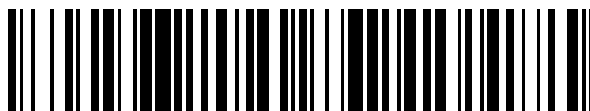


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 393**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2011** **E 14200023 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017** **EP 2853589**

54 Título: **Diferenciación de células madre embrionarias humanas**

30 Prioridad:

31.08.2010 US 378472 P

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

15.03.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

REZANIA, ALIREZA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 659 393 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).

Diferenciación de células madre embrionarias humanas**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención proporciona métodos para promover la diferenciación de células madre pluripotentes en células productoras de insulina. En particular, la presente invención proporciona un método para producir una población de células, en donde más del 85% de las células en la población expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.

ANTECEDENTES

[0002] Los avances en la terapia de células de reemplazo para diabetes mellitus de tipo I y la escasez de islotes trasplantables de Langerhans han centrado el interés en el desarrollo de fuentes de células productoras de insulina, o células β , apropiadas para el injerto. Un enfoque es la generación de células β funcionales de células madre pluripotentes, tales como, por ejemplo, células madre embrionarias.

[0003] En el desarrollo embrionario de los vertebrados, una célula pluripotente da lugar a un grupo de células que comprenden tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) en un proceso conocido como la gastrulación. Los tejidos tales como, por ejemplo, la tiroides, el timo, el páncreas, el intestino y el hígado, se desarrollarán a partir del endodermo, a través de una etapa intermedia. La etapa intermedia en este proceso es la formación de endodermo definitivo. Células de endodermo definitivo expresan un número de marcadores, tales como, HNF3 beta, GATA4, MIXL1, CXCR4 y SOX17.

[0004] La formación del páncreas surge de la diferenciación de endodermo definitivo en endodermo pancreático. Las células del endodermo pancreático expresan el gen homeobox pancreático-duodenal, PDX1. En ausencia de PDX1, el páncreas no logra desarrollarse más allá de la formación de yemas ventral y dorsal. Así, la expresión de PDX1 marca un paso crítico en la organogénesis pancreática. El páncreas maduro contiene, entre otros tipos de células, tejido exocrino y tejido endocrino. Tejidos exocrinos y endocrinos surgen de la diferenciación de endodermo pancreático.

[0005] Las células que llevan las características de las células de los islotes según se informa se han derivado a partir de células embrionarias de ratón. Por ejemplo, Lumelsky et al. (Science 292: 1389, 2001) informan de diferenciación de células madre embrionarias de ratón a estructuras secretoras de insulina similares a los islotes pancreáticos. Soria et al. (Diabetes 49:157, 2000) informan de que las células secretoras de insulina derivadas de células madre embrionarias de ratón normalizan la glucemia en ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina.

[0006] En un ejemplo, Hori et al. (PNAS 99: 16105, 2002) describen como el tratamiento de células madre embrionarias de ratón con inhibidores de fosfoinosítido 3-quinasa (LY294002) produjo células que se asemejaban a células β .

[0007] En otro ejemplo, Blyszczuk et al. (PNAS 100: 998, 2003) informa de la generación de células productoras de insulina a partir de células madre embrionarias de ratón que expresan constitutivamente Pax4.

[0008] Micallef et al. informan que el ácido retinoico puede regular el compromiso de las células madre embrionarias para formar endodermo pancreático positivo para PDX1. El ácido retinoico es más eficaz en la inducción de la expresión de Pdx1 cuando se añade a los cultivos en el día 4 de la diferenciación de células madre embrionarias durante un período correspondiente al final de la gastrulación en el embrión (Diabetes 54: 301, 2005).

[0009] Miyazaki et al. informan de una línea de células madre embrionarias de ratón que sobreexpresan Pdx1. Sus resultados muestran que la expresión de Pdx1 exógeno mejora claramente la expresión de insulina, somatostatina, glucoquinasa, neurogenina3, p48, Pax6, y genes Hnf6 en las células diferenciadas resultantes (Diabetes 53:1030, 2004).

[0010] Skoudy et al. informan de que la activina A (un miembro de la superfamilia de TGF- β) favorece la expresión de genes exocrinos pancreáticos (p48 y amilasa) y genes endocrinos (Pdx1, insulina y glucagón) en células madre embrionarias de ratón. Se observó el efecto máximo utilizando 1 nM de activina A. También observaron que el nivel de expresión de la insulina y ARNm de Pdx1 no se vio afectado por el ácido retinoico; sin embargo, el tratamiento 3 nM FGF7 resultó en un mayor nivel de la transcripción para Pdx1 (Biochem. J. 379: 749, 2004).

[0011] Shiraki et al. estudiaron los efectos de los factores de crecimiento que mejoran específicamente la diferenciación de células madre embrionarias en células positivas para PDX1. Observaron que el TGF- β 2 produjo reproduciblemente una mayor proporción de células positivas para PDX1 (Genes Cells. 2005 Jun; 10(6): 503-16.).

[0012] Gordon et al. demostraron la inducción de células del endodermo brachyury [positivas]/HNF3 beta [positivas]

a partir de células madre embrionarias de ratón en la ausencia de suero y en presencia de activina junto con un inhibidor de la señalización de Wnt (US 2006/0003446A1).

[0013] Gordon *et al.* (PNAS, Vol 103, página 16806, 2006) afirma que "Wnt and TGF-beta/ nodal/ activin signaling simultaneously were required for the generation of the anterior primitive streak".

[0014] Sin embargo, el modelo de ratón de desarrollo de células madre embrionarias puede no exactamente imitar el programa de desarrollo en los mamíferos superiores, tales como, por ejemplo, seres humanos.

[0015] Thomson *et al.* aislaron células madre embrionarias de blastocistos humanos (Science 282: 114, 1998). Al mismo tiempo, Gearhart *et al.* derivaron líneas celulares humanas germinales embrionarias (HEG) de tejido gonadal fetal (Shamblott *et al.*, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 95: 13 726, 1998). A diferencia de las células madre embrionarias de ratón, que pueden ser prevenidas de diferenciarse simplemente mediante el cultivo con Factor Inhibidor de Leucemia (LIF), las células madre embrionarias humanas se deben mantener en condiciones muy especiales (patente de EE.UU. N° 6.200.806; WO 99/20741; WO 01/51616).

[0016] D'Amour *et al.* describe la producción de cultivos enriquecidos de endodermo definitivo derivado de células madre embrionarias humanas en presencia de una alta concentración de la activina y de bajo suero (Nature Biotechnology 2005). El trasplante de estas células bajo la cápsula renal de ratones dio como resultado la diferenciación en células más maduras con características de algunos órganos endodérmicos. Células de endodermo definitivo derivadas de células madre embrionarias humanas pueden diferenciarse adicionalmente en células positivas PDX1 después de la adición de FGF-10 (US 2005/0266554A1).

[0017] D'Amour *et al.* (Nature Biotechnology - 24, 1392-1401 (2006)) establece: "We have developed a differentiation process that converts human embryonic stem (hES) cells to endocrine cells capable of synthesizing the pancreatic hormones insulin, glucagon, somatostatin, pancreatic polypeptide and ghrelin. This process mimics *in vivo* pancreatic organogenesis by directing cells through stages resembling definitive endoderm, gut-tube endoderm, pancreatic endo- derm and endocrine precursor en route to cells that express endocrine hormones".

[0018] En otro ejemplo, Fisk *et al.* informa de un sistema para la producción de células de los islotes pancreáticos de células madre embrionarias humanas (US2006/0040387A1). En este caso, la vía de diferenciación se dividió en tres etapas. Las células madre embrionarias se diferenciaron primero a endodermo usando una combinación de butirato de sodio y activina A. Las células se cultivaron a continuación con antagonistas TGF- β tales como Noggin en combinación con EGF o betacelulina para generar células positivas PDX1. La diferenciación terminal se indujo mediante nicotinamida.

[0019] El documento WO 2007/143193 describe un método para la generación de endodermo definitivo y células endodérmicas pancreáticas a partir de células madre utilizando medios definidos en ausencia de células alimentadoras.

[0020] El documento WO 2009/154606 describe métodos para generar células endodérmicas de tipo linaje derivadas de células pluripotentes humanas, tales como células madre embrionarias humanas, mediante el uso de diversos agentes, incluyendo GDF8, GDF-11 e inhibidores de GSK-3 β .

[0021] Todavía existe una necesidad significativa para desarrollar métodos *in vitro* para generar una célula funcional que expresa insulina que se asemejan más a una célula β . La presente invención toma un enfoque alternativo para mejorar la eficiencia de diferenciación de las células madre embrionarias humanas hacia las células que expresan insulina, mediante la generación de una población de células en la que más del 85% de las células en la población expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.

RESUMEN

[0022] La invención proporciona un método para generar una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo, que comprende las etapas de:

a. el cultivo de una población de células madre pluripotentes humanas,

b. la diferenciación de la población de células madre pluripotentes humanas a una población de células que expresan marcadores característicos de linaje endodérmico definitivo en suero carente de medio y suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1, en el que el medio es complementado adicionalmente con GDF-8 y 14-Prop-2-en-1-ilo-3,5,7,14,17,23,27-heptaazatetracilo-[19.3.1.1~2,6~.0,1~8,12~] heptacosa-1(25),2(27),3,5,8 (26),9,11,21,23-nonaen-16-ona.

[0023] En una realización, la presente divulgación proporciona una población de células, en donde más del 85% de las células en la población expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.

[0024] En una realización, las poblaciones de células madre pluripotentes se diferencian en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en medio suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1. En una realización de la divulgación, la diferenciación de la población de células madre pluripotentes hacia una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se consigue por tratamiento de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt.

[0025] En una realización, la diferenciación de la población de células madre pluripotentes hacia una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se consigue mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes con GDF-8 y al menos un otro factor es seleccionado de entre el grupo que consiste en: una anilina-piridinotriazina, una anilina-piridinotriazina cíclica, N- {[1-(fenilmetilo)azepan-4-ilo]metilo}-2-piridina-3-ilacetamida, 4-[[4-(4-[[2-(piridina-2-ilamino)etilo]amino)-1,3,5-triazina-2-ilo]piridina-2-ilo]oxilbutan-1-ol, 3-([3-[4-([2-[metilo(piridina-2-ilo)amino]etilo]amino)-1,3,5-triazina-2-ilo]piridina-2-ilo]amino]propan-1-ol, N~4~[2-(3-fluorofenilo)etilo]-N~2~-[3-(4-metilpiperazina-1-ilo)propilo]pirido[2,3-d]pirimidina-2,4-diamina, 1-metilo-N-[[4-piridina-3-ilo-2-[[3-(trifluorometilo)fenilo]amino]-1,3-tiazol-5-ilo]metilo]piperidina-4-carboxamida, 1,1-dimetiletilo {2-[4-([5-[3-(3-hidroxipropilo)fenilo]-4H-1,2,4-triazol-3-ilo]amino)fenilo]etilo}carbamato, 1,1-dimetiletilo {[3-([5-[5-(3-hidroxipropilo)-2-(metiloxi)fenilo]-1,3-oxazol-2-ilo]amino)fenilo]metilo}carbamato, 1-([5-[6-([4-([4-metilpiperazina-1-ilo)sulfonilo]fenilo]amino)pirazina-2-ilo]tiofen-2-ilo]metilo]piperidina-4-ol, 1-([4-[6-([4-([4-metilpiperazina-1-ilo)sulfonilo]fenilo]amino)pirazina-2-ilo]tiofen-2-ilo]metilo]piperidina-4-carboxamida, y 2-[[4-(1-metiletilo)fenilo]amino]N-(2-tiofen-2-iletilo)-7,8-dihidropirido[4,3-d]pirimidina-6(5H)-carboxamida.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0026]

La Figura 1 muestra el análisis PCR en tiempo real de la expresión de los genes indicados en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciadas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1.

La Figura 2 muestra el análisis FACS de la expresión de las proteínas indicadas en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciadas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1.

La Figura 3 muestra el análisis en tiempo real PCR de la expresión de los genes indicados en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciadas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 2.

La Figura 4 muestra la expresión de SOX17 a través de inmunofluorescencia en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciadas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 2.

La Figura 5 muestra el análisis FACS de la expresión de las proteínas indicadas en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciadas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 2.

La Figura 6 muestra el análisis en tiempo real PCR de la expresión de los genes indicados en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciadas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 3.

La Figura 7 muestra la expresión de SOX17 a través de inmunofluorescencia en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciadas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 3.

La Figura 8 muestra la expresión de SOX17 a través de inmunofluorescencia en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciadas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 3.

La Figura 9 muestra el análisis en tiempo real PCR de la expresión de los genes indicados en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1, diferenciadas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 5.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0027] Para mayor claridad de descripción, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las siguiente subsecciones que describen o ilustran ciertas características, realizaciones o aplicaciones de la presente invención.

Definiciones

[0028] Las células madre son células no diferenciadas definidas por su capacidad en el nivel de células individuales tanto para auto-renovarse como diferenciarse para producir células de la progenie, incluyendo progenitores de auto-

renovación, progenitores no de auto-renovación, y células diferenciadas terminalmente. 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, los tejidos después de la inyección en blastocistos.

[0029] 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, lo que significa capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias; (3) multipotentes, que significa capaces de dar lugar a un subconjunto de los linajes de células pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir una progenie que incluyen HSC (auto-renovación), progenitores oligopotentes restringidos por glóbulos, y todos los tipos celulares y elementos (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre); (4) oligopotentes, que significa capaces de dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes de células que las células madre multipotentes; y (5) unipotentes, que significa capaces de dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre de espermatogénesis).

[0030] 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 la diferenciación inducida es una que ha adoptado 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 a un punto en el que, en circunstancias normales, continuará para diferenciarse en un tipo celular específico o un subconjunto de tipos de células, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o volver a un tipo de células menos diferenciadas. Desdiferenciación se refiere al proceso por el cual una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Tal como se usa en el presente documento, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir, las células de las que procedía y a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula coloca la célula dentro de un esquema hereditario del desarrollo y la diferenciación. Un marcador de linaje específico se refiere a una característica asociada específicamente con el fenotipo de las células de un linaje de interés y se puede utilizar para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida con el linaje de interés.

[0031] "Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo", o "células de etapa 1", o "Etapa 1", como se usa en el presente documento, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX17, GATA4, HNF3beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteínas homeobox de tipo mezcla, FGF4 CD48, eomesodermina (Eomes), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99, o OTX2. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo incluyen células precursoras de línea primitiva, células de línea primitiva, células mesendodérmicas y células endodérmicas definitivas.

[0032] "Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático", como se usa aquí, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: PDX1, NKX6.1, HNF1 beta, PTF1 alfa, HNF6, HNF4 alfa, SOX9, HB9 o PROX1. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático incluyen células pancreáticas endodérmicas, células tubulares de intestino primitivo, y células del intestino anterior posterior.

[0033] "Endodermo definitivo", como se usa en el presente documento, se refiere a células que tienen las características de las células derivadas del epiblasto durante la gastrulación y que forman el tracto gastrointestinal y sus derivados. Células endodérmicas definitivas expresan los siguientes marcadores: beta HNF3, GATA4, SOX17, Cerberus, OTX2, gooseoid, C-Kit, CD99, y MIXL1.

[0034] "Marcadores", como se usa en el presente documento, son el ácido nucleico o moléculas polipeptídicas 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 ácido nucleico marcador 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.

[0035] "Célula pancreática endocrina", o "célula que expresa hormona pancreática", o "células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula capaz de expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

Aislamiento, expansión y cultivo de células madre pluripotentes

Caracterización de células madre pluripotentes

[0036] 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 los anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81 (Thomson et al., Science 282 : 1145, 1998). La diferenciación de células madre pluripotentes *in vitro* da como resultado la pérdida de expresión de SSEA-4, Tra 1-60 y Tra 1-81 (si está presente) y aumento de la expresión de SSEA-1. 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 expresan típicamente OCT4 y de TERT, según lo detectado mediante RT-PCR.

[0037] 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 pluripotentes puede ser confirmada, por ejemplo, mediante la inyección de células en ratones inmunodeficientes combinados severos (SCID), fijando los teratomas que se forman usando 4% de paraformaldehído, y después de examinarlos 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.

[0038] Las líneas de células madre pluripotentes pueden ser reproducidas por cariotipo utilizando una técnica de bandedo G estándar y se compararon con cariotipos publicados de las especies de primates correspondientes. Es deseable obtener células que tienen un "cariotipo normal", lo que significa que las células son euploides, con lo que todos los cromosomas humanos están presentes y no notablemente alterados.

Fuentes de células madre pluripotentes

[0039] Los ejemplos de células madre pluripotentes son líneas establecidas de células madre embrionarias humanas o células germinales embrionarias humanas, tales como, por ejemplo las líneas de células madre embrionarias humanas H1, H7 y H9 (WiCell). También se contempla 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 líneas mutantes humanas de células madre embrionarias, tales como, por ejemplo, la línea celular de referencia BG01V (BresaGen, Athens, GA).

Cultivo de células madre pluripotentes

[0040] En una realización, las células madre pluripotentes se cultivan en una capa de células alimentadoras que apoyan las células madre pluripotentes de diversas maneras. Alternativamente, las células madre pluripotentes se cultivan en un sistema de cultivo que está esencialmente libre de células alimentadoras, pero no obstante apoya la proliferación de células madre pluripotentes sin sufrir diferenciación sustancial. El crecimiento de las células madre pluripotentes en cultivo libre de alimentador sin diferenciación admite el uso de un medio acondicionado mediante el cultivo previamente con otro tipo de célula. Alternativamente, el crecimiento de las células madre pluripotentes en cultivo libre de alimentador sin diferenciación se apoya mediante el uso de un medio químicamente definido.

[0041] En una realización, las células madre pluripotentes pueden ser cultivadas en una capa embrionaria de células alimentadoras de fibroblastos de ratón de acuerdo con los métodos descritos en Reubinoff et al (Nature Biotechnology 18: 399-404 (2000)). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en una capa embrionaria de células alimentadoras de fibroblastos de ratón de acuerdo con los métodos descritos en Thompson et al (Science 6 Noviembre de 1998: Vol 282. nº 5391, pp. 1145-1147). Alternativamente, las células madre pluripotentes se pueden cultivar en cualquiera de las capas de células de alimentación descritas en Richards et al, (Stem Cells 21: 546-556, 2003).

[0042] En una realización, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en una capa de células de alimentación humana de acuerdo con los métodos descritos en Wang et al (Stem Cells 23:1221-1227, 2005). En una realización alternativa, las células madre pluripotentes pueden ser cultivadas sobre la capa de células de alimentación humana descritas en Stojkovic et al (Stem Cells 2005 23:306-314, 2005). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden ser cultivadas sobre la capa de células de alimentación humana descritas en Miyamoto et al (Stem Cells 22: 433-440, 2004). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden ser cultivadas sobre la capa de células de alimentación humana descritas en Amit et al (Biol Reprod. 68: 2150-2156, 2003). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden ser cultivadas sobre la capa de células de alimentación humana descritas en Inzunza et al (Stem Cells 23: 544-549, 2005).

[0043] En una realización, las células madre pluripotentes se pueden cultivar en medios de cultivo derivados de acuerdo con los métodos descritos en US20020072117. Alternativamente, las células madre pluripotentes se pueden cultivar en medios de cultivo derivados de acuerdo con los métodos descritos en US6642048. Alternativamente, las células madre pluripotentes se pueden cultivar en medios de cultivo derivados de acuerdo con los métodos descritos en WO2005014799. Alternativamente, las células madre pluripotentes se pueden cultivar en medios de cultivo derivados de acuerdo con los métodos descritos en Xu et al (Stem Cells 22: 972-980, 2004).

Alternativamente, las células madre pluripotentes se pueden cultivar en medios de cultivo derivados de acuerdo con los métodos descritos en US20070010011. Alternativamente, las células madre pluripotentes se pueden cultivar en medios de cultivo derivados de acuerdo con los métodos descritos en US20050233446. Alternativamente, las células madre pluripotentes se pueden cultivar en medios de cultivo derivados de acuerdo con los métodos descritos en US6800480. Alternativamente, las células madre pluripotentes se pueden cultivar en medios de cultivo derivados de acuerdo con los métodos descritos en WO2005065354.

[0044] En una realización, las células madre pluripotentes se pueden cultivar de acuerdo con los métodos descritos en Cheon et al (BioReprod DOI: 10.1095/biolreprod 105,046870, 19 de octubre, 2005). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos descritos en Levenstein et al (Stem Cells 24: 568-574, 2006). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos descritos en US20050148070. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos descritos en US20050244962. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos descritos en WO2005086845.

[0045] Las células madre pluripotentes se pueden sembrar sobre un sustrato de cultivo adecuado. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es un componente de la matriz extracelular, tal como, por ejemplo, aquellos derivados de membrana basal o que pueden formar parte de acoplamiento de receptor-ligando de moléculas de adhesión. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es MATRIGEL® (Becton Dickinson). MATRIGEL® es una preparación soluble a partir de células tumorales Engelbreth-Holm Swarm que se gelifica a temperatura ambiente para formar una membrana basal reconstituida.

[0046] Otros componentes de la matriz extracelular y el componente de mezcla son adecuados como alternativa. Dependiendo del tipo de célula que se está proliferando, esto puede incluir la laminina, fibronectina, proteoglicanos, entactina, heparán sulfato, y similares, solos o en varias combinaciones.

[0047] Las células madre pluripotentes se pueden sembrar en el sustrato en una distribución adecuada y en presencia de un medio que promueve la supervivencia celular, propagación, y la retención de las características deseables. Todas estas características se benefician de una cuidadosa atención a la distribución de la siembra y se pueden determinar fácilmente por un experto en la técnica.

[0048] Medios de cultivo adecuados pueden estar hechos de los siguientes componentes, tales como, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Gibco # 11965-092; Medio de Knockout Dulbecco modificado de Eagle (KO DMEM), Gibco n° 10829-018; F12 de Ham/50% de medio basal DMEM; 200 mM de L-glutamina, Gibco n° 15039-027; solución de aminoácidos no esencial, Gibco 11140-050; (β-mercaptoetanol, Sigma n° M7522; factor básico recombinante humano de crecimiento de fibroblastos (bFGF), Gibco n° 13256-029.

Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodermo definitivo de las células madre pluripotentes

[0049] La presente invención proporciona métodos para la formación de poblaciones de células que expresan marcadores característicos de linaje endodérmico definitivo a partir de poblaciones de células madre pluripotentes. En una realización, la presente invención proporciona métodos para diferenciar aún más las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en células que expresan marcadores del linaje endocrino pancreático. En una realización, esto se consigue utilizando un protocolo de diferenciación paso a paso, en el que las poblaciones de células madre pluripotentes se diferencian primero en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. A continuación, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo entonces se diferencian en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático. A continuación, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos de linaje endodérmico pancreático entonces se diferencian en poblaciones de células que expresan marcadores característicos de linaje endocrino pancreático.

[0050] La presente divulgación proporciona una población de células en la que más del 85% de las células expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. La población de células se puede tratar adicionalmente para formar una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático. La población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se puede tratar adicionalmente para formar una población de células que expresa marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.

[0051] La eficacia de la diferenciación se puede determinar mediante la exposición de una población celular tratada con un agente (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador proteico expresado por células que expresan marcadores característicos del tipo de célula deseado.

[0052] Los métodos para evaluar la expresión de proteínas y marcadores de ácido nucleico en células cultivadas o aisladas son estándar en la técnica. Estos incluyen la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa (RT-PCR), transferencias Northern, hibridación *in situ* (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular

Biology (Ausubel et al., Eds. 2001 suplemento)), e inmunoensayos tales como análisis inmunohistoquímico de material seccionado, transferencia de Western, y para los marcadores que son accesibles en células intactas, análisis de citometría de flujo (FACS) (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies: a Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

[0053] Continúan identificándose características de las células madre pluripotentes que son bien conocidas para los expertos en la técnica, y características adicionales de las células madre pluripotentes. Marcadores de células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, la expresión de uno o más de los siguientes: ABCG2, cripto, FOXD3, CONNEXIN43, CONNEXIN45, OCT4, SOX2, NANOG, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, Tra 1-81.

[0054] Después de tratar células madre pluripotentes con los métodos de la presente invención, las células diferenciadas se pueden purificar mediante la exposición de una población celular tratada con un agente (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteína, tal como CXCR4, expresada por células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.

[0055] Las células madre pluripotentes citadas para la referencia son la línea humana embrionaria de células madre H9 (código NIH: WA09), la línea de células madre humanas embrionarias H1 (código NIH: WA01), la línea de células madre embrionarias humanas H7 (código NIH: WA07), y la línea de células madre embrionarias humanas SA002 (Cellartis, Suecia). También son adecuadas para uso en la presente invención células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores característicos de células pluripotentes: ABCG2, cripto, CD9, FOXD3, CONNEXIN43, CONNEXIN45, OCT4, SOX2, NANOG, hTERT, UTF 1, ZFP42, SSEA -3, SSEA-4, Tra 1-60 y Tra 1-81.

[0056] Los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se seleccionan del grupo que consiste en SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox Mix-como, FGF4, CD48, eomesodermina (Eomes), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-kit, CD99, y OTX2. Adecuado 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 mesendodérmica. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una célula de endodermo definitivo.

[0057] Los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se seleccionan del grupo que consiste de PDX1, Nkx6.1, HNF1 beta, PTF1 alfa, HNF6, HNF4 alfa, SOX9, HB9 y PROX1. Adecuada para uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático es una célula de endodermo pancreático.

[0058] Los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo que consiste en NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4, NGN3, y PTF1 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 de páncreas.

[0059] 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 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, HNF3 beta, MAFA, PAX4, y PAX6. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células β es una célula β .

Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo de células madre pluripotentes

[0060] En un aspecto de la presente invención, las poblaciones de células madre pluripotentes se pueden diferenciar en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en el suero que carece de medio y suplementadas con BSA y un factor seleccionado a partir del grupo constituido por insulina e IGF-1. En una realización de la divulgación, la diferenciación de la población de células madre pluripotentes hacia una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se consigue por tratamiento de las células madre pluripotentes con activina a y un ligando Wnt.

[0061] En una realización alternativa, la diferenciación de la población de células madre pluripotentes hacia una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se consigue

mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes con GDF-8 y al menos otro factor es seleccionado de entre el grupo que consiste en: una anilina-piridinotriazina, una anilina-piridinotriazina cíclica, N-[(1-(fenilmetilo)azepan-4-ilo]metilo-2-piridina-3-ilacetamida, 4-[(4-(4-[(2-(piridina-2-ilamino)etilo]amino)-1,3,5-triazina-2-ilo]piridina-2-ilo]oxi)butano-1-ol, 3-[(3-[4-[(2-[metilo(piridina-2-ilo)amino]etilo]amino)-1,3,5-triazina-2-ilo]piridina-2-ilo]amino)propan-1-ol, N~4~-2-(3-fluorofenilo)etilo-N~2~-3-(4-metilpiperazina-1-ilo)propilo]pirido[2,3-d]pirimidina-2,4-diamina, 1-metilo-N-[(4-piridina-3-ilo-2-[(3-(trifluorometilo)fenilo]amino)-1,3-tiazol-5-ilo]metilo]piperidina-4-carboxamida, 1,1-dimetiletilo {2-[4-[(5-[3-(3-hidroxipropilo)fenilo]-4H-1,2,4-triazol-3-ilo]amino)fenilo]etilo}carbamato, 1,1-dimetiletilo {3-[(5-[5-(3-hidroxipropilo)-2-(metiloxi)fenilo]-1,3-oxazol-2-ilo]amino)fenilo]metilo}carbamato, 1-[(5-[6-[(4-[(4-metilpiperazina-1-ilo)sulfonilo]fenilo]amino)pirazina-2-ilo]tiofen-2-ilo]metilo]piperidina-4-ol, 1-[(4-[6-[(4-[(4-metilpiperazina-1-ilo)sulfonilo]fenilo]amino)pirazina-2-ilo]tiofen-2-ilo]metilo]piperidina-4-carboxamida, y 2-[(4-(1-metiletilo)fenilo]amino[N-(2-tiofen-2-iletile)-7,8-dihidropirido[4,3-d]pirimidina-6(5H)-carboxamida. Ejemplos de los factores adecuados para su uso pueden encontrarse en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Número de Serie 12/494.789. En una realización, al menos otro factor es 14-Prop-2-en-1-ilo-3,5,7,14,17,23,27-heptaazatetraciclo [19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]heptacosa-1(25), 2(27), 3,5,8(26), 9,11,21,23-nonaen-16-ona.

[0062] La población de células madre pluripotentes se puede cultivar en el suero que carece de medio y suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste en insulina e IGF-1 durante aproximadamente un día a aproximadamente siete días. Alternativamente, la población de células madre pluripotentes se puede cultivar en el suero que carece de medio y suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1 durante aproximadamente un día a aproximadamente seis días. Alternativamente, la población de células madre pluripotentes se puede cultivar en el suero que carece de medio y suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1 durante aproximadamente un día a aproximadamente cinco días. Alternativamente, la población de células madre pluripotentes se puede cultivar en el suero que carece de medio y suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1 durante aproximadamente un día a aproximadamente cuatro días. Alternativamente, la población de células madre pluripotentes se puede cultivar en el suero que carece de medio y suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1 durante aproximadamente cuatro días.

[0063] En una realización, la GDF-8 se usa a una concentración de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml. En una realización alternativa, la GDF-8 se usa a una concentración de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml. En una realización alternativa, la GDF-8 se usa a una concentración de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 25 ng/ml. En una realización alternativa, la GDF-8 se usa a una concentración de aproximadamente 25 ng/ml.

[0064] La activina-A se puede usar a una concentración de aproximadamente 1 pg/ml a aproximadamente 100 µg/ml. En una realización alternativa, la concentración puede ser de aproximadamente 1 pg/ml a aproximadamente 1 µg/ml. En otra realización alternativa, la concentración puede ser de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 100 ng/ml. En otra realización alternativa, la concentración puede ser de aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml. En otra realización alternativa, la concentración puede ser de aproximadamente 100 ng/ml.

[0065] El ligando Wnt puede ser seleccionado del grupo que consiste de Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-5a y Wnt-7a. En una realización, el ligando Wnt es Wnt-1. En una realización alternativa, el ligando Wnt es Wnt-3a.

[0066] El ligando Wnt puede usarse en una concentración de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 1000 ng/ml. En una realización alternativa, el ligando Wnt se puede usar a una concentración de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml. En una realización, la concentración del ligando Wnt es de aproximadamente 20 ng/ml.

[0067] En una realización, la insulina se utiliza a una concentración de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml.

[0068] En una realización, el IGF-1 se usa a una concentración de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml.

Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endodermo

[0069] En una realización, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo formado por los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático mediante cualquier método en la técnica.

[0070] Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático mediante el

tratamiento de la población de células que expresan marcadores característica del linaje endodérmico definitivo según los procedimientos revelados en D'Amour et al, Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006).

[0071] Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático mediante el tratamiento de la población de 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.

Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático

[0072] En una realización, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático mediante cualquier método en la técnica.

[0073] Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el tratamiento de la población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático según los métodos descritos en D' Amour et al, Nature Biotechnology, 2006.

[0074] Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el tratamiento de la población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático según los métodos descritos en D' Amour et al, Nature Biotechnology, 2006.

[0075] Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el tratamiento de la población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. Ser. N° 11/736.908.

[0076] Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el tratamiento de la población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. Ser. N° 11/779.311.

[0077] Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el tratamiento de la población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. Ser. N° 60/953.178.

[0078] Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el tratamiento de la población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. Ser. N° 60/990.529.

[0079] La presente invención se ilustra adicionalmente, pero no está limitada por los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo de referencia 1

El papel de la insulina en la diferenciación de células madre pluripotentes a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo: Siembra en cluster

[0080] Los estudios previos han demostrado que una alta concentración de FBS es perjudicial para la formación de endodermo definitivo (DE) de las células madre embrionarias. Véase, por ejemplo, D'Amour et al., Nature Biotechnology, 2005, donde la inducción de endodermo definitivo a partir de células madre embrionarias humanas se incrementó de manera significativa cuando la concentración de FBS se redujo de 10% de FBS a 0,5-2% de FBS. Se informó de observaciones similares, en las que la adición de 25 ng/ml de IGF o 200 ng/ml de insulina a 2% de FBS a células ES cultivadas en MEF-CM (medio acondicionado por fibroblastos de ratón embrionario) disminuyó la

expresión de SOX17 por aproximadamente 70% después del tratamiento con activina A. Véase McLean et al, Stem Cells 25: 29-38, 2007.

[0081] El efecto inhibitor observado fue probablemente debido a la presencia de insulina o IGF en el FBS, provocando la vía de 3-quinasa de fosfatidilinositol. Véase McLean et al, Stem Cells 25: 29-38, 2007. El bloqueo de la vía de señalización de quinasa PI-3 incrementó el porcentaje de células positivas Sox17 en células madre embrionarias humanas cultivadas en MEF-CM (medio acondicionado de fibroblastos de ratón embrionario). Véase McLean et al, Stem Cells 25: 29-38, 2007.

[0082] Estos datos sugieren que sería de esperar que la adición de tan poco como 25 ng/ml de IGF o 200 ng/ml de insulina a los medios que contienen la activina A y baja concentración de FBS (0,5-2% FBS) bloquearía la formación de endodermo definitivo. La concentración típica de IGF e insulina en FBS es de aproximadamente 70 ng/ml (J. Clin Invest 76: 4, 1985) (In Vitro Cell Dev Biol. 32: 8-12, 1996) y aproximadamente 60 ng/ml, respectivamente. Esto se traduce en aproximadamente 1,4 ng/ml de IGF y aproximadamente 1,2 ng/ml de insulina en 2% de FBS.

[0083] Las células de las células madre embrionarias humanas línea H1 (p40-p52) se cultivaron en placas revestidas de MATRIGEL® (1:30 dilución) (BD Biosciences; Cat n° 356231) en MEF-CM (medio acondicionado por fibroblastos embrionarios de ratón) suplementado con 16 ng/ml de FGF2 (Catálogo n° 100-18B, Peprotech, NJ) y se diferenciaron en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo del siguiente modo:

a. Medio RPMI suplementado con 2% de BSA libre de ácido graso (N° de catálogo 68700, Proliant, IA), y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) más 20 ng/ml de WNT-3a (Catálogo n° 1324-WN-002, R&D Systems, MN) durante un día, luego

b. Medio RPMI suplementado con 2% de BSA y 100 ng/ml de activina A durante un período adicional de tres días.

[0084] En algunos de los cultivos, las células fueron tratadas con la siguiente dilución de ITS-X (n° de catálogo 51500-056, Invitrogen, CA): 0, 1:10⁶, 1:5 X 10⁵, 1:10⁵, 1:10⁴. ITS-X es un reemplazo de suero suplementado compuesto de 1 mg/ml de insulina, 0,55 mg/ml de transferrina, 0,00067 mg/ml de selenita de sodio, y 0,2 mg/ml de etanolamina. La gama de diluciones de ITS-X corresponde a 0, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 10 ng/ml, y 100 ng/ml de insulina. Como control, se utilizó 0,2% de FBS (Catálogo n° SH30070.03, Hyclone, UT) para el día 1 de diferenciación, 0,5% de FBS en el día 2 y 2% de FBS se utilizó para los días 3-4. Los cultivos FBS tratados no fueron suplementados con ITS-X.

[0085] En el día 4, se recogieron muestras para FACS y análisis de la expresión génica utilizando PCR en tiempo real. Sorprendentemente, como se muestra en la Figura 1, la adición de 1-100 ng/ml de insulina al medio utilizado para diferenciar las células, no afectó significativamente la expresión de marcadores asociados con endodermo definitivo (FOXA2, SOX17, y CXCR4), marcadores asociados con mesénquima (T, también conocido como Brach), o marcadores extraembrionarios (SOX7, AFP). Además, los cultivos tratados con medio suplementado con 2% de BSA mostraron significativamente mayor expresión de marcadores asociados con endodermo definitivo, que los cultivos tratados con medio suplementado con 0,5-2% de FBS.

[0086] Estas observaciones fueron apoyadas además por la expresión de CXCR4 y CD9, como se determinó por FACS, para los diversos tratamientos. Véase la Figura 2. El receptor de superficie celular CXCR4 se ha demostrado previamente para ser un marcador de endodermo definitivo. CD9 es un marcador de células ES indiferenciadas. En consecuencia, un aumento en la expresión de CXCR4 y una disminución en la expresión de CD9 en una población de células es indicativa de la formación de endodermo definitivo. Como se resume en la Tabla I, ningún cambio significativo en la expresión de CXCR4, o CD9 se observó en las células tratadas con medio suplementado con BSA, a cualquier concentración de insulina examinada. Estos datos sugieren que la insulina no es inhibidor a las concentraciones ensayadas en el medio de cultivo empleado en estos estudios.

Tabla I.

Tratamiento	% CXCR4+CD9-	% CXCR4-CD9 +	% CXCR4-CD9-
FBS	56	27	9
BSA	69	13	13
BSA + 1 ng/ml de insulina	70	13	10
BSA + 5 ng/ml de insulina	67	15	12
BSA + 10 ng/ml de insulina	69	13	13
BSA + 100 ng/ml de insulina	73	12	9

Ejemplo de Referencia 2

El papel de la insulina en la diferenciación de células madre pluripotentes a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo: Siembra de célula individual

[0087] Las células de las células madre embrionarias humanas línea H1 (p40-p52) se sembraron como células individuales a una densidad de 100.000 células/cm² en placas revestidas con MATRIGEL® (1:30 dilución) (BD Biosciences; Cat n° 356231) en MEF-CM (medio acondicionado de fibroblastos de ratón embrionario) suplementado con 16 ng/ml de FGF2 (Catálogo n° 100-18B, PeproTech, NJ) y 10 µM de Y27632 (inhibidor de Rock, Catálogo n° Y0503, Sigma, MO). 72 horas después de la siembra, los cultivos se diferenciaron en endodermo definitivo (DE) del siguiente modo:

a. MCDB-131 (n° de catálogo 10372-019, Invitrogen, CA) suplementado con 2% de BSA libre de ácido graso (Catálogo n° 68700, Proliant, IA), 0,0025 g/ml de bicarbonato de sodio (Catálogo n° S3187, Sigma, MO), 1X GlutaMax™ (Catálogo n° 35050-079, Invitrogen, CA) y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) más 20 ng/ml de WNT-3a (Catálogo n° 1324- WN-002, Systems, MN R&D) durante un día, entonces

b. medio MCDB-131 suplementado con 2% de BSA, bicarbonato de sodio, Glutamax, y 100 ng/ml de activina A durante otros tres días.

[0088] En algunos de los cultivos, las células se trataron con las siguientes concentraciones de insulina (N° de catálogo I9278, Sigma, MO): 0, 1, 10, 100, 1000, o 10000 ng/ml. En el día 4, se recogieron muestras para FACS y análisis de la expresión génica utilizando PCR en tiempo real.

[0089] La adición de 1-100ng/ml de insulina al medio utilizado para diferenciar las células, no afectó significativamente la expresión de marcadores asociados con endodermo definitivo (FOXA2, SOX17, CER1, y CXCR4). Del mismo modo, la expresión de marcadores embrionarios (NANOG), o marcadores extraembrionarios (SOX7, AFP) no se vieron afectados. Véase la Figura 3. La adición de 1-10 µg/ml de insulina, sin embargo, incrementó la expresión de NANOG. Estos datos fueron apoyados adicionalmente por tinción de inmunofluorescencia (IF) para el marcador de endodermo definitivo SOX17 (Catálogo n° AF1924, R&D systems, MN) (Figura 4).

[0090] La Figura 5 representa el perfil de expresión de CXCR4 y CD9 de los diferentes tratamientos tal como se mide por análisis FACS. Como se resume en la Tabla II, solamente a concentraciones super fisiológicas de insulina (1-10 µg/ml) hubo una disminución en el porcentaje de células CXCR4+CD9- y un aumento en la expresión de la fracción de CXCR4-CD9+. Estos datos sugieren que en las condiciones de este estudio, solamente concentraciones suprafisiológicas de insulina inhiben la formación de endodermo definitivo.

Tabla II.

Tratamiento	% CXCR4+CD9-	% CXCR4-CD9+	% CXCR4-CD9-
BSA	96	1,3	0,9
BSA + 1 ng/ml de insulina	96	1,5	0,7
BSA + 10 ng/ml de insulina	95	1,4	0,7
BSA + 100 ng/ml de insulina	90	4,1	2
BSA + 1 µg/ml de insulina	90	3,6	2,2
BSA + 10 µg/ml de insulina	84	6,6	4,7

Ejemplo de Referencia 3

El papel de los IGF en la diferenciación de células madre pluripotentes a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo: Siembra de célula individual

[0091] Las células de las células madre embrionarias humanas línea H1 (p40-p52) se sembraron como células individuales a una densidad de 100.000 células/cm² en placas revestidas de MATRIGEL® (1:30 dilución) (BD Biosciences; Cat n° 356231)- en MEF-CM (medio acondicionado de fibroblastos de ratón embrionario) suplementado con 16 ng/ml de FGF2 (Catálogo n° 100-18B, PeproTech, NJ) y 10 µM de Y27632 (inhibidor de Rock, Catálogo n° Y0503, Sigma, MO). 72 horas después de la siembra, los cultivos se diferencian en endodermo definitivo (DE) del siguiente modo:

a. Medio de MCDB-131 (n° de catálogo 10372-019, Invitrogen, CA) suplementado con 2% de BSA libre de ácido graso (N° de catálogo 68700, Proliant, IA), 0,0025 g/ml de bicarbonato de sodio (n° de catálogo S3187, Sigma, MO), 1X GlutaMax™ (Catálogo n° 35050-079, Invitrogen, CA) y 100 ng/ml de GDF8 (Catálogo n° 120-00,

PeproTech, NJ), además de 2,5 μ M del inhibidor de GSK3B 14-Prop-2-en-1-ilo-3,5,7,14,17,23,27-heptaazatetraciclo-[19.3.1.1~2,6~0,1~8,12~]heptacosa-1(25), 2(27), 3,5,8(26), 9,11,21,23-nonaen-16-uno durante un día, entonces

- 5 b. Medio MCDB-131 suplementado con 2% de BSA, bicarbonato de sodio, Glutamax, y 100 ng/ml de GDF-8 durante otros tres días.

10 **[0092]** En algunos de los cultivos, las células se trataron con las siguientes concentraciones de IGF (Catálogo nº AF100, Peprotech, NJ): 0, 1, 10, 50, o 200 ng/ml. Como control, en lugar de BSA, 0,2% de FBS (Catálogo nº SH30070.03, Hyclone, UT) se utilizó durante el día 1 de diferenciación, y 2% de FBS se utilizó durante días 2-4. Algunos de los cultivos de FBS tratados también fueron tratados con varias concentraciones de IGF.

15 **[0093]** En el día 4, se recogieron muestras para FACS y análisis de la expresión génica utilizando PCR en tiempo real.

20 **[0094]** Sorprendentemente, la adición de 1-200 ng/ml de IGF a cultivos tratados con BSA no afectaron significativamente la expresión de marcadores asociados con endodermo definitivo (FOXA2, SOX17, CER1, y CXCR4), cuando se compara con muestras de control no tratadas con IGF (figura 6). Se observaron resultados similares con los marcadores extraembrionarios (SOX7, AFP). La adición de 50-200 ng/ml de IGF hizo aumentar la expresión del marcador embrionario NANOG.

25 **[0095]** Los cultivos tratados con medio suplementado con FBS eran mucho más sensibles al efecto inhibidor de IGF. En estos cultivos, la expresión de SOX 17, HNF3B y CXCR4 disminuyó con el aumento de concentración de IGF. Estas observaciones se apoyan además con la tinción de inmunofluorescencia (IF) para el marcador DE SOX17 (Catálogo nº AF1924, R&D Systems, MN) (Figuras 8-9).

30 **[0096]** Tal como se resume en la Tabla III, sólo a concentraciones súper fisiológicas de IGF (50-200 ng/ml) en cultivos tratados con BSA hubo una caída en la expresión de células CXCR4+CD9 y un aumento en la expresión de la fracción de CXCR4-CD9+. Sin embargo, con dosis crecientes de IGF, cultivos tratados con FBS mostraron una caída más significativa en la expresión de la fracción de CXCR4+CD9- en comparación con cultivos tratados con BSA. Los ejemplos anteriores muestran colectivamente que, en ausencia de FBS, las concentraciones fisiológicas de IGF o insulina no son inhibidores para la inducción de marcadores DE.

Tabla III.

