

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 419**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2006 PCT/US2006/008055**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.09.2006 WO06094286**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2006 E 06737248 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 1860950**

54 Título: **Células estromales adultas derivadas del páncreas**

30 Prioridad:

04.03.2005 US 658929 P

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

28.07.2017

73 Titular/es:

**LIFESCAN, INC. (100.0%)
1000 Gibraltar Drive
Milpitas, CA 95035-6312, US**

72 Inventor/es:

**O'NEIL, JOHN;
XU, JEAN y
REZANIA, ALIREZA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 627 419 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).

Células estromales adultas derivadas del páncreas**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCIÓN**

Esta invención se refiere a una población expansible de las células pancreáticas adultas que pueden diferenciarse en un linaje de células β . Esta invención también proporciona métodos para aislar y expandir tales células adultas de páncreas, así como métodos relacionados y composiciones para la utilización de tales células en el tratamiento terapéutico de la diabetes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 La pérdida de la función del órgano puede ser el resultado de defectos congénitos, lesión o enfermedad. Un ejemplo de una enfermedad que causa la pérdida de la función del órgano es la diabetes mellitus o diabetes. La mayoría de los casos de diabetes se dividen en dos tipos clínicos: Tipo 1, también conocido como diabetes de inicio juvenil o diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) y el Tipo 2, también conocido como diabetes de inicio en adultos. Cada tipo tiene un diferente pronóstico, tratamiento y causa. Ambas clases se caracterizan por la incapacidad del paciente para regular sus niveles de glucosa en sangre. Como consecuencia, los niveles de glucosa en sangre se elevan a valores altos porque la glucosa no puede entrar en las células para satisfacer las demandas metabólicas. Esta incapacidad para metabolizar correctamente el azúcar en la sangre provoca una compleja serie de sintomatologías tempranas y de etapa tardía, a partir de, por ejemplo, la hiperglucemia, el hambre anormal, sed, poliuria y glucosuria, y luego la escalada a, por ejemplo, neuropatía, enfermedad macrovascular y enfermedad microvascular.

25 Un método común de tratamiento de la diabetes de tipo 1 implica la administración exógena de insulina, típicamente por inyección con una jeringa o una bomba. Este método no normaliza completamente los niveles de glucosa en sangre y, a menudo se asocia con un mayor riesgo de hipoglucemia. El control de la glucemia más eficaz se puede lograr si la función del páncreas puede ser restaurada o rejuvenecida a través de trasplante o terapias a base celular.

30 Se ha documentado que las células progenitoras, derivadas de tejidos fetales o embrionarios, tienen el potencial para diferenciarse en una célula productora de hormonas de páncreas. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.436.704, W003/062405, W002/092756 y el documento EP 0 363 125 A2, que informan el potencial de las células fetales y embrionarias humanas derivadas de diferenciarse en un linaje de células β . Es importante tener en cuenta a partir de estas publicaciones, sin embargo, que las células embrionarias humanas a menudo requieren una capa de alimentación para la expansión y mantenimiento de la pluripotencia, que no permite para una escalada fácil de células y una terapia celular eventual para el tratamiento de diabetes.

40 También se ha documentado que las células progenitoras derivadas de tejidos adultos son capaces de diferenciación en un fenotipo de células β de páncreas. Véase, por ejemplo, W02004/087885 A2, Hess et al. (Nature Biotechnology 21, 763 - 770, 2003), y Janus et al. (J. Clin. Invest. 111: 843 850, 2003), que informa de la capacidad de las células adultas derivadas de médula ósea (células mesenquimales y hematopoyéticas) para diferenciarse en células que tienen características de una célula β de páncreas *in vitro*, o secretan factores tróficos que ayudan a regenerar un páncreas dañado *in vivo*.

45 Entre otras fuentes de células progenitoras que pueden diferenciarse en células pancreáticas se incluyen células madre de hígado de roedor ovals (W003/033697) y placenta después del parto (solicitud publicada de EE.UU. 2004/0161419 A1).

