

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 412**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

A61L 27/00 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2006 E 06255896 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 1788077**

54 Título: **Un método para crear grupos de células**

30 Prioridad:

18.11.2005 US 738171 P

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

14.03.2017

73 Titular/es:

**LIFESCAN, INC. (100.0%)
965 Chesterbrook Boulevard
Wayne, PA 19087, US**

72 Inventor/es:

GHABRIAL, RAGAE M.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 605 412 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).

Un método para crear grupos de células**Descripción:**

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

10 **[0001]** Esta invención se relaciona con un método *in vitro* para inducir a las células a formar grupos de células tridimensionales. También se relaciona con un método para controlar el tamaño y la uniformidad de tales grupos.

ANTECEDENTES

15 **[0002]** En tejidos de mamíferos *in vivo*, existen células en un entorno tridimensional (3D) complejo, donde crecen células, de manera uniforme o no, en tres dimensiones en torno a una célula centra o un grupo de células. Las células están en estrecho contacto con células vecinas, y también conectadas a una red de matriz extracelular (MEC) que proporciona apoyo para tales células. Las decisiones de destino celular son reguladas por una interacción compleja provista por señales autónomas de células y estímulos de las células circundantes. Está demostrado que el contacto de células con la MEC a través de integrinas afecta muchas funciones celulares, tales como la proliferación, diferenciación, migración, apoptosis y forma de las células. Por ejemplo, en resumir los estudios previos de la función pancreática, la Patente estadounidense 6703017 reporta una notable organización estructural y celular de los islotes pancreáticos ideal para respuestas rápidas pero cuidadosamente controladas a cambios en los niveles de glucosa en la sangre.

25

[0003] Riedl y otros (Journal of Immunology, 2000, 165: 1381-1386) reporta que el desarrollo de células de Langerhans epiteliales de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ humanas en respuesta a la coestimulación de TGF-β1 está asociado con la formación pronunciada de grupos de células a partir de células CL precursoras en desarrollo. Las células de Langerhans epiteliales forman una red tridimensional en las capas epidérmicas suprabasales *in vivo* y permanecen en la epidermis durante largos períodos, permitiéndoles cumplir un papel de vigilancia en que filtran el tejido circundante para detectar antígenos extraños.

30

[0004] Sin embargo, para poder estudiar estos procesos celulares *in vitro*, las células normalmente se aíslan de los tejidos y crecen en monocapas, que pueden ser comparadas con un sistema de cultivo bidimensional (2D) donde las células crecen en capas de solo una o dos células de espesor. Este tipo de formación de capas celulares, sin embargo, altera las interacciones intercelulares y la MEC, y cambia la interacción compleja entre las integrinas y las moléculas del citoesqueleto.

35

[0005] El cultivo de células en un entorno *in vitro* semejante al entorno 3D observado *in vivo* es extremadamente beneficioso para permitir el contacto directo de manera similar al entorno *in vivo* original. A su vez, esto tiene un efecto significativo en la función celular. Las células madre embrionarias (CME) responden claramente a las consecuencias de este fenómeno. Cuando las CME pueden distinguir en un cultivo en suspensión, con el tiempo, espontáneamente forman agregados multicelulares esféricos o cuerpos embrioides (CE). Se cree en que las células de un CE participan en un alto grado de comunicación y organización, lo que inicia su diferenciación en las tres capas germinales.

40

45

[0006] El cultivo de células en un soporte sólido 3D, tal como, por ejemplo, una matriz, es un enfoque para restaurar artificialmente el entorno 3D *in vivo*. Sin embargo, las células inicialmente continúan creciendo en una monocapa por la superficie del soporte, adhiriéndose preferentemente al sustrato antes de que se adhieran una a la otra.

50

[0007] Los grupos multicelulares han sido ampliamente usados en las últimas cuatro décadas como sistemas *in vitro* para estudiar, por ejemplo, mecanismos que subyacen a la organogénesis, respuestas de células tumorales a terapias e interacciones de células epiteliales mesenquimales en tumores. Estos cultivos de células agregadas primero fueron introducidos como un enfoque para entender la morfogénesis. Se obtiene una única suspensión de células por disociación enzimática y/o mecánica y se vuelve a agregar como grupos 3D por diversos métodos. Luego se disponen las condiciones de cultivo de tejidos de tal manera que las fuerzas adhesivas entre las células sean mayores que para las del sustrato sobre el cual se incuban las células. Los métodos más recientes en el desarrollo de grupos implican incubar células en agitadores giratorios o frascos rotatorios o de agitación que se muevan continuamente y eviten así la adherencia celular a las paredes del vaso.

55

60

[0008] Por ejemplo, US20040096967 describe un método para la formación de CE cultivando células en un cultivo en suspensión, aplicando al mismo tiempo una fuerza de agitación rotatoria. La desventaja de esta técnica es el efecto destructivo de la tensión de cizallamiento de la fuerza de rotación en las células.

65

[0009] Los grupos de células también se puede forma de forma espontánea *in vitro*. La Patente estadounidense 6,703,017 indica que las estructuras similares a islotes o los islotes derivados de células progenitoras de islotes son estructuras altamente organizadas de células que se originan en un cultivo indirectamente de un islote que produce células madre.

5 **[0010]** Otra técnica implica simplemente cubrir las superficies de los cultivos de tejidos con una capa fina de agarosa u otra sustancia no adhesiva. En estas condiciones, las células no puede adherirse a la superficie de los frascos de cultivo; como resultado, muchos tipos de células experimentan una agregación homotípica.

10 **[0011]** Por ejemplo, en un estudio para producir una terapia celular para la diabetes, Zayas y otros (EP 0 363 125, 1990), revelaron un proceso para la proliferación de células endocrinas pancreáticas. El proceso depende del uso de tejido pancreático fetal y una estructura sintética que incluye colágeno y que se prepara para incorporar estas células para la implantación.

15 **[0012]** Las células pueden formar grupos también en respuesta a la adición de un factor para el medio de cultivo. Por ejemplo, Riedl y otros establecen que "la citoquina TGF- β 1 tiene un papel clave durante el desarrollo de células de Langerhans epiteliales y la diferenciación. Usando un modelo de diferenciación *in vitro* de células progenitoras hematopoyéticas CD34+, recientemente demostramos que el desarrollo de CL a partir de células progenitoras CD34+ en un sistema de cultivo sin suero es absolutamente dependiente de la estimulación con TGF- β 1".

20 **[0013]** Sin embargo, estas técnicas, aunque son efectivas para facilitar la formación de grupos, no tienen medios para controlar el tamaño de los grupos o su uniformidad. Una vez que se forman los grupos en suspensión, continúan aumentando en tamaño agregando otras células o grupos vecinos. Esto eventualmente reduce la difusión de oxígeno y nutrientes a la parte interna del grupo e inicia una sucesión de eventos que provocan la muerte de las células en el núcleo del grupo.

RESUMEN

30 **[0014]** La actual invención comprende, entre otras cosas, un método *in vitro* para la formación controlada de un grupo de células. Los grupos de la actual invención se pueden formar a partir de grupos de células individuales, grupos de células u otras combinaciones. Las células que comprenden un grupo pueden ser de un único tipo o de varios tipos. Pueden ser células madre o células primarias o expandidas no diferenciadas o diferenciadas parcial o totalmente y/o genéticamente modificadas. Se pueden inducir las células para iniciar la agrupación mientras estén en una monocapa o en suspensión.

35 **[0015]** El método *in vitro* de la actual invención incluye, además, pasos para controlar el tamaño óptimo del grupo y evitar una mayor agregación que pueda ocurrir entre los grupos formados previamente. El método puede incluir, además, pasos para la manipulación de las células que comprenden un grupo anterior, durante o después de la formación del grupo.

40 **[0016]** En un aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* para la formación de grupos de células que comprende:

- 45 a) seleccionar un grupo de células para agrupar, donde las células se derivan de líquido pancreático y amniótico o un cocultivo de células derivadas de líquido pancreático y amniótico;
- b) expandir las células en una monocapa;
- c) formar una suspensión de las células en un medio líquido que contenga suero a una concentración de casi 2% a un 10%;
- 50 d) incubar el medio que contenga las células en un espacio volumétrico unido por una superficie y;
- e) limitar la adhesión celular a la superficie;

donde la superficie tiene un área y el paso de limitar la adhesión celular a la superficie comprende limitar el área disponible para la adhesión celular.

55 **[0017]** En otro aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* para la formación de grupos de células que comprenden:

- 60 a) seleccionar un grupo de células para agrupar, donde las células se derivan de líquido pancreático y amniótico o un cocultivo de células derivadas de líquido pancreático y amniótico;
- b) expandir las células en una monocapa;
- 65 c) formar una suspensión de un subgrupo de las células en un medio líquido que contenga suero a una concentración de casi 2% a un 10%;

d) introducir el medio que contiene el subgrupo de células en un espacio volumétrico unido por una superficie;

5 e) dejar que el subgrupo de células se adhiera a la superficie;

f) retirar las células del subgrupo de células que no se han adherido a la superficie;

10 g) introducir el resto de las células; y

h) dejar que el resto de las células se adhiera a las células que se adhieren a la superficie;

donde la superficie tiene un área y el paso de dejar que el subgrupo de células se adhiera a la superficie comprende el paso de limitar el área disponible para la adhesión celular.

15 [0018] La formación de grupos, de acuerdo con este método, implica pasos para limitar o eliminar completamente la adhesión celular a una superficie modificando esa superficie. Por lo que se puede limitar la adhesión modificando un medio de cultivo de células para aumentar o reducir la adhesión celular. Como alternativa, se puede hacer introduciendo células a una superficie tratada que ha sido modificada para permitir la adhesión celular solo en puntos seleccionados en esa superficie.

20 [0019] En otro contexto, aplicar ciertos factores al medio de cultivo en función del tiempo de tal manera que no puedan al principio, pero sí en última instancia, limitar o evitar la adhesión de células a la superficie y, así, inducir la formación de grupos. Por ejemplo, los factores que aumentan la adhesión celular se podrán aplicar primero seguido de forma secuencial por otros factores que reduzcan la adhesión celular para evitar una mayor agregación entre los grupos formados.

25 [0020] Esta invención también proporciona un método *in vitro* para controlar el tamaño de un grupo. En un contexto, se ajusta la concentración de suero en un medio de cultivo para controlar el tamaño del grupo.

30 [0021] En otro contexto, la densidad de siembra de células inicial es una característica utilizada para controlar el tamaño de un grupo.

[0022] Esta invención también comprende un método *in vitro* para usar una célula o un grupo de células que comprenda ciertas características para modificar otras células que se puedan agregar al grupo.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0023]

40 La **Figura 1** muestra la morfología típica de las células derivadas pancreáticas que crecen en un cultivo de monocapa.

La **Figura 2** muestra la morfología de células derivadas de líquido amniótico que crecen en un cultivo de monocapa.

45 La **Figura 3** muestra grupos de células derivadas pancreáticas formadas en un cultivo en suspensión a un nivel sérico del 2%.

50 La **Figura 4** muestra grupos de células derivadas pancreáticas formadas en un cultivo en suspensión a un nivel sérico del 10%.

La **Figura 5** muestra grupos de células derivadas pancreáticas formadas en un cultivo en suspensión que comprende células $0,5E6$ a un nivel sérico del 2%

55 La **Figura 6** muestra grupos de células derivadas pancreáticas formadas en un cultivo en suspensión que comprende células $1,0E6$ a un nivel sérico del 2%.

60 La **Figura 7** muestra un grupo de células que crecen hacia fuera desde un borde creado con un bisturí estéril en un platillo recubierto de hidrogel de baja adhesión.

La **Figura 8** muestra un cogrupo compuesto de células derivadas pancreáticas en rojo y de células derivadas amnióticas en verde formado en un cultivo en suspensión que comprende ambos tipos de células en una proporción de 1:1.

65 La **Figura 9** muestra células adheridas a un islote recubierto de colágeno IV a 12 horas de la incubación.

La **Figura 10** muestra la formación de grupos con células adheridas a un islote recubierto de colágeno IV a 24 horas de la incubación.

La **Figura 11** muestra un grupo flotante tras 48 horas de adhesión celular inicial a un islote recubierto de colágeno IV.

La **Figura 12** muestra datos de PCR en tiempo real que muestran el nivel de expresión de los genes seleccionados en células derivadas pancreáticas que crecen una monocapa (barras blancas) y células derivadas pancreáticas que crecen en un grupo (barras negras). Los datos que se muestran están normalizados a niveles de expresión observados en el páncreas humano adulto.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0024] La actual invención comprende un método *in vitro* para inducir la agrupación de células. Se puede considerar un grupo de células como una aglomeración tridimensional de más de una célula donde tales células no están formadas en una monocapa. El grupo puede tener cualquier forma, como por ejemplo, esferoide, elipsoide, cuboide, etc. Además, pueden ser aglomeraciones no uniformes y no asimétricas que se forman en tres dimensiones en torno a una célula central un grupo central pequeño de células.

[0025] Se puede considerar una monocapa como una capa individual continua de células de una o, como máximo, dos células de espesor. Las células de una monocapa pueden formar grupos o colonias de más de una célula, pero estas colonias son comúnmente de una célula de espesor.

[0026] Las células de la actual invención pueden ser derivadas de líquido pancreático y amniótico o un cocultivo de células derivadas de líquido pancreático y amniótico. Las células pueden ser células autólogas, alogénicas o xenogénicas relacionadas entre sí y/o con un receptor *in vivo* para la implantación. Las células pueden ser células primarias utilizadas inmediatamente después del aislamiento a partir de un donante. Se expanden en una monocapa antes de su utilización. Las células pueden ser diferenciadas o diferenciadas parcial o totalmente y/o genéticamente modificadas.

[0027] Un grupo de la actual invención puede incluir materias primas compuestas de una población homogénea de células de un tipo o una población heterogénea de diversos tipos de células. La proporción de distintos tipos de células que contribuyen a un grupo individual puede ser variada para optimizar o suprimir ciertas características del grupo en su conjunto. Las materias primas pueden ser células individuales o grupos de células u otras combinaciones. Todas las células que contribuyen a un grupo pueden ser introducidas a la vez durante el proceso de inducción del grupo. Como alternativa, se pueden introducir células adicionales después de la siembra de células inicial y la formación del grupo. Además, se pueden introducir grupos adicionales después de que se forme un grupo inicial por el cual la agregación o fusión de grupos puede llevar a la formación de grupos compuestos.

[0028] En un contexto, un grupo de células puede comprender una célula genéticamente modificada con una alta expresión de un gen o grupo de genes específico de interés. La alta expresión puede inducir un aumento de genes de interés en otros tipos de células dentro del grupo. Además, la mayor expresión de genes para una proteína de interés en un tipo de células puede inducir un efecto deseado en los genes receptivos y vías de señalización de células vecinas dentro de un grupo.

[0029] En otro contexto, un grupo de células puede comprender una célula xenogénica de un fenotipo específico que puede tener ligandos de superficie inherentes o receptores, factores de crecimiento segregados o citoquinas que pueden influir en las células vecinas dentro del grupo o alrededor tras la implantación. Tales efectos pueden ser mediados en parte o totalmente por la reconstitución de vías de unión y señalización normales entre moléculas similares de diferentes especies. La célula xenogénica se puede colocar o retirar de forma selectiva antes de la implantación usando anticuerpos citotóxicos individuales y complementos. Como alternativa, si la célula xenogénica (o la(s) célula(s) opuesta(s) del grupo) ha(n) sido genéticamente modificada(s) para responder a un agente de selección único, ese agente se puede agregar al medio de cultivo durante un tiempo suficiente para causar un efecto citotóxico seguido de un lavado del agente de selección antes de la implantación.

[0030] La supervivencia de las células en un grupo es una función de la distancia de difusión que los nutrientes y el oxígeno deben recorrer para alcanzar las células más internas dentro de un grupo. El tamaño óptimo de los grupos de la actual invención variará dependiendo de la aplicación, pero debe representar la distancia de difusión necesaria para mantener la supervivencia de los tipos de células constituyentes. Es evidente para las personas con conocimientos comunes en la material que esta distancia variará de un tipo de célula a otro. En un contexto, esta distancia puede estar en el rango de 2 a 1000 micrones. Como alternativa, puede estar en el rango de casi 10 a aprox. 500 micrones. Como alternativa, puede estar en el rango de casi 10 a 300 micrones.

[0031] La cantidad total de células que contribuyen a un grupo también puede variar. Un grupo puede comprender de 10 a 10.000 células. Como alternativa, puede comprender de casi 100 a 10.000 células. Como alternativa, puede comprender de casi 1.000 a 5.000 células.

[0032] En un contexto, un grupo de células puede comprender células implicadas en la secreción de insulina y el mantenimiento de glucosa a cierto nivel, imitando la función de los islotes de Langerhans que se encuentran en el páncreas.

5 [0033] En otro contexto, un grupo de células puede comprender células implicadas en la formación de vasos sanguíneos, tales como células endoteliales. La presencia de vasos sanguíneos pueden mejorar la supervivencia celular dentro del cuerpo de un grupo después de un trasplante in vivo. Los vasos sanguíneos recién formados pueden dejar que la sangre penetre más en el cuerpo de un grupo, reduciendo así la distancia de difusión general necesaria para el intercambio eficiente de nutrientes, gases y desechos.

10 [0034] De acuerdo con el método de esta invención, la inducción de agrupación celular se puede lograr a través de diversas técnicas. En un contexto, las células que crecieron en una monocapa se suspenden en un medio idóneo para mantener la supervivencia de las células. La suspensión de las células se deposita en un vaso cuya superficie ha sido tratada de manera que inhiba o evite que la adhesión celular forme un sistema donde la afinidad de las células para la adhesión a la superficie del vaso sea inferior a la afinidad de las células para adherirse entre sí, provocando inicialmente la formación de grupos de células adheridas ligeramente. Poco después, las células recién adheridas producen una matriz extracelular endógena, llevando así a las células que componen el grupo a una estructura más compacta y estable.

15 [0035] La modificación de una superficie para evitar la adhesión celular se puede lograr a través de una variedad de técnicas conocidas para los expertos en la materia. Por ejemplo, se puede recubrir una superficie con un material de hidrogel que aumente la hidrofobicidad y a la vez disminuya la afinidad de las membranas celulares para adherir a la superficie.

20 [0036] La adhesión celular se controla limitando el área disponible para una adhesión normal. Luego se introduce una suspensión celular a la superficie disponible para la adhesión. Después de que se ocupe la superficie completa disponible para la adhesión, las células restantes en suspensión se retiran y las que ya están adheridas se mantienen y pueden proliferar hacia fuera formando islotes que eventualmente abandonan la superficie y forman grupos.

25 [0037] En un contexto, la minimización de la superficie disponible para la adhesión puede ocurrir generando islotes para la adhesión celular en una superficie que evite de otro modo la adhesión celular. Estos islotes se denominan aquí micropuntos. Los micropuntos se pueden crear depositando gotas de una solución de una proteína de matriz extracelular en la superficie. Luego la superficie se deja secar. Como alternativa, se podría utilizar litografía blanda para crear micropatrones de MEC en una superficie que no permita de otro modo la adhesión celular. Cada micropunto podría llevar a la formación de al menos un grupo. Las personas con conocimientos comunes en la materia apreciarán que existan muchas formas de modificar una superficie dada para crear micropuntos que permitan la adhesión celular.

30 [0038] En otro contexto, se podría introducir una suspensión celular a una superficie que no permita de otra manera la adhesión celular usando micropuntos en la superficie que permitan tal adhesión. Después de que las células llenan el espacio disponible para la adhesión, se pueden retirar, y se puede introducir un nuevo tipo de célula en suspensión, teniendo una afinidad de adhesión al primer tipo de célula, que a su vez se adhiere a los micropuntos. Se puede usar esta técnica para formar un grupo 3D compuesto de diversas capas de tipos de célula que imiten una estructura *in vivo*.