Tratamiento	% CXCR4 + CD9-	% CXCR4-CD9 +	% CXCR4-CD9-
BSA	92	0,9	2,6
FBS	93	2,7	5,9
BSA + 1 ng/ml de IGF	92	0,8	3
FBS + 1 ng/ml de IGF	89	3	3,6
BSA + 10 ng/ml IGF	90	1,3	5,3
FBS + 10 ng/ml IGF	87	6,4	3,3
BSA + 50 ng/ml IGF	87	6	3,5
FBS + 50 ng/ml IGF	78	6,8	13,2
BSA + 200 ng/ml de IGF	79	10	8
FBS + 200 ng/ml de IGF	70	13,4	12,9

Ejemplo 4

Las concentraciones de IGF en varios lotes de FBS

55 **[0097]** Un kit de IGF-1 se adquirió de Diagnostic Systems Laboratories (DSL) (Cat. DSL-10-2800) y se usó para la detección. Veinte microlitros (20 μ l) de suero (duplicados) se trataron previamente y luego 20 μ l de muestra diluida se usó para el ensayo. Para muestras de medio, 20 μ l de las muestras se usaron directamente para el ensayo. El ensayo se realizó después de la instrucción proporcionada por el kit. Este kit puede detectar IGF-1 tanto humana como bovina como los anticuerpos monoclonales 2 utilizados para el kit están en contra de las secuencias de péptidos homólogos.

60 **[0098]** *Muestras de ensayo* : Se utilizaron las siguientes muestras de ensayo:

4A/5A: suero de ternera recién nacido Hyclone; Lote AKM12868

4B/5B: NIH-FBS (de alícuota@ -20 C)

4C/5C: Hyclone FBS, Lote: ATK33398

4D/5D: Hyclone FBS, Lote: AUK 54924
 4E/5E: Suero humano, Lote: A70184, de Valley Biomedical Inc
 4F/5F: suero knockout; Invitrogen, Lote: 557914
 4F/5F: F12 DMEM, Invitrogen, Lote: 692281
 4H/5H: Medio de Condición MEF, Lote: 011410 (Día 5)

[0099] *Muestras de Control:* Se utilizaron las siguientes muestras de control:

Antecedentes: "0" IGF-1 (control negativo, de kit); la muestra de F12 enumerada anteriormente también sirve como un control negativo. 2 controles positivos (127 ng/ml y 241 ng/ml; del kit).

[0100] Resultados: La sensibilidad del ensayo para el suero era mayor de 10 ng/ml; y para el medio fue mayor que 0,1 ng/ml.

Positivos conocidos (ng/ml)	Concentración determinado por el ensayo (ng/ml)	SE
127 ng/ml	126,8	8,2
241 ng/ml	233,8	4,2

Duplicados	Muestras	IGF-1 (ng/ml)	SE
4A/5A	Suero de ternera recién nacido Hyclone; Lote AKM12868	29,78	0,41
4B/5B	NIH-FBS (de alícuota@ -20 C)	49,16	2,68
4C/5C	Hyclone FBS, Lote: ATK33398	80,29	5,39
4D/5D	Hyclone FBS, Lote: AUK 54924	76,45	1,99
4E/5E	Suero humano, Lote: A70184, de Valley Biomedical Inc,	55,65	2,28
4F/5F	Suero knockout; Invitrogen, Lote: 557914	12,07	0,15
4G/5G	F12 DMEM, Invitrogen, Lote: 692281	ND*	ND
4H/5H	Medio Condición MEF-, Lote: 011410 (día 5)	1,33 **	0,07

Ejemplo de Referencia 5

Papel de la insulina/ IGF y FBS en la diferenciación de células madre pluripotentes a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo: Siembra de célula individual

[0101] Las células de las células madre embrionarias humanas línea H1 (p40-p52) se sembraron como células individuales a una densidad de 100.000 células/cm² en placas revestidas con MATRIGEL® (1:30 dilución) (BD Biosciences; Cat n° 356231) en MEF-CM (medio acondicionado de fibroblastos de ratón embrionario) suplementado con 16 ng/ml de FGF2 (Catálogo n° 100-18B, PeproTech, NJ) y 10 µM de Y27632 (inhibidor de Rock, Catálogo n° Y0503, Sigma, MO). 72 horas después de la siembra, los cultivos se diferencian en endodermo definitivo (DE) del siguiente modo:

a. con MCDB-131 (n° de catálogo 10372-019, Invitrogen, CA) suplementado con 0,2% de FBS (Catálogo n° SH30070.03, Hyclone, UT), 0,0025 g/ml de bicarbonato de sodio (n° de catálogo S3187, Sigma, MO), 1X GlutaMax™ (Catálogo n° 35050-079, Invitrogen, CA) y 100 ng/ml GDF8 (Catálogo n° 120-00, PeproTech, NJ), además de 2,5 µM de inhibidor GSK3B 14-Prop-2-en-1-ilo-3, 5,7,14,17,23,27-heptaazatetraciclo-[19.3.1.1~2,6~0,1~8,12~]heptacosa-1(25), 2(27), 3,5,8(26), 9,11,21,23-nonaen-16-ona durante un día, entonces

b. Medio MCDB-131 suplementado con FBS, bicarbonato de sodio, Glutamax, y 100 ng/ml GDF8 durante otros tres días.

[0102] 0,5% de FBS se utilizó durante el día 2 y 2% de FBS se utilizó durante los días 3-4. Además de FBS regular, FBS tratado con calor (Catálogo n° F4135, Sigma, MO) y FBS tratado con carbón vegetal (Catálogo n° F6765, Sigma, MO) se ensayaron también. Algunos de los cultivos tratados con FBS también fueron tratados con varias concentraciones de IGF (10-100 ng/ml) o insulina (10-100 ng/ml).

[0103] En el día 4, se recogieron muestras para el análisis por FACS y PCR en tiempo real. En contraste cultivos tratados con BSA (véanse los Ejemplos anteriores) en presencia de FBS, la adición de dosis de insulina o IGF dependientemente regularon hacia abajo marcadores asociados con endodermo definitivo como SOX17 y CXCR4. Véase la Figura 9. También se reguló hacia arriba la expresión del marcador de pluripotencia NANOG.

Reivindicaciones

1. Un método para generar una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo, que comprende las etapas de:

- a. cultivar una población de células madre pluripotentes humanas,
- b. diferenciar la población de células madre pluripotentes humanas a una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en suero carente de medio y suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1, en el que el medio se complementa además con GDF-8 y 14-Prop-2-en-1-ilo-3,5,7,14,17,23,27-heptaazatetracilo-[19.3.1.1~2,6~0,1~8,12~] heptacosa-1(25), 2(27), 3,5,8(26), 9,11,21,23-nonaen-16-ona.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la población de células madre pluripotentes se diferencia para una población de células en la que más del 85% de las células en la población expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la población de células madre pluripotentes se diferencia para una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo usando IGF-1, GDF-8 and 14-Prop-2-en-1-ilo-3,5,7,14,17,23,27-heptaazatetracilo-[19.3.1.1~2,6~0,1~8,12~]heptacosa-1(25), 2(27), 3,5,8(26), 9,11,21,23-nonaen-16-ona.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la población de células madre pluripotentes se diferencian en el suero que carece de medio y suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1 durante un periodo de al menos 6 días.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la población de células madre pluripotentes se diferencia en el suero que carece de medio y suplementado con BSA y un factor seleccionado del grupo que consiste de insulina e IGF-1 durante un periodo de al menos 7 días.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se seleccionan del grupo que consiste en SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox de tipo mezcla, FGF4, CD48, eomesodermina (Eomes), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99, y OTX2.

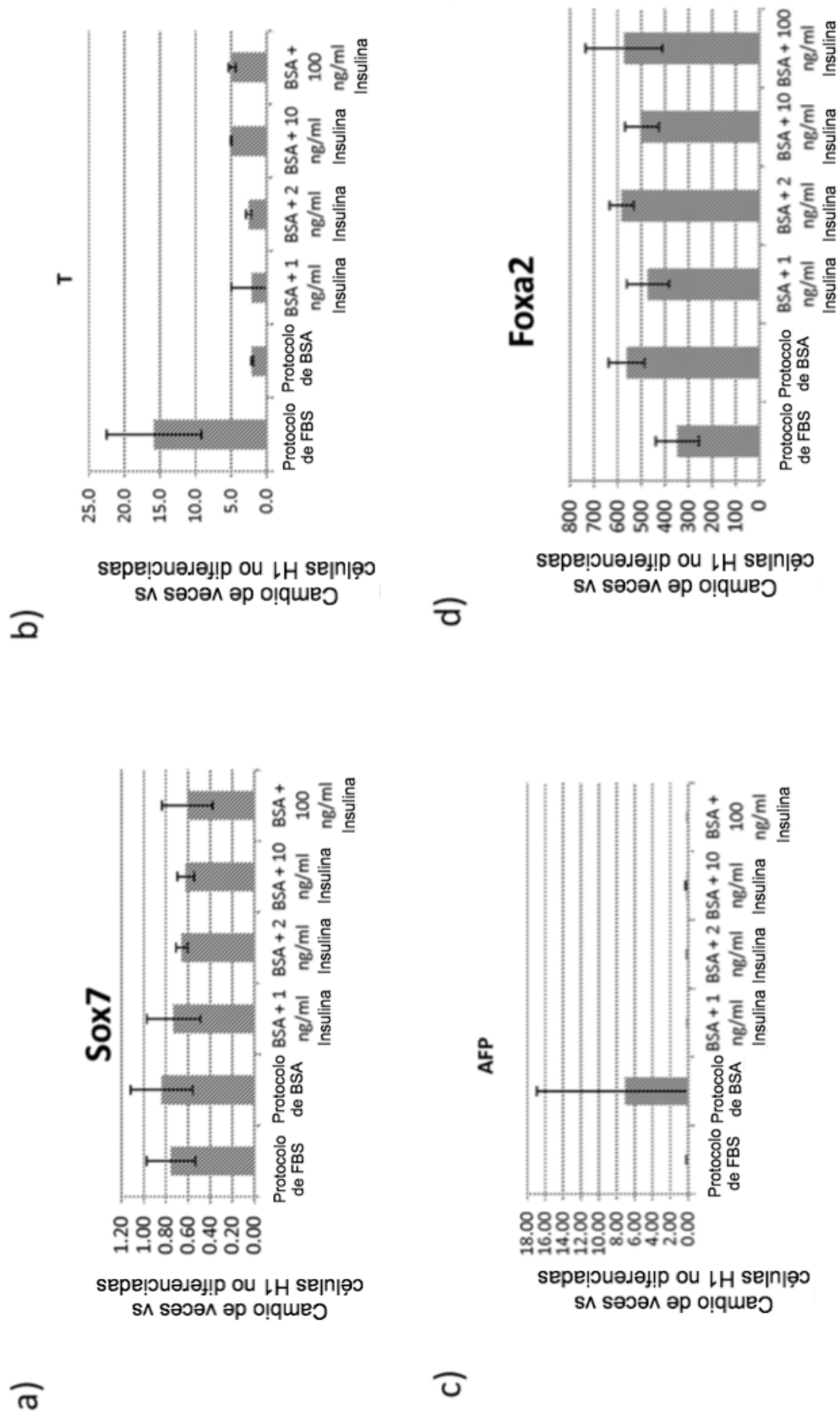
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el GDF-8 se usa a una concentración de 5 ng/ml a 500 ng/ml; 5 ng/ml a 50 ng/ml; 5 ng/ml a 25 ng/ml; o 25 ng/ml.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o 4 a 7, en el que la insulina se utiliza a una concentración de 1 ng/ml a 100 ng/ml; 10 ng/ml a 100 ng/ml.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el IGF-1 se usa a una concentración de 1 ng/ml a 200 ng/ml; 10 ng/ml a 100 ng/ml.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se diferencian además en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático.

