

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 328**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2010** **E 10705891 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016** **EP 2403872**

54 Título: **Método para aumentar la reserva de células progenitoras endocrinas N[b3+ y masa celular endocrina pancreática**

30 Prioridad:

03.03.2009 EP 09305197

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

27.09.2016

73 Titular/es:

**ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS
(100.0%)
3 Avenue Victoria
75004 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**POLAK, MICHEL;
SCHARFMANN, RAPHAËL y
ZERTAL-ZIDANI, SAMIA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 584 328 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para aumentar la reserva de células progenitoras endocrinas Ngn3+ y masa celular endocrina pancreática

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la medicina, en particular para el tratamiento o la prevención de la diabetes. También se refiere al campo de la biología celular.

Antecedentes de la invención

10 El páncreas es un órgano glándula compuesto de dos subclases de tejido: las células exocrinas (tejido acinar) y las células endocrinas (islotos de Langerhans). Las células exocrinas producen las enzimas digestivas que pasan al intestino delgado. Las células de los islotos producen hormonas que están implicadas en el metabolismo de los hidratos de carbono. Los islotos se componen de cinco tipos de células: células α , β , δ , ϵ y PP que producen glucagón, insulina, somatostatina, grelina y polipéptido pancreático, respectivamente. Las células β secretan insulina en respuesta a un aumento de la concentración de glucosa extracelular.

15 Los primeros signos morfológicos del páncreas primitivo surgen como brotes dorsales y ventrales del epitelio del intestino primitivo en el día embrionario (E) 9,5 en el ratón. Consecuentemente, todos los linajes que definen los diversos tipos de células pancreáticas, que comprenden células de los islotos endocrinas y acinares exocrinas y de los conductos, están formados por un grupo de células progenitoras multipotentes que expresan el factor de transcripción PDX1. El factor de transcripción Ngn3 se expresa transitoriamente en un subconjunto de las células progenitoras de páncreas desde E 9.5 a E 18.5 e inicia el programa de diferenciación de todas las células de los islotos. Se demostró que Ngn3 se requiere para la especificación de un precursor común para los cinco tipos de células endocrinas pancreáticas (α , β , δ , ϵ y PP) y que los ratones que carecen de la función Ngn3 dejan de generar cualesquiera células endocrinas pancreáticas y mueren, después del nacimiento, por diabetes (Gradwohl et al, 2000). La especificación de diferentes tipos de células de los islotos y la finalización del proceso de diferenciación requieren la activación de factores de transcripción que están situados a continuación de Ngn3. Entre estos factores reguladores, NeuroDI, Pax4 y NKX2.2 son blancos directos de Ngn3.

25 La diabetes tipo 1 y tipo 2 se caracteriza por la pérdida y la disfunción de las células beta. La diabetes tipo 2, que es la forma más común, se asocia a una disminución gradual de la sensibilidad respecto a la insulina. La diabetes tipo 1 es una condición en la que las células inmunes del cuerpo atacan a las células beta ubicadas en los islotos pancreáticos, reduciendo o eliminando la capacidad del cuerpo para producir insulina. El tratamiento para la diabetes tipo 1 consiste en un esfuerzo de por vida del control de la glucosa en la sangre, ejercicio físico, dieta y tratamiento con insulina. En algunos casos, los individuos con diabetes tipo 2 requieren, de manera similar, terapia con insulina. Sin embargo, estos enfoques son a veces insuficientes para controlar los niveles de glucosa en sangre. La diabetes mal controlada puede conducir a complicaciones potencialmente fatales. Los ojos, los nervios y los riñones son particularmente susceptibles a los daños causados por la diabetes tipo 1 o tipo 2 mal controladas.

35 Un tratamiento alternativo para los pacientes con diabetes tipo 1 es el trasplante completo del órgano pancreático. Tal procedimiento ofrece la posibilidad de un excelente control de la glucemia pero los pacientes están sometidos a los efectos adversos de la inmunodepresión y a los riesgos de una cirugía mayor.

40 Recientemente, se han hecho grandes avances en el desarrollo de trasplantes de islotos humanos en el tratamiento de la diabetes. Sin embargo, se requiere un gran número de islotos para lograr una independencia de la insulina a largo plazo y se necesitan dos o más donantes de órganos para acumular suficientes células de los islotos para un solo trasplante completo. Por lo tanto, la falta de islotos de cadáveres humanos es un obstáculo importante en el uso generalizado del trasplante de los islotos. Además, con este procedimiento, la inmunodepresión es todavía necesaria y los islotos son, a menudo, severamente lesionados por las condiciones de almacenamiento o por el tiempo de transporte que causa la apoptosis de las células β que secretan la insulina.

45 Estas limitaciones han dado una alta prioridad a los esfuerzos realizados para estimular el crecimiento de nuevos tejidos de los islotos pancreáticos. Como ejemplo, la solicitud de patente WO 2006/046923 propone, para el tratamiento de células madre pancreáticas con ácido retinoico, obtener células endocrinas productoras de hormonas pancreáticas.

50 Sin embargo, aún hay una gran necesidad de proporcionar métodos para proporcionar un número grande de células beta que puedan ser utilizadas para tratar la diabetes, mediante el trasplante de islotos de páncreas, o para promover la maduración de células β .

Compendio de la invención

55 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método in vitro para aumentar la reserva de células endocrinas progenitoras Ngn3⁺ obtenidas a partir de células madre, en el que dicho método comprende la etapa de poner en contacto las células madre, que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas, excepto células madre embrionarias humanas, con un inhibidor de canales SUR1/Kir6.2.

En un segundo aspecto, la presente solicitud proporciona un método in vitro para aumentar el número de células endocrinas pancreáticas obtenidas a partir de células madre, en el que dicho método comprende la etapa de poner en contacto las células madre, que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas, excepto células madre de embriones humanos, con un inhibidor de canales SUR1/Kir6.2.

5 En otro aspecto, la presente solicitud también se refiere a un método in vitro para incrementar la masa de células β obtenidas a partir de células madre, en el que dicho método comprende la etapa de poner en contacto las células madre, que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas con un inhibidor de canales SUR1/Kir6.2.

10 La presente solicitud también se refiere a un método in vitro para la obtención de células endocrinas pancreáticas, en el que dicho método comprende la etapa de poner en contacto las células madre, que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas, con un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2 para la diferenciación in vitro o ex vivo de células madre en células endocrinas pancreáticas.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona células pancreáticas obtenidas por el método de la invención.

15 En un aspecto adicional, la presente solicitud describe islotes pancreáticos obtenidos mediante el método de la invención.

En otro aspecto, la presente solicitud describe una composición farmacéutica que comprende células pancreáticas y/o islotes pancreáticos obtenidos mediante el método de la invención.

20 En otro aspecto, la presente solicitud se refiere a células pancreáticas y/o islotes pancreáticos obtenidos mediante el método de la invención para el tratamiento de la diabetes en un sujeto en necesidad del mismo.

En un último aspecto, la presente solicitud se refiere a un método para tratar la diabetes en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo dicho método las etapas que consisten en:

- obtener células madre que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas;
- 25 - poner en contacto dichas células madre con un inhibidor de los canales SUR1/Kir6.2 durante su diferenciación en células endocrinas pancreáticas;
- realizar el trasplante de una cantidad terapéuticamente eficaz de los islotes pancreáticos obtenidos por la diferenciación de dichas células madre en dicho sujeto.

Breve descripción de los dibujos

30 Figura 1: Efecto morfológico del aumento de las concentraciones de la glibenclamida en el desarrollo del páncreas embrionario in vitro.

(Fig. 1A) Se cultivaron páncreas de rata embrionarias E13.5 en la interfase aire/líquido durante 7 días sin (control) o con concentraciones crecientes de la glibenclamida. Se muestran imágenes representativas de páncreas cultivados en 1, 3, 5 y 7 días. El epitelio, con un círculo en blanco y rodeado por su mesénquima, está más ramificado en los páncreas tratados con glibenclamida 100 μ M (asteriscos blancos). (Fig. 1B) Tinción de Hoechst de páncreas cultivados 7 días sin o con las concentraciones indicadas de la glibenclamida. Téngase en cuenta la falta de núcleos picnóticos en los páncreas tratados con glibenclamida. Barra de escala: 50 micras. (Fig. 1C) Cuantificación de las áreas de superficie absolutas ocupadas por la tinción de Hoechst después de 7 días de cultivo sin o con glibenclamida 10 y 100 μ M. La cuantificación de la tinción de Hoechst se utilizó para estimar el tamaño de los rudimentos de páncreas. Se analizaron de cinco a seis páncreas para cada condición. Los valores son medias \pm SEM.

Figura 2: Efectos de la glibenclamida sobre la diferenciación de células β y α .

45 Cuantificación por PCR en tiempo real de la insulina. (Fig. 2A), ZnT-8 (Fig. 2B) y MAFA (Fig. 2C). ARNm en páncreas E13.5 antes (D0) y después de 1, 3, 5 y 7 días de cultivo (D1, D3, D5 y D7 respectivamente) con o sin glibenclamida 100 μ M. Cada punto de datos representa la media \pm SEM de al menos seis experimentos independientes **, $p < 0,01$. (Fig. 2D) Cuantificación de la superficie absoluta ocupada por la tinción de proproteína convertasa subtilisina/Kexina 1/3 (PCSK1/3) en células que expresan PDX-I que se desarrollaron después de 7 días de cultivo en presencia o en ausencia de glibenclamida 100 μ M. Los valores son medias \pm SEM de al menos tres experimentos independientes.

50 La diferenciación celular α se evaluó mediante tinción de glucagón en páncreas E13.5 cultivados 7 días en presencia o en ausencia de glibenclamida 100 μ M. (Fig. 2E) La superficie absoluta de la tinción de glucagón en páncreas E13.5 cultivados 7 días en presencia o en ausencia de glibenclamida 100 μ M se cuantificó. Los valores son medias \pm SEM de al menos tres experimentos independientes **, $p < 0,01$. (Fig. 2F) Perfil de expresión de Pou3F4 por PCR

en tiempo real en páncreas E13.5 antes (D0) y después de 1, 3, 5 y 7 días de cultivo (D1, D3, D5 y D7, respectivamente), en presencia o en ausencia de glibenclamida 100 μ M. Cada punto de datos representa la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes **, $p < 0,01$.

5 Figura 3: El tratamiento con glibenclamida amplifica la reserva de precursores pro-endocrinos sin actuar sobre la proliferación de células progenitoras de páncreas.

(Fig. 3A) Cuantificación por PCR en tiempo real de transcritos de Ngn3 en páncreas E13.5 después de 0, 1, 3, 5 y 7 días de cultivo (D0, D1, D3, D5 y D7 respectivamente) con o sin glibenclamida 100 μ M. Cada punto de datos representa la media \pm SEM de al menos siete experimentos independientes ***, $p < 0,001$. (Fig. 3B): Análisis inmunohistoquímico de la expresión Ngn3 de páncreas E13.5 cultivados 5 días en presencia (C, C') o en ausencia (B, B') de glibenclamida 100 μ M. Téngase en cuenta el aumento del número de núcleos Ngn3 positivos en los explantes tratados con glibenclamida. Barra de escala: 50 micras. B' y C' son, respectivamente, la ampliación de B y C. (Fig. 3C) Cuantificación del número de células positivas Ngn3 en páncreas E13.5 cultivados durante 5 días en presencia o en ausencia de glibenclamida 100 μ M. Los valores son medias \pm SEM de al menos tres experimentos independientes **, $p < 0,01$. (Fig. 3D) Páncreas E13.5 fueron cultivados durante 24 horas con o sin glibenclamida 100 μ M y pulsados con BrdU durante la última hora de cultivo. La inmunohistoquímica se realizó utilizando anticuerpos anti-BrdU y anti-PDX1. Cuantificación de la proliferación de progenitores tempranos PDX1 en páncreas cultivados 24h en ausencia o presencia de glibenclamida 100 μ M.

Figura 4: Las células Ngn3+ inducidas por glibenclamida se diferencian en células beta.

(Fig. 4A) Cuantificación de la superficie absoluta ocupada por la tinción con insulina en células beta que se desarrollaron después de 7, 9, 11 y 14 días de cultivo en ausencia o en presencia de glibenclamida 100 μ M sólo durante los primeros 5 días de cultivo. Cada punto de datos representa la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. (Fig. 4B) Cuantificación por PCR en tiempo real de las transcripciones de insulina en páncreas E13.5 después de 7, 9, 11 y 14 días cultivado sin o con glibenclamida 100 μ M sólo durante los primeros 5 días de cultivo. Cada punto de datos representa la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes **, $p < 0,01$. Cuantificación por PCR en tiempo real de las transcripciones de ZnT-8 (Fig. 4C) y MAFA (Fig. 4D) en páncreas E13.5 después de 7, 9, 11 y 14 días cultivados sin o con glibenclamida 100 μ M sólo durante los primeros 5 días de cultivo. Cada punto de datos representa la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes **, $p < 0,01$.

Descripción detallada de la invención

30 El canal de KATP de células β de páncreas desempeña un papel clave en la secreción de insulina estimulada por glucosa mediante la regulación del flujo de iones potasio a través de las membranas celulares. Los canales de K_{ATP} están abiertos a bajas concentraciones de glucosa, pero se cierran cuando la captación de glucosa y el metabolismo son estimulados por un aumento en la concentración de glucosa en plasma. Esto conduce a la despolarización de membrana, la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje, la entrada de calcio y, a su vez, a la secreción de insulina. Este canal se compone de dos tipos de subunidades - el rectificador interno del canal K^+ (Kir6.2) que forma el poro del canal y el receptor de sulfonilurea (SUR1), que sirve como una subunidad reguladora. Estas subunidades, asociadas con una estequiometría de subunidades Kir6.2/SUR1₄. Kir6.2 y SUR1, están codificadas por los genes KCNJ11 y ABCC8, respectivamente.

40 Los inventores en este documento han demostrado que los inhibidores de los canales Kir6.2/SUR1 son capaces de amplificar la reserva de células Ngn3+ progenitoras endocrinas que posteriormente se diferencian en células endocrinas pancreáticas. Estos inhibidores de este modo se pueden utilizar para aumentar drásticamente la masa de células β y la capacidad de secreción de la insulina en el páncreas en desarrollo o de los islotes.

45 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método in vitro para aumentar la reserva de células Ngn3+ progenitoras endocrinas, en el que dicho método comprende la etapa de poner en contacto células madre, que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas, con un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2.

50 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "células progenitoras endocrinas Ngn3+" se refiere a precursores de células endocrinas pancreáticas que expresan el factor de transcripción Neurogenina-3 (Ngn3). Las células progenitoras están más diferenciadas que las células madre multipotentes y pueden diferenciarse en sólo unos pocos tipos de células. En particular, las células progenitoras Ngn3+ endocrinas tienen la capacidad de diferenciarse en los cinco tipos de células endocrinas pancreáticas (α , β , δ , ϵ y PP). La expresión de Ngn3 puede evaluarse por cualquier método conocido por el experto en la técnica, tal como la inmunohistoquímica, usando un anticuerpo anti-Ngn3 o RT-PCR cuantitativa.

55 La expresión "células madre" se refiere a células que tienen la capacidad de ir a través de numerosos ciclos de división celular mientras se mantiene un estado no diferenciado y tienen la capacidad de diferenciarse en tipos de células especializadas. Existen dos grandes tipos de células madre de mamíferos: células madre embrionarias aisladas de los blastocitos y células madre adultas que se encuentran en los tejidos adultos.

- Las células madre pueden ser clasificadas de acuerdo con su potencia (su capacidad de diferenciarse en diferentes tipos de células). Las células madre totipotentes pueden diferenciarse en tipos de células embrionarias y extraembrionarias. Estas células contienen toda la información genética necesaria para crear un organismo completo y viable. Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en casi todos los tipos de células, pero no pueden desarrollarse en un embrión. Estas células mantienen la plasticidad para generar todos los tipos de células en un individuo, excepto el tejido extraembrionario, tal como la placenta. Las células madre multipotentes pueden diferenciarse en varios tipos de células, pero sólo aquellas de una familia estrechamente relacionada de células. Las células madre adultas, que residen en pequeño número en casi todos los tejidos adultos, generalmente son multipotentes: su potencial regenerativo es específico de tejido o de capa germinal.
- 5
- 10 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "células madre" abarca las células madre embrionarias, células madre adultas y células somáticas reprogramadas (células madre pluripotentes inducidas).
- Las células madre embrionarias son células madre embrionarias no humanas debido a algunas de las leyes y prácticas de las patentes.
- 15 En una realización, las células madre, que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas, se seleccionan del grupo que consiste en células madre pancreáticas, células madre pluripotentes y células madre multipotentes.
- En una realización particular, las células madre pancreáticas se seleccionan del grupo que consiste en células madre derivadas de islotes pancreáticos, conductos pancreáticos, células acinares pancreáticas y células madre derivadas del brote dorsal pancreático a partir de embriones.
- 20 Tal como se usa en este documento, se deberá tomar la expresión "células derivadas de" para indicar que este grupo particular de células se ha originado a partir de la fuente especificada, pero necesariamente no se ha obtenido directamente a partir de dicha fuente.
- 25 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "células madre pancreáticas" se refiere a células madre multipotentes específicas y de órganos que expresan PDX1 y que son capaces de diferenciarse en todos los tipos de células pancreáticas. El gen homeobox duodenal del páncreas PDX1 (UniGene Hs.32938) es uno de los primeros genes expresados en el páncreas en desarrollo. Las células que expresan PDX1 dan lugar a los tres tipos de tejido pancreático, exocrino, endocrino y conductos. Después del nacimiento, la expresión PDX1 se limita esencialmente a células β dentro de los islotes endocrinos del páncreas.
- 30 La identificación de las células madre pancreáticas de los islotes pancreáticos y poblaciones ductales se ha descrito en Seaberg et al. (Seaberg et al., 2004). Este trabajo demostró que estas células madre coexpresan marcadores de precursores neuronales y pancreáticos y que se diferencian para formar poblaciones distintas de neuronas, células de la glía y estrelladas, células endocrinas pancreáticas beta, alfa y delta y células exocrinas pancreáticas.
- 35 Además, se ha descubierto recientemente que las células ductales y acinares pancreáticas son capaces, bajo ciertas condiciones, de producir una regresión a un fenotipo menos diferenciado y, a continuación, pueden diferenciarse para formar células endocrinas y, en particular, para formar células beta (Bonner-Weir et al., 2008; Minami et al., 2008).
- 40 En consecuencia, las células madre que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas pueden ser células madre pancreáticas derivadas de tejido exocrino, endocrino o ductal o células pancreáticas diferenciadas que se mueven en una fase menos diferenciada que expresan PDX1. Tales células madre pancreáticas se pueden obtener a partir de tejido adulto por cualquier método conocido en la técnica anterior, tales como los descritos en los artículos de Seaberg et al. Bonner-Weir et al., y Minami et al. (Seaberg et al., 2004; Bonner-Weir et al., 2008; Minami et al., 2008).
- 45 También pueden derivarse células madre pancreáticas de los brotes de páncreas dorsal a partir de embriones. El páncreas dorsal es un brote embrionario del revestimiento endodérmico del intestino en la pared dorsal cefálica al nivel del divertículo hepático, que forma la mayor parte del páncreas y su conducto principal. Pueden obtenerse células madre pancreáticas que expresan PDX1 a partir de ovocitos fertilizados cuando el tejido pancreático ha comenzado a desarrollarse y antes de la diferenciación terminal de la mayoría de las células pancreáticas.
- Las células madre pancreáticas se pueden derivar del brote pancreático dorsal de embriones no humanos debido a algunas de las leyes y prácticas de las patentes.
- 50 En otra realización, las células madre que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas son células madre multipotentes derivadas de otros tejidos adultos diferentes al tejido pancreático. Preferiblemente, las células madre multipotentes se derivan de tejido adulto seleccionado de entre el grupo que consiste en médula ósea, hígado, sistema nervioso central, bazo y tejido adiposo.
- 55 Se han descrito células madre derivadas de médula ósea (hematopoyéticas o mesenquimales) que son capaces de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas (Oh et al., 2004; Moriscot et al., 2005; Sun et al., 2007; Gabr et al.,

2008). Las células madre derivadas de la médula ósea se pueden aislar de la médula ósea en función de su capacidad de adherirse a un soporte de plástico. Luego, se pueden expandir y cultivarse. La expresión génica de PDX-1 puede ser inducida en estas células utilizando factores tales como sulfóxido de dimetilo, tricostatina o β -mercaptoetanol.

- 5 Las células madre mesenquimales de la médula ósea y el tejido adiposo representan una población celular muy similar con fenotipo comparable. En consecuencia, las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo también tienen el potencial de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas (Timper et al., 2006).

10 Se ha descrito que las células madre del hígado, también llamadas células madre ovas, son capaces de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas cuando se cultivan en un ambiente de mucha glucosa (Yang et al., 2002). Otra posibilidad puede ser inducir la transdiferenciación de células madre hepáticas en células progenitoras pancreáticas mediante la expresión de un transgén PDX-1 (Sapir et al., 2005).

Se han descrito también células progenitoras neurales cerebrales (Hori et al., 2005) y esplenocitos (Kodama et al., 2003) capaces de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas.

15 En una realización preferida, no se modifican genéticamente las células madre multipotentes derivadas de tejido adulto y aquellas que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas. Estas células presentan la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas solamente cultivándolas en presencia de factores de crecimiento específicos y/o compuestos.

En una realización particular adicional, las células madre son células madre pluripotentes obtenidas por reprogramación de células somáticas. Dichas células también se denominan células madre pluripotentes inducidas.

20 Se ha encontrado que las células madre pluripotentes inducidas reproducen las características de las células madre embrionarias, tales como las células madre embrionarias humanas, y que son, por lo tanto, una alternativa al controvertido uso de estas células (Romano et al., 2008). Se pueden obtener células madre pluripotentes inducidas a partir de células somáticas, tales como fibroblastos de piel humana, por una variedad de métodos esencialmente basados en la manipulación de un grupo seleccionado de factores de transcripción (Maherali et al., 2008). Por ejemplo, se han generado células madre pluripotentes inducidas por la expresión ectópica de cuatro factores de transcripción, Oct4, Sox2, Klf4 y c-MYC (Takahashi et al., 2007; Lowry et al., 2008) u Oct4, Sox2, NANOG y Lin28 (Yu et al., 2007). Además, se ha demostrado que las células pluripotentes inducidas tienen el potencial de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas (Tateishi et al., 2008).

30 En otra realización, las células madre pluripotentes se derivan de células madre embrionarias. Las células madre embrionarias (ES) se derivan de células totipotentes de embriones de mamífero en etapas tempranas y son capaces de una proliferación ilimitada, no diferenciada, in vitro. Características esenciales de estas células incluyen (i) derivación del embrión de pre-implantación o peri-implantación, (ii) proliferación indiferenciada prolongada, y (iii) un potencial de un desarrollo estable para formar derivados de las tres capas germinales embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo), incluso después de un cultivo prolongado.

35 Las células ES crecen como colonias homogéneas y no diferenciadas cuando se propagan en una capa de alimentación tales como los fibroblastos de embriones de ratón. La eliminación de esta capa de alimentación se asocia con la diferenciación en los derivados de las tres capas germinales embrionarias. Las células madre pluripotentes se derivan de las células madre embrionarias no humanas, debido a algunas de las leyes y prácticas de las patentes.

40 Las células madre, como se describió anteriormente, que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas y, por lo tanto, en sus precursores; es decir, las células progenitoras endocrinas Ngn3+, se pueden utilizar en el método de la invención para aumentar la reserva de estas células Ngn3+. La etapa de ponerlas en contacto con un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2 tiene que ser llevada a cabo después de la detección de la expresión génica de PDX1 y antes de la diferenciación completa de estas células en células endocrinas pancreáticas, preferiblemente después de la detección de la expresión génica de PDX1 y antes de la detección de la expresión de Ngn3.

Las células madre, como se describió anteriormente, pueden ser derivadas de cualquier mamífero, tales como ratones, ratas, cerdos, perros, gatos, caballos, monos o seres humanos.

50 La expresión "inhibidor del canal SUR1/Kir6.2", tal como se utiliza en este documento, se refiere a un compuesto que tiene la capacidad de cerrar el canal Kir6.2/SUR1 y, por lo tanto, bloquear el flujo de iones potasio a través de las membranas celulares.

El inhibidor de los canales de SUR1/Kir6.2 se selecciona de sulfonilureas y metiglinidas (o glinidas), y cualquier combinación de las mismas.

En una realización, el inhibidor es una sulfonilurea seleccionada del grupo que consiste en acetohexamida, carbutamida, glibornurida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, glipizida, gliclazida, glibenclamida (gliburida), gliquidona, glicopiramida, glisoxepida y glimepirida.

5 En otra realización, el inhibidor es una metiglinida seleccionada del grupo que consiste de repaglinida, nateglinida y mitiglinida.

En una realización preferida, el inhibidor de los canales de SUR1/Kir6.2 es glibenclamida.

El inhibidor de los canales de SUR1/Kir6.2 se puede usar solo, en combinación con uno o varios inhibidores de los canales de SUR1/Kir6.2 y en combinación con otras sustancias activas. Por ejemplo, la glibenclamida se puede utilizar en asociación con metformina.

10 En el presente método, se ponen en contacto células madre que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas con un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2. Este paso de poner en contacto las células madre con un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2 puede consistir en el cultivo de células madre en un medio que contiene un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2.

15 La concentración del inhibidor de canales SUR1/Kir6.2 puede ser elegida por el experto en la técnica utilizando procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, se pueden conseguir pruebas preliminares para evaluar la toxicidad del inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2 en células madre. En este caso, las células madre son cultivadas a diferentes concentraciones de este inhibidor, monitorizándose los marcadores de toxicidad. Estos marcadores pueden ser marcadores de muerte celular por apoptosis, tales como la fragmentación del ADN apoptótico y la activación de caspasa-DEVD. La concentración del inhibidor del canal tiene que ser elegida con el fin de prevenir cualquier efecto
20 tóxico sobre las células madre en crecimiento. Preferiblemente, la concentración se elige con el fin de que sea la concentración más alta que no presenta ningún efecto tóxico.

En una realización, se ponen en contacto células madre con un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2 mediante su cultivo en presencia de 0,1 a 500 μM de dicho inhibidor, preferiblemente en presencia de 1 a 250 μM de dicho inhibidor y, lo más preferiblemente, en presencia de 50 a 150 μM de dicho inhibidor.

25 En una realización particular, el inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2 es glibenclamida y las células madre se ponen en contacto con glibenclamida mediante su cultivo en presencia de 100 μM de glibenclamida.

El medio de cultivo que se puede utilizar durante la etapa de poner en contacto un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2 está diseñado para apoyar el crecimiento y la diferenciación de las células madre. Este medio generalmente se cambia cada día y comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, antibióticos que previenen el crecimiento de bacterias y hongos, un tampón para mantener el pH y factores de crecimiento
30 específicos. Este medio puede ser diseñado fácilmente por la persona experta en la técnica. Un ejemplo de tal medio se presenta en la sección experimental más adelante o en la sección experimental del artículo de Guillemain et al. (Guillemain et al., 2007).

35 También se pueden añadir otros compuestos en el medio, tal como el compuesto conocido que estimula la replicación de células β , que induce la diferenciación en células β o que inhibe la apoptosis de las células β . Tales compuestos pueden elegirse entre el grupo que consiste en nicotinamida, glucagón tipo péptido 1 (GLP-1), la glucosa, la exendina-4 y el ácido retinoico.

40 En una realización, se ponen en contacto células madre con un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2 de 3 a 10 días, preferiblemente de 5 a 7 días. Durante la etapa de puesta en contacto, las células madre son cultivadas en un medio de apoyo del crecimiento y a la diferenciación y que contiene un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2.

Al final de la etapa de puesta en contacto y/o varios días después, el número de células que expresan Ngn3 puede ser evaluado con el fin de verificar la eficacia del tratamiento, es decir, el aumento de la reserva de células progenitoras endocrinas Ngn3+. El número de células que expresan Ngn3 obtenidas en las muestras tratadas se compara con el número de células que expresan Ngn3 obtenidas en la muestra de control, es decir, sin la etapa de
45 puesta en contacto con un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2. Con el fin de ser comparables, las células madre en las muestras tratadas y de control tienen que ser del mismo tipo celular y presentarse con el mismo protocolo, excepto el tratamiento con el inhibidor de canales.

En una realización, el conjunto de células progenitoras endocrinas Ngn3+ ha aumentado en más de un 25%, preferiblemente en más de un 50% y, lo más preferiblemente, en más de un 100%.

50 En una realización preferida, el conjunto de células progenitoras endocrinas Ngn3+ ha aumentado en más de un 150%, preferiblemente en más de un 200% y los más preferiblemente en más de un 250%.

En una realización, el método comprende además una etapa que consiste en la diferenciación de células progenitoras endocrinas Ngn3+ obtenidas en precursores de células endocrinas pancreáticas y/o en las propias células endocrinas pancreáticas.

En un medio de cultivo apropiado, tal como se ha descrito anteriormente, las células progenitoras endocrinas Ngn3+ se diferencian en precursores de células endocrinas pancreáticas y posteriormente en células β , δ , ϵ y/o PP.

5 La presente solicitud también se refiere a un método in vitro para aumentar el número de células endocrinas pancreáticas obtenidas a partir de células madre, en el que dicho método comprende la etapa de poner en contacto las células madre, que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas, con un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2.

Este método comprende la etapa de poner en contacto las células madre, que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas; excepto las células madre embrionarias humanas, debido a algunas de las leyes y prácticas de las patentes.

10 La presente solicitud también describe un método in vitro para aumentar la masa de células β obtenida a partir de células madre, en la que dicho método comprende la etapa de poner en contacto las células madre, que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas, con un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2.

15 Este método comprende la etapa de poner en contacto las células madre, que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas, excepto células madre embrionarias humanas, debido a algunas de las leyes y prácticas de las patentes.

La presente solicitud también describe un método in vitro para la obtención de células endocrinas pancreáticas, en el que dicho método comprende la etapa de poner en contacto las células madre, que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas, con un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2 para la diferenciación in vitro o ex vivo de células madre en células endocrinas pancreáticas. Las células madre tienen que ser capaces de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas y pueden elegirse como se describió anteriormente.

En otro aspecto, la presente solicitud también describe un método in vivo para aumentar el número de células endocrinas pancreáticas, en particular, las células β , en el páncreas de un feto, en el que dicho método comprende la administración de un inhibidor de canales SUR1/Kir6.2 a la mujer embarazada.

25 En otro aspecto, la presente solicitud también describe un método in vivo para aumentar el número de células endocrinas pancreáticas, en particular, de las células β , en el páncreas de un sujeto, en el que dicho método comprende la administración de un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2 a dicho sujeto. Preferiblemente, el sujeto es un niño.

30 En un aspecto adicional, la presente solicitud describe células pancreáticas obtenidas por el método in vitro de la invención.

En un aspecto, las células pancreáticas son células progenitoras endocrinas Ngn3⁺.

En otro aspecto, las células pancreáticas son células derivadas de células endocrinas progenitoras Ngn3⁺, es decir, precursores de células endocrinas pancreáticas y las células endocrinas pancreáticas.

35 Los precursores de células endocrinas pancreáticas pueden expresar, por ejemplo, Pax4 (gen que codifica box-7 emparejado) o Arx (homeobox relacionado con Aristaless).

Las células endocrinas pancreáticas pueden ser células α , β , δ , ϵ y/o PP.

40 Preferiblemente, las células pancreáticas son células β . La expresión "células β ", como se usa en este documento, se refiere a las células pancreáticas que son capaces de producir insulina. In vivo, estas células se encuentran en los islotes pancreáticos de Langerhans. Esta población de células puede ser identificada por la expresión de marcadores específicos, tales como ZnT-8, un transportador específico de zinc (Chimienti et al, 2004.) o MafA, un factor de transcripción específico (Zhang et al, 2005; Matsuoka et al, 2007), o por la capacidad de responder a la exposición de glucosa de una manera específica mediante la secreción de insulina.

La presente solicitud también describe islotes pancreáticos que comprenden las células pancreáticas de la invención como se describe anteriormente.

45 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "islote pancreático" se refiere a agregados celulares discretos de células pequeñas obtenidos in vitro o ex vivo y que incluyen células productoras de hormonas endocrinas pancreáticas, tales como células alfa, células beta, células delta, células PP y células epsilon. Los islotes pancreáticos se asemejan en forma a los islotes de Langerhans del páncreas y son esferoides en la forma. In vivo, los islotes de Langerhans están rodeados por el tejido exocrino del páncreas.

50 En un aspecto, los islotes pancreáticos comprenden células beta obtenidas por el método de la invención.

En otro aspecto, los islotes pancreáticos comprenden células beta y células alfa obtenidas por el método de la invención.

Preferiblemente, los islotes pancreáticos comprenden células alfa, células beta, células delta, células PP y células épsilon obtenidas por el método de la invención.

- 5 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende células pancreáticas y/o islotes pancreáticos de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los vehículos farmacológicamente aceptables tienen que ser compatibles con las células y pueden ser, por ejemplo, un medio de cultivo celular (tal como medio esencial mínimo de Eagle), solución salina tamponada con fosfato, tampón de Krebs-Ringer, y solución salina equilibrada de Hank +/- glucosa (HBSS).

- 10 Preferiblemente, la composición farmacéutica es adecuada para su administración parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, retroperitoneal y por vía intravenosa. Dicha composición puede comprender cualquier aditivo compatible con las células.

- 15 La composición farmacéutica que comprende células pancreáticas y/o islotes pancreáticos de la invención se formula de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20^a ed), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York) conocido por cualquier persona experta en la técnica. Las composiciones para administración parenteral son generalmente soluciones estériles fisiológicamente compatibles o suspensiones. Adyuvantes tales como un anestésico local, conservantes y agentes tamponantes pueden disolverse en el vehículo.

- 20 En un aspecto, la composición farmacéutica comprende células pancreáticas y/o islotes pancreáticos, como se describe en este documento, encapsulados en una matriz biocompatible conocida en la técnica. Una variedad de tecnologías de encapsulación se han desarrollado (por ejemplo, Qi et al, 2008 y el documento WO 91/10425).

- 25 La composición farmacéutica que comprende células pancreáticas y/o islotes pancreáticos de la invención, como se describe en este documento, se puede utilizar para el trasplante de islotes y/o el tratamiento de la diabetes tipo 1 y tipo 2.

La composición farmacéutica también puede comprender uno o varios compuestos activos adicionales, por ejemplo, compuestos conocidos para mejorar la supervivencia celular, la proliferación o para evitar cualquier tipo de contaminación.

- 30 En otro aspecto, la presente solicitud describe células pancreáticas y/o islotes pancreáticos, como se describe en esta invención, para el tratamiento de la diabetes en un sujeto en necesidad del mismo.

La presente solicitud también describe un método de tratamiento de la diabetes en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo dicho método las etapas que consisten en:

- obtener células madre que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas;
- 35 - poner en contacto dichas células madre con un inhibidor de los canales de SUR1/Kir6.2 durante su diferenciación en células endocrinas pancreáticas;
- trasplantar una cantidad terapéuticamente eficaz de los islotes pancreáticos obtenidos por la diferenciación de dichas células madre en dicho sujeto.

- 40 Una vez trasplantados, los islotes pancreáticos comienzan a producir insulina, que regulan activamente el nivel de glucosa en la sangre. El principal obstáculo en el trasplante de islotes es el hecho de que hay un suministro inadecuado de islotes de cadáver para poner en práctica este procedimiento sobre una base clínica generalizada. El método, como se describe en este documento, resuelve este problema mediante la obtención de un número de aumento de los islotes pancreáticos que se pueden utilizar para el trasplante.

El término "diabetes" pretende abarcar la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2.

- 45 Tal como se utiliza en este documento, el término "tratamiento", "tratar" o "tratando" se refieren a cualquier acto destinado a mejorar el estado de salud de los pacientes, tal como la terapia, la prevención, la profilaxis y el retraso de la enfermedad. En ciertos aspectos, dicho término se refiere a la mejora o la erradicación de una enfermedad o síntomas asociados con una enfermedad.

- 50 En particular, la expresión "tratamiento de la diabetes", como se usa en este documento, no significa necesariamente una cura completa pero significa que se reducen los síntomas o complicaciones de la enfermedad subyacente, y/o que una o más de las causas o mecanismos subyacentes celulares, fisiológicos, o que causan los síntomas o complicaciones bioquímicos se reducen. La expresión "tratamiento de la diabetes" también incluye en su

alcance el tratamiento profiláctico de un sujeto asintomático que se piensa que está en riesgo de desarrollar diabetes.

El sujeto a tratar es cualquier mamífero, preferiblemente un ser humano.

5 Tal como se usa en este documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de islotes administrados al sujeto, que será efectiva para mejorar, prevenir, retardar la aparición o tratar la diabetes o las complicaciones asociadas en el sujeto. Típicamente, se estimó que un paciente diabético necesita al menos 10.000 islotes pancreáticos por kilogramo de peso corporal para lograr un aumento mensurable en la producción de insulina. En general, entre 10.000 y 30.000 islotes pancreáticos por kilogramo de peso corporal se administran al sujeto durante el trasplante. El número de islotes pancreáticos que se administra a un sujeto variará dependiendo de una serie de parámetros que incluyen el peso del sujeto, la gravedad de la enfermedad y el sitio de implantación.

10 Generalmente, los islotes pancreáticos se suspenden en un vehículo farmacológicamente aceptable, tal como, por ejemplo, un medio de cultivo celular (tal como el medio esencial mínimo de Eagle), tampón fosfato salino, tampón de Krebs-Ringer y solución salina equilibrada de Hank +/- glucosa (HBSS).

Los islotes pancreáticos se pueden administrar por cualquier método conocido para un experto en la técnica.

15 En un aspecto, los islotes pancreáticos se administran por inyección. Por ejemplo, los islotes pancreáticos se pueden administrar mediante inyección subcutánea, inyección intra-peritoneal, inyección bajo la cápsula renal, inyección a través de la vena porta y la inyección en el bazo.

Según el origen de las células madre, el trasplante de islotes puede ser autólogo, isogénico, alogénico o xenogénico.

20 Tal como se utiliza más adelante, el "donante" es un donante de células madre y el "receptor" es un sujeto que recibe un trasplante de islotes.

En un aspecto, el trasplante de islotes es isogénico, es decir, el donante y el receptor son genéticamente idénticos.

En otro aspecto, el trasplante de islotes es alogénico, es decir, el donante y el receptor son de la misma especie.

En otro aspecto, el trasplante de islotes es xenogénico, es decir, el donante y el receptor son de especies diferentes.

Los trasplantes alogénicos y xenogénicos requieren la administración de medicamentos contra el rechazo.

25 Para el trasplante isogénico, alogénico y xenogénico, el donante puede estar vivo o muerto.

Preferiblemente, el trasplante de islotes es autólogo, es decir, el donante y el receptor son el mismo sujeto. En este caso, las células madre pueden ser (i) derivadas del tejido adulto del sujeto, (ii) derivarse de las células somáticas de dicho sujeto que han sido reprogramadas para proporcionar células madre pluripotentes inducidas o (iii) a partir de células madre embrionarias obtenidas por clonación.

30 Todas las referencias citadas en esta memoria descriptiva se incorporan por referencia.

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero indicado o una etapa o un grupo de números enteros o etapas pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas".

35 La referencia en la presente memoria descriptiva a cualquier publicación previa (o información derivada de ella), o para cualquier asunto que se conoce, no es, y no debe tomarse como un reconocimiento o admisión o cualquier forma de sugerencia de que esa publicación previa (o información deriva de ella) o la materia conocida forme parte del conocimiento general común en el campo de la actividad a la que se refiere esta memoria descriptiva.

Los siguientes ejemplos se dan con fines de ilustración y no a modo de limitación.

40 **Ejemplos**

Materiales y métodos

Animales y disección de páncreas

45 Fueron compradas ratas Wistar preñadas en el centro de cría Janvier (CERJ, LeGenet, Francia). El primer día postcoital se tomó como día embrionario (E) 0,5. Se sacrificaron las ratas preñadas por asfixia con CO₂ de acuerdo con las directrices emitidas por el Comité de Cuidado de Animales Francés. Se diseccionaron brotes dorsales de páncreas de embriones de rata E13.5 tal como se ha descrito anteriormente (Miralles et al, 1998). En pocas palabras, el estómago, el páncreas y una pequeña parte del intestino se diseccionaron juntos, y luego se aisló el primordio del páncreas.

Cultivo de órganos

Fueron cultivados rudimentos dorsales de páncreas en filtros de 0,45 micras (Millipore) en la interfaz de aire-medio en placas Petri estériles de 35 mm que contenían 2 ml de medio RPMI-1640 (Invitrogen) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 10 mmol/L de HEPES, 2 mmol/L de L-glutamina, IX aminoácidos no esenciales (Invitrogen) y suero de ternera fetal al 10% inactivado por calor (Hyclone, Logan, UT, EE.UU.). Se disolvieron glibenclamida (MP Biomedical) y nifedipina (Sigma), usados a las concentraciones indicadas, primero en forma de soluciones concentradas en DMSO dimetilsulfóxido (Sigma), la concentración final de DMSO en el medio de cultivo era inferior al 0,5% (vol/vol). El medio de cultivo se cambió cada día. Se añadieron glibenclamida y nifedipino al medio diariamente. Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada compuesta de 95% de aire y 5% de CO₂. Al final del periodo de cultivo, los páncreas fueron fotografiados, y se fijaron como se describe a continuación o se recogieron para la extracción del ARN.

Inmunoquímica y superficie de la cuantificación

Inmunoquímica - Los rudimentos de páncreas fueron fijados en formalina al 10%, se pre-embobieron en gel de agarosa (4% de agarosa tipo VII de baja temperatura de gelificación (Sigma) en H₂O) y se embobieron en parafina. La inmunohistoquímica se realizó en secciones de parafina de 4 micras como se ha descrito previamente (Duvillie et al, 2006). Los anticuerpos primarios fueron de anti-insulina de ratón (1/2000; Sigma), anti-glucagón de conejo (1/1000; Diasorin), anti-amilasa de conejo (1/300; Sigma), anti-carboxipeptidasa A de conejo (1/600; Biogenesis, Kidlington, Oxford, Reino Unido), anti-PDX1 de conejo (1/1000) (Duvillie et al, 2003) anti-BrdUrd5 de ratón (1/2; Amersham Biosciences, Buckingham, Reino Unido), anti-PCK1/3 de conejo, anti-Ngn3 de conejo (1/100, Guillemain et al., 2007), anti-Kir6.2 de conejo y anti-SUR1 (1/100, Santa Cruz). Los anticuerpos secundarios fluorescentes eran anticuerpo anti-conejo de fluoresceína (1/200; Jackson Immunoresearch, Baltimore, MD, EE.UU.), anti-conejo de cabra de fluoresceína Alexa Fluor 488 (1/400; Invitrogen) y el anticuerpo anti-ratón de color rojo Texas (1/200; Jackson). Los núcleos se tiñeron de azul con Hoechst 33342 (0,3 µg/ml; Invitrogen). La detección de Ngn3 se realizó como se ha descrito previamente (Guillemain et al., 2007) usando el kit Vectastain elite ABC (Vector Laboratories).

Las fotografías fueron tomadas usando un microscopio de fluorescencia (Leica, Leitz DMRB, Rueil-Malmaison, Francia) y se digitalizaron usando una cámara 3CCD enfriada C5810 de Hamamatsu (Middlesex, Nueva Jersey).

Cuantificación - Para cuantificar el área de superficie de las células que expresaban insulina, glucagón, PCSK1/3, CPA y amilasa, todas las secciones de cada rudimento del páncreas fueron digitalizadas. Se examinaron secciones alternativas para evitar contar la misma celda dos veces. La superficie de insulina, glucagón, PCSK1/3, CPA, amilasa, y las tinciones de Hoechst se cuantificaron utilizando Iplab (Scanalytics). Las áreas teñidas se suman para obtener la superficie total por rudimento en mm². Para medir la proliferación de los progenitores tempranos que expresan PDX1, se contó la frecuencia de progenitores BrdU positivos que expresaban PDX1 entre 3000 progenitores tempranos que expresaban PDX1 por rudimento. Para cuantificar el número absoluto de células que expresaban NGN3, los rudimentos de páncreas se seccionaron y todas las secciones se tiñeron con un anticuerpo anti-Ngn3. Las células positivas se contaron en todas las secciones de cada rudimento de páncreas. Un mínimo de tres rudimentos se analizó por condición.

Extracción de ARN y PCR en tiempo real

El ARN total se aisló a partir de grupos de al menos tres páncreas utilizando el Qiagen RNeasy Microkit (Qiagen, Courtaboeuf, Francia) y se transcribió de forma inversa usando reactivos Superscript (Invitrogen). La PCR en tiempo real se realizó con el sistema de PCR 7300 rápida en tiempo real (Applied Biosystem) utilizando tanto mezcla maestra Taqman PCR Universal o mezcla verde maestra de PCR SYBR (Applied Biosystem) con cebadores y sondas marcadas específicas para cada gen. Se utilizó peptidilpropil isomerasa A/ciclofilina A como control endógeno y ADNc de páncreas E 16.5 como muestra del calibrador. Los datos se analizaron por el método umbral de ciclo comparativo (Livak et al, 1997) y se presentan como las veces del cambio en la expresión génica. Al menos tres grupos de explantes fueron analizados por condición.

Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como media ± SEM. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student.

Resultados

Las altas concentraciones de glibenclamida no alteraron la morfología del páncreas en desarrollo in vitro

Usando el modelo in vitro como se ha descrito anteriormente (páncreas E13.5 de embriones de rata cultivados en la interfase aire/medio de un filtro flotante), se examinaron los efectos del aumento de las concentraciones de la sulfonilurea glibenclamida (un inhibidor de los canales K_{ATP}) en el desarrollo del páncreas. Como se muestra en la Figura 1A, el crecimiento del páncreas fue similar en ausencia (control) o en presencia de glibenclamida 10 nM, 100 nM, 1, 10 ó 100 µM durante los 7 días de cultivo. En ambas condiciones, el epitelio creció rápidamente, se extendió hacia el mesénquima y desarrolló lóbulos. No hay ninguna diferencia en la apoptosis en los páncreas cultivados 7

días sin o con glibenclamida 10 y 100 μM como se muestra por la tinción de Hoechst de los núcleos (Figura 1B). Por otra parte, la falta de toxicidad de glibenclamida en el desarrollo del páncreas se confirmó mediante el análisis cuantitativo del tamaño global de páncreas cultivado 7 días en presencia o en ausencia de 10 ó 100 μM glibenclamida (Figura 1C).

- 5 Sobre la base de estos primeros resultados, en particular, la falta de toxicidad de glibenclamida en la morfología del páncreas, y en los efectos sobre las células progenitoras pro-endocrinas (véase la figura 4), la concentración de glibenclamida 100 μM se utilizó en los siguientes experimentos.

Efectos de la glibenclamida en la diferenciación de células α y β .

10 Para determinar los efectos de la glibenclamida en el desarrollo endocrino y en particular en células que expresan SUR1, se comparó el número de células positivas para insulina en páncreas cultivados durante 7 días en ausencia o en presencia de la glibenclamida. Los explantes tratados con glibenclamida presentan muy pocas células positivas de insulina y la superficie ocupada por la población de células de insulina se redujo en un 70% (datos no mostrados). Debido a que la glibenclamida es un secretagogo de insulina potente, los inventores preguntaron si el bajo contenido de insulina observado fue solamente la consecuencia de un aumento de la secreción de insulina en el medio de cultivo o era debido al nivel de ARNm de insulina reducida. Para probar esta última hipótesis, se analizaron por PCR en tiempo real la expresión del gen de la insulina antes (D0) y después de 1, 3, 5 y 7 días de cultivo. Como se muestra en la Figura 2A, la expresión de insulina se redujo fuertemente en los páncreas tratados con glibenclamida tan pronto como D3. Dos mecanismos pueden dar cuenta de la disminución observada en la expresión de insulina: (i) la inhibición de la diferenciación de las células β de los progenitores de pro-endocrinas que conduce a una reducción del número de células β y por lo tanto a una disminución de la cantidad total de ARNm de insulina o (ii) la inhibición del gen de insulina sin afectar a la población de células β . Por lo tanto, se examinó el patrón de expresión de dos marcadores de células β : el transportador de zinc ZnT-8 (Chimienti et al, 2004) y el factor de transcripción específico de células β MAFA (Zhang et al, 2005; Matsuoka et al, 2007) (Figuras 2B y 2C). Estos resultados indican que durante los 7 días de cultivo, la glibenclamida no afectó la expresión de estos dos marcadores de las células beta. Por otra parte, después de 7 días de cultivo, la superficie ocupada por la tinción de prohormona convertasa 1/3 (PCSK1/3) en células PDX-1+ (PDX-1 se expresa específicamente en las células β adultas (Ohlsson et al., 1993)) fue similar en los páncreas cultivados sin o con glibenclamida (Figura 2D). Estos resultados demuestran que elevadas concentraciones de glibenclamida no impiden la diferenciación de las células β .

30 Se observó, además, que la glibenclamida se incrementó en 3,5 veces el número de células que expresan el glucagón (Figura 2E). Por otra parte, este resultado fue confirmado por el aumento significativo del nivel de ARNm de Pou3F4/Brn4 a D7 (Figura 2F); Pou3F4, conocido como el factor de transcripción específico sólo de células α que mantiene el destino de las células α (Jensen et al, 2000; Heller et al, 2004). Por otro lado, los inventores encontraron también un aumento de dos veces la expresión de somatostatina después de 7 días de cultivo en páncreas tratados con glibenclamida (datos no mostrados).

35 La glibenclamida amplifica el grupo de progenitores endocrinos, aumenta la expresión del objetivo Ngn3 pero no afecta a la proliferación de precursores del páncreas

40 El destino endocrino pancreático se determina por la expresión de Ngn3, un factor de transcripción que marca específicamente los precursores endocrinos (Gradwohl et al., 2000; Gu et al, 2002). El patrón de expresión de Ngn3 fue investigado antes y después de 1, 3, 5 y 7 días de cultivo. Como se muestra en la Figura 3A, Ngn3 se expresó débilmente en E13.5 (D0). Aumenta el día 1 y 3, pero siguen siendo similares en ausencia o en presencia de la glibenclamida. Por el contrario, después de 5 días de cultivo, la expresión de Ngn3 alcanzó un pico y se incrementó en glibenclamida siete veces (***: $p < 0,001$). A partir de entonces, el nivel de ARNm de Ngn3 disminuyó ligeramente, pero siguió siendo mucho más alto (***: $p < 0,001$) en los páncreas tratados con glibenclamida.

45 Para probar si la glibenclamida no sólo actúa sobre la expresión génica de Ngn3 sino también en el número de células que expresan Ngn3, la expresión de Ngn3 se analizó mediante inmunohistoquímica (Figura 3B) y el número de células Ngn3+ se comparó en los páncreas cultivados durante 5 días en ausencia o en presencia de glibenclamida. La Figura 3C muestra que el número de células Ngn3+ que se desarrollan en presencia de glibenclamida fue tres veces mayor que en ausencia de la glibenclamida. Estos resultados indican que la glibenclamida amplifica el grupo de progenitores Ngn3+ endocrinos.

50 Debido a que el factor de transcripción NeuroD/Beta 2 es un blanco posterior a Ngn3 (Huang et al, 2000) y es necesario para la diferenciación endocrina (Guillemain et al., 2007); los inventores examinaron el patrón de expresión de esta diana de Ngn3. Los niveles de ARNm fueron similares después de 1 y 3 días de cultivo en ausencia o en presencia de glibenclamida. En concordancia con el patrón de expresión de Ngn3 en los páncreas tratados con glibenclamida, NeuroD se incrementó significativamente en D5 y permaneció mejorado en D7 (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de Ngn3 conduce a la inducción de un factor clave importante para la diferenciación de los islotes.

Además, se cultivaron páncreas embrionarios durante 1 día y se añadió BrdU durante la última hora de cultivo para probar si la glibenclamida aumentaba el número de células Ngn3+ actuando sobre la proliferación de células

progenitoras del páncreas. El porcentaje de células PDX-I+ que incorporan BrdU fue similar en presencia (32,60% ± 4,2%) o en ausencia (31,24% ± 2,8%) de la glibenclamida (Figura 3D). Estos resultados demuestran que la glibenclamida no modifica la proliferación del precursor de páncreas.

5 En conclusión, la glibenclamida amplifica la reserva de células que expresan pro-endocrinos Ngn3 sin actuar sobre la proliferación de progenitores del páncreas.

Las células Ngn3+ inducidas por la glibenclamida se diferencian en células beta

10 Se cultivaron páncreas hasta 14 días en presencia de glibenclamida sólo durante los primeros 5 días de cultivo, es decir, hasta que Ngn3 alcanzó un pico (páncreas Glib-5D), en ausencia (páncreas de control) o en presencia de glibenclamida (páncreas Glib) durante un periodo de cultivo de 14 días. Entonces, las masas de células que expresaban insulina se compararon después de 9, 11 y 14 días de cultivo. Como se muestra en la figura 4A, se observó un gran número de células que expresaban insulina en páncreas Glib-5D los D9, D11 o D14. Por el contrario, se detectaron menos células que contenían insulina en páncreas Glib (datos no mostrados). Un efecto inhibitorio tal de glibenclamida en la expresión de insulina y el contenido sin afectar al número de células beta ya se ha mencionado anteriormente (véase la Figura 2).

15 Por PCR a tiempo real, la expresión de insulina se evaluó después de 7, 9, 11 y 14 días de cultivo. Como se muestra en la Figura 4B, mientras que los niveles de ARNm de insulina en el control y páncreas Glib-5D fueron idénticos el D7, el nivel de ARNm de insulina de los páncreas Glib-5D aumentó el triple el D9, el doble el D11 y tres veces el D14, en comparación con el páncreas control. Este resultado se confirmó adicionalmente mediante la cuantificación de la zona de tinción de insulina (datos no mostrados), que reveló un aumento significativo de las células positivas para insulina en páncreas Glib 5D.

20 Para comprobar que la fuerte activación de la expresión de insulina, junto con el aumento de las células positivas para insulina observadas en los páncreas Glib 5D, se correlacionaba con un aumento de la diferenciación de células β, los patrones de expresión de los dos marcadores de las células beta de ZnT-8 y MAFA se analizaron los D7, D9, D14 y D11. Como se muestra en las figuras 4C y 4D, mientras que la expresión ZnT-8 y MAFA en Glib-5D y los páncreas de control fueron similares después de 7 días de cultivo, un aumento considerable (p <0,01) de la expresión de estos dos marcadores de células β se observó después de 9, 11 y 14 días de cultivo en los páncreas Glib 5D, lo que sugiere que el número de células β se incrementa por el tratamiento de glibenclamida.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que las células Ngn3+ inducidas por glibenclamida tienen la capacidad de diferenciarse en las células β.

30 **Conclusión**

Los inventores demostraron que un inhibidor de canales SUR1/Kir6.2, es decir, la glibenclamida, era capaz de ampliar significativamente el grupo de células Ngn3⁺ progenitoras endocrinas que se diferencian además en células endocrinas pancreáticas, lo que conduce a un aumento final de la masa de células beta y de la expresión de insulina, sin inducir ningún efecto perjudicial en el desarrollo del páncreas.

35 **Referencias**

Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes*. 50(8): 1691-7, 2001

Bonner-Weir S, Inada A, Yatoh S, Li WC, Aye T, Toschi E, Sharma A: Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine beta-cells. *Biochem Soc Trans*. 36(3):353-6, 2008

40 Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M: Identification and cloning of a beta- cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 53:2330-2337, 2004

Duvillie B, Attali M, Aiello V, Quemeneur E, Scharfmann R: Label-retaining cells in the rat pancreas: location and differentiation potential in vitro. *Diabetes* 52:2035-2042, 2003

45 Duvillie B, Attali M, Bounacer A, Ravassard P, Basmaciogullari A, Scharfmann R: The mesenchyme controls the timing of pancreatic beta-cell differentiation. *Diabetes* 55:582-589, 2006

Gabr MM, Sobh MM, Zakaria MM, Refaie AF, Ghoneim MA: Transplantation of insulin-producing clusters derived from adult bone marrow stem cells to treat diabetes in rats. *Exp Clin Transplant*. 6(3):236-43, 2008

Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F: neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1607-1611, 2000

50 Gu G, Dubauskaite J, Melton DA: Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129:2447- 2457, 2002

- Guillemain G, Filhoulaud G, Da Silva-Xavier G, Rutter GA, Scharfmann R: Glucose is necessary for embryonic pancreatic endocrine cell differentiation. *J Biol Chem* 282:15228-15237, 2007
- Heller RS, Staffers DA, Liu A, Schedl A, Crenshaw EB, 3rd, Madsen OD, Serup P: The role of Brn4/Pou3f4 and Pax6 in forming the pancreatic glucagon cell identity. *Dev Biol* 268:123-134, 2004
- 5 Hori Y, Gu X, Xie X, Kim SK: Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells. *PLoS Med.* 2(4):e 103, 2005
- Huang HP, Liu M, El-Hodiri HM, Chu K, Jamrich M, Tsai MJ: Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. *Mol Cell Biol* 20:3292- 5 3307, 2000
- 10 Hyde K, Reid CJ, Tebbutt SJ, Weide L, Hollingsworth MA, Harris A: The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator as a marker of human pancreatic duct development. *Gastroenterology* 113:914-919, 1997
- Jensen J, Heller RS, Funder-Nielsen T, Pedersen EE, Lindsell C, Weinmaster G, 10 Madsen OD, Serup P: Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3 -expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes* 49:163-176, 2000
- 15 Kilic G, Wang J, Sosa-Pineda B: Osteopontin is a novel marker of pancreatic ductal tissues and of undifferentiated pancreatic precursors in mice. *Dev Dyn* 235:1659-1667, 15 2006
- Kodama S, Kühtreiber W, Fujimura S, Dale EA, Faustman DL: Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. *Science.* 302(5648): 1223-7, 2003
- Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time 0 quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408, 2001
- 20 Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, Clark AT, Plath K. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(8):2883-8, 2008
- Maherali et al, Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent 5 stem cells. *Cell Stem Cell,* 3(6):595-605, 2008
- 25 Matsuoka TA, Kaneto H, Stein R, Miyatsuka T, Kawamori D, Henderson E, Kojima I, Matsuhisa M, Hori M, Yamasaki Y: MafA regulates expression of genes important to islet beta-cell function. *Mol Endocrinol* 21 :2764-2774, 2007
- Miralles F, Czernichow P, Scharfmann R: Follistatin regulates the relative 30 proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development* 125:1017-1024, 1998
- Moriscot C, de Fraipont F, Richard MJ, Marchand M, Savatier P, Bosco D, Favrot M, Benhamou PY: Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro. *Stem Cells.* 23(4):594-603, 2005
- 30 Oh SH, Muzzonigro TM, Bae SH, LaPlante JM, Hatch HM, Petersen BE: Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab Invest.* 84(5):607-17, 2004
- 35 Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T: IPFI, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *Embo J* 12:4251-4259, 1993
- Park SP, Lee YJ, Lee KS, Ah Shin H, Cho HY, Chung KS, Kim EY, Lim JH. Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers. *Hum Reprod.*19(3):676-84, 2004
- 40 Qi M, Strand BL, Mørch Y, Lacik I, Wang Y, Salehi P, Barbara B, Gangemi A, Kuechle J, Romagnoli T, Hansen MA, Rodriguez LA, Benedetti E, Hunkeler D, Skjak-Braek G, Oberholzer J. Encapsulation of human islets in novel inhomogeneous alginate- ca2+/ba2+ microbeads: in vitro and in vivo function. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 36(5):403-20, 2008
- Romano G: Artificial reprogramming of human somatic cells to generate pluripotent stem cells: A possible alternative to the controversial use of human embryonic stem cells. *Drug News Perspect.* 21(8): 440-5, 2008
- 45 Sapir T, Shternhall K, Meivar-Levy I, Blumenfeld T, Cohen H, Skutelsky E, Eventov-Friedman S, Barshack I, Goldberg I, Pri-Chen S, Ben-Dor L, Polak-Charcon S, Karasik A, Shimon I, Mor E, Ferber S: Cell-replacement therapy for diabetes: Generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(22):7964-9, 2005
- 50 Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB, Korbitt G, van der Kooy D: Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol.* 22(9): 1115- 24, 2004

- Sun Y, Chen L, Hou XG, Hou WK, Dong JJ, Sun L, Tang KX, Wang B, Song J, Li H, Wang KX: Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro. *Chin Med J (Engl)*. 120(9):771-6, 2007
- 5 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131(5):861-72, 2007
- Tateishi K, He J, Taranova O, Liang G, D'Alessio AC, Zhang Y. Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *J Biol Chem*. 283(46):31601-7, 2008
- 10 Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, Müller B, Zulewski H: Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 341(4):1135-40, 2006
- Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck AB: In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(12):8078-83, 2002
- 15 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 318(5858):1917-20, 2007
- Zhang C, Moriguchi T, Kajihara M, Esaki R, Harada A, Shimohata H, Oishi H, Hamada M, Morito N, Hasegawa K, Kudo T, Engel JD, Yamamoto M, Takahashi S: MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol* 25:4969-4976, 2005.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método in vitro para aumentar la reserva de células progenitoras endocrinas Ngn3⁺ obtenidas a partir de células madre, en el que dicho método comprende la etapa de poner en contacto las células madre, que tienen la capacidad de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas, excepto células madre embrionarias humanas, con un inhibidor de canales SUR1/Kir6.2 seleccionado a partir del grupo que consiste en sulfonilureas y meglitinidas, y cualquiera de sus combinaciones.
2. El método según la reivindicación 1, que comprende además una etapa que consiste en la diferenciación de dichas células endocrinas progenitoras Ngn3⁺ en precursores de células endocrinas pancreáticas y/o células endocrinas pancreáticas.
- 10 3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2 es glibenclamida.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células madre no se seleccionan de un embrión humano y se seleccionan del grupo que consiste en células madre pancreáticas, células madre pluripotentes y células madre multipotentes.
- 15 5. El método según la reivindicación 4, en el que las células madre pancreáticas se seleccionan del grupo que consiste en células madre derivadas de islotes pancreáticos, conductos pancreáticos o células acinares pancreáticas y de las células madre derivadas del brote dorsal pancreático a partir de embriones no humanos.
6. El método según la reivindicación 4, en el que las células madre multipotentes se derivan de tejido adulto seleccionado de entre el grupo que consiste en médula ósea, hígado, sistema nervioso central, el bazo y el tejido adiposo.
- 20 7. El método según la reivindicación 4, en el que las células madre pluripotentes se derivan de las células madre embrionarias no humanas o se obtienen mediante la reprogramación de células somáticas.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las células madre se ponen en contacto con un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2 de 3 a 10 días.
- 25 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las células madre se ponen en contacto con un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2 de 5 a 7 días.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las células madre se ponen en contacto con un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2 cultivándolas en presencia de 0,1 a 500 mM de dicho inhibidor.
- 30 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las células madre se ponen en contacto con un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2 cultivándolas en presencia de 50 a 150 mM de dicho inhibidor.
12. El uso de un inhibidor de canales de SUR1/Kir6.2 seleccionado del grupo que consiste en sulfonilureas y meglitinidas, y cualquiera de sus combinaciones para la diferenciación de células madre in vitro o ex vivo, excepto células madre embrionarias humanas, en células endocrinas pancreáticas.

35

FIGURA 1A

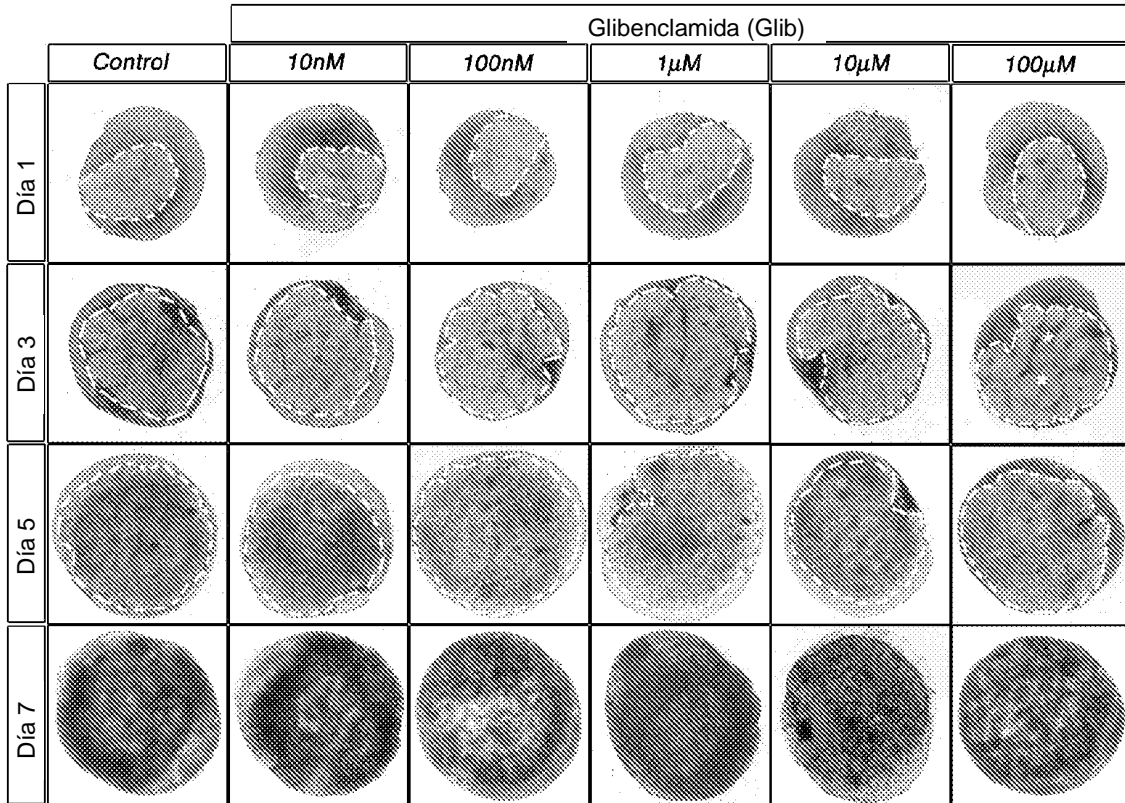


FIGURA 1B

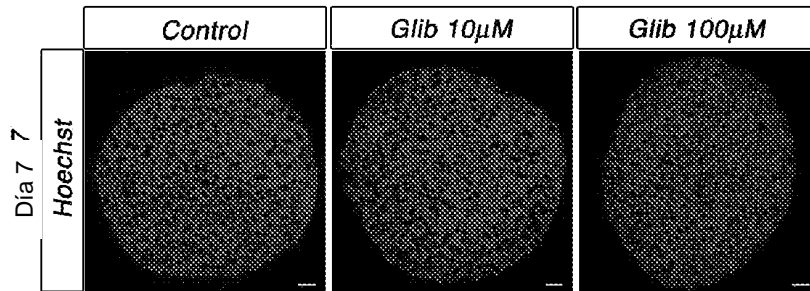


FIGURA 1C

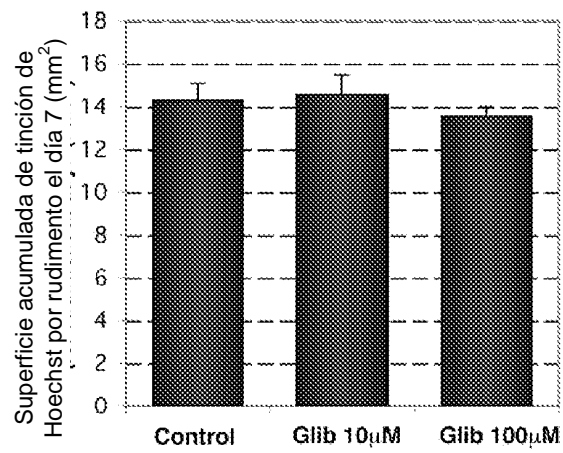


FIGURA 2A

Insulina

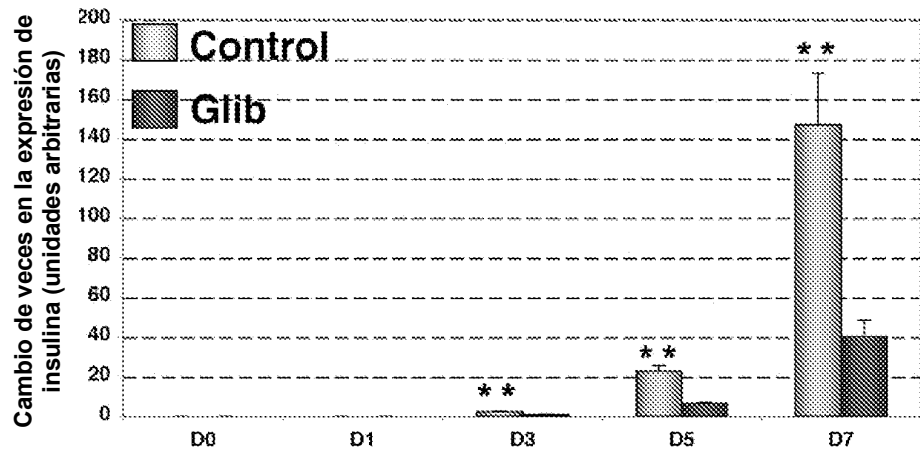


FIGURA 2B

Znt8

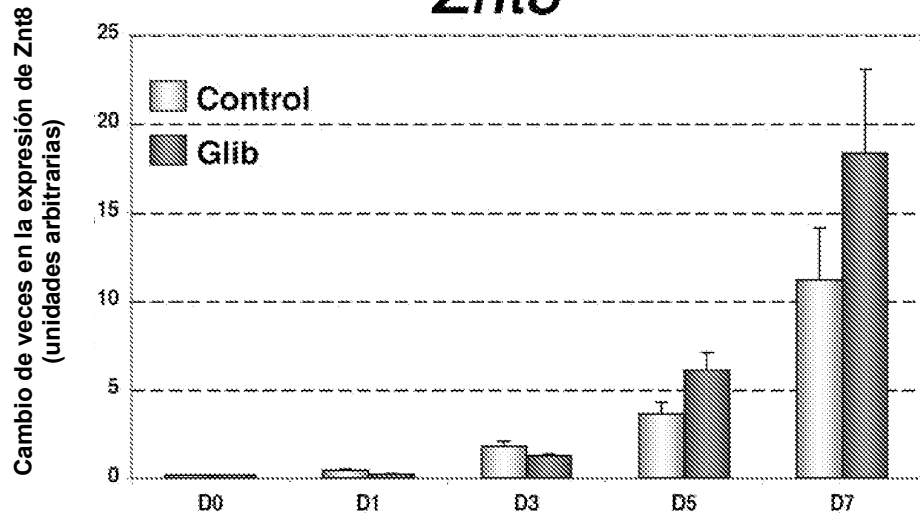


FIGURA 2C

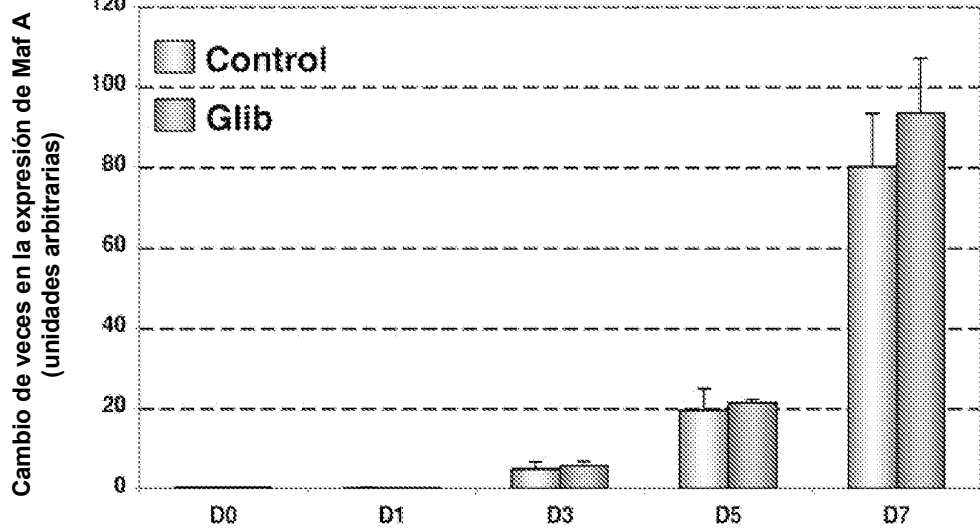


FIGURA 2D

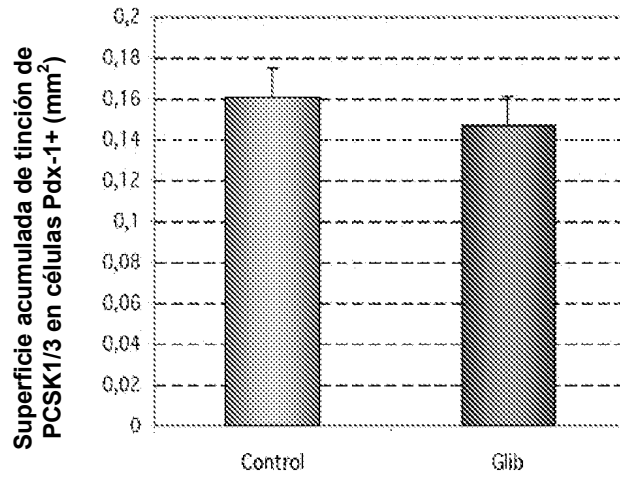


FIGURA 2E

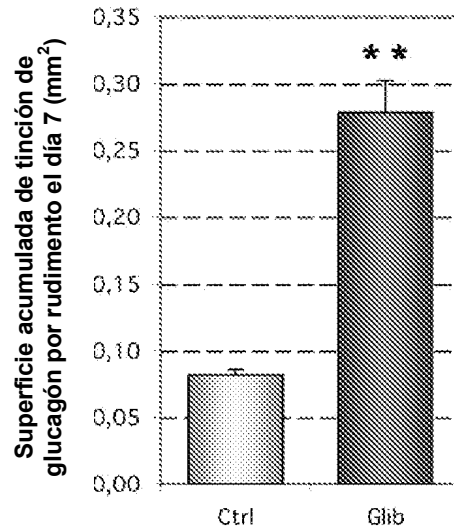


FIGURA 2F

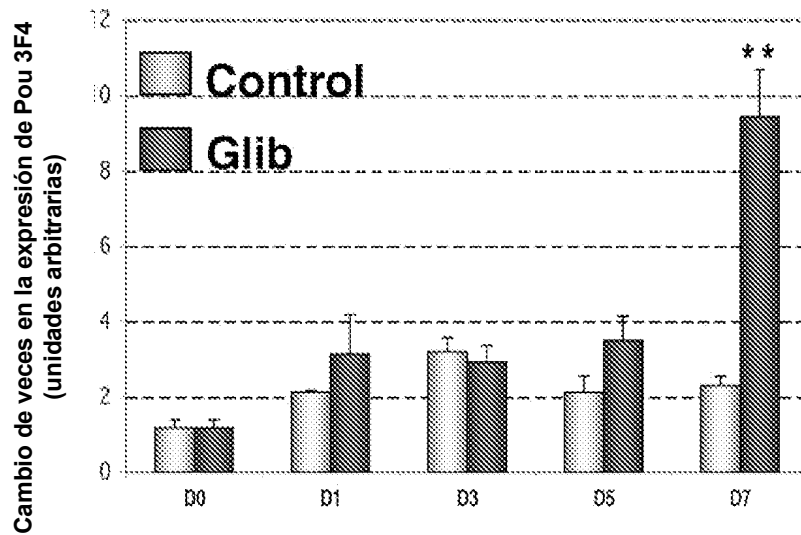


FIGURA 3A

Ngn3

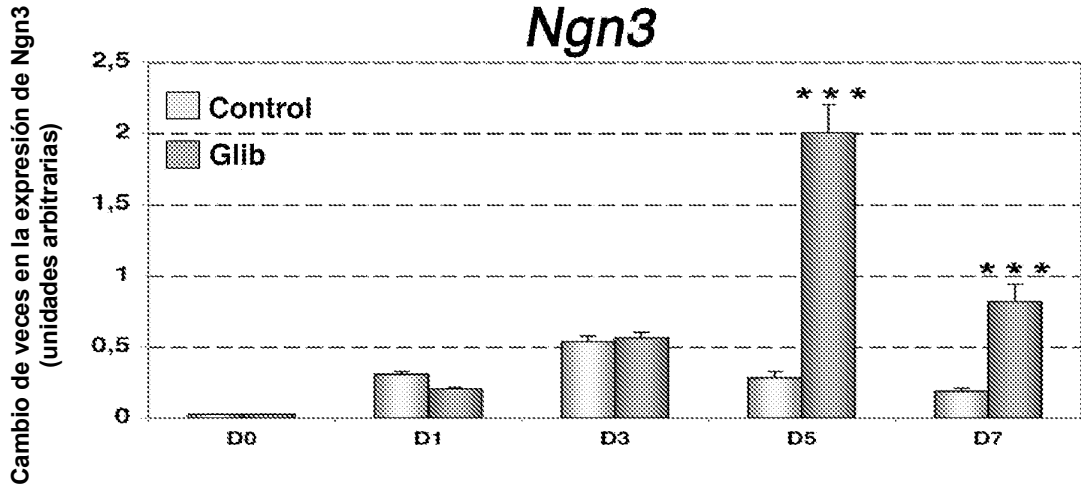


FIGURA 3B

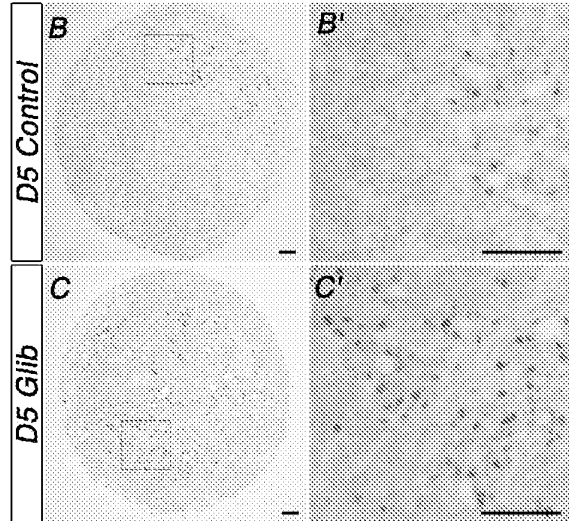


FIGURA 3C

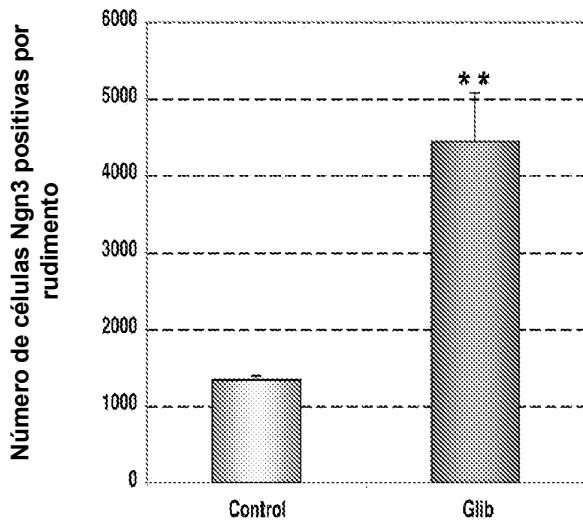


FIGURA 3D

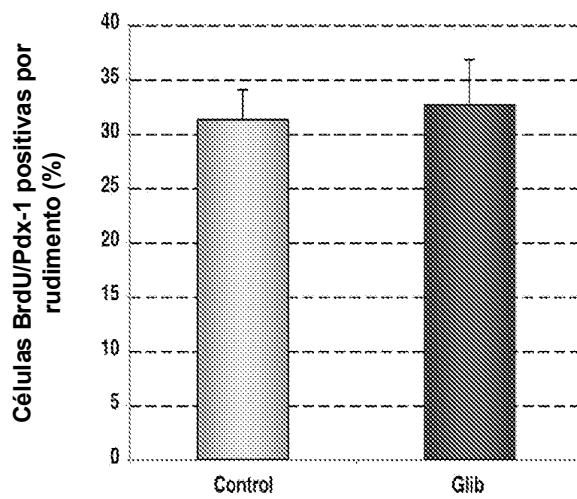


FIGURA 4A

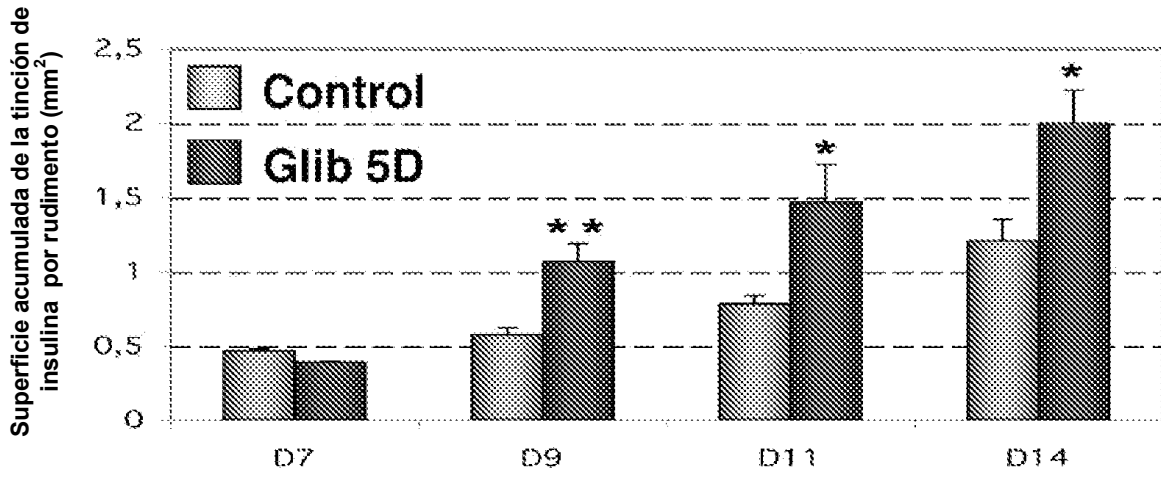


FIGURA 4B

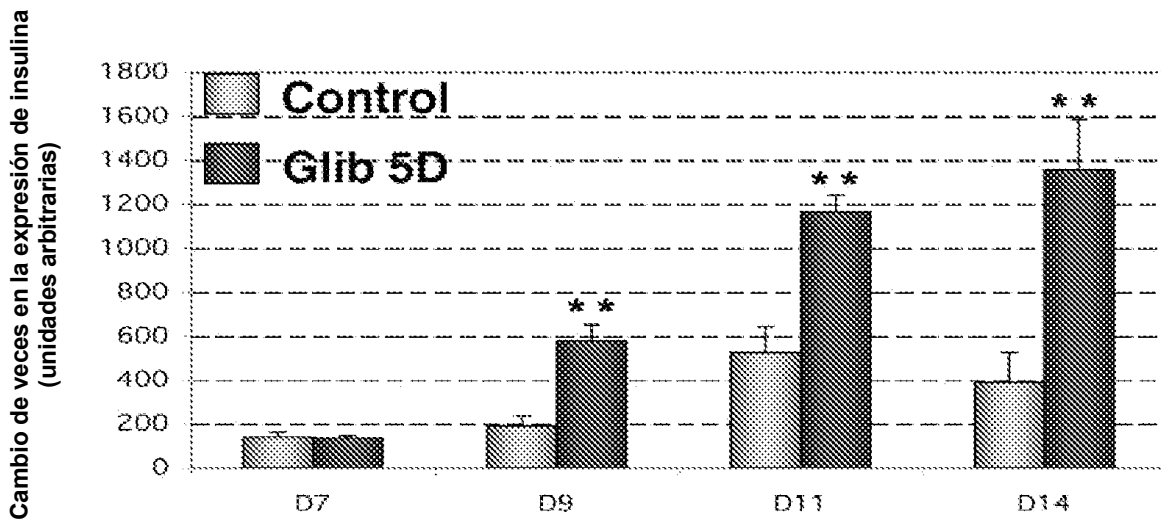


FIGURA 4C

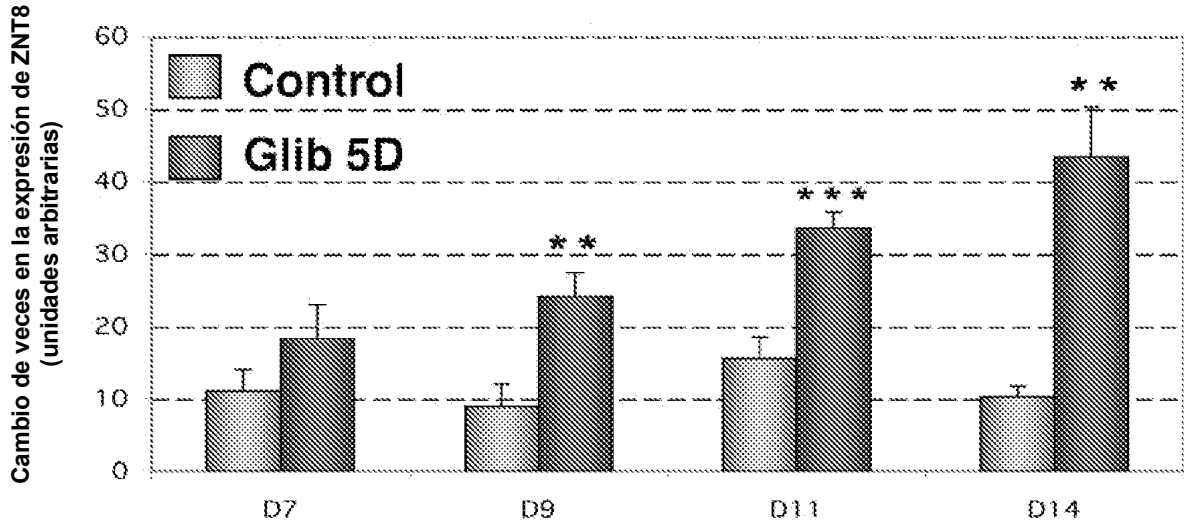


FIGURA 4D