35 [0039] En un contexto, una superficie que permite la adhesión celular se puede modificar recubriéndola con un material que permita la adhesión celular y luego retirando las partes del material de recubrimiento, exponiendo nuevamente así la superficie debajo para la adhesión celular. El **Ejemplo 4** es una representación de esta técnica donde se usó una hojilla quirúrgica para retirar el recubrimiento de hidrogel que evita la adhesión celular, exponiendo así la superficie de poliestireno original, que posteriormente acomodó la adhesión celular.

40 [0040] La densidad celular puede influir en la inducción del grupo. La densidad celular se refiere aquí a la cantidad de células por volumen de medio. Mientras más alta sea la densidad celular, más alta es la probabilidad de agrupación y más rápido el índice de formación de grupos. Por el contrario, aumentar la densidad celular por encima de un umbral óptimo puede afectar la supervivencia definitiva de las células y reducir la eficiencia general de la agrupación. Esto se muestra claramente en el **Ejemplo 2**, donde duplicar la densidad celular de $0,5 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^6$ células por 6ml de medio de cultivo no provocó un aumento significativo en la formación de grupos. Las personas con conocimientos comunes en la materia apreciarán el equilibrio que requiere esta invención entre la velocidad de inducción de la agrupación y la eficiencia general del proceso demostrado por la viabilidad de las células que contribuyen a la agrupación.

45 [0041] Otro parámetro que afecta la formación de grupos es la concentración de suero en el medio de cultivo. La concentración de suero puede variar de acuerdo con el tamaño óptimo requerido de los grupos. El tamaño de los grupos se correlaciona directamente con la concentración de suero, nuevamente como se muestra en el **Ejemplo**

2. El tamaño de los grupos formados de células derivadas pancreáticas aumentó radicalmente cuando aumentó la concentración de suero de un 2% a un 10%. Por el contrario, la ausencia de suero en el medio de cultivo puede reducir la eficiencia de la agrupación y provocar la muerte de las células.

5 **[0042]** Otra técnica para reducir el índice de formación de grupos y limitar el tamaño de un grupo se basa en la introducción calculada de factores que reduzcan la tendencia de las células de adherirse entre sí. La adición de estos factores al medio de cultivo una vez que haya ocurrido la agrupación de células y se haya alcanzado el tamaño óptimo del grupo, reducirá más la adhesión de células individuales a grupos formados y también se reducirá la agregación entre los grupos formados.

10

Ejemplo 1

Preparación de células derivadas pancreáticas

15 **[0043]** *Preparación del páncreas:* Los páncreas humanos no idóneos para trasplante clínico se obtuvieron de The National Disease Research Interchange (Filadelfia, PA), después del consentimiento apropiado para uso de investigación. Se transfirió el páncreas con una solución para la conservación de órganos a un recipiente de acero inoxidable sobre hielo y se le retire todo el tejido extraño. Se canuló el ducto pancreático con un catéter de calibre 18 y se introdujo el páncreas con una solución enzimática que contiene enzima LIBERASE HI™ (Roche: 20 0,5 mg/ml) y DNasa I (0,2 mg/ml) disueltas en Solución salina fosfatada (DPBS, en inglés) de Dulbecco.

[0044] *Disociación mecánica gradual con digestión enzimática simultánea:* Los páncreas impregnados con enzimas fueron procesados de acuerdo con los métodos descritos en Diabetes 37:413-420 (1988). En resumen, se limpió el tejido extraño de los páncreas y se introdujeron con la solución enzimática según lo descrito 25 anteriormente. Luego se colocaron los páncreas en una Cámara Ricordi con perlas de acero inoxidable y se cubrieron con una pantalla que tenía un tamaño de red de 400-600 µm para retener las partes más grandes de tejido. La cámara se cubrió y se distribuyó la solución enzimática por la cámara a aproximada 37 °C, y se agitó la cámara para dejar que las perlas alteraran el tejido pancreático mientras la enzima digería el páncreas. Una vez que se logró la disociación y digestión, se terminó la digestión y se recolectó el tejido.

30

[0045] *Separación del tejido:* El tejido recolectado se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos a 4 °C. Se aspiró el sobrenadante y se lavó el tejido dos veces más en DPBS. Después del último lavado, se aplicó el tejido en un gradiente discontinuo para su purificación. Se suspendió el tejido digerido en polisucrosa (Mediatech, VA) con una densidad de 1,108 g/ml en una proporción de casi 1 a 2 ml de pellet de tejido por 10 ml de solución de polisucrosa. 35 Luego se transfirió la suspensión de tejido a tubos de centrifuga de policarbonato de fondo redondo y soluciones de polisucrosa con densidades de 1,096 y 1,037, respectivamente fueron colocadas cuidadosamente en la suspensión de tejido en los tubos. Una última capa de DMEM completó el gradiente discontinuo de purificación. Los tubos de gradientes se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos a 4 °C sin aplicar frenados. Después de la centrifugación, se recolectó el tejido de forma individual de cada fracción de interfaz (tres interfaces), se lavó varias veces en DPBS+ según lo descrito anteriormente y se recolectó en un tubo de ensayo de 50 ml.

40

[0046] *Más disociación de grupos de células:* Opcionalmente, se pueden disociar más los grupos grandes de células obtenidos usando el protocolo anterior en grupos más pequeños o suspensiones de células individuales. Después del último lavado, se suspendió el tejido de cada fracción en 1 solución de tripsina/EDTA de 10 ml con 200U/mL de DNasa I. Los tubos se colocaron en baño maría y se aspiró y expulsó repetidamente de una pipeta serológica de 10 ml durante 5 a 6 minutos hasta que se logró una suspensión celular casi individual. Se sació la digestión con la adición de DPBS+ a 4 °C y se centrifugaron los tubos a 800 rpm durante 5 minutos. Las suspensiones celulares se lavaron con DPBS+ y se cultivaron según lo descrito anteriormente.

45

[0047] *Cultivo de células pancreáticas:* Después del último lavado, las células de cada interfaz se suspendieron nuevamente en DMEM, 2% de FBS, 100 U/µg de penicilina/estreptomina, ITS, 2 mM de L-Glutamina, 0,0165 mM de ZnSO₄ (Sigma) y 0,38 mM de 2-mercaptoetanol (Invitrogen, CA) (en adelante, "el medio de selección"). Se sembraron partes alícuotas de seis ml de la suspensión celular en frascos de cultivo de tejidos T-25 o, como alternativa, se sembraron 12 ml de la suspensión celular en frascos T-75. Los frascos se colocaron en incubadoras a 37 °C con un 5% de CO₂. Después de un cultivo de 2 a 4 semanas, se realizó un cambio completo de medio y se devolvieron las células adherentes al cultivo en DMEM (2750 mg/L de D-glucosa, 862 mg/L de glutamina) (Gibco, CA) con un 5% de FBS (HyClone, UT), 1% de P/S, 0,0165 mM de ZnSO₄ (en adelante, "el medio de crecimiento") y se dejó que alcanzara una confluencia cercana (esta etapa se denomina "paso 0" o "P0"), en cuyo punto se pasaron. El cultivo posterior de las células fue de 5000 células/cm² en el medio de crecimiento. Los cultivos se pasaron cada 7 a 10 días después de alcanzar aproximadamente un 70 a 90% de confluencia. La 60 **Figure 1** muestra la morfología estromal de las células derivadas pancreáticas.

55

Ejemplo 2

Agrupación de las células pancreáticas

65

5 [0048] Las células pancreáticas aisladas de acuerdo con el **Ejemplo 1** se cultivaron en suspensión en platillos de 6 pocillos de baja adhesión (Corning Life Sciences). Los medios usados comprendieron glucosa de bajo DMEM complementada con 0, 2 o 10% de FBS. Los pocillos contenían células de $0,25 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, o $1,0 \times 10^6$. Las células se cultivaron en suspensión durante dos días. La eficiencia de la agrupación se evaluó según el tamaño de los grupos, la viabilidad, uniformidad y cantidad.

10 [0049] El análisis visual en un microscopio mostró claramente que la densidad celular y la concentración de suero tienen un papel clave en formar la geometría de los grupos. El suero mejora la capacidad de las células de adherirse entre sí y también la capacidad de los grupos de agregar y aumentar en tamaño. Para una densidad de siembra de células de $0,5 \times 10^6$, el nivel de medio FBS de un 2% (**Figura 3**) a un 10% (**Figura 4**) provocó un gran aumento en el tamaño de los grupos y a su vez provocó una necrosis central de los grupos resultantes, según lo indicado por los centros de grupos oscuros.

15 [0050] El análisis visual también reveló que cuando la concentración de suero se mantuvo constante al 2% y la cantidad de siembra de células varió entre $0,5 \times 10^6$ (**Figura 5**) y $1,0 \times 10^6$ (**Figura 6**), la cantidad total de grupos no varió de forma significativa. La cantidad más baja de células de sembrado favoreció el tamaño óptimo de los grupos y la retención de la viabilidad celular, como se muestra en la comparación de las dos figuras.

Ejemplo 3 Prueba de viabilidad

20 [0051] Los grupos se formaron, de acuerdo con el **Ejemplo 1**, con células de $0,5 \times 10^6$ por pocillo en un medio que contenía DMEM-LG complementado con un 2% de FBS. El día tres, se retiraron los grupos del pocillo y se pipetearon en un tubo de 50ml (Falcon). El tubo se lavó con PBS y se acumuló con los contenidos del tubo para asegurar la colección de todos los grupos. Se centrifugaron los grupos a 200 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante y se reemplazó con 5ml de TRYPLE™ Express (Invitrogen, CA), y luego se incubó durante 10 minutos. Pipetear varias veces ayudó más a separar los grupos. Luego se evaluó la suspensión celular bajo el microscopio para asegurar la preparación de una suspensión celular individual. Se evaluó la viabilidad celular usando un sistema de análisis de células Guava PCA-96 y el reactivo VIACOUNT® (Guava, CA). La cuenta obtenida fue un promedio de tres ensayos por separado. La viabilidad celular total se midió en un 76%, demostrando que la mayoría de las células que comprenden los grupos eran células viables.

Ejemplo 4

Técnica de agrupación alternativa

35 [0052] Se crearon bordes en la superficie de un platillo de baja adhesión de 10 cm usando un bisturí estéril para retirar el recubrimiento de hidrogel de baja adhesión. El proceso expuso la superficie de poliestireno por debajo. Se pipeteó una solución de 5ml de 10mg/ml de colágeno de tipo IV (BD Biosciences) en PBS en el platillo y se dejó incubar durante una hora. El colágeno se unió solo junto con los bordes donde se había retirado el hidrogel de baja adhesión. Se aspiró la solución de colágeno para retirarlo y se pipeteó una suspensión celular individual de células de $1,0 \times 10^6$ en DMEM-LG con un 2% de FBS en el platillo. Se dejó incubar las células toda la noche en una atmósfera de 37 °C con un 5% de CO₂. Se retiraron las células no adherentes y se agregó un Nuevo medio. Se realizó un cambio completo de medio en los días alternos. El día 10, los grupos adheridos aparecieron en los bordes expuestos, convirtiéndose eventualmente en grupos no adherentes (**Figura 7**).

Ejemplo 5

Células derivadas amnióticas

50 [0053] El líquido amniótico usado para aislar células de la presente invención fue extraído de especímenes obtenidos de una amniocentesis de rutina realizada a las 17 a 22 semanas de gestación para un cariotipo fetal de rutina. Se centrifugó el líquido amniótico durante 7 minutos a 400-x g y se retiró el sobrenadante. El pellet celular resultando se suspendió nuevamente en un medio de crecimiento Amniomax® (Gibco, MD, USA). Las células se cultivaron en platillos recubiertos (10 µg/ml) (BD Biosciences, CA, USA) con fibronectina. Los cultivos se dejaron intactos durante al menos 5 a 10 días en condiciones hipóxicas (3% de O₂) después de lo cual se alimentaron los cultivos con el mismo medio de crecimiento y se cultivaron hasta alcanzar aproximadamente un 70 a un 80% de confluencia. En esta etapa, las células se denominaron "P0". Las células derivadas de líquido amniótico (AF, en inglés) usadas para el propósito de esta invención estaban en un paso de expansion 10. La **Figura 2** muestra la morfología celular típica derivada de líquido amniótico.

Ejemplo 6

Agrupación de células derivadas de líquido amniótico

[0054] Se usaron dos líneas de células de AF para este experimento. Las líneas se establecieron según lo indicado en el ejemplo anterior. Se indujo la agrupación usando el método descrito anteriormente en el ejemplo 2. Se cultivaron las células en platillos de 6 pocillos de baja adhesión en DMEM-LG complementado con un 2% de FBS. Se evaluaron los grupos a las 48 horas. Una de las dos líneas (Línea A) formó grupos. La segunda línea de células (Línea B) no respondió al método de inducción de grupos, incluso cuando el período de cultivo se extendió a 1 semana.

Ejemplo 7

Cocultivo como método para inducir la formación de grupos

[0055] Este experimento se llevó a cabo usando dos tipos de células: células derivadas pancreáticas y células AF de línea B según lo derivado en los ejemplos anteriores. Se indujo la agrupación usando el método descrito anteriormente en el **Ejemplo 2**. Se cultivaron las células en platillos de 6 pocillos de baja adhesión en DMEM-LG complementado con un 2% de FBS. Se evaluaron los grupos a las 48 horas. Cada pocillo comprendió una densidad inicial de células de $0,5 \times 10^6$ de células derivadas pancreáticas solamente, células AF de línea B solamente o una proporción 1:1 de los dos tipos de células mezcladas. Como se esperaba, las células derivadas pancreáticas cultivadas solas formaron grupos dentro de 48 horas. Las células AF de línea B no formaron algún grupo incluso cuando el cultivo se extendió a 1 semana. Por el contrario, la combinación de los dos tipos de células formó grupos dentro de 48 horas. Para asegurar que los grupos comprendieran ambos tipos de células, cada tipo de célula fue etiquetado con un marcador fluorescente distinto usando un equipo de etiquetado de células de múltiples colores vivos (Molecular Probes, OR, USA). Después de la inducción de grupos, se analizaron los grupos con un microscopio fluorescente. La **Figura 8** muestra un grupo que comprende ambos tipos de células.

Ejemplo 8

Microislotes como método para inducir la agrupación

[0056] Las células derivadas pancreáticas se obtuvieron a través de métodos descritos en el **Ejemplo 2**. Se cultivaron las células y se mantuvieron en un medio DMEM-LG complementado con un 10% de FBS. Se preparó una solución de colágeno IV (¿Vendedor?) en PBS a una concentración de 20µg/ml. Se usaron platillos de baja adhesión recubiertos con hidrogel (diámetro = 10 cm) (Corning, NY) para este experimento. 0,21µl de gotas de la solución de colágeno IV se depositaron en la superficie del platillo, y se incubó el platillo a temperatura ambiente 5 durante 1 hora. Se pipeteó una suspensión celular de 10ml de células derivadas pancreáticas en un medio DMEM-LG complementado con un 10% de FBS lentamente en la superficie del platillo. El platillo se incubó durante 3 horas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Al día siguiente, se realizó un cambio completo de medio para retirar todas las células restantes en suspensión. Las células adheridas a la superficie recubierta con colágeno IV formaron un patrón de islotes (**Figura 9**). A las 24 horas, se habían dispersado las células para llenar los espacios de intervención entre los islotes (**Figura 10**). A las 48 horas, las células se reunieron en grupos (**Figura 11**) y eventualmente se separaron de la superficie del platillo.

Ejemplo 9

Análisis de PCR para células derivadas pancreáticas en monocapa y en grupos

[0057] Las células derivadas pancreáticas aisladas, de acuerdo con el **Ejemplo 1**, se cultivaron en monocapa o fueron inducidas a agruparse de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 2.

[0058] Se extrajo ARN de células individuales crecidas en monocapa o de grupos de células. Se usó el ARN total de un páncreas humano (Ambion, INC.) como control positivo.

[0059] *Extracción de ARN, purificación y síntesis de ADNc*: Se purificaron muestras de ARN a través de su unión a una membrana de gel de sílice (Rneasy Mini Kit, Qiagen, CA) en presencia de un amortizador salino con etanol; mientras se limpiaban los contaminantes. El ARN se purificó más mientras estaba unido a la columna por un tratamiento con DNasa I (Qiagen, CA) durante 15 min. Se eluyó ARN de alta calidad en agua. Se evaluaron el rendimiento y la pureza con lecturas de A260 y A280 en el espectrofotómetro. Se hicieron copias de ADNc a partir de ARN purificado usando un equipo archivador de ADNc de alta capacidad de ABI (ABI, CA).

[0060] *Amplificación de PCR en tiempo real y análisis cuantitativo*: A menos que se establezca lo contrario, todos los reactivos se compraron en Applied Biosystems. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron usando el Sistema de detección de secuencias 7000 de ABI PRISM®. TAQMAN® UNIVERSAL PCR MASTER MIX® (ABI, CA) se usó con 20 ng de ARN transcrito inversamente en un volumen de reacción total de 20 µl. Cada muestra de ADNc se ensaya en duplicado para corregir los errores de pipeteo. Se usaron bases y sondas etiquetadas con FAM de TAQ-MAN® en concentraciones de 200 nM. El nivel de expresión de cada gen objetivo se normalizó usando el ARN ribosómico 18S desarrollado previamente de Applied Biosystem o un equipo de

control endógeno de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, en inglés) humano. Se diseñaron bases y sondas usando el programa ABI PRISM PRIMER EXPRESS™ o se usó un equipo de análisis genético desarrollado previamente de ABI. Para cada gen se diseñó una de las bases o la sonda que abarca los límites de exones. Esto eliminó la posibilidad de que las bases/sonda se unan a algún ADN genómico presente. Los sets de bases y sondas figuran en una lista de la siguiente forma: Pax6 (Hs00240871), Insulina (Hs00355773), Glucagón (Hs00174967), Isl-1 (Hs00158126), Somatostatina (Hs00174949). Las bases restantes se diseñaron usando el programa PRIMERS (ABI, CA). Después de unos iniciales 50 °C durante 2 min., y 95 °C durante 10 min., se ciclaron las muestras 40 veces en dos etapas: un paso de desnaturalización a 95 °C durante 15 seg., seguido por un paso de recocción a 60 °C durante 1 min. Se llevaron a cabo análisis de datos usando el programa Sistema de detección de secuencias 7000 GENE-AMP®. Para cada set de base/sonda, se determinó un valor C_t como número de ciclo en el que la intensidad de fluorescencia alcanzó un valor específico en medio de la región exponencial de amplificación. Los niveles de expresión de genes relativos se calcularon usando el método comparativo de C_t . En resumen, para cada muestra de ADNc, se sustrajo el valor C_t de control endógeno del gen de interés C_t para dar el valor C_t delta (ΔC_t). Se calculó la cantidad normalizada objetivo en $2^{-\Delta C_t}$, suponiendo que la amplificación tenga un 100% de eficiencia. Los últimos datos se expresaron en relación con una muestra calibradora. El método comparativo de C_t solo es válido si el objetivo y las eficiencias de amplificación de control endógeno son aproximadamente iguales. Por tanto, se realizaron experimentos de validación preliminar por cada set de base/sonda amplificando de forma serial las muestras de ADNc diluidas y determinando los valores de C_t . Estos valores de ΔC_t deberían permanecer constantes en el rango de diluciones si las eficiencias de amplificación son iguales. La **Figura 12** muestra una comparación entre los niveles de expresión genéticos para células en monocapa frente a las que están en grupos.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un método *in vitro* para la formación de grupos de células que comprende:

- 5 1. seleccionar un grupo de células para agrupar, donde las células se derivan de líquido pancreático y amniótico o un cocultivo de células derivadas de líquido pancreático y amniótico;
- 2. expandir las células en una monocapa;
- 3. formar una suspensión de las células en un medio líquido que contenga suero a una concentración de casi un 2% a un 10%;
- 10 4. incubar el medio que contenga las células en un espacio volumétrico unido por una superficie; y
- 5. limitar la adhesión celular a la superficie;

donde la superficie tiene un área y el paso de limitar la adhesión celular a la superficie comprende limitar el área disponible para la adhesión celular.

- 15 2. El método de la afirmación 1, la superficie ha sido modificada para permitir la adhesión celular solo en puntos seleccionados de la superficie.
- 3. El método de afirmación 1, donde limitar el área comprende recubrir la superficie con un material que inhiba la adhesión celular.
- 20 4. El método de afirmación 3, donde el material que inhibe la adhesión celular evita la adhesión celular.
- 5. El método de afirmación 4, donde se retiran partes del material que inhibe la adhesión celular.
- 25 6. El método de afirmación 1, donde en el paso de limitar la adhesión celular a la superficie comprende reducir la afinidad de unión de la superficie para las células a un valor inferior a la afinidad de unión de las células a ellas mismas.
- 30 7. El método de afirmación 1, donde los grupos se forman en la superficie.
- 8. El método de afirmación 1, donde el grupo de células para agrupar comprende 2 o más tipos de células.
- 9. El método de afirmación 1, que comprende, además, depositar proteína de matriz extracelular en áreas de dicha superficie.
- 35 10. Un método *in vitro* para la formación de grupos de células que comprende:

- 40 a) seleccionar un grupo de células para agrupar, donde las células sean derivadas de líquido pancreático, amniótico o un cocultivo de células derivadas de líquido pancreático y amniótico;
- b) expandir las células en una monocapa;
- c) formar una suspensión de un subgrupo de las células en un medio líquido que contenga suero a una concentración de casi 2% a un 10%;
- 45 d) introducir el medio que contenga el subgrupo de células en un espacio volumétrico unido por una superficie;
- e) dejar que el subgrupo de células se adhiera a la superficie;
- f) retirar las células del subgrupo de células que no se han adherido a la superficie;
- g) introducir el resto de las células; y
- h) dejar que el resto de las células se adhiera a las células que se adhieren a la superficie;
- 50

11. donde la superficie tiene un área y donde el paso de dejar que el subgrupo de células se adhiera a la superficie comprenda el paso de limitar el área disponible para la adhesión celular.

- 55 12. El método de afirmación 10, donde limitar el área comprende recubrir la superficie con un material que inhiba la adhesión celular.
- 13. El método de afirmación 11, donde se retiran partes del material que inhibe la adhesión celular.
- 14. El método de afirmación 10, la adherencia se limita a reducir la afinidad de unión de la superficie para las células a un valor inferior a la afinidad de unión de las células para sí mismas.
- 60 15. El método, de acuerdo con la afirmación 11, donde los grupos se forman en la superficie.
- 16. El método de afirmación 10, donde el grupo de células para agrupar comprende 2 o más tipos de células.
- 65

17. El método de afirmación 10, que comprende, además, depositar proteína de matriz extracelular en áreas limitadas de dicha superficie.

18. El método de afirmación 1 o 10, donde el medio líquido contiene suero a una concentración de casi un

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

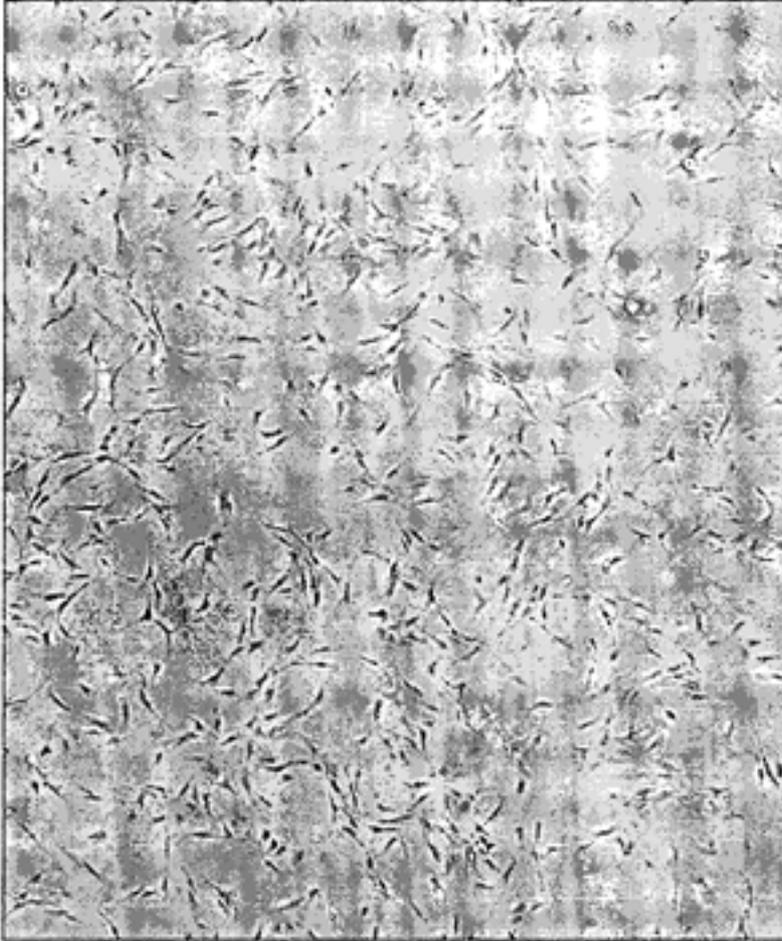


Figura 1

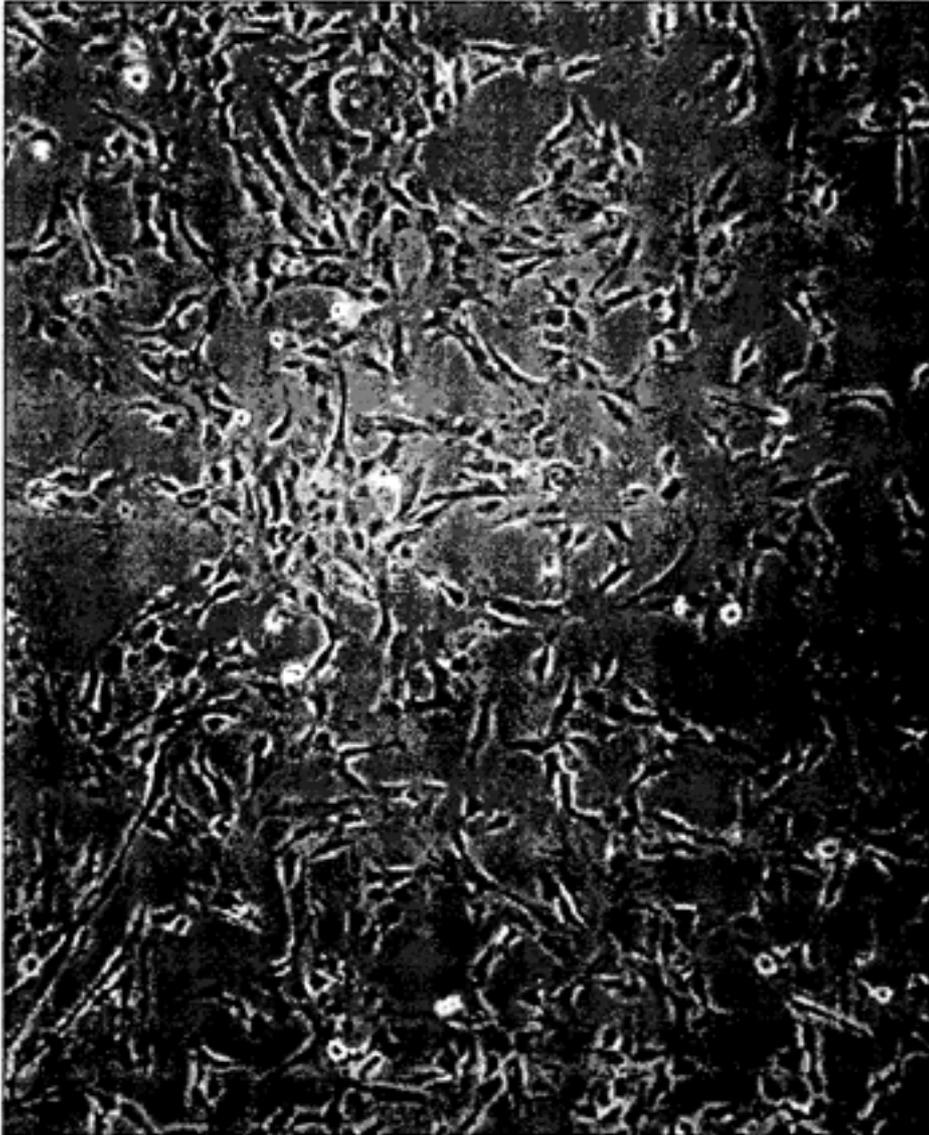


Figura 2

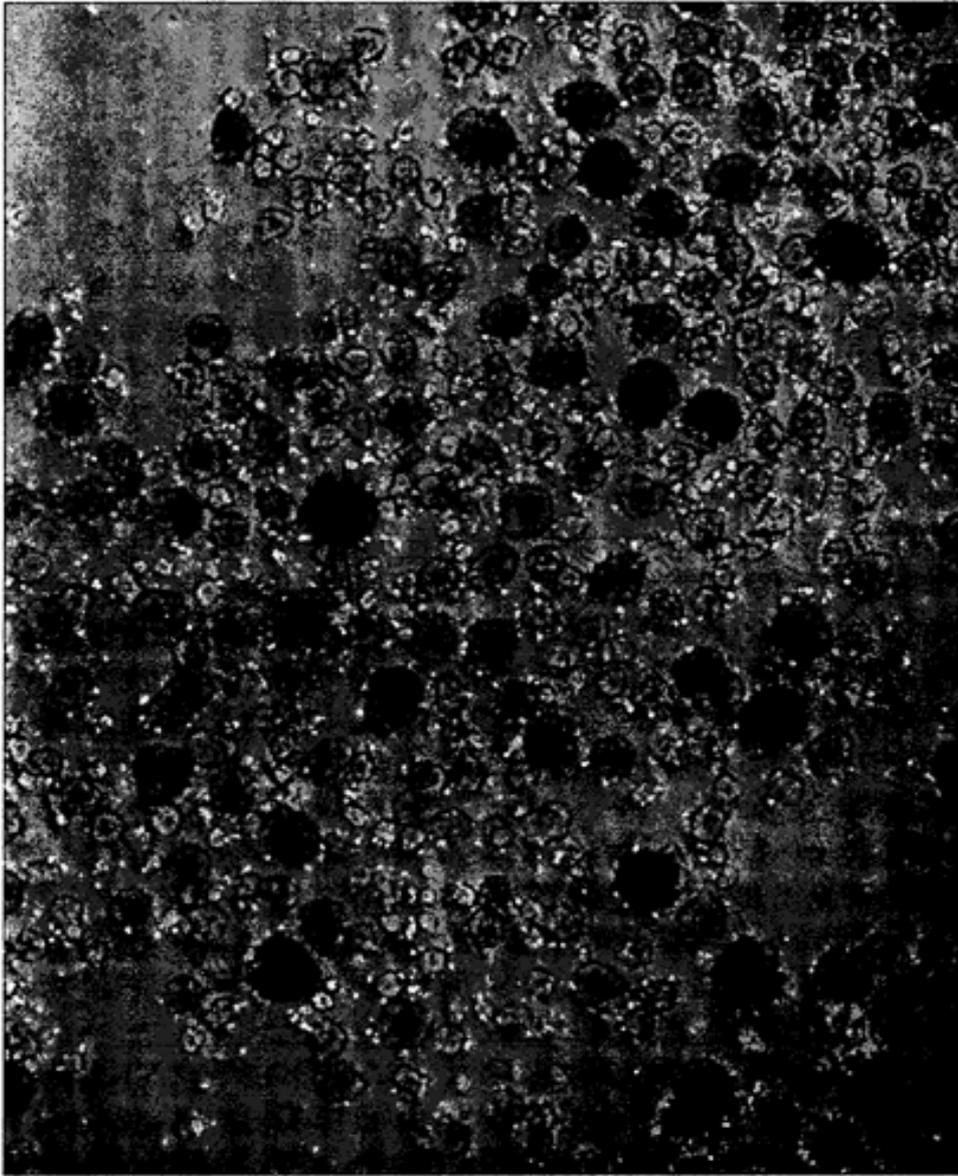


Figura 3

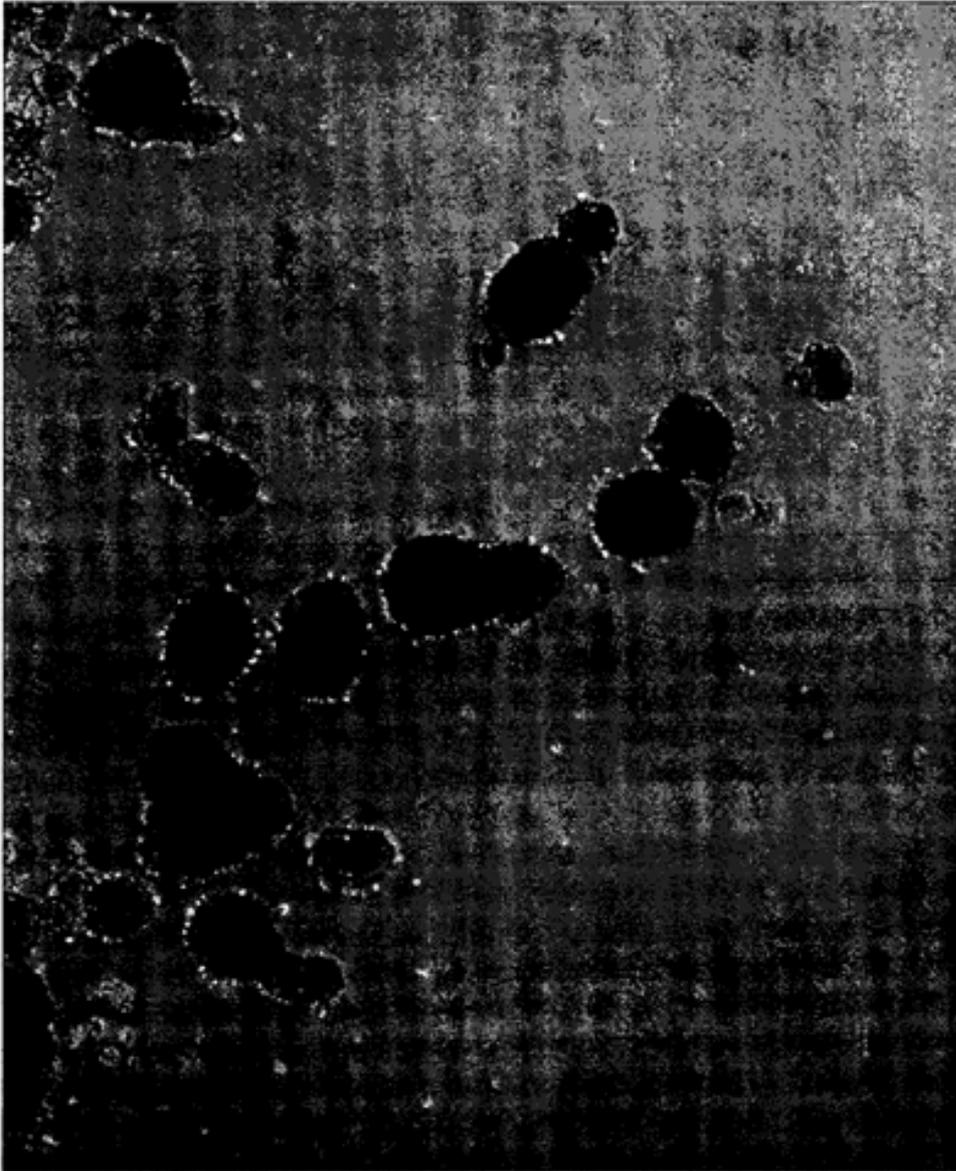


Figura 4

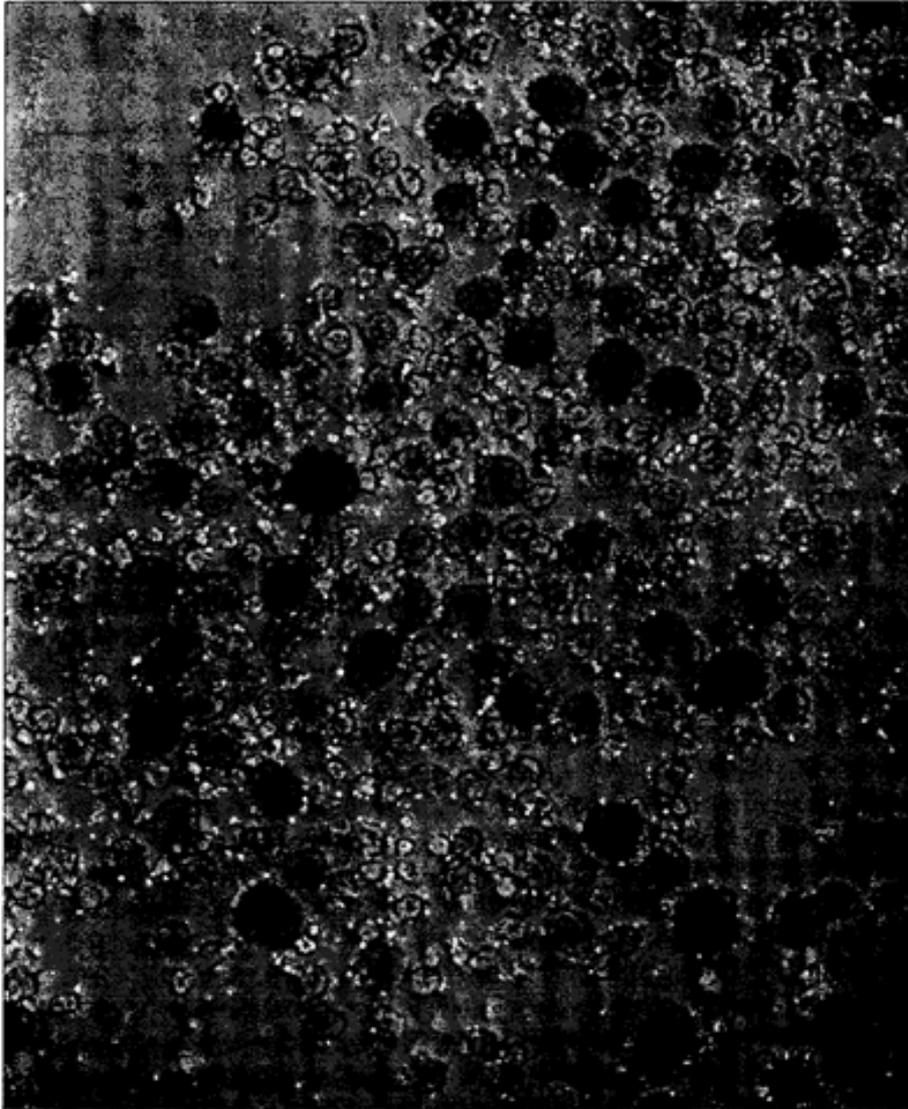


Figura 5

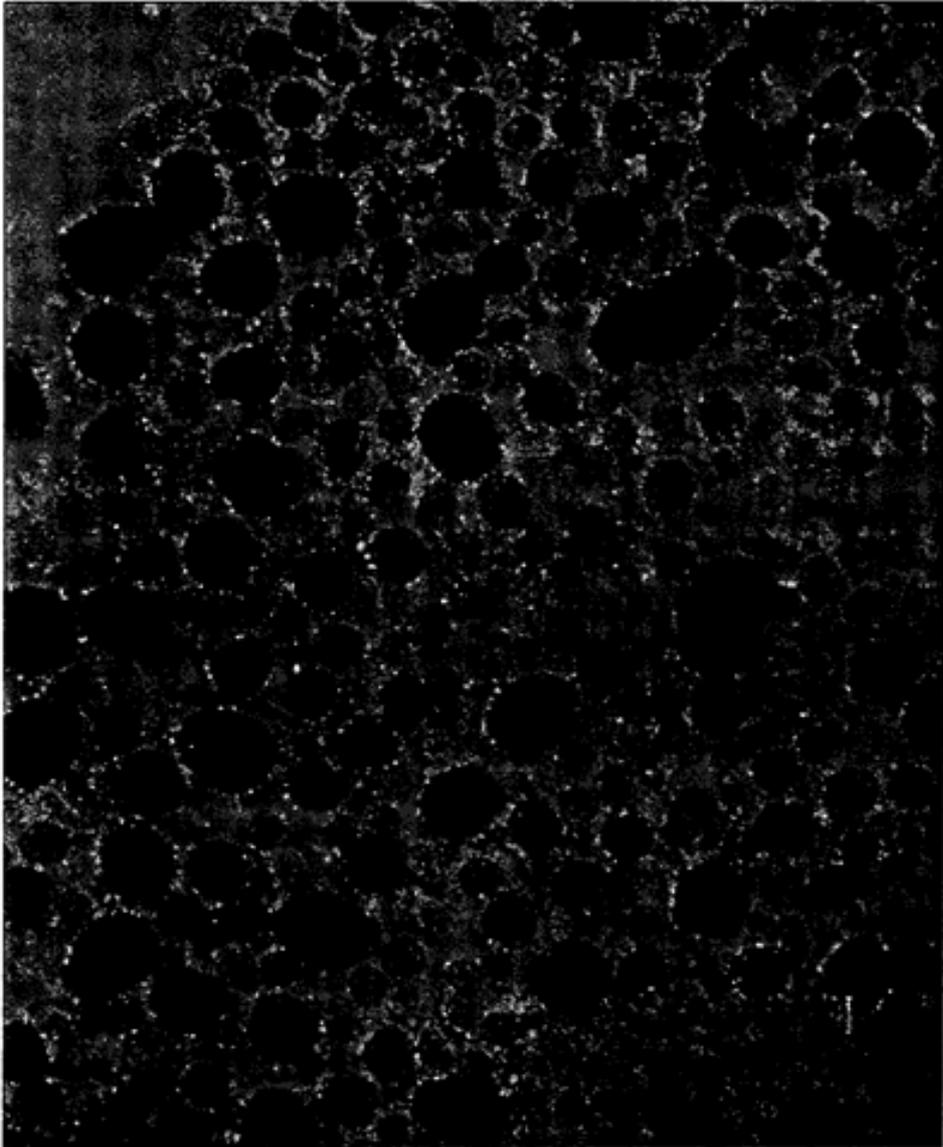


Figura 6



Figura 7

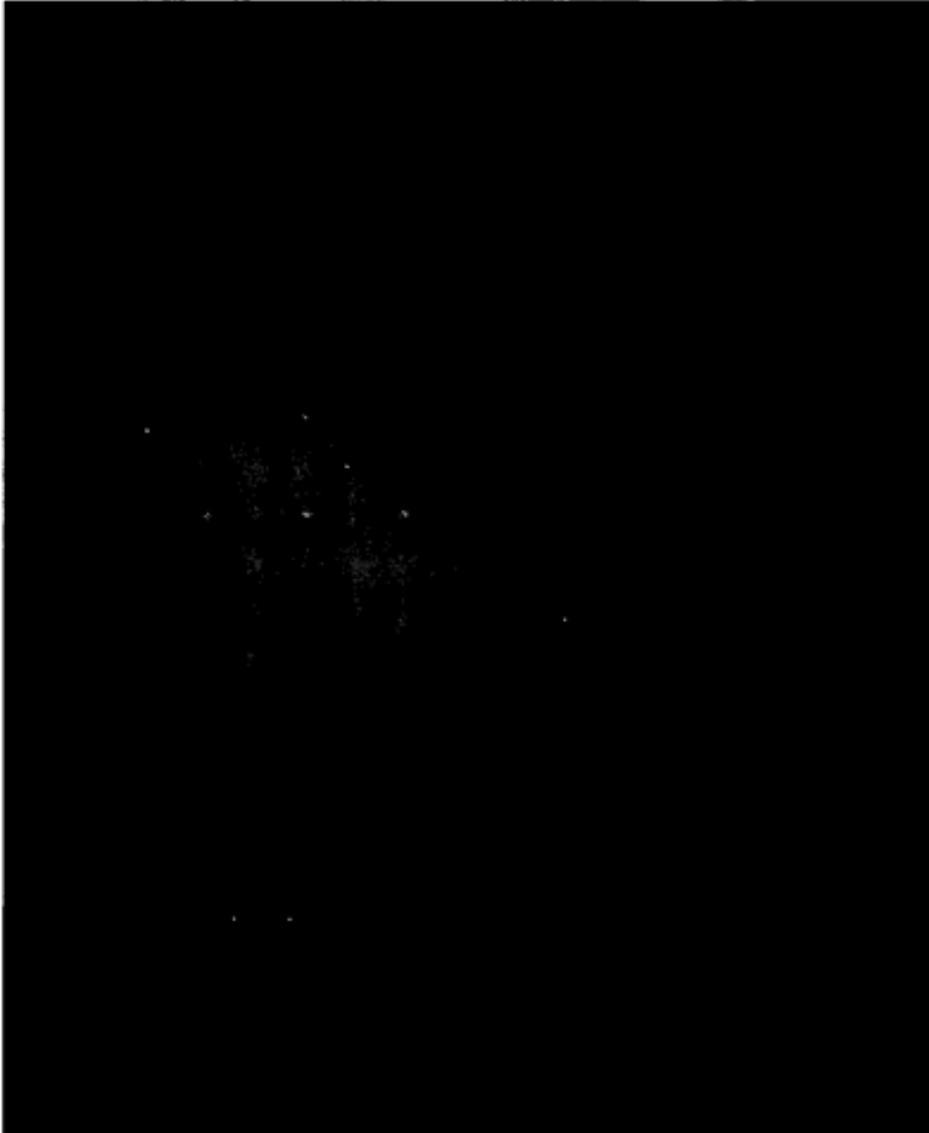


Figura 8

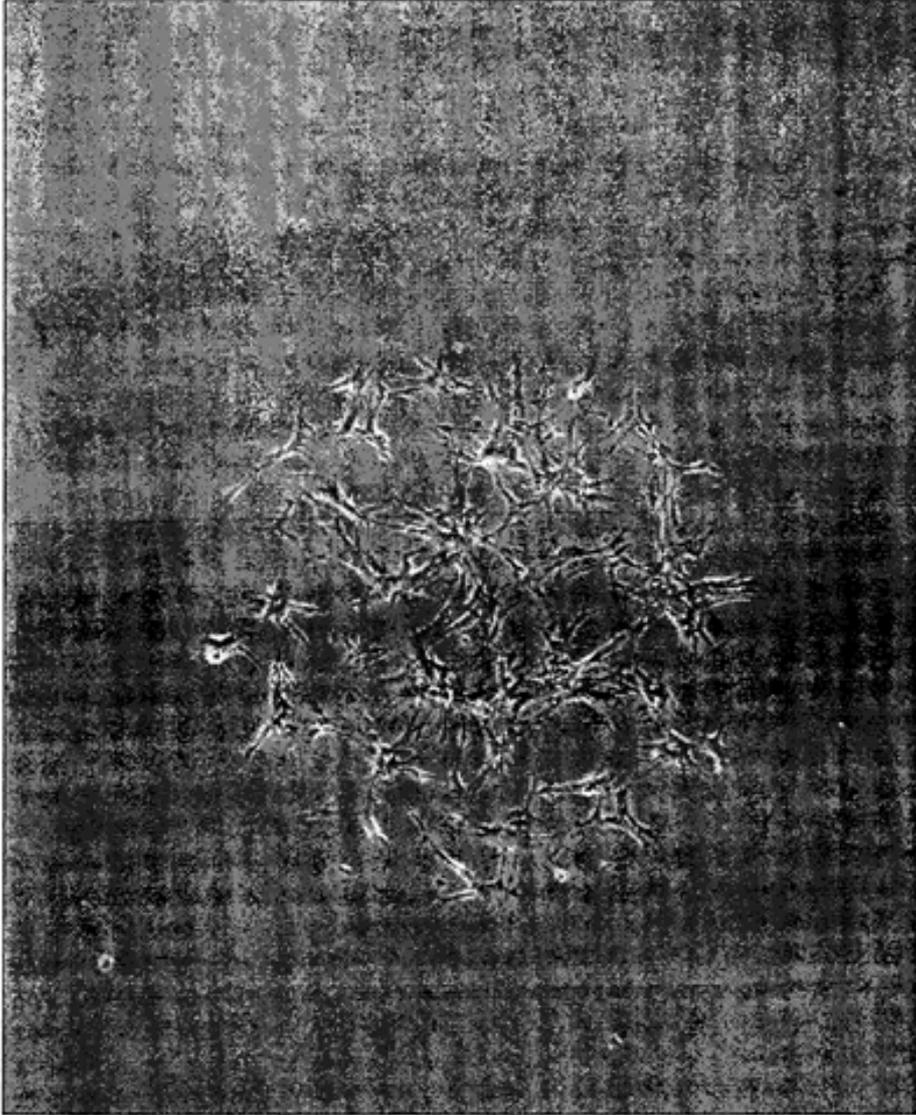


Figura 9

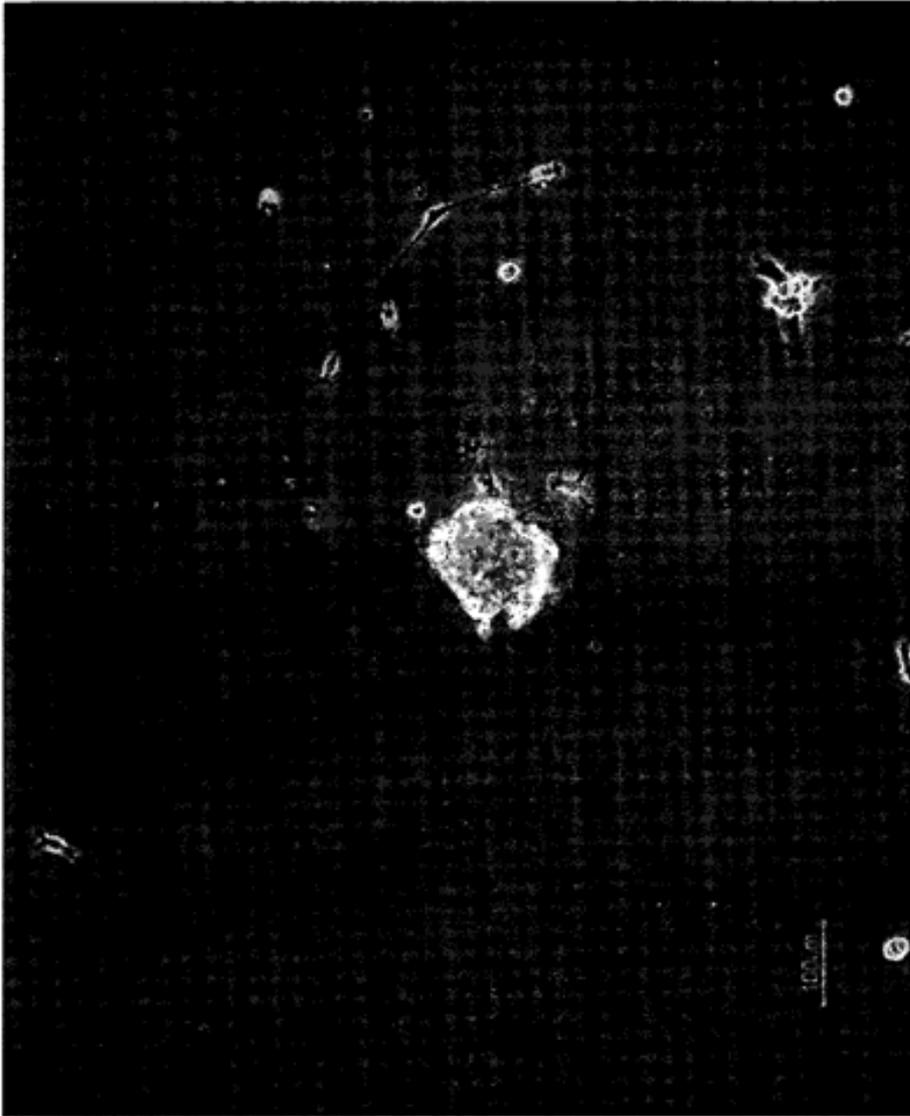


Figura 10

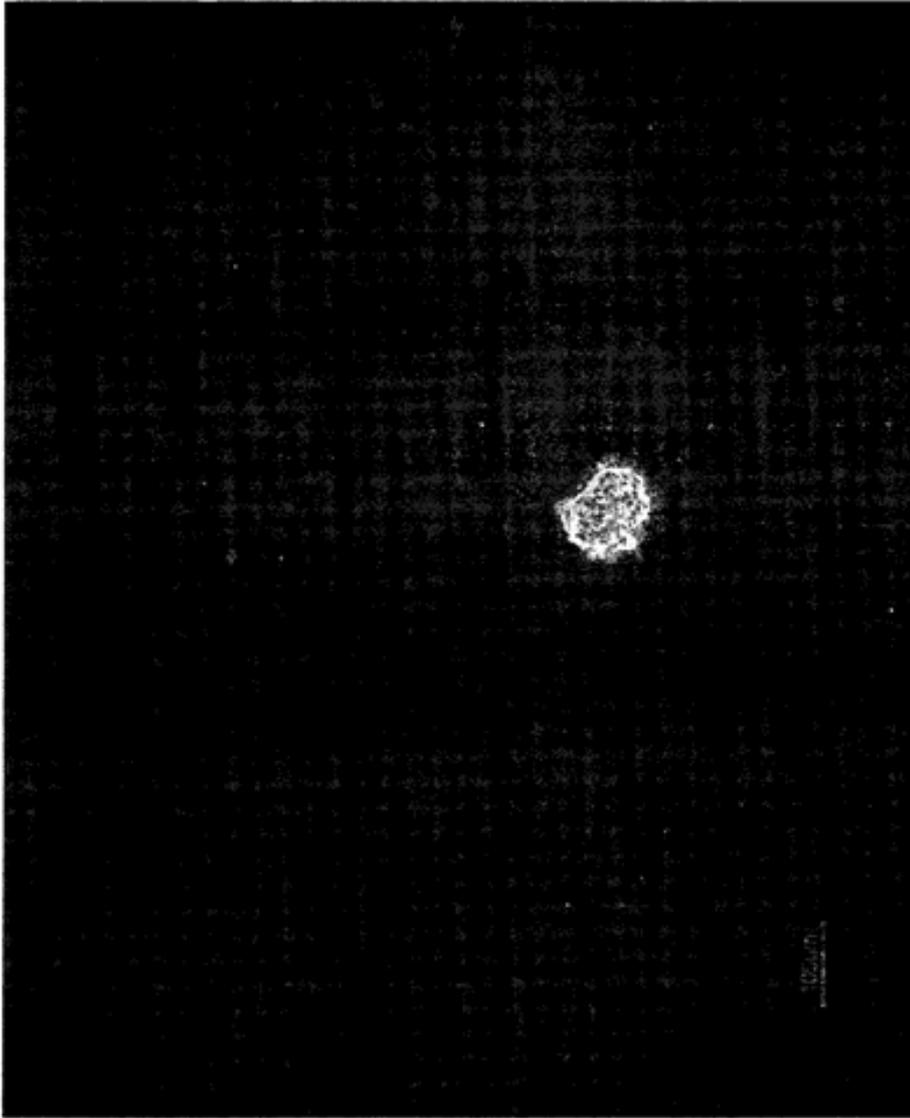


Figura 11

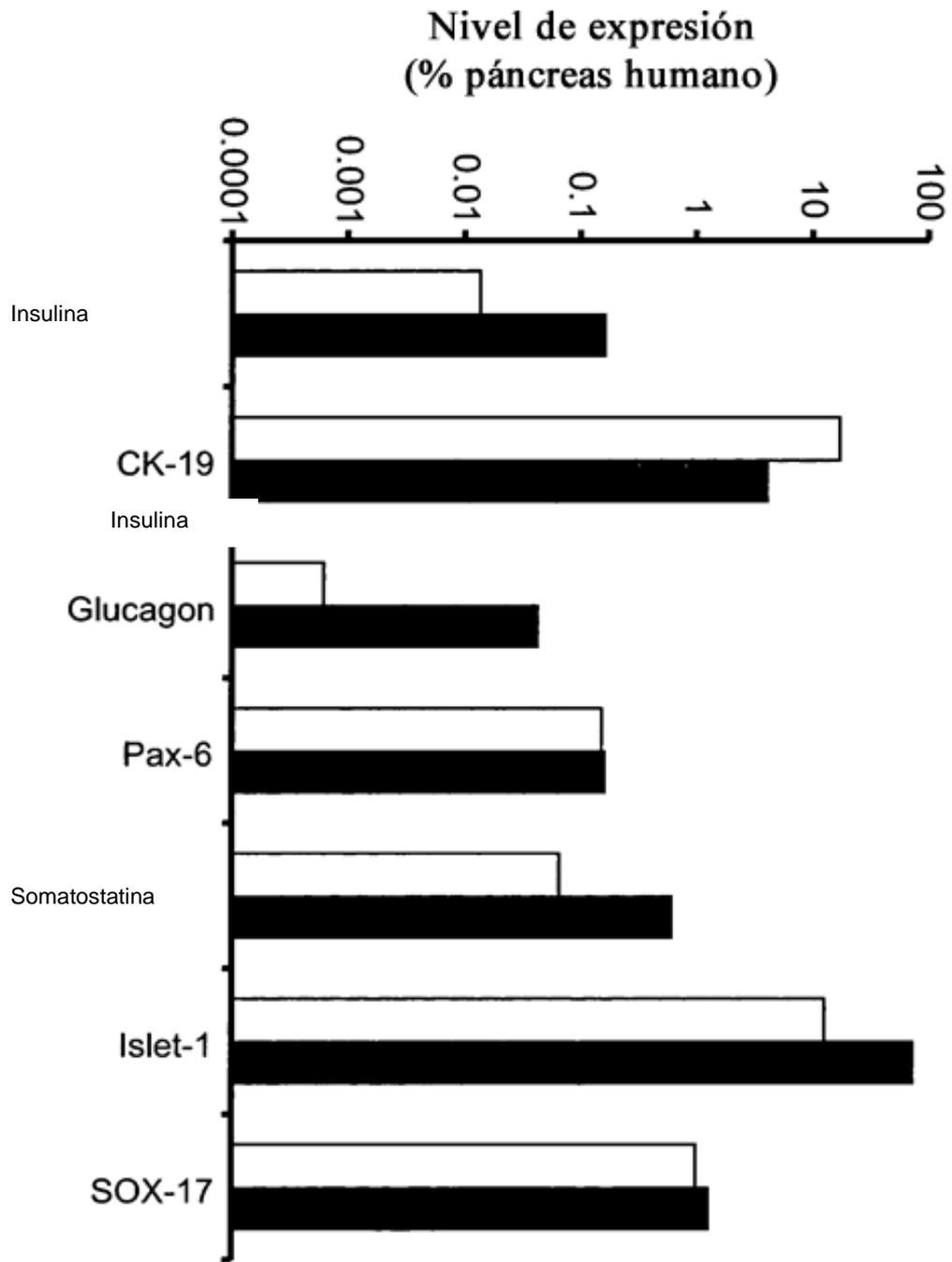


Figura 12