Figura 1



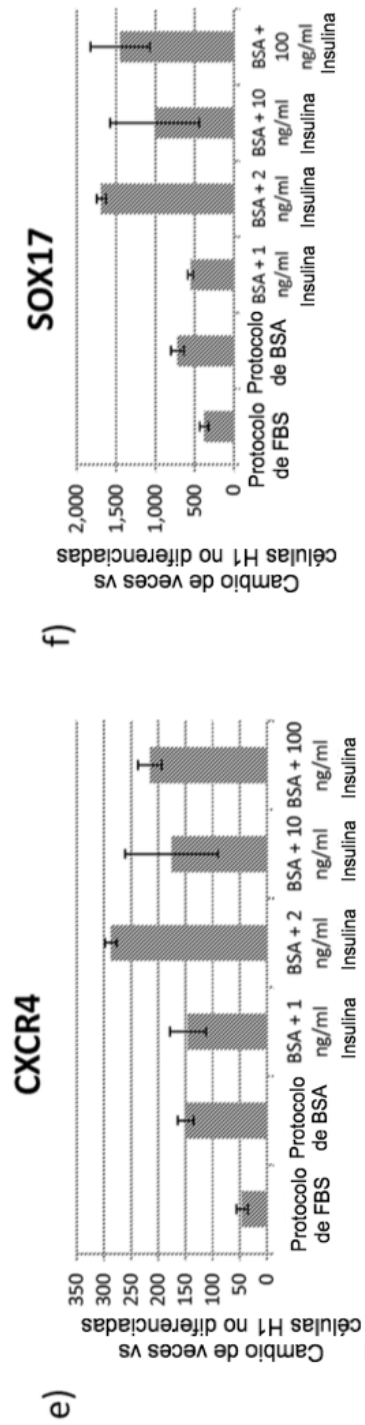


Figura 2

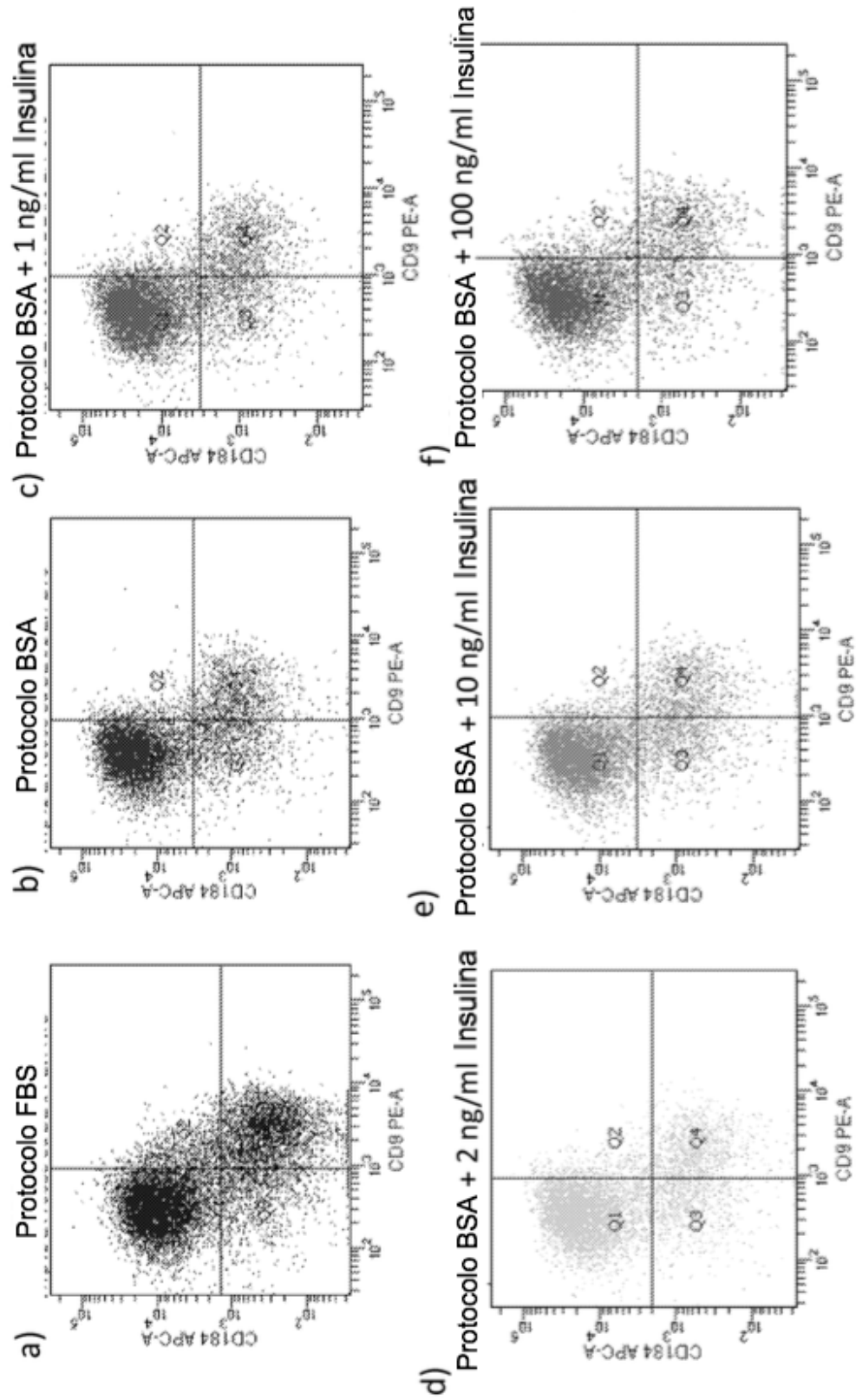
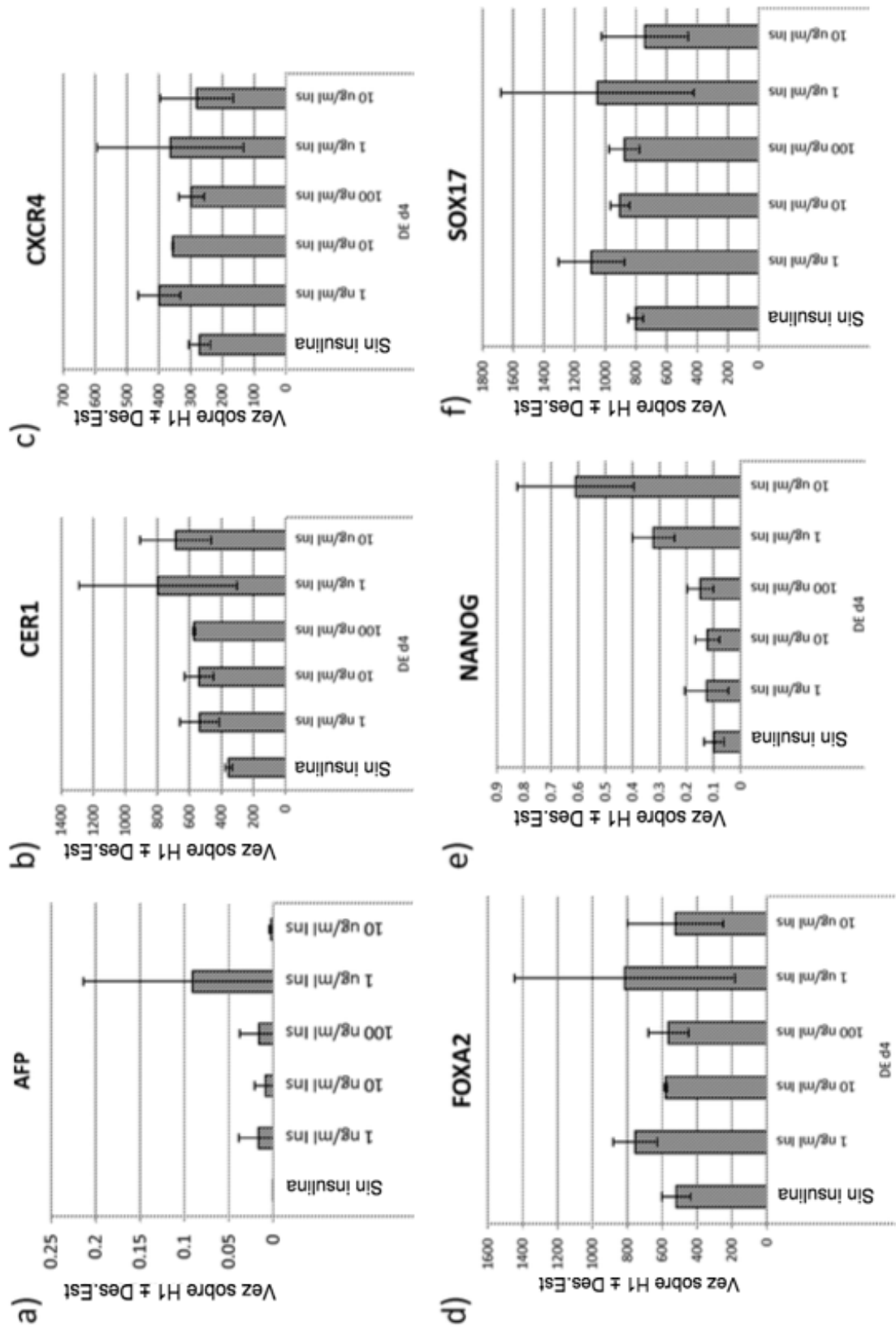