50 Las células endocrinas de los islotes de Langerhans, incluyendo cells β , están constantemente girando por procesos de apoptosis y la proliferación de nuevas células de los islotes (neogénesis). Como tal, se piensa que el páncreas para es una fuente de células progenitoras que son capaces de diferenciarse en células productoras de hormona pancreática. Hay tres tipos distintos de tejido, aislados de un páncreas, que son una fuente potencial de células progenitoras pancreáticas: una fracción rica en islote, una fracción rica en células ductales, y una fracción rica en células acinares.

55 El aislamiento de células progenitoras o células parcialmente diferenciadas a partir de extractos de tejido pancreático crudo se puede conseguir usando anticuerpos dirigidos contra marcadores de superficie celular. Por ejemplo, la solicitud publicada 2004/0241761 da a conocer el aislamiento de células murinas que eran positivas para ErbB2, ErbB3, ErbB4, Msx-2 y PDX-1 (Célula 1, Tabla I a continuación), y positivo para la expresión de insulina.

60 Gershengorn *et al.* (Science 306: 2261-2264, 2004) enseña la producción de la proliferación de células que eran capaces de formar agregados de células de tipo islote. Las células se derivan de una población heterogénea de células adherentes que surgieron del cultivo de los islotes pancreáticos humanos aislados *in vitro*. Los islotes aislados de Langerhans se sembraron inicialmente sobre placas de cultivo tisular y se cultivaron en medio que contiene 10% de suero. Se observaron células de tipo fibroblasto para migrar fuera de los islotes cultivados y formar una monocapa. Estas células expresan nestina, actina de músculo liso y vimentina (Célula 2, la **Tabla I** a continuación).

Células progenitoras pancreáticas también pueden surgir del cultivo de los islotes pancreáticos y tejido ductal que se ha disociado en células individuales, como se describe por Seaberg *et al.* (Nature Biotechnology 22: 1115 - 1124, 2004).

Las células progenitoras murinas describen por Nestina expresada por Seaberg *et al.* durante la proliferación (Célula 3, **Tabla I** a continuación).

5 Solicitud Publicada de Estados Unidos 2003/0082155 describe métodos para aislar e identificar una población de células de los islotes de Langerhans del páncreas humano, que tienen las características funcionales y moleculares de las células madre. En particular, estas células se caracterizaron mediante tinción positiva por Nestina, la expresión génica nestina, tinción positiva por GLP-1R, expresión del gen GLP-1R, tinción positiva por ABCG2, la expresión del gen ABCG2, tinción positiva por Oct3/4, expresión del gen por Oct3/4, tinción positiva por latrofilina (tipo 2), expresión génica de latrofilina (tipo 2), tinción positiva por Hes-1, expresión génica Hes-1, tinción positiv de subunidades de integrina $\alpha 6$ y $\beta 1$, expresión génica de subunidades de integrina $\alpha 6$ y $\beta 1$, tinción positiva de c-kit, expresión génica de c-kit, tinción positiva MDR1, expresión génica MDR1, tinción positiva de SST-R, 2, 3, 4, expresión génica SST-R, 2, 3, 4, la tinción positiva SUR-1, expresión génica SUR-1, tinción positiva de Kir 6,2, expresión génica de Kir 6,2, tinción negativa de CD34, tinción negativa de CD45, tinción negativa CD133, tinción negativa de MHC de clase I, tinción negativa de MHC de clase II, tinción negativa de citoqueratina 19, la proliferación a largo plazo en el cultivo, y la capacidad de diferenciarse en pseudoislotes en cultivo (Célula 4, **Tabla I** a continuación).

En otro enfoque, como se describe en la patente de EE.UU. 5.834.308, Patente de EE.UU. 6.001.647 y Patente de EE.UU. 6.703.017, preparaciones crudas de los cultivos de los islotes de ratones NOD pueden utilizarse para establecer cultivos de tipo epitelial, que pueden mantenerse en cultivos en crecimiento para más de 1 año y que parecen demostrar la capacidad de diferenciarse en racimos de tipo islote, capaces de secretar insulina. (Célula 5, **Tabla I** a continuación).

Estructuras de tipo islote pueden ser generadas a partir de fracciones de páncreas humano digerido enriquecido para el tejido ductal, como se describe en Bonner-Weir *et al.* (*Proc Nat Acad Sci* 97: 7999-8004, 2000) y la patente de EE.UU. 6.815.203 B1. Grupos de tipo islote descritos en estas publicaciones tiñeron positivos para citoqueratina 19 y mostraron inmunoreactividad para la insulina. (Célula 6, **Tabla I** a continuación).

W02004/011621 da a conocer la generación de células adherentes de insulina negativa de fragmentos ductales pancreáticos humanos. (Célula 7, **Tabla I** a continuación).

30 W003/102134 da a conocer la generación de una célula epitelial positiva para citoqueratina19 a partir de una fracción acinar de un digerido pancreático humano. Las células generadas son capaces de expansión limitada y se diferencian en una célula productora de insulina en presencia de un medio de inducción. (Célula 8, la **Tabla I** a continuación).

35 Solicitud Publicada de EE.UU. 2004/015805 A1 informa de que un subconjunto de células madre pancreáticas humanas puede aislarse utilizando ligandos para la CD56 de marcador de superficie celular (también conocida como NCAM). Estas células pueden diferenciarse en células productoras de insulina y agregados productores de insulina. (Célula 9, **Tabla I** a continuación).

40 Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad significativa para desarrollar condiciones de cultivo para el establecimiento de líneas celulares adultas derivadas del pancreas que se puede ampliar para hacer frente a las necesidades clínicas actuales, mientras que conserva el potencial para diferenciarse en un linaje de células β a finales de los pasajes.

RESUMEN DE LA INVENCION

45 <INSERTAR PÁGINAS A CONTINUACIÓN 4a-4c AQUÍ>

Los métodos para aislar una población de células adultas derivadas del pancreas pueden incluir la expansión de la población de células durante hasta aproximadamente 20 duplicaciones de la población, mientras que conserva el potencial de las células para diferenciarse en células con características de un linaje de células β . AlteARNtivamente, la población de células se puede ampliar para hasta aproximadamente 50, o, alteARNtivamente, para hasta aproximadamente 70 duplicaciones de la población, al tiempo que conserva el potencial de las células para diferenciarse en células con características de un linaje de células β .

55 En un método para aislar células estromales derivadas del pancreas de mamíferos adultos de acuerdo con la presente invención, las células pancreáticas se obtienen de los digestos de tejido pancreático, que incluyen las células pancreáticas diferenciadas y células estromales pancreáticas no diferenciadas. Con el fin de seleccionar y enriquecer las células estromales, las células obtenidas a partir de digestos de tejido pancreático se cultivan en un medio de selección, que es un medio de comunicación rico en nutrientes que contiene menos de 5% de suero y glucosa a una concentración de menos de 30 mM. El intervalo de glucosa también puede ser menor, por ejemplo, 6 mM o menos. El cultivo se dejó en reposo durante aproximadamente dos a aproximadamente cuatro semanas sin ningún cambio de los medios hasta que las células se adhieren al sustratos de cultivo.

60 Con posterioridad a la fase inicial de la selección y la fijación de las células, los medios de selección se pueden cambiar a un medio de expansión rico en nutrientes suplementados con suero en una concentración de más de 1% pero inferior al 20% y glucosa a una concentración de menos de 30 mM.

La población de células resultante se enriquece en las células adultas del estroma derivadas del pancreas. Tal población de células estromales es negativa para los siguientes marcadores: NCAM, ABCG2, citoqueratina 7, 8, 18 y 19; y

opcionalmente por lo menos uno de los siguientes marcadores: EpCAM, CD 45, CD1 17, CD133, CD138, o CD184, y puede ser ampliado para múltiples generaciones sin perder la capacidad de diferenciarse en células del linaje de células β .

5 La población de células enriquecidas en células estromales adultas derivadas del páncreas puede ser contactada, por ejemplo, con un agente (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador proteico expresado por células estromales, para identificar y seleccionar células estromales adultas derivadas del páncreas, obteniendo de este modo una población sustancialmente pura de células estromales adultas derivadas del páncreas, es decir, en el que un marcador de proteína reconocido se expresa en al menos el 50% de la población celular.

10 La población pura aislada de células estromales adultas derivadas del páncreas de la invención es negativa para NCAM, ABCG2, citoqueratina 7, 8, 18, y 19; y es opcionalmente negativa para al menos uno de los siguientes marcadores: EpCAM, CD45, CD1 17, CD133, CD138, o CD184.

15 En una realización, células estromales adultas derivadas del páncreas aisladas y expandidas de acuerdo con la presente invención se puede utilizar en un ensayo *in vitro* para la detección de agentes que son capaces de diferenciar células en el linaje de células β .

20 Células estromales adultas derivadas del páncreas aisladas y expandidas de acuerdo con la presente invención pueden ser inducidas para diferenciarse en células del linaje de células β bajo condiciones apropiadas *in vitro* o *in vivo*. De acuerdo con ello, las células estromales adultas derivadas del páncreas seleccionadas y expandidas de acuerdo con la presente invención, así como las células diferenciadas derivadas de las células estromales adultas derivadas del páncreas, son útiles para el tratamiento de diabetes de tipo 1 y 2.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** resume el proceso de múltiples etapas usado para aislar las células estromales adultas derivadas del páncreas de la presente invención.

30 La **Figura 2** representa la morfología de células estromales adultas humanas derivadas del páncreas adheridas no diferenciadas (100X aumento) en el paso 12 cultivadas en medio basal suplementado con 5% de suero bovino fetal (FBS), 1% de penicilina/estreptomicina (FBS), y 0,0165 mM sulfato de zinc.

35 La **Figura 3** muestra la curva de crecimiento típica de células estromales adultas derivadas del páncreas de la presente invención. La curva representada es de células de paso 10.

40 La **Figura 4** ilustra el análisis FACS típico de paso 9 células estromales adultas derivadas del páncreas de la presente invención, a) de control de isotipo, b) CD117 en eje X y fosfatasa alcalina en eje Y, c) CD 105 en eje X y CD44 en eje Y, d) CD73 en eje X y CD90 en eje Y, e) EPCAM, f) ABCG2, g) citoqueratina 14, 15, 16, y 19, h) citoqueratina 5, 6, 8, 10, 13, y 18, i) vimentina.

La **Figura 5** representa la inmunotinción de 11 células de paso. Las células se tiñeron positivas para vimentina, nestina, tubulina beta III, actina de músculo liso, y negativas para citoqueratina (incluyendo CK 7 y CK 19).

45 La **Figura 6** muestra el potencial de expansión de una población de células estromales adultas derivadas del páncreas aislada de acuerdo con la presente invención.

50 La **Figura 7** muestra la expresión de genes seleccionados, según lo determinado por PCR en tiempo real con el tiempo en cultivo. Los resultados mostrados son los niveles de expresión de PDX-1 (Panel A), la insulina (Panel B), HNF-3B (Panel C) y CK 19 (Panel D), expresados como un porcentaje de los niveles observados en el páncreas humano. El tiempo en cultivo, como se representa por el número de paso se indica en el eje x. Los datos se obtuvieron a partir de células estromales pancreáticas adultas derivadas de la fracción 3 del páncreas donante H4. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con 2% de FBS.

55 La **Figura 8** muestra la expresión de genes seleccionados, según lo determinado por PCR en tiempo real con el tiempo en cultivo. Los resultados mostrados son los niveles de expresión de PDX-1 (Panel A), la insulina (Panel B), HNF-3B (Panel C) y CK 19 (Panel D), expresados como un porcentaje de los niveles observados en el páncreas humano. El tiempo en cultivo, como se representa por el número de paso se indica en el eje x. Los datos se obtuvieron a partir de células estromales pancreáticas adultas derivadas de la fracción 4 del páncreas donante H4. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con 2% de FBS.

60 La **Figura 9** muestra la expresión de genes seleccionados, según lo determinado por PCR en tiempo real con el tiempo en cultivo. Los resultados mostrados son los niveles de expresión de PDX-1 (Panel A), la insulina (Panel B), HNF-3 β (Panel C) y CK 19 (Panel D), expresados como un porcentaje de los niveles observados en el páncreas humano. El tiempo en cultivo, como se representa por el número de paso se indica en el eje x. Los datos se obtuvieron a partir de células estromales pancreáticas adultas derivadas de la fracción 5 de páncreas donante H4. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con 2% de FBS.

La **Figura 10** muestra la expresión de genes seleccionados, según lo determinado por PCR en tiempo real con el tiempo en cultivo. Los resultados mostrados son los niveles de expresión de PDX-1 (Panel A), insulina (Panel B), HNF-3 β (Panel C) y CK 19 (Panel D), expresados como porcentaje de los niveles observados en el páncreas humano. El tiempo en cultivo, como se representa por el número de paso se indica en el eje x. Los datos se obtuvieron a partir de células estromales pancreáticas adultas derivadas de la fracción 3 de páncreas donante H4. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de PBS.-

La **Figura 11** muestra la expresión de genes seleccionados, según lo determinado por PCR en tiempo real con el tiempo en cultivo. Los resultados mostrados son los niveles de expresión de PDX-1 (Panel A), la insulina (Panel B), HNF-3 β (Panel C) y CK 19 (Panel D), expresados como un porcentaje de los niveles observados en el páncreas humano. El tiempo en cultivo, como se representa por el número de paso, se indica en el eje x. Los datos se obtuvieron a partir de células estromales pancreáticas adultas derivadas de la fracción 4 de páncreas donante H4. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de FBS.

La **Figura 12** muestra la expresión de genes seleccionados, según lo determinado por PCR en tiempo real con el tiempo en cultivo. Los resultados mostrados son los niveles de expresión de PDX-1 (Panel A), la insulina (Panel B), HNF-3 β (Panel C) y CK 19 (Panel D), expresados como un porcentaje de los niveles observados en el páncreas humano. Tiempo en cultivo, como se representa por el número de paso se indica en el eje x. Los datos se obtuvieron a partir de células estromales pancreáticas adultas derivadas de la fracción 5 de páncreas donante H4. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de FBS.

La **Figura 13** muestra la expresión de genes seleccionados, según lo determinado por PCR en tiempo real con el tiempo en cultivo. Los resultados mostrados son los niveles de expresión de PDX-1 (Panel A), la insulina (Panel B), HNF-3 β (Panel C) y CK 19 (Panel D), expresados como un porcentaje de los niveles observados en el páncreas humano. Tiempo en cultivo, como se representa por el número de paso se indica en el eje x. Los datos se obtuvieron a partir de células estromales pancreáticas adultas derivadas de la fracción 3 de páncreas donante H4. Las células fueron cultivadas en CMRL suplementado con 10% de FBS.

La **Figura 14** muestra la expresión de genes seleccionados, según lo determinado por PCR en tiempo real con el tiempo en cultivo. Los resultados mostrados son los niveles de expresión de PDX-1 (Panel A), la insulina (Panel B), HNF-3 β (Panel C) y CK 19 (Panel D), expresados como un porcentaje de los niveles observados en el páncreas humano. Tiempo en cultivo, como se representa mediante el número de paso se indica en el eje x. Los datos se obtuvieron a partir de células estromales adultas derivadas del páncreas de la fracción 4 de páncreas de donantes H4. Las células se cultivaron en CMRL suplementado con 10% FBS

La **Figura 15** muestra la expresión de genes seleccionados, según lo determinado por PCR en tiempo real con el tiempo en cultivo. Los resultados mostrados son los niveles de expresión de PDX-1 (Panel A), la insulina (Panel B), HNF-3 β (Panel C) y CK 19 (Panel D), expresados como un porcentaje de los niveles observados en el páncreas humano. Tiempo en cultivo, como se representa por el número de paso se indica en el eje x. Los datos se obtuvieron a partir de células estromales pancreáticas adultas derivadas de la fracción 5 de páncreas donante H4. Las células fueron cultivadas en CMRL suplementado con 10% de FBS.

La **Figura 16** muestra la expresión de genes seleccionados, según lo determinado por PCR en tiempo real con el tiempo en cultivo. Los resultados mostrados son los niveles de expresión de PDX-1 (Panel A), la insulina (Panel B), HNF-3 β (Panel C) y CK 19 (Panel D), expresados como un porcentaje de los niveles observados en el páncreas humano. Tiempo en cultivo, como se representa por el número de paso se indica en el eje x. Los datos se obtuvieron a partir de células estromales pancreáticas adultas derivadas de la fracción 3 de páncreas donante H8. Las células fueron cultivadas en CMRL suplementado con 10% de FBS.

La **Figura 17** muestra la expresión de genes seleccionados, según lo determinado por PCR en tiempo real con el tiempo en cultivo. Los resultados mostrados son los niveles de expresión de glucagón (Panel A), Glut2 (Panel B), Pax4 (Panel C) y Pax6 (Panel D), expresados como un porcentaje de los niveles observados en el páncreas humano. Tiempo en cultivo, como se representa por el número de paso se indica en el eje x. Los datos se obtuvieron a partir de células estromales pancreáticas adultas derivadas de la fracción 3 de páncreas donante H8. Las células fueron cultivadas en CMRL suplementado con 10% de FBS.

La **Figura 18** muestra la expresión de genes seleccionados, según lo determinado por PCR en tiempo real con el tiempo en cultivo. Los resultados mostrados son los niveles de expresión de somatostatina (Panel A), neuroD1 (Panel B), NKX2.2 (Panel C) y Nkx6.1 (Panel D), expresados como porcentaje de los niveles observados en el páncreas humano. Tiempo en cultivo, como se representa por el número de paso se indica en el eje x. Los datos se obtuvieron a partir de células estromales adultas derivadas del páncreas de la fracción 3 del páncreas de donante H8. Las células se cultivaron en CMRL suplementado con 10% FBS.

La **Figura 19** muestra la expresión de genes seleccionados, según lo determinado por PCR en tiempo real con el tiempo en cultivo. Los resultados mostrados son los niveles de expresión de HNF-1 α (Panel A), y Sox 17 (Panel B), expresados como un porcentaje de los niveles observados en el páncreas humano. Tiempo en cultivo, como se representa por el número de paso se indica en el eje x. Los datos se obtuvieron a partir de células estromales pancreáticas adultas

derivadas de la fracción 3 de páncreas donante H8. Las células fueron cultivadas en CMRL suplementado con 10% de FBS.

5 La **Figura 20** muestra la expresión de genes seleccionados, según lo determinado por PCR en tiempo real después del tratamiento.

La **Figura 21** muestra el potencial de expansión de dos poblaciones de células estromales adultas derivadas del pancreas aisladas de acuerdo con la presente invención antes de, y después del avivamiento de criopreservación.

10 La **Figura 22** muestra los efectos de la privación de nutrientes sobre el potencial de expansión de una población de células estromales adultas derivadas del pancreas aisladas según la presente invención.

La **Figura 23** muestra el cariotipo de una población representativa de células estromales adultas derivadas del pancreas aisladas según la presente invención.

15 La **Figura 24** muestra el cariotipo de una población representativa de células estromales adultas derivadas del pancreas aisladas según la presente invención.

20 La **Figura 25** muestra el cariotipo de una población representativa de células estromales adultas derivadas del pancreas aisladas según la presente invención.

La **Figura 26** muestra el cariotipo de una población representativa de células estromales adultas derivadas del pancreas aisladas según la presente invención.

25 La **Figura 27** muestra el cariotipo de una población representativa de células estromales adultas derivadas del pancreas aisladas según la presente invención.

30 La **Figura 28** muestra los gráficos de dispersión de los genes expresados en células estromales adultas derivadas del pancreas derivadas de fracciones 3, 4, y 5 de páncreas donante H5. También se enumera el coeficiente de correlación de Pearson para cada comparación.

35 La **Figura 29** muestra el gráfico de dispersión de los genes expresados en células estromales pancreáticas adultas derivadas de la fracción 3 de páncreas donante H5 y páncreas donante H8. También se enumera el coeficiente de correlación de Pearson.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

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

Definiciones

45 "Células derivadas del pancreas" se refieren a células primarias pancreáticas procedentes de especies de mamíferos, o células primarias aisladas a partir de un páncreas de mamíferos, que contienen tipos de células acinares, ductales, y de islotes, así como células de apoyo tales como las estromales, estrelladas, neuronas, células vasculares, células madre, y las células progenitoras.

50 "Las células acinares" se refieren a células pancreáticas que representan aproximadamente el 80% de las células del páncreas y producen muchas enzimas diferentes, incluyendo amilasa, lipasa, tripsina, quimotripsina y elastasa.

55 "Células ductales" se refieren a células pancreáticas que representan aproximadamente el 10% de las células del páncreas y definen los conductos interlobulares y intralobulillares más grandes, así como los más pequeños, conductos intercalares, que drenan las enzimas pancreáticas de los acinos. Células ductales también producen bicarbonato y agua para diluir las enzimas y alterar el pH intestinal después de la liberación en el intestino a partir de estas estructuras ductales. Células ductales pueden ser identificadas por la citoqueratina 19 (CK 19).

60 "Células de los islotes" se refieren a células endocrinas que suman alrededor de 1 a 2% de las células del páncreas y existen como agregados celulares particulares llamados islotes, que contienen tipos de células diferentes que generan hormonas diferentes. Células β representan alrededor del 60 al 80% del agregado de islote y secretan insulina que permite la entrada de glucosa en la mayoría de las células del cuerpo. Las células alfa representan alrededor del 10 al 30% del islote, y secretan glucagón que se libera durante el ayuno para permitir el suministro de glucosa desde el hígado a mantener el azúcar en la sangre normal. Las células delta representan aproximadamente el 5 al 10% de las células de los islotes y secretan somatostatina que regula aún más los niveles de glucosa. Células productoras de polipéptido pancreático (alrededor de 5 a 10% de las células de los islotes) liberan su hormona para alterar el funcionamiento exocrino y gastrointestinal. También hay otros tipos de células de los islotes, tales como células endoteliales, células neuronales y células progenitoras.

ES 2 627 419 T3

"Células estromales derivadas del páncreas" se refieren a células de tipo fibroblasto derivadas del páncreas que tienen la capacidad de expandir *in vitro* y están desprovistas de cualquiera de los marcadores que son característicos de una célula pancreática productora de hormonas, una célula de islote, una célula de linaje de células β , o una célula β .

5 "Linaje de células β " se refiere a las células con expresión génica positiva para el factor de transcripción PDX-1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN-3, Nkx2.2, Nkx6.1, NeuroD, Isl-1, HNF-3 beta, MAFA, Pax4 y Pax6.

10 "Estructura pancreática de tipo islote" se refiere a racimos tridimensionales de células derivadas mediante la práctica de los métodos de la invención, que tiene la apariencia de un islote pancreático. Las células en una estructura de tipo islote pancreático expresan al menos el gen PDX-1 y una hormona seleccionada de la lista de glucagón, somatostatina, o insulina.----

15 El término "hipóxico" se refiere a los niveles de oxígeno de menos de 20%, alteARNtivamente de menos de 10%, alteARNtivamente menos de 5% pero más del 1%.

El término "normoxia" se refiere a niveles de oxígeno atmosférico de aproximadamente 20%.

20 El término "sustancialmente positivo", cuando se usa en relación con una población de células con respecto a la expresión de cierto marcador (tal como un receptor de membrana, proteína citoplasmática o nuclear, o un factor de transcripción), significa que el marcador está presente o expresado en al menos aproximadamente 50%, preferiblemente al menos aproximadamente 60%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 70%, de la población celular total.

25 El término "sustancialmente negativo", cuando se usa en relación con una población de células con respecto a la expresión de cierto marcador (tal como un receptor de membrana, proteína citoplasmática o nuclear, o un factor de transcripción), significa que el marcador no está presente o expresado a aproximadamente 70%, alteARNtivamente aproximadamente 80%, alteARNtivamente aproximadamente 90%, de la población celular total.

30 El término "sustancialmente puro", cuando se usa en relación con una población de células significa que la célula de interés suma al menos aproximadamente 50%, preferiblemente al menos aproximadamente 60%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 70%, y lo más preferiblemente >80% de la población celular total.

35 Una "célula madre" tal como se utiliza aquí se refiere a una célula indiferenciada que es capaz de propagación extensa *in vivo* o *ex vivo* y capaz de diferenciación a otros tipos de células.

40 Una "célula progenitora" se refiere a una célula que se deriva de una célula madre por diferenciación y es capaz de diferenciación adicional a tipos de células más maduras. Las células progenitoras típicamente tienen capacidad de proliferación más restringida en comparación con las células madre. AlteARNtivamente, una "célula progenitora" puede surgir de la desdiferenciación de una célula total o parcialmente diferenciada.

45 "Población expandible" se refiere a la capacidad de una población de células aisladas para ser propagadas a través de al menos aproximadamente 20, de forma alteARNtiva, a través de al menos aproximadamente 50, alteARNtivamente, al menos aproximadamente 70 duplicaciones de la población en un sistema de cultivo celular.

Por "células indiferenciadas," cuando se usa en relación con las células aisladas de un páncreas, se entiende una población de células derivadas del páncreas que son sustancialmente negativas para la expresión de PDX-1 o insulina.

50 Por "células diferenciadas," cuando se usa en relación con las células aisladas de un páncreas, se entiende una población de células derivadas del páncreas que son sustancialmente positivas para la expresión de PDX-1 o insulina.

55 "Marcadores", tal como se usa en el presente documento, son el ácido nucleico o moléculas polipeptídicas que son diferencialmente expresadas en una célula de interés. En este contexto, la expresión diferencial significa un nivel mayor del marcador para un marcador positivo, y una disminución del nivel de un marcador negativo. El nivel detectable del ácido nucleico o marcador polipéptido es suficientemente más alto o más bajo en las células de interés, en comparación con otras células, de tal manera que la célula de interés pueda identificarse y distinguirse de otras células, usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica.

60 "Nestina" se refiere a una proteína de filamento intermedio que tiene una secuencia descrita en N° de Acceso de Genbank X65964, o una secuencia variante de origen natural de la misma (por ejemplo, variante alélica).

"Tubulina de Beta III" es parte del componente del citoesqueleto que participa en diversas funciones citosólicas, tales como la generación y mantenimiento de la morfología celular y el transporte de orgánulos membranosos. Se ha demostrado que Tubulina Beta III está presente en las células neuronales.

65 La "vimentina" es una proteína de filamentos intermedios del citoesqueleto que es un marcador general de células que se originan en el mesénquima.

"ABCG2" se refiere a transportador de resistencia de fármacos múltiples de casete de unión ATP G2 a que tiene una secuencia descrita en el N° de Acceso de Genbank XM 032424, o una secuencia variante de origen natural de la misma (variante por ejemplo, alélica). Un experto en la técnica reconocerá que existen equivalentes en el que la secuencia de ADN que codifica ABCG2 puede variar, pero en el que la secuencia de aminoácidos codificada sigue siendo el mismo.

5

Moléculas de "grupo de diferenciación" (CD) son marcadores de la superficie celular, como se reconoce por conjuntos específicos de anticuerpos, que se utilizan para identificar el tipo de células, etapa de la diferenciación y actividad de estado de una célula. Función y designación de marcadores CD están bien establecidas en la técnica. Véase, por ejemplo, *The Leukocyte Antigen Fact Book*, 2ª edición, Barclay, A.N. *et al.* Academic Press, Londres 1997.

10

"CD49b" también se denomina "VLA-2" y es un receptor de superficie para proteínas extracelulares, tales como laminina, colágeno, fