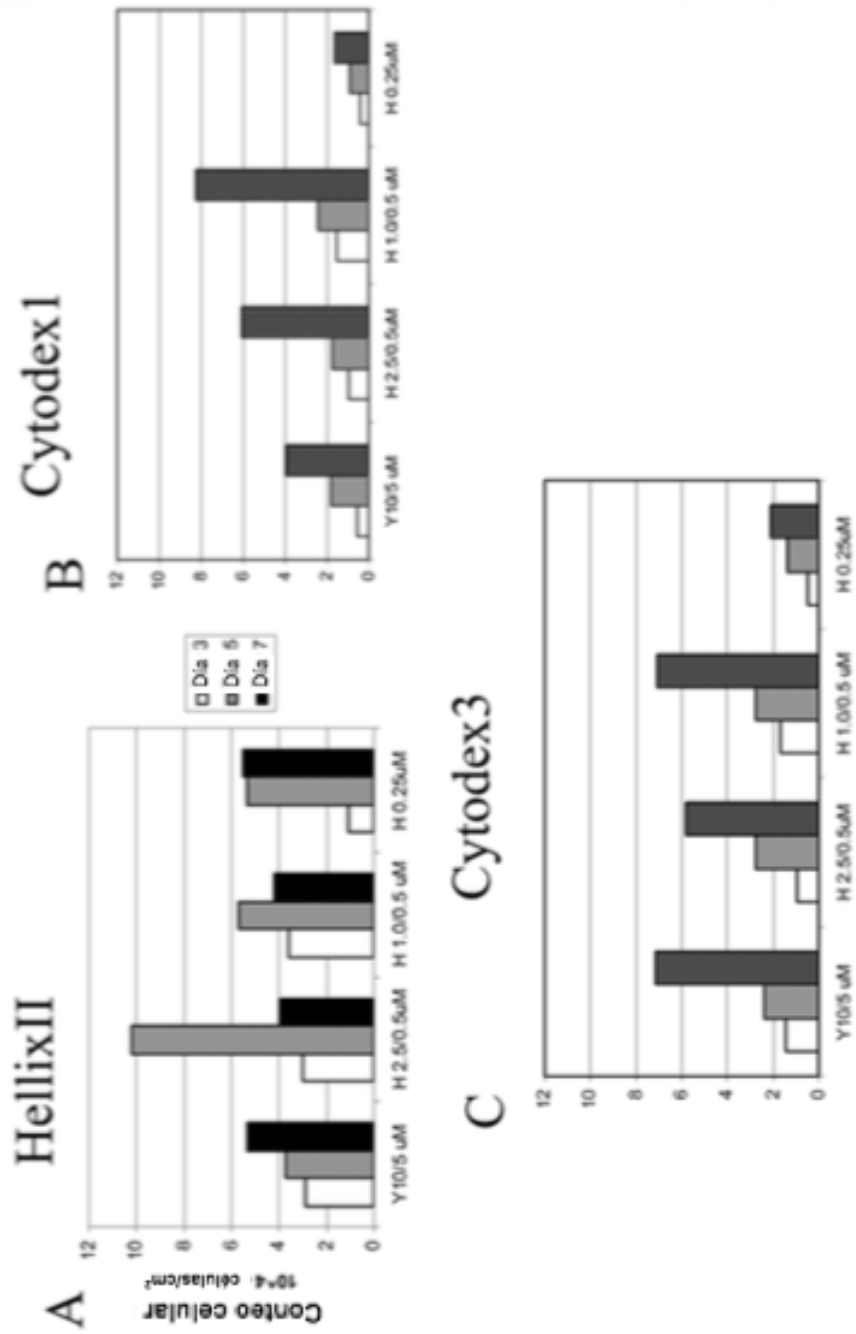


Figura 9

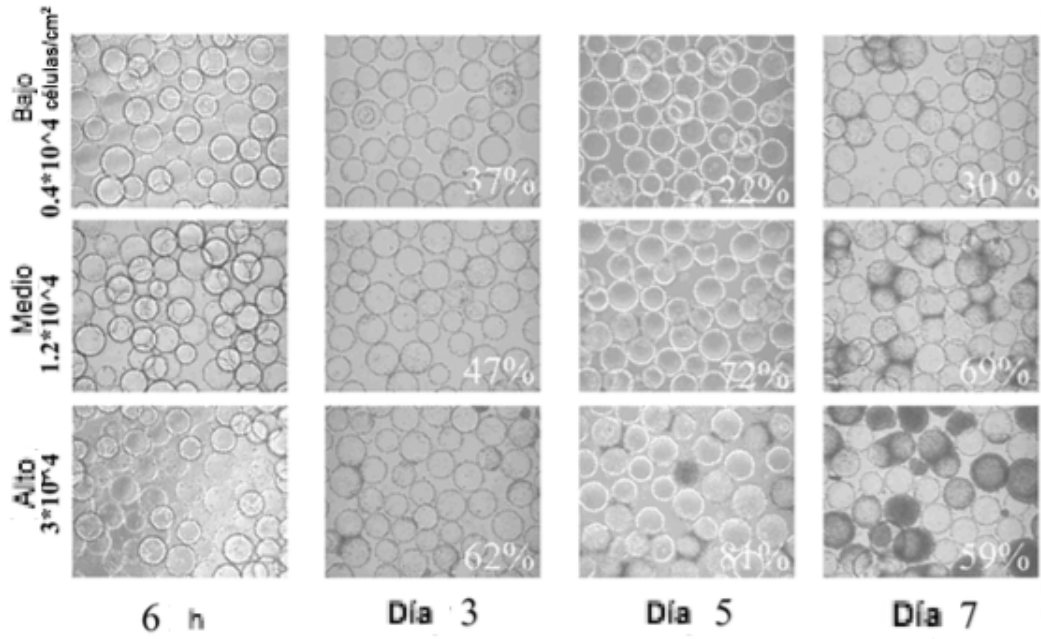


Figura 10

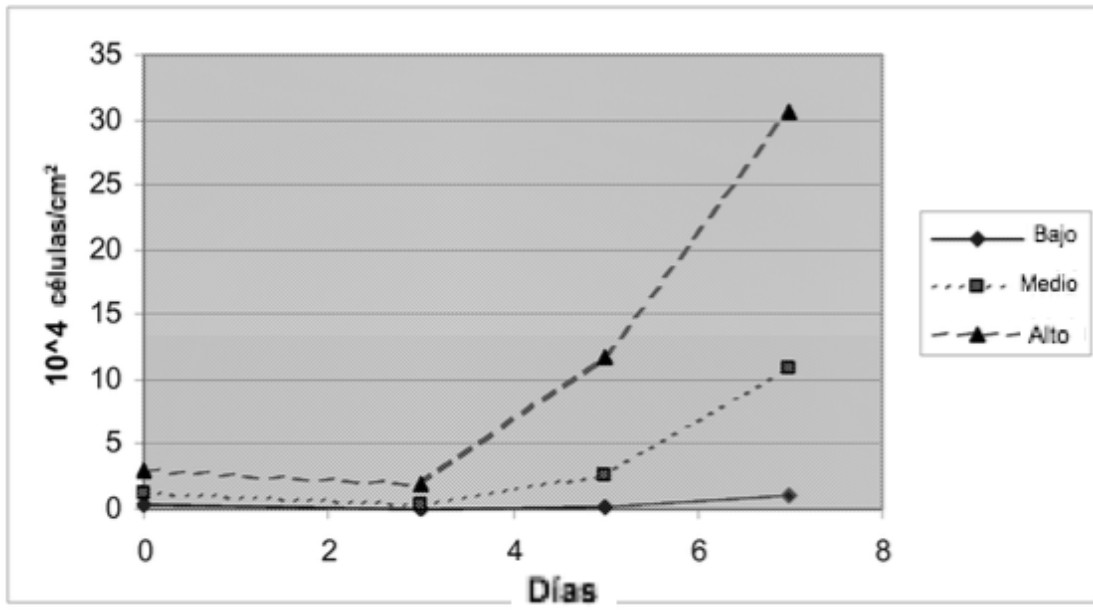


Figura 11

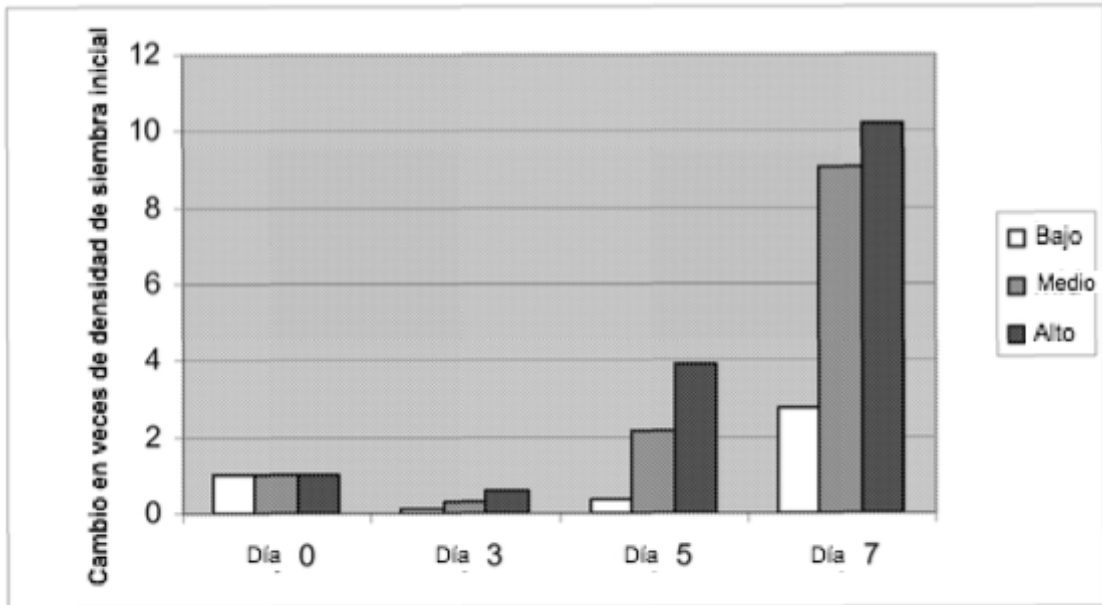


Figura 12

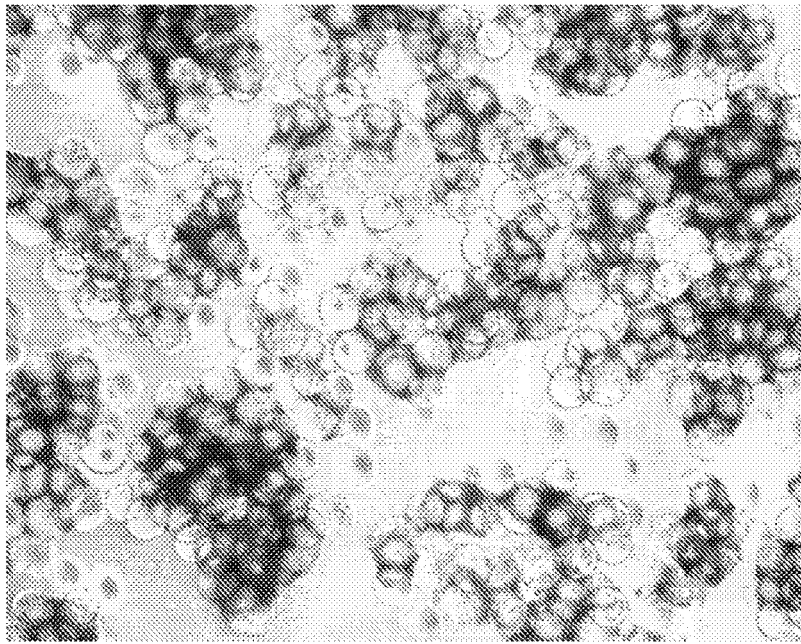


Figura 13

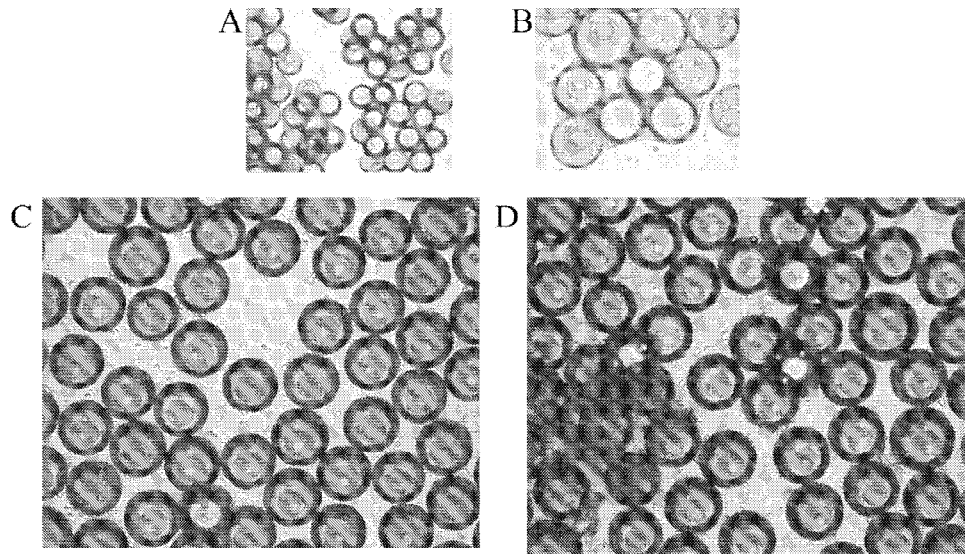


Figura 14

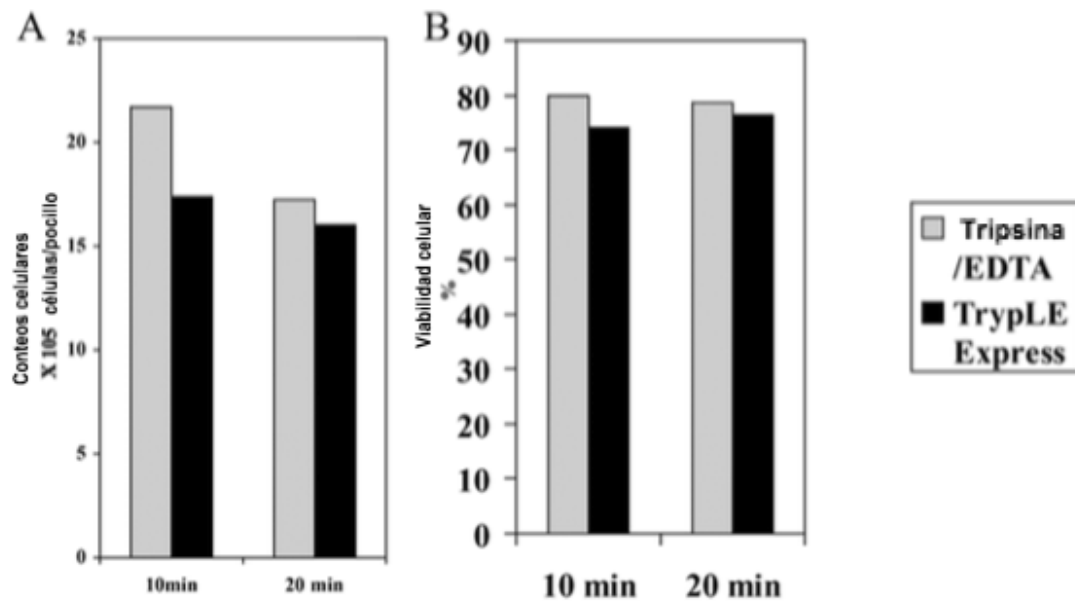


Figura 15

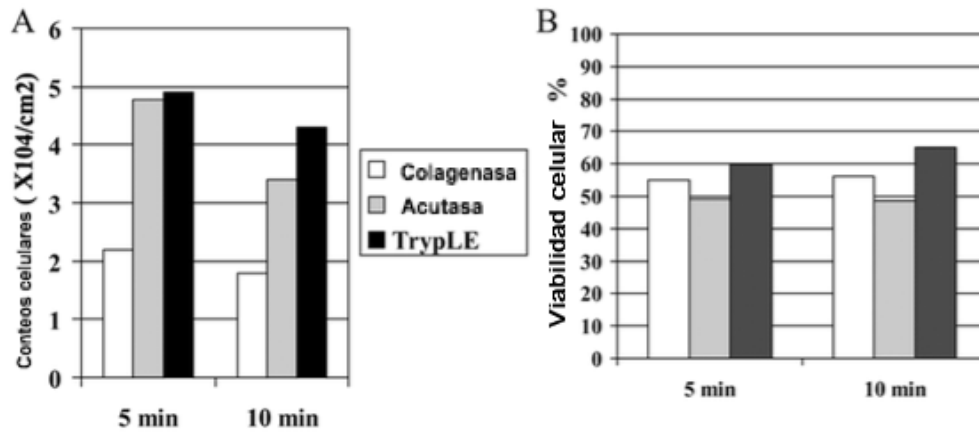


Figura 16

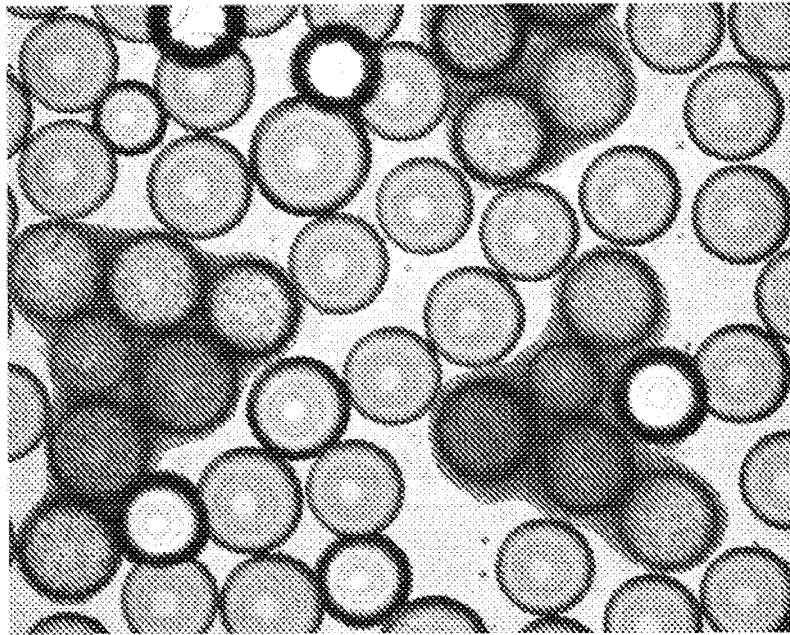


Figura 17

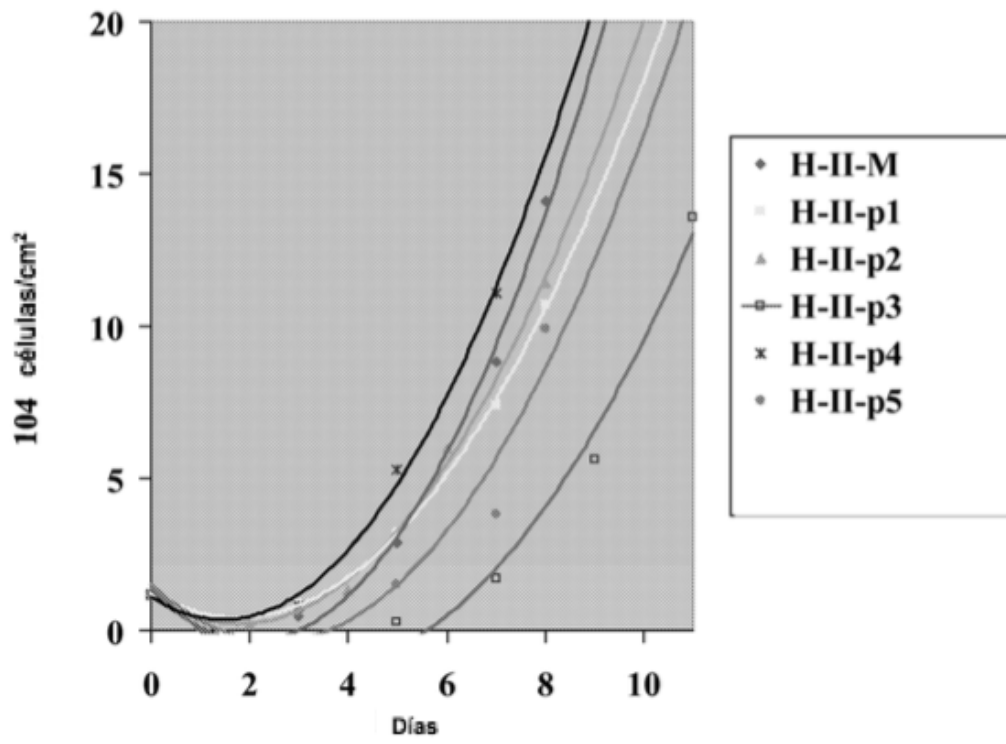


Figura 18

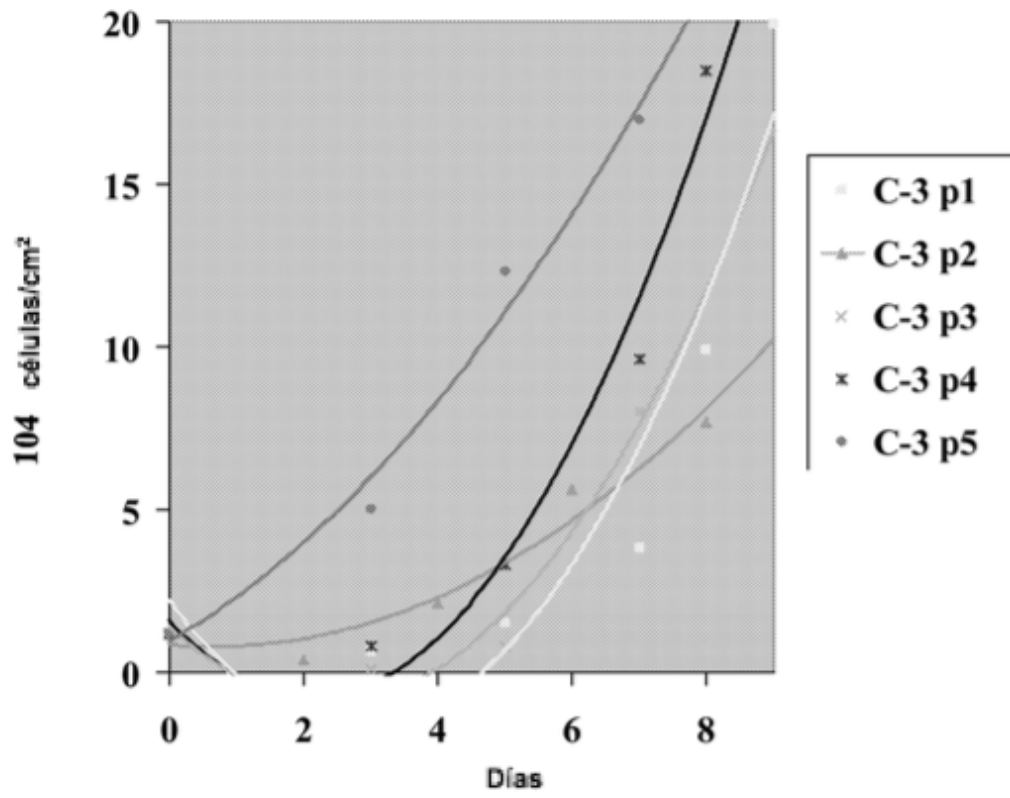


Figura 19

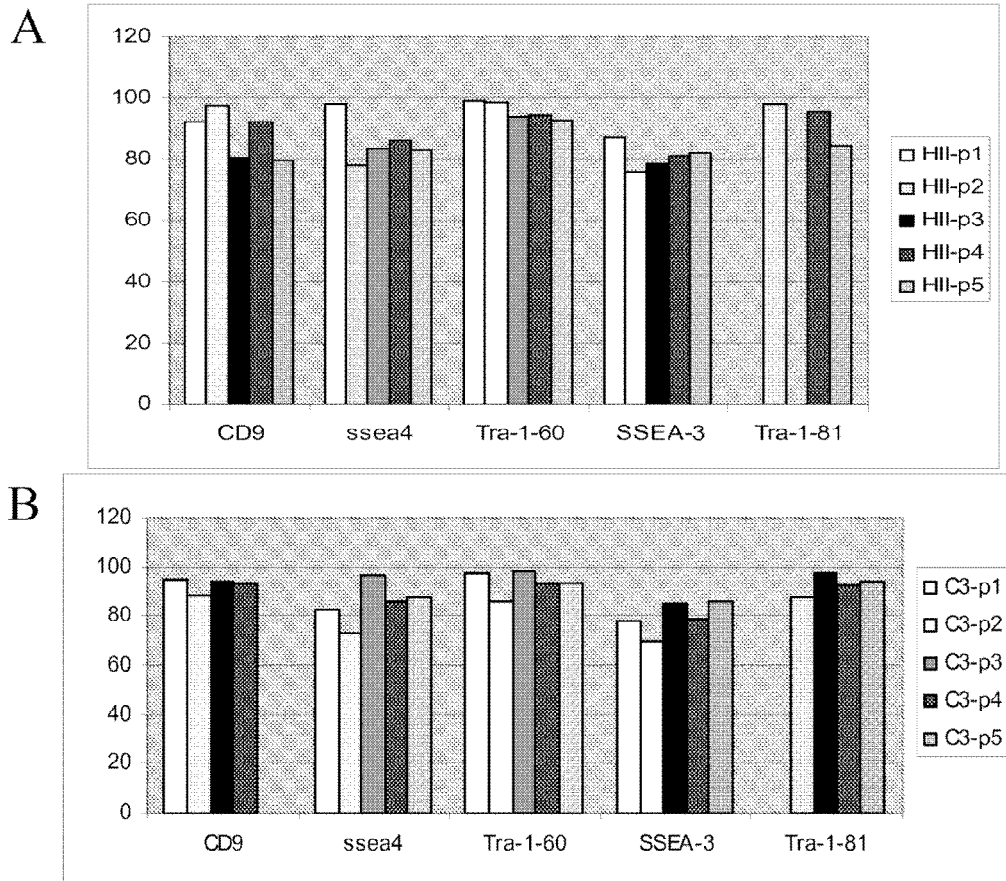


Figura 20

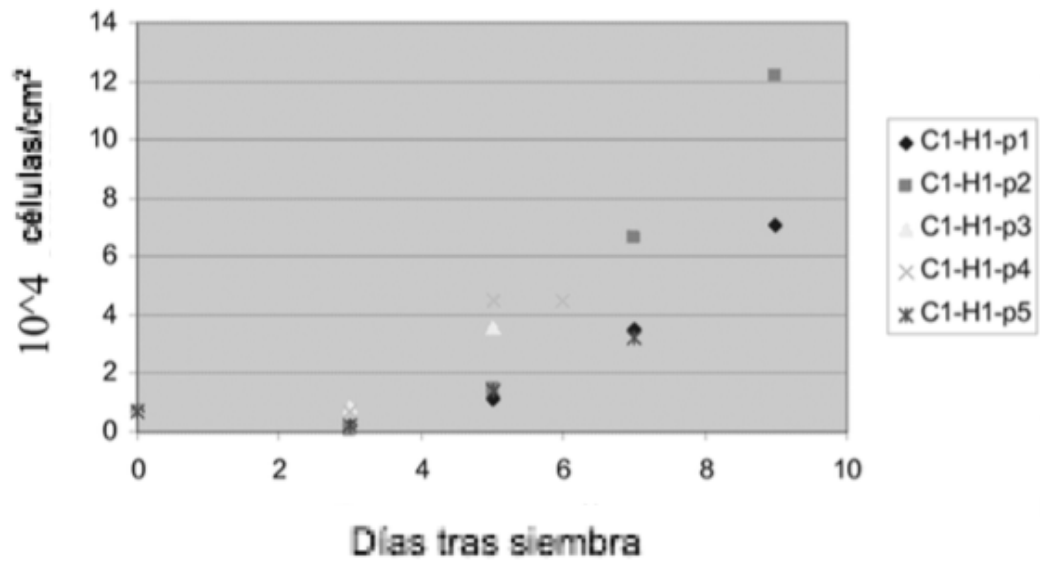


Figura 21

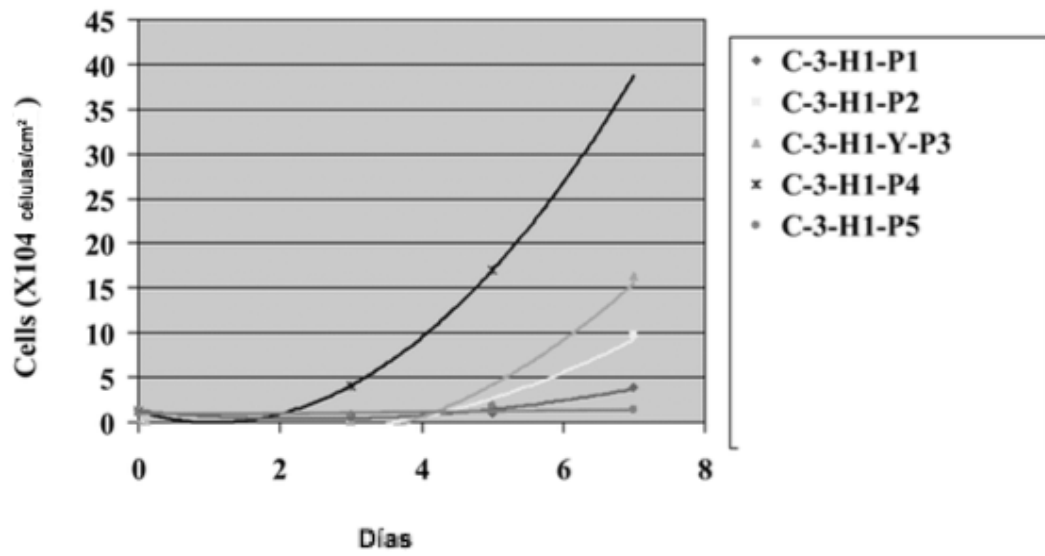


Figura 22

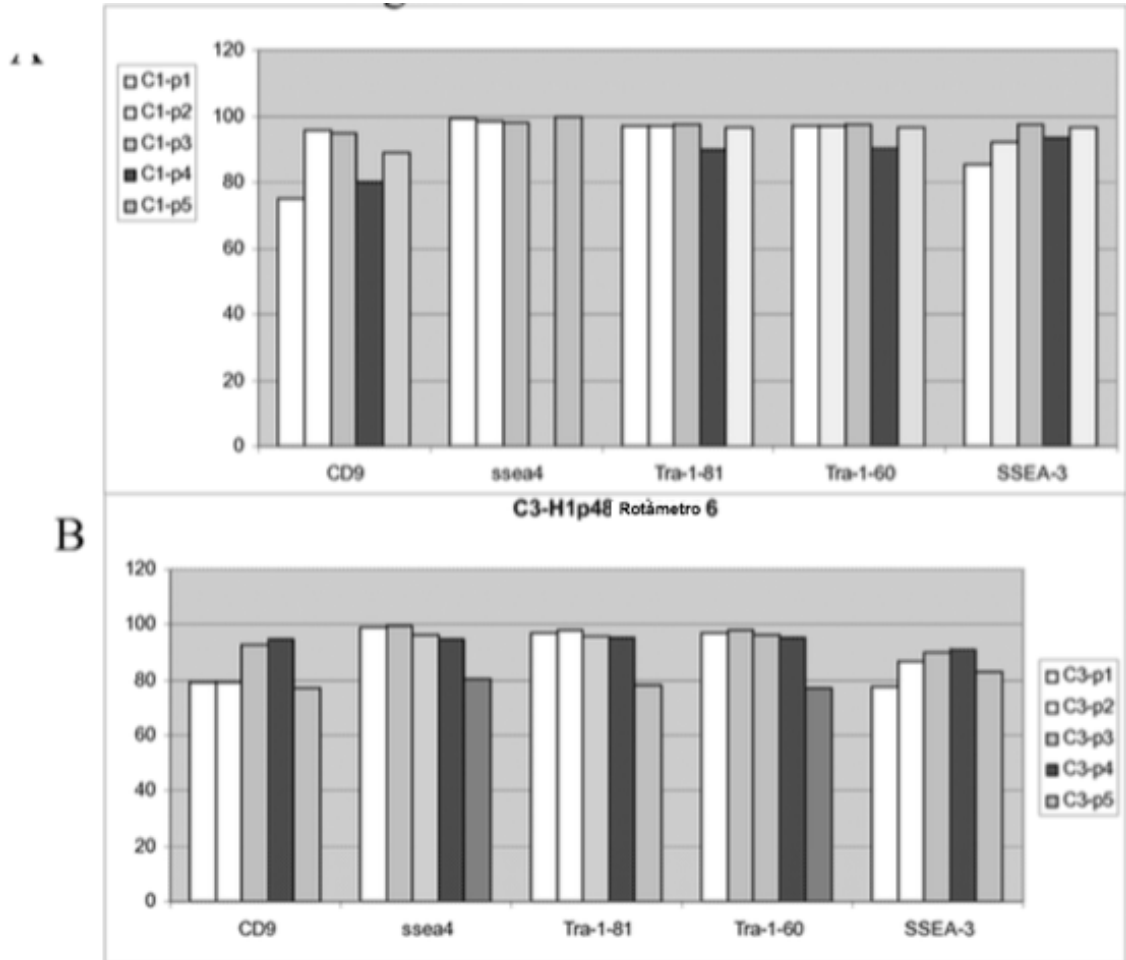


Figura 23

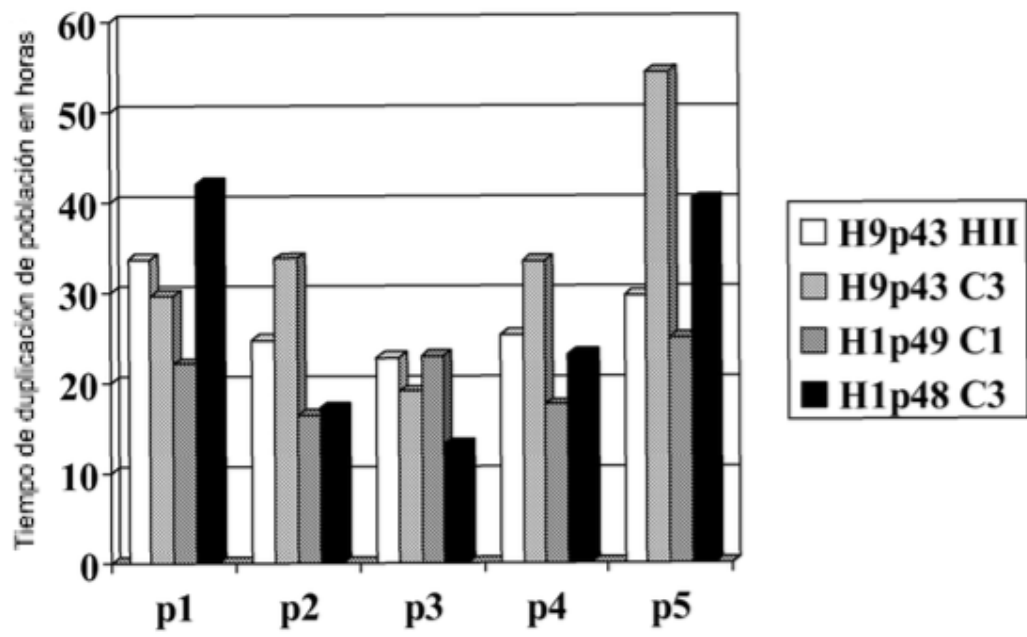


Figura 24

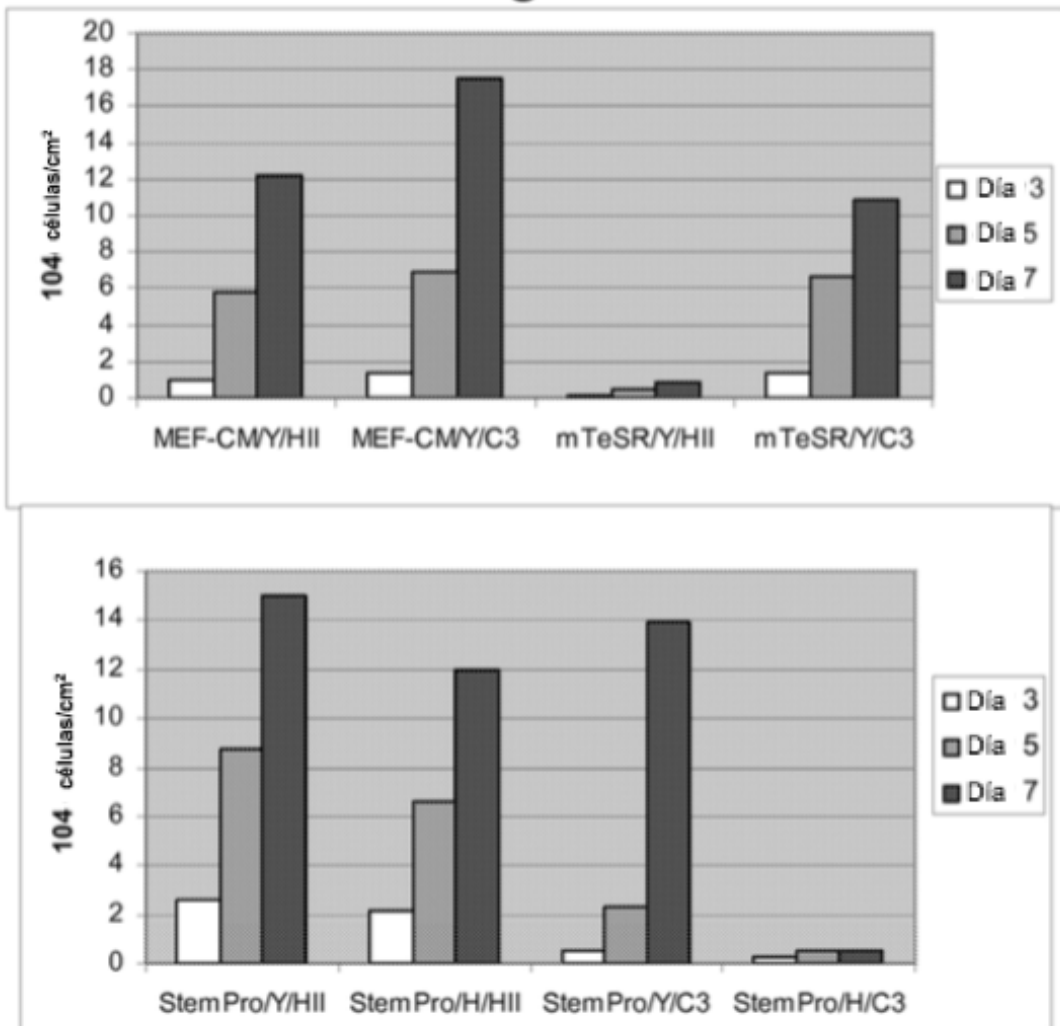


Figura 25

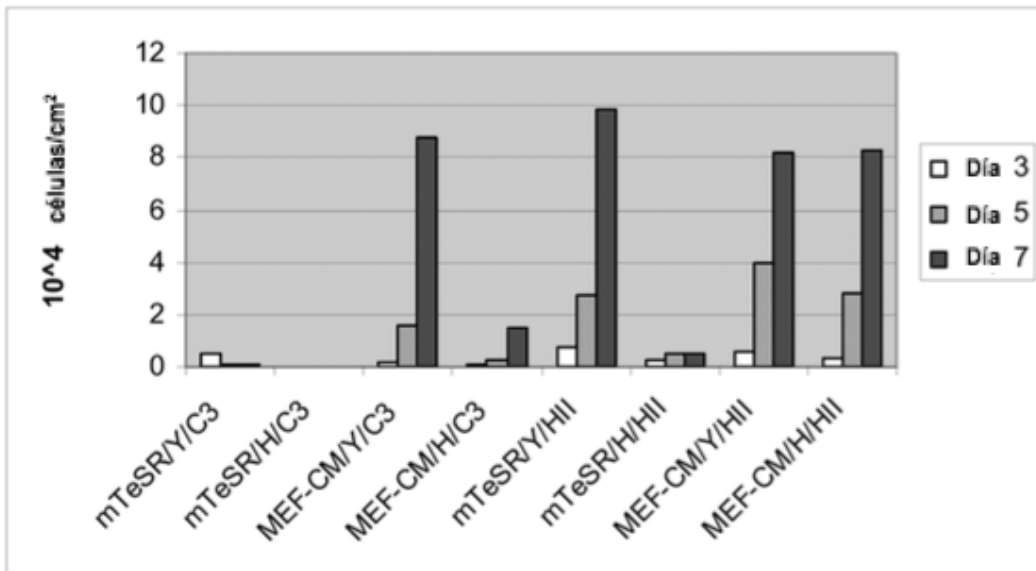
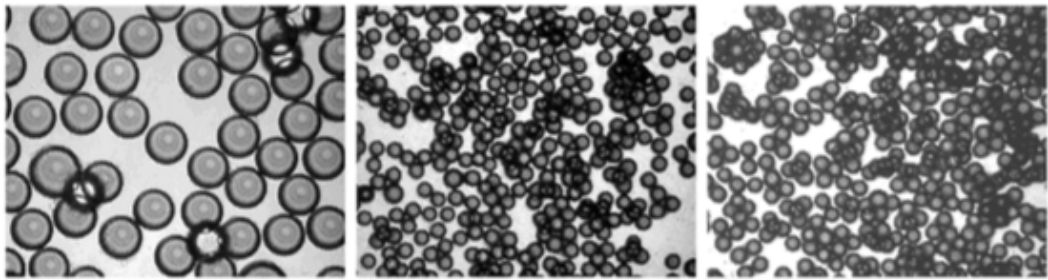
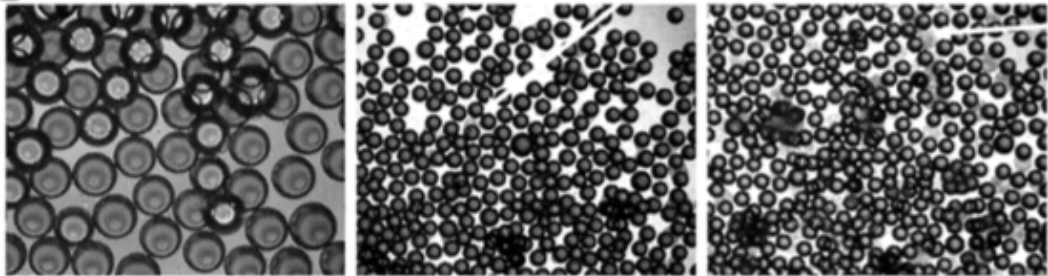


Figura 26

A



B



Día 3

Día 7

Día 9

Figura 27

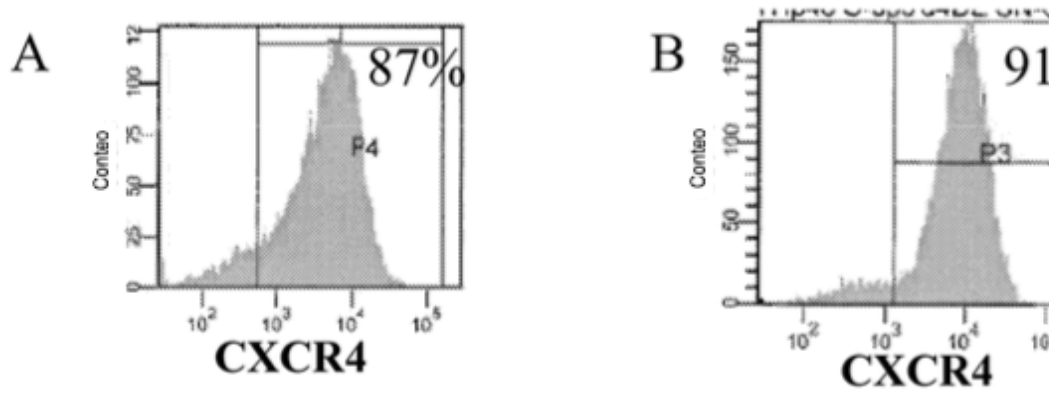


Figura 28

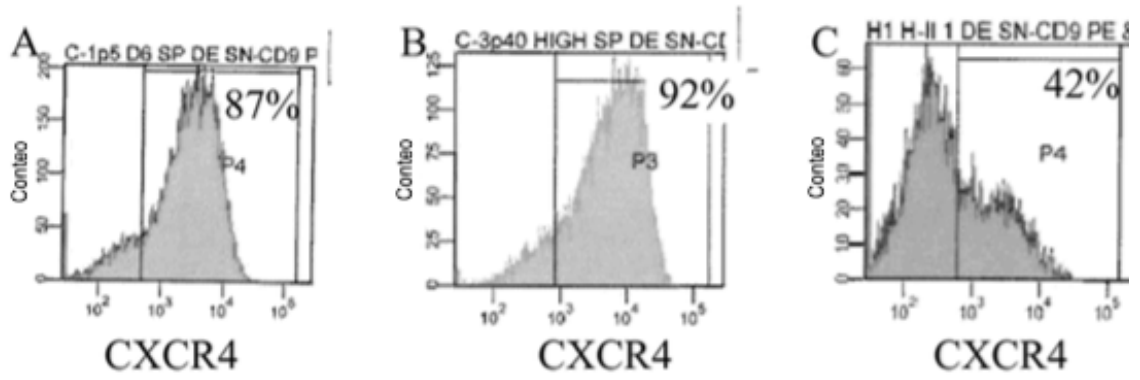


Figura 29

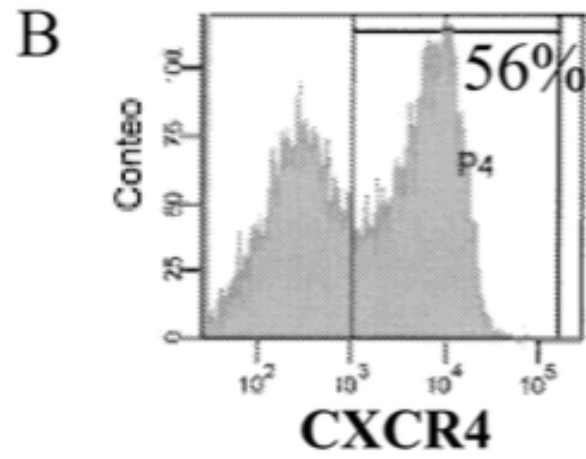
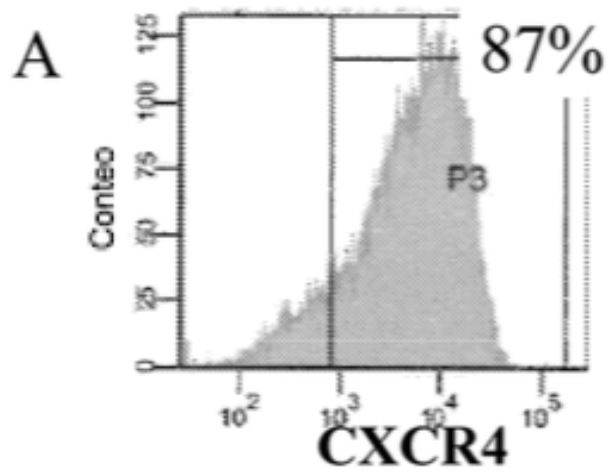


Figura 30

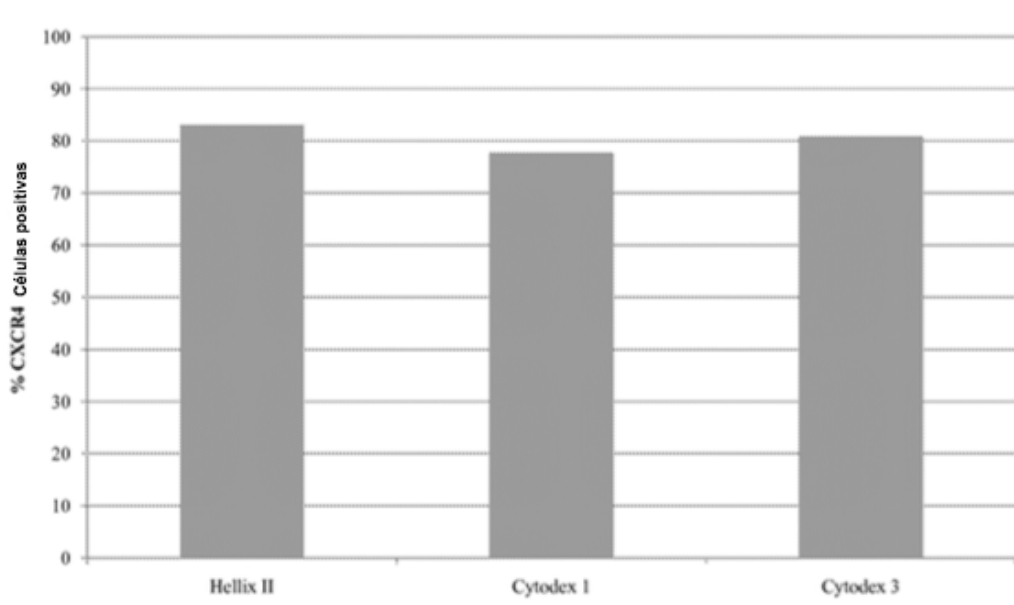


Figura 31

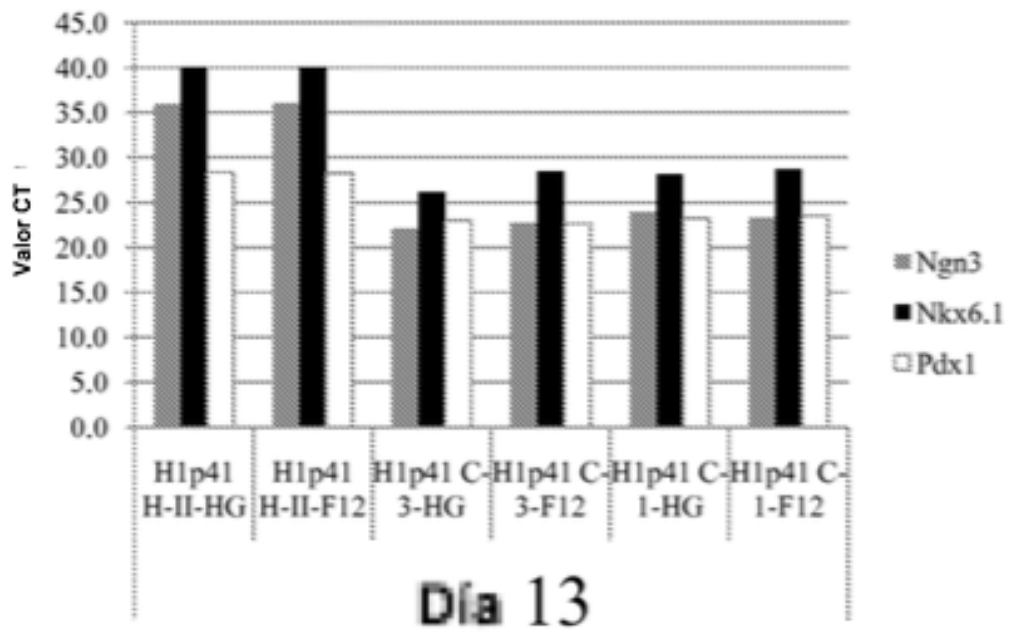


Figura 32

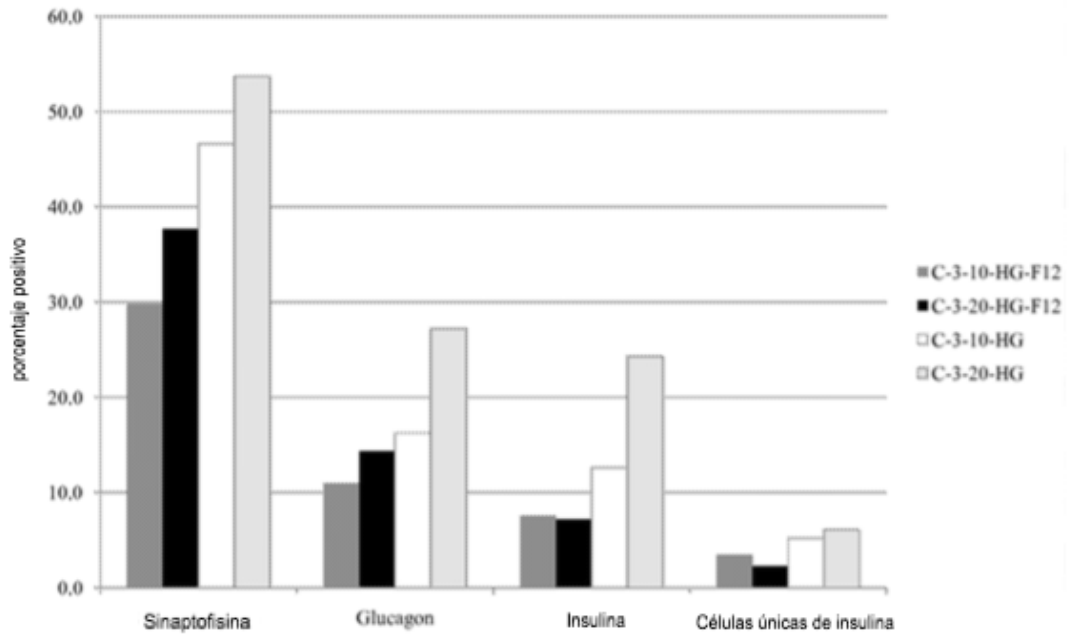


Figura 33

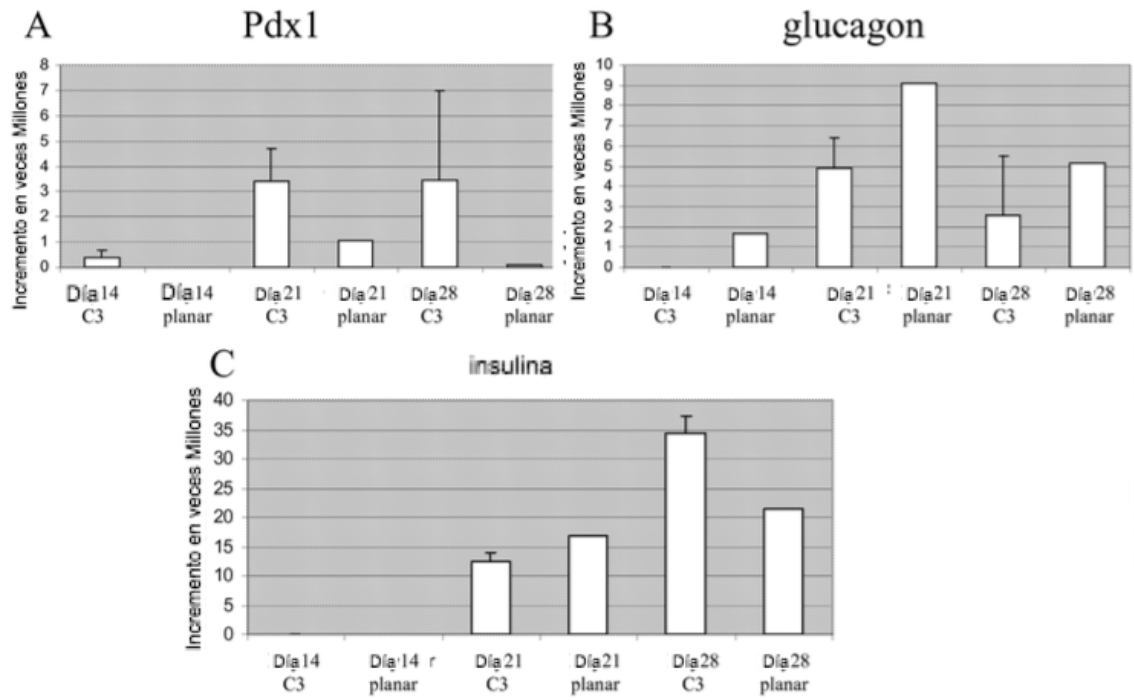


Figura 34

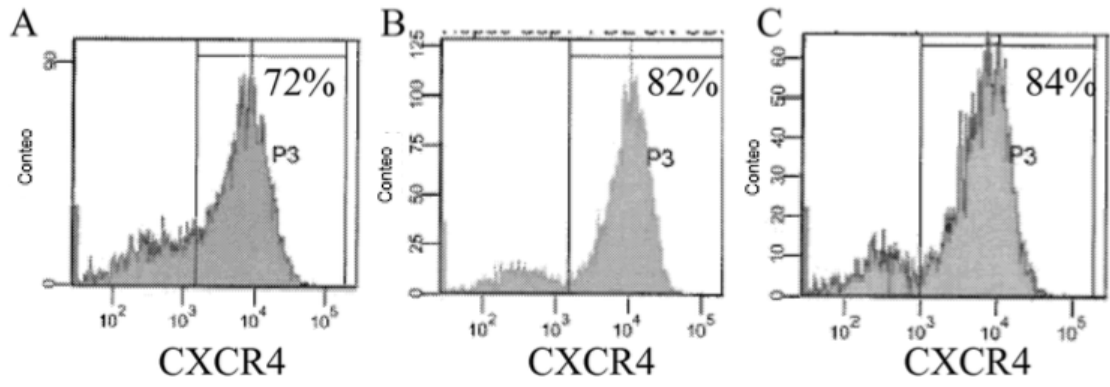


Figura 35

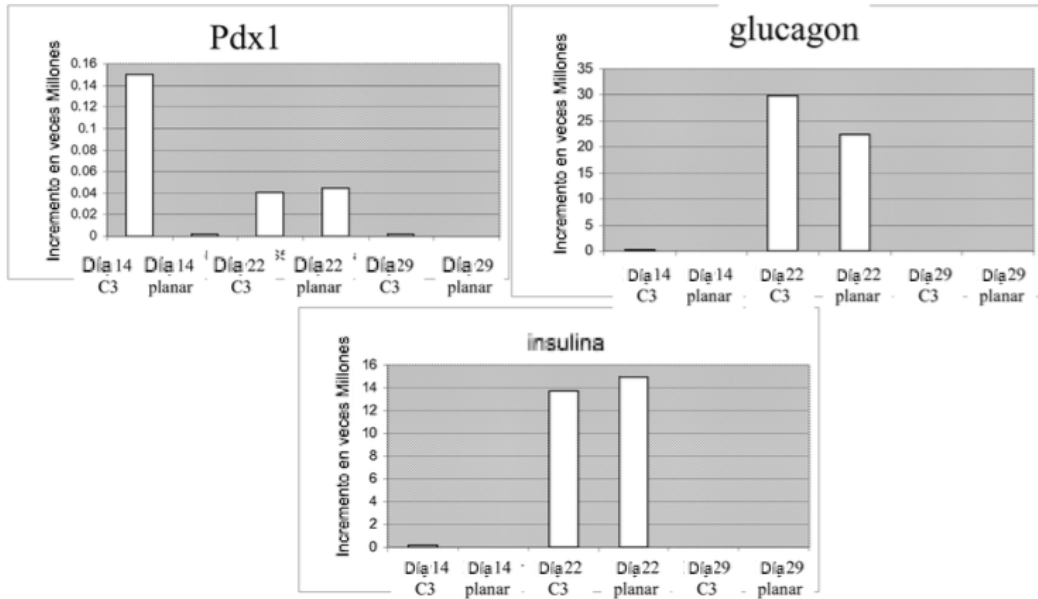


Figura 36

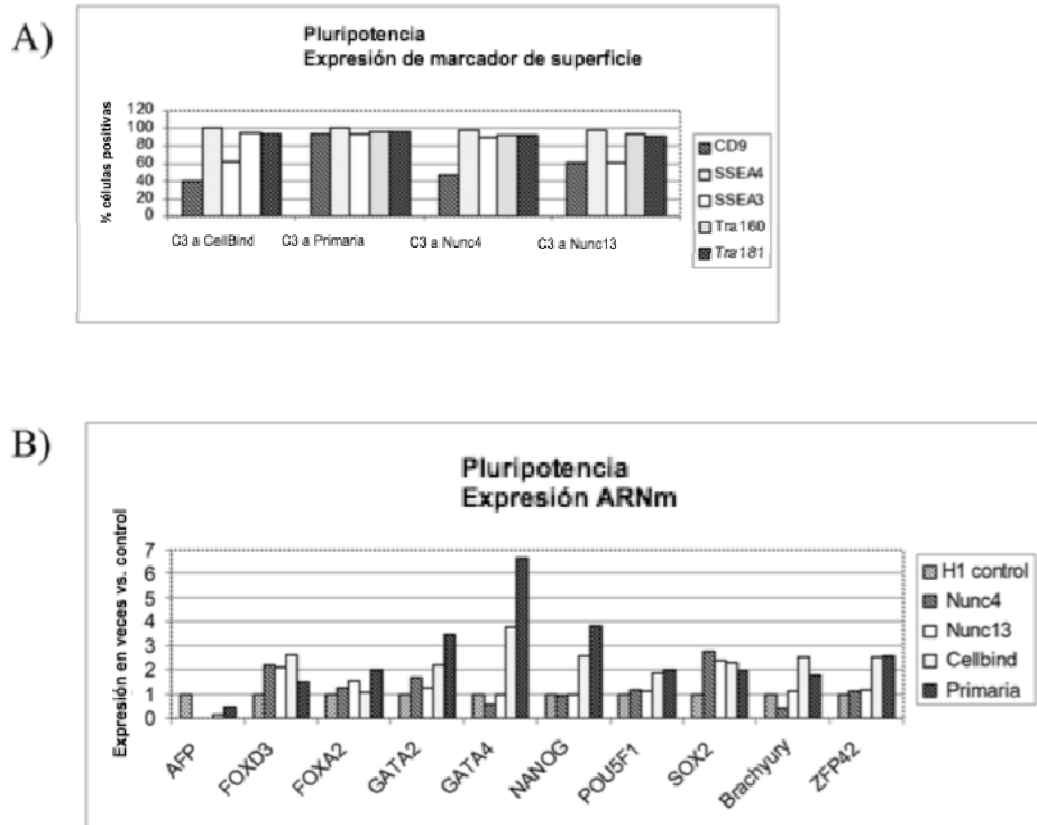


Figura 37

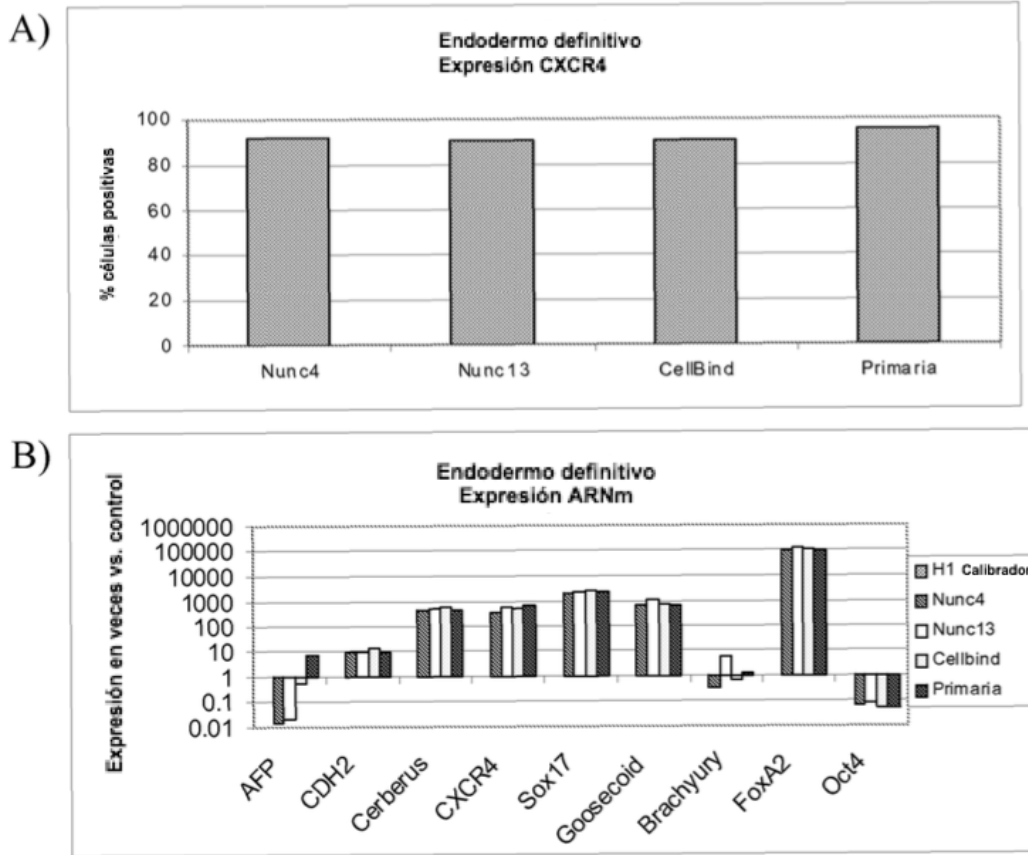


Figura 38

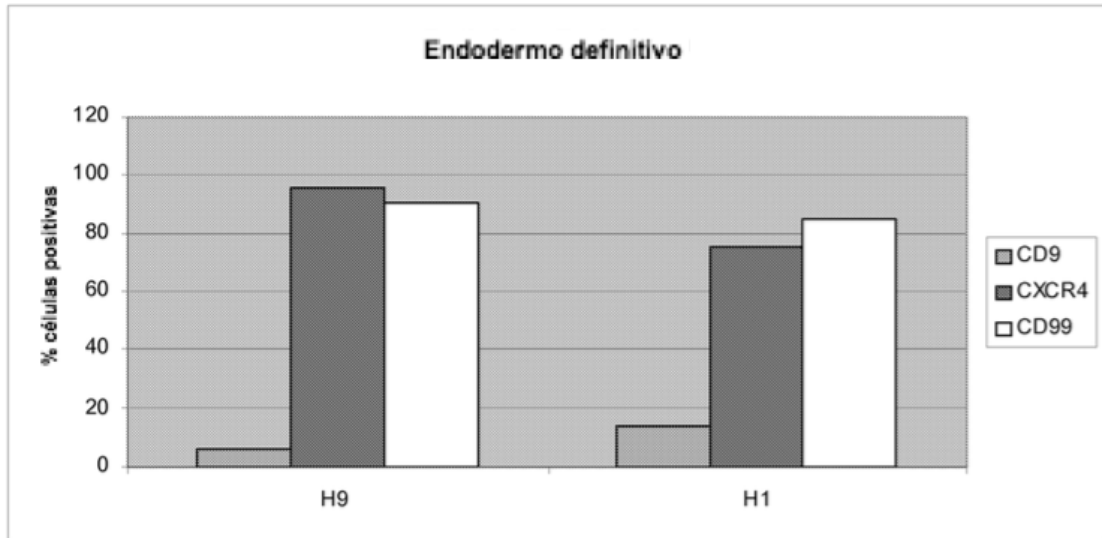


Figura 39

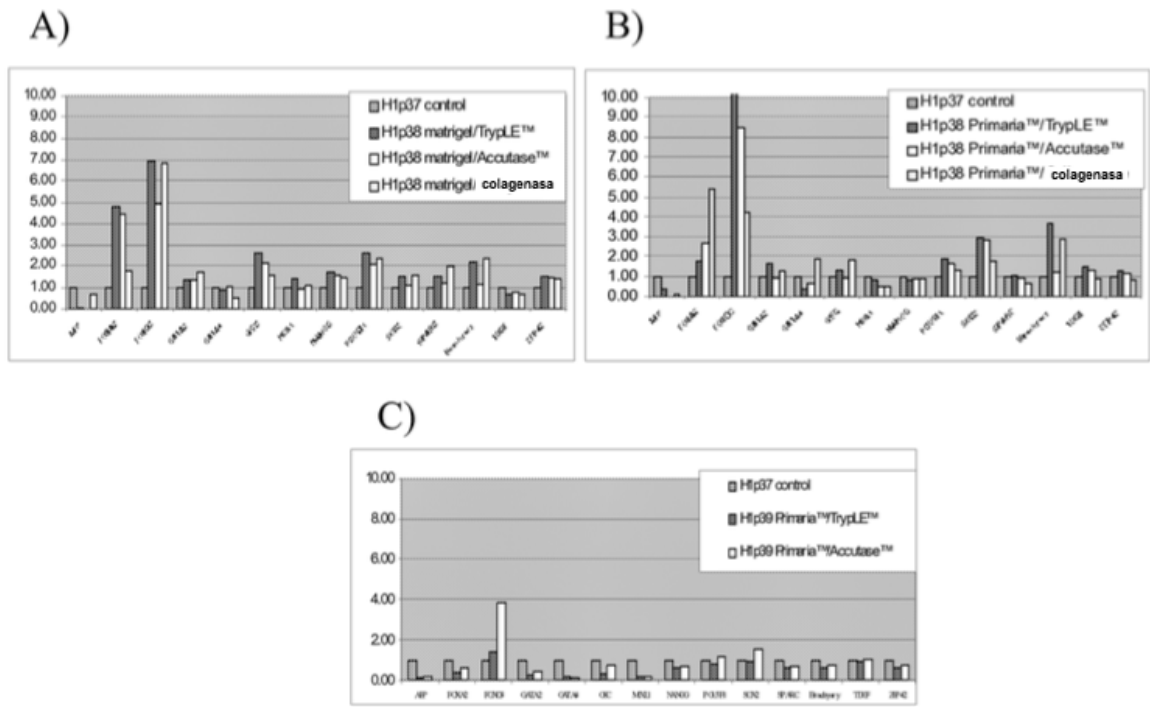


Figura 40

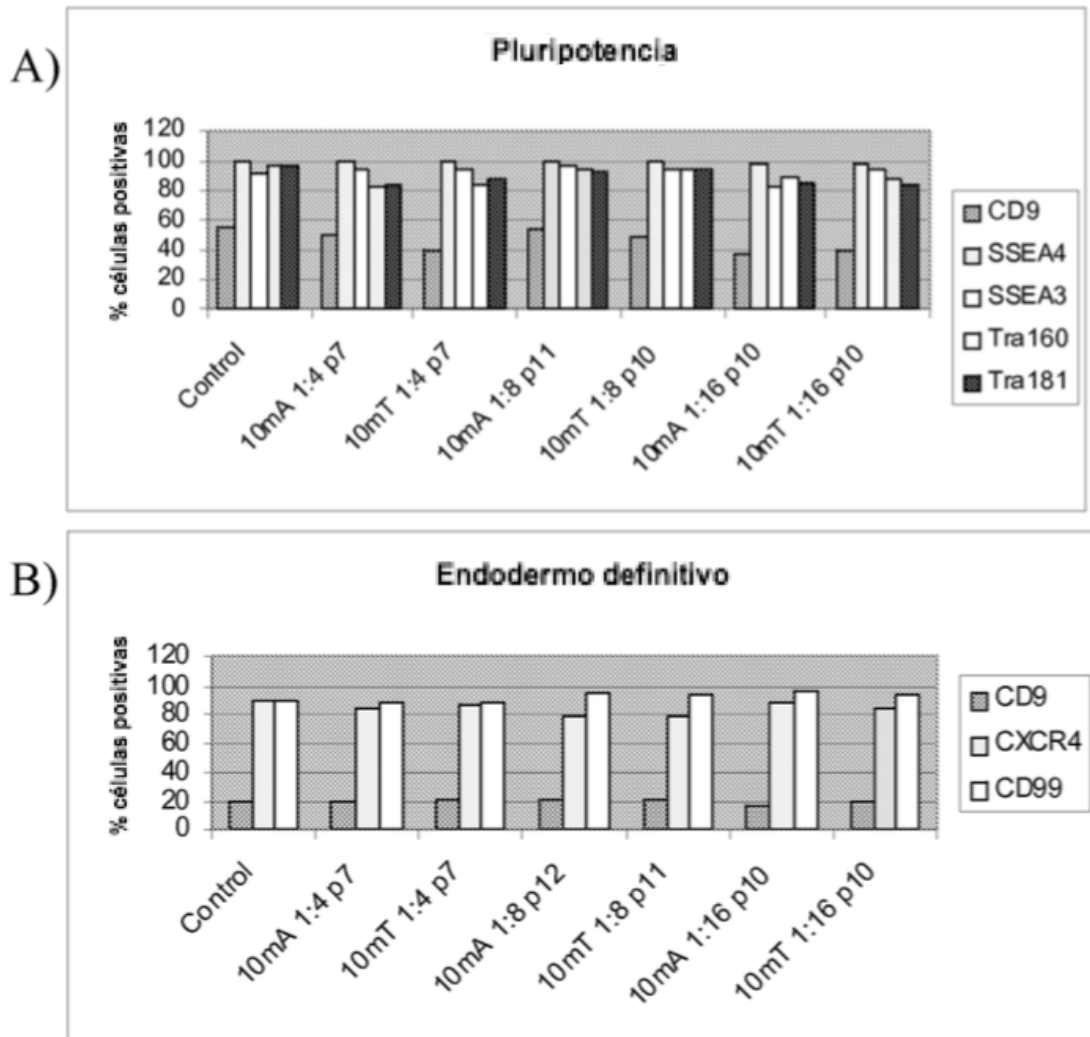


Figura 41

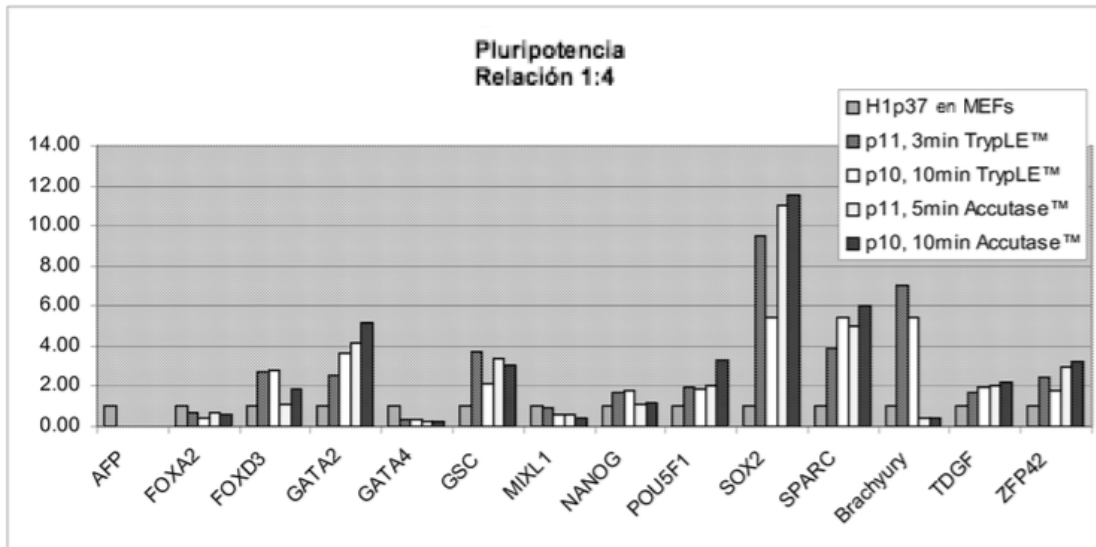


Figura 42

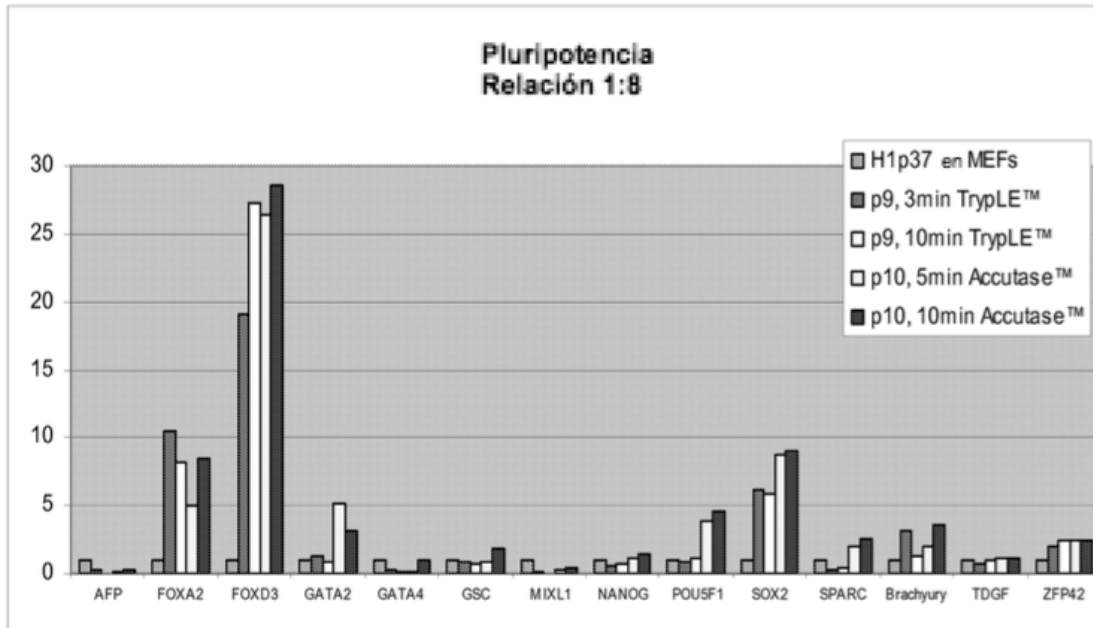


Figura 43

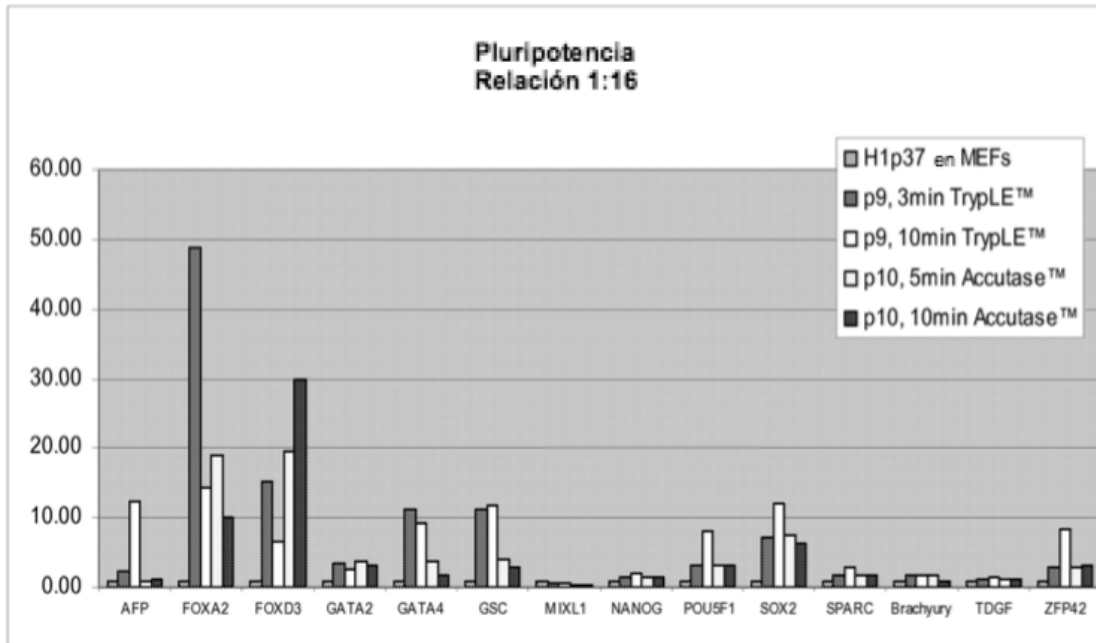


Figura 44

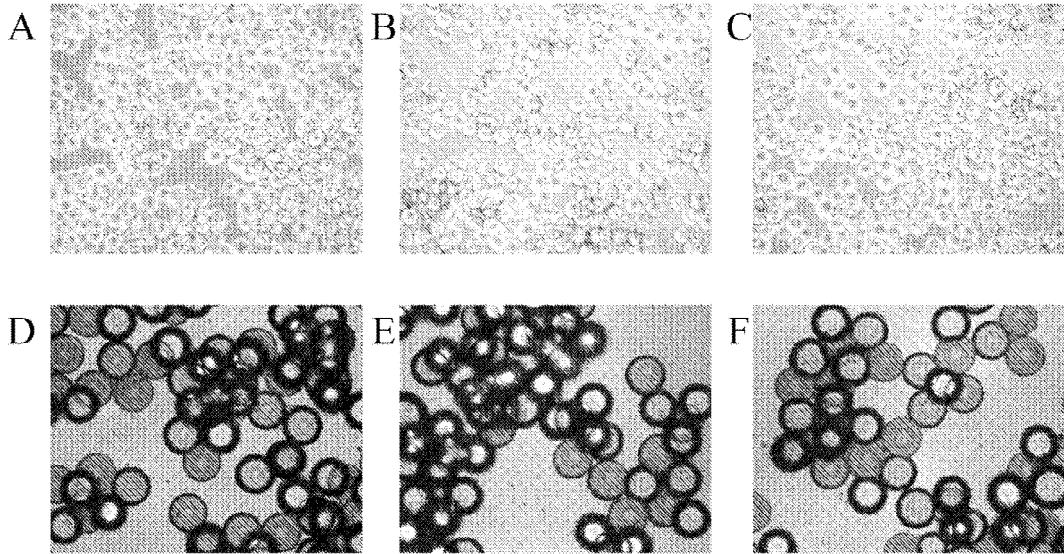


Figura 45

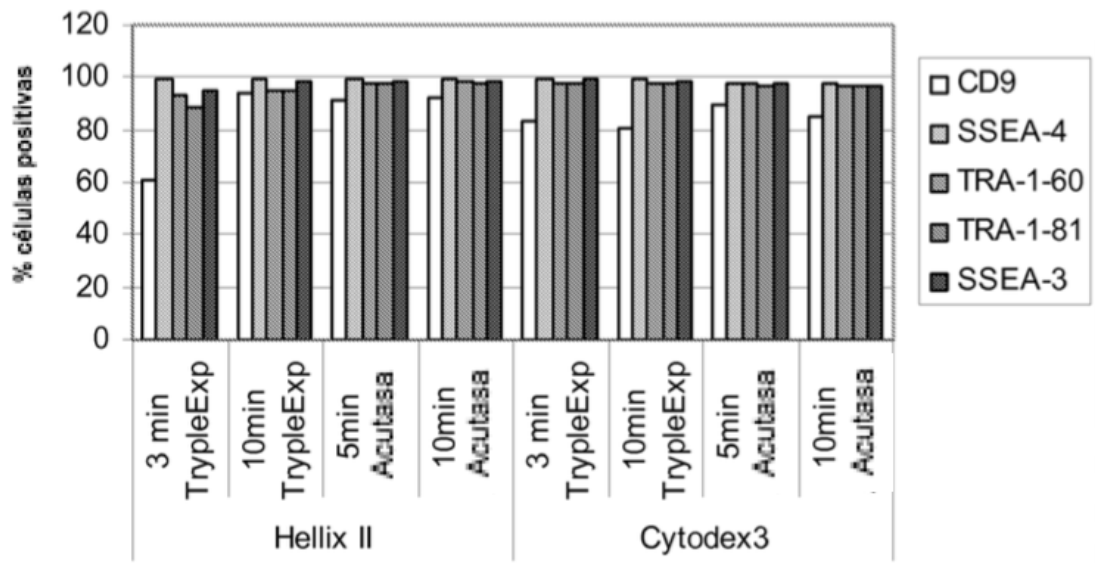


Figura 46

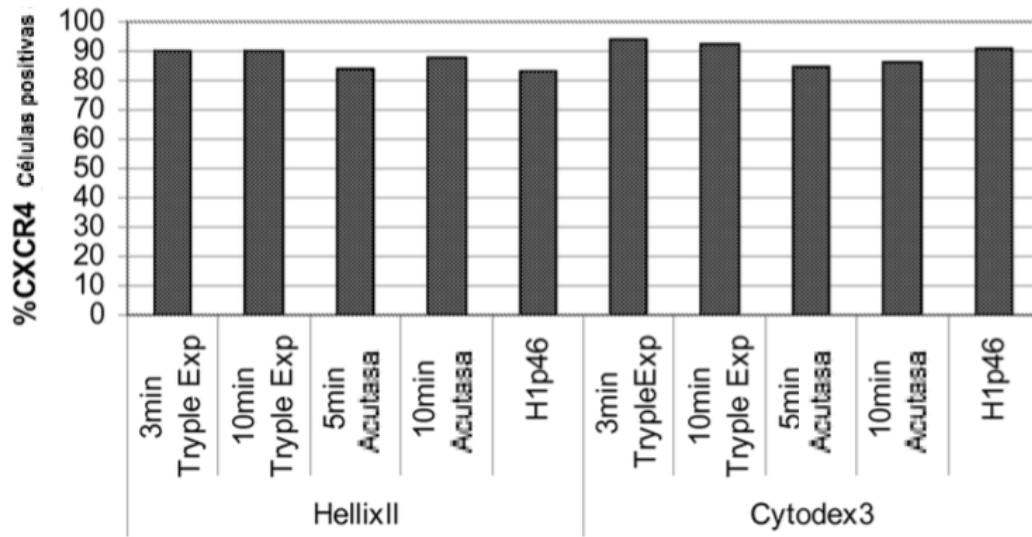


Figura 47

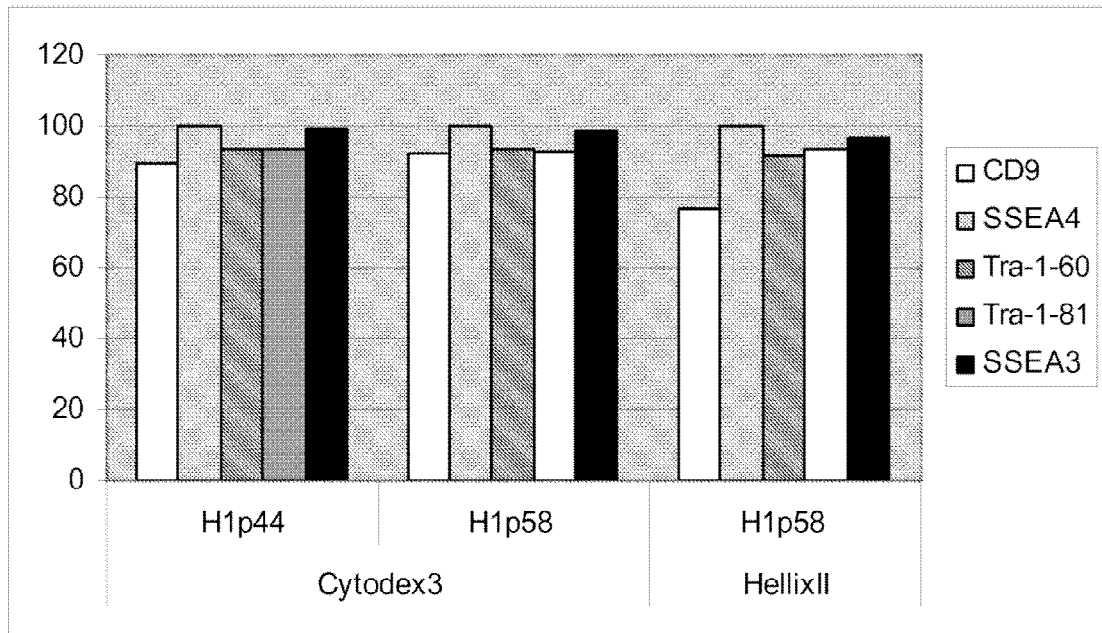


Figura 48