Figura 3



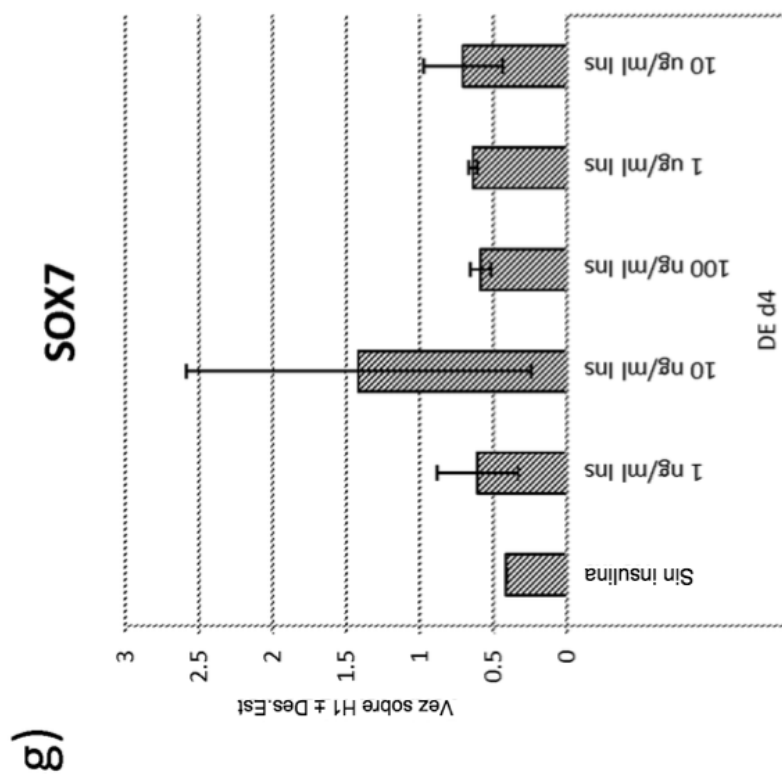


Figura 4

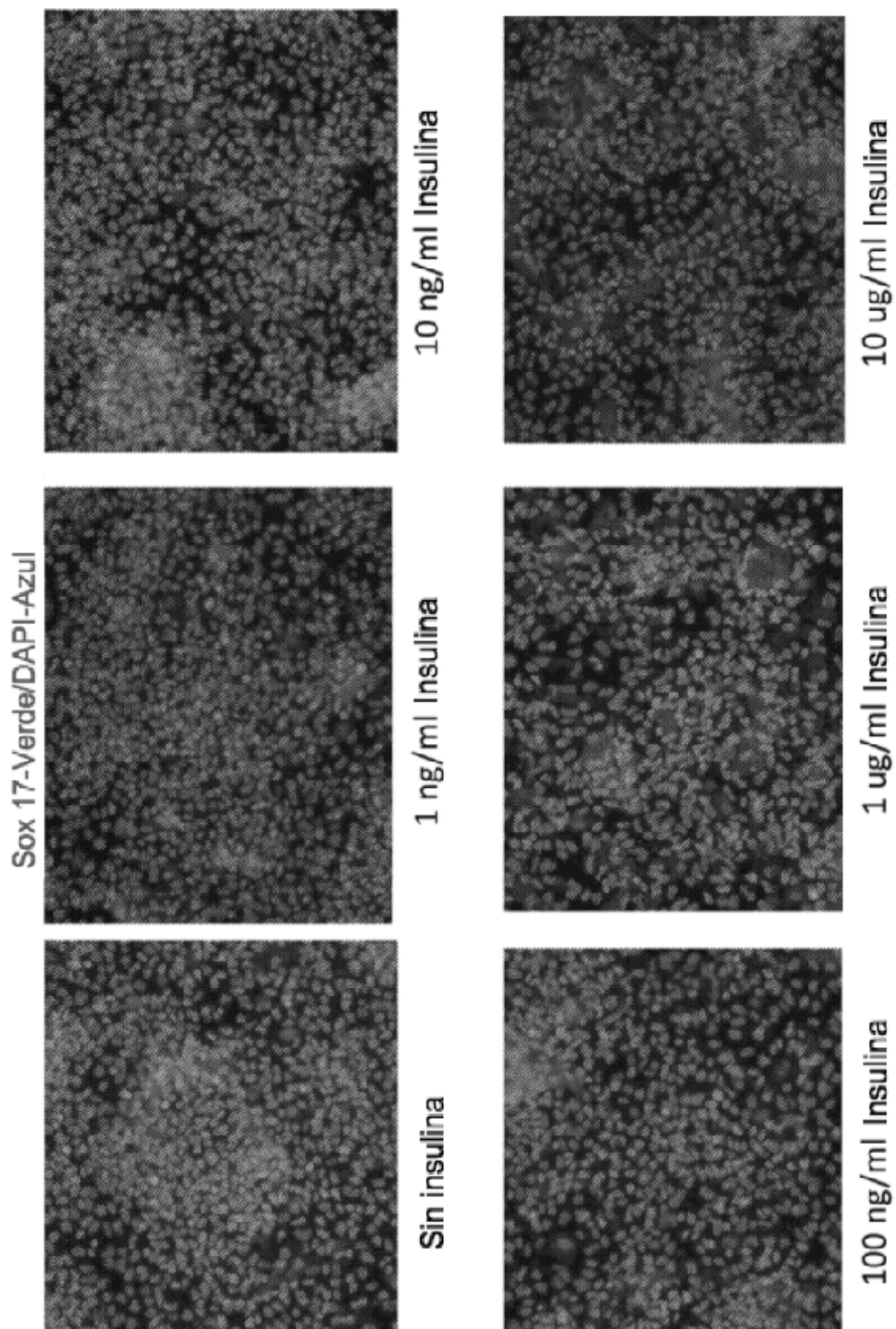


Figura 5

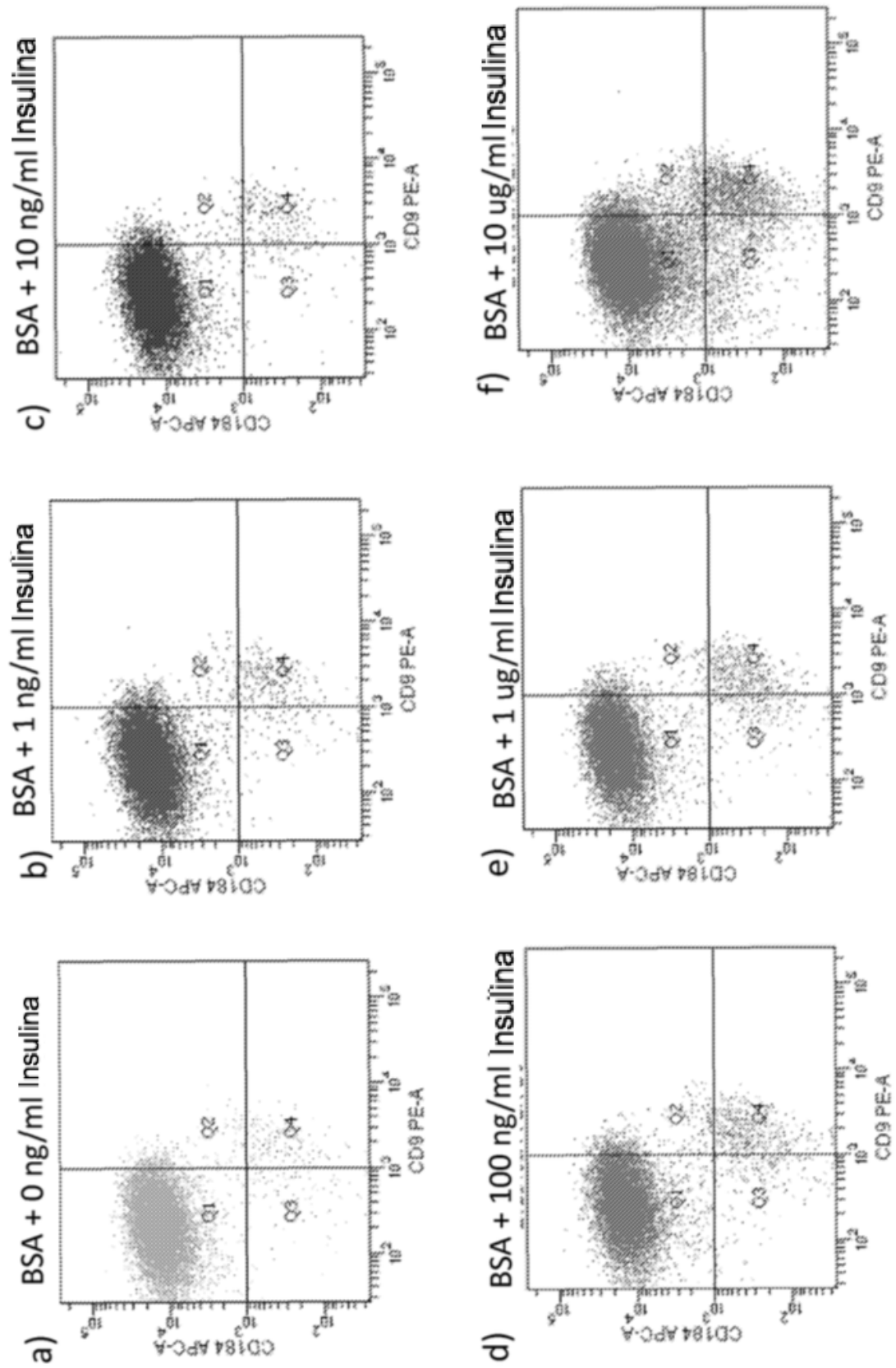


Figura 6

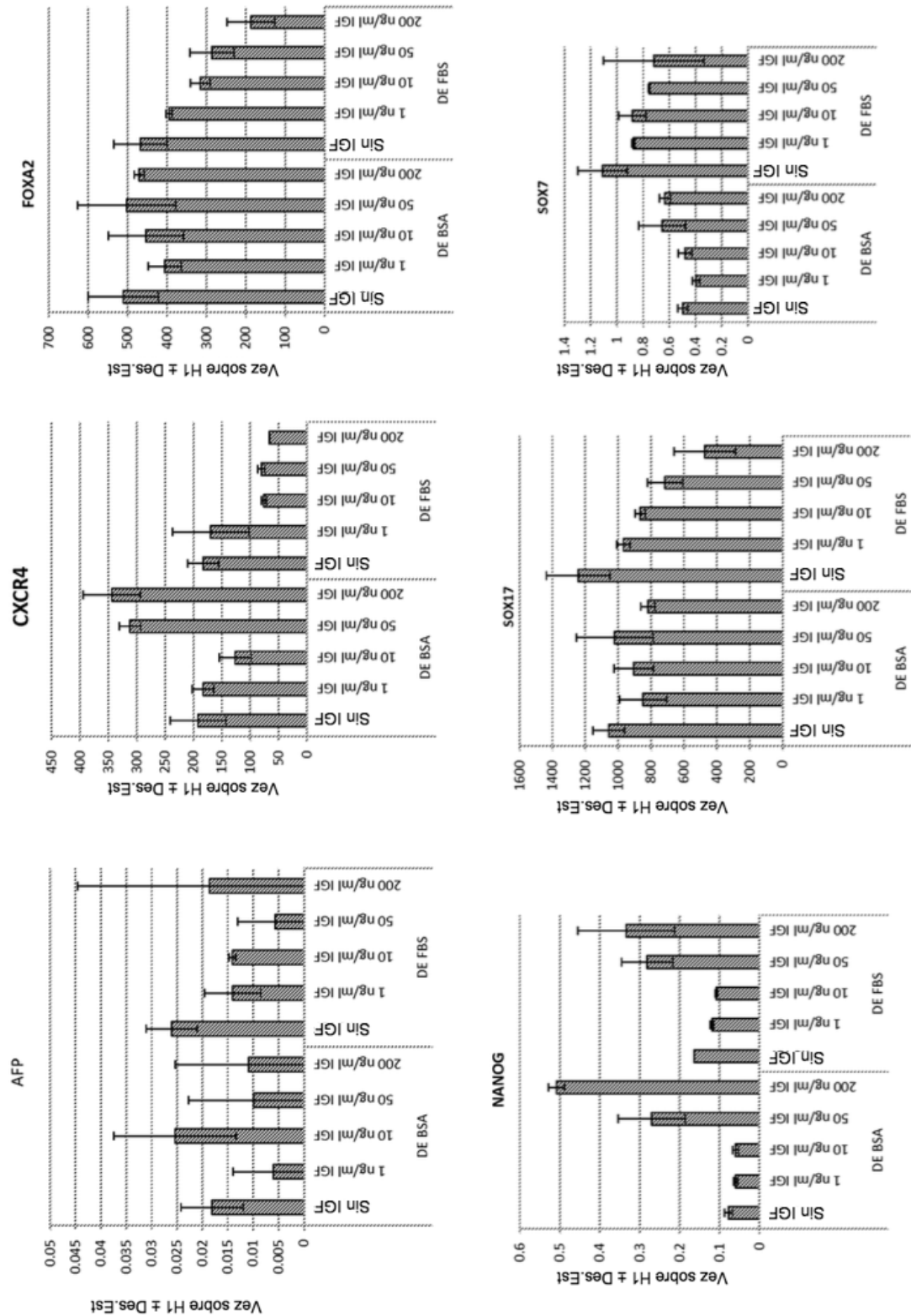


Figura 7

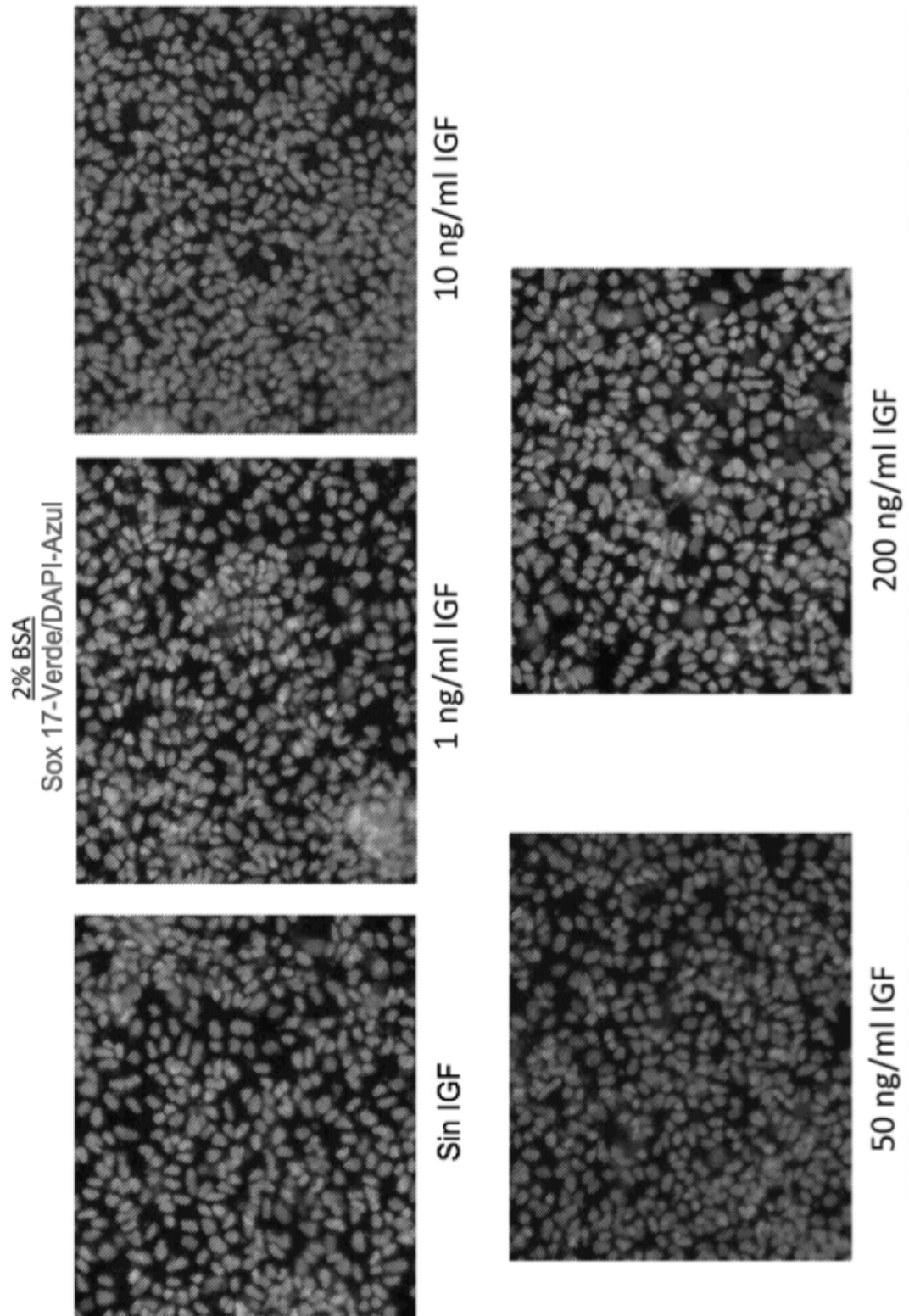


Figura 8

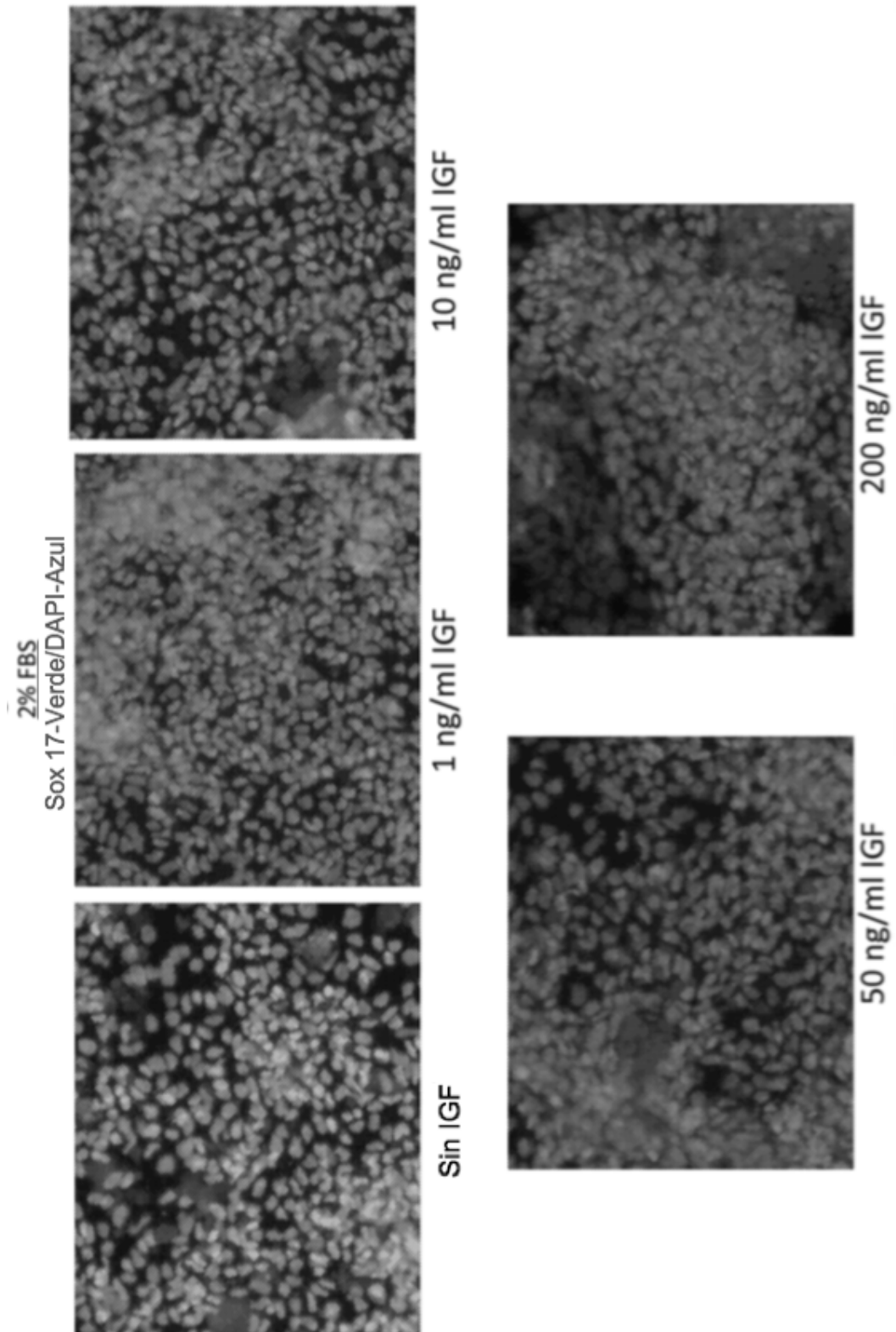


Figura 9

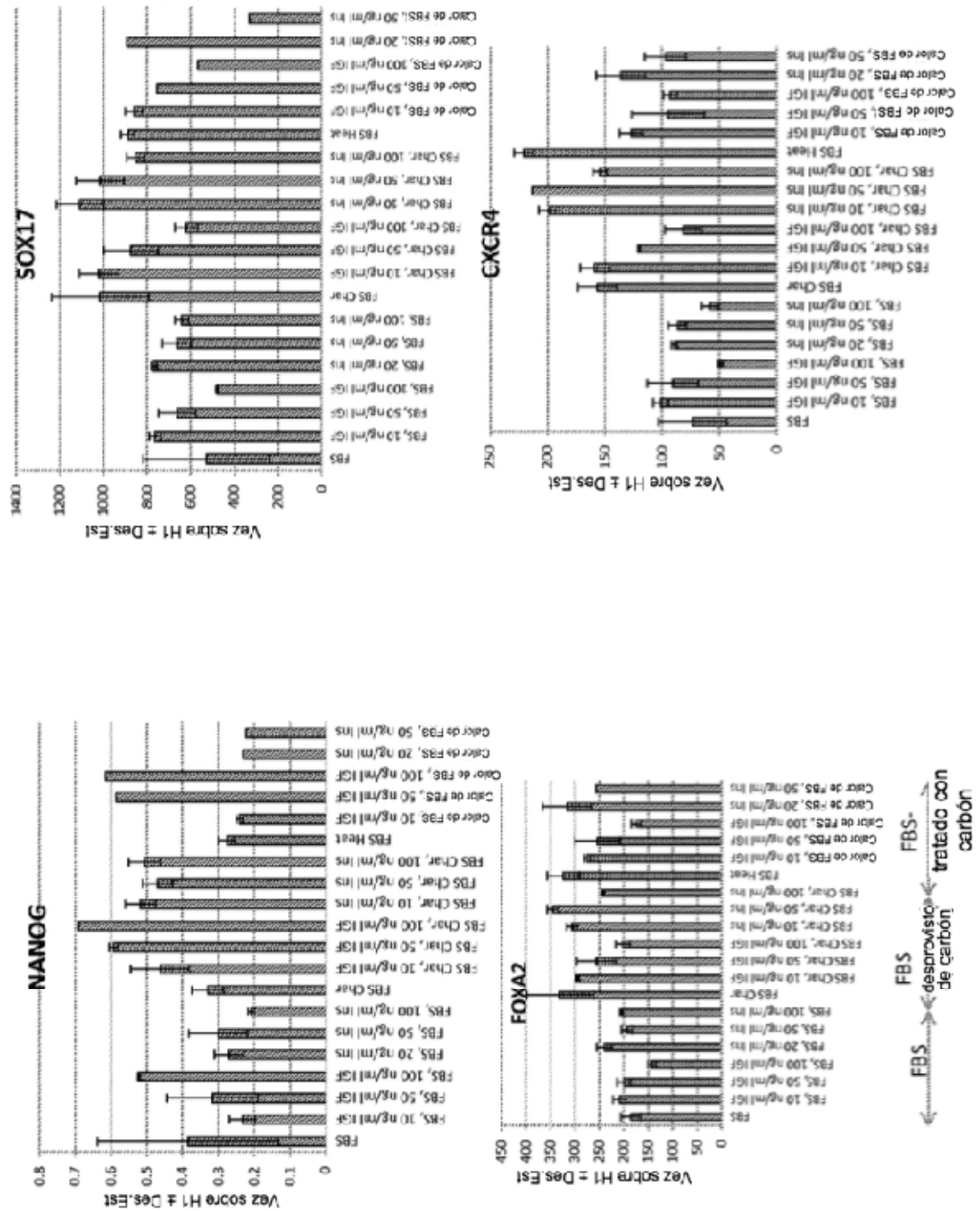


Figura 9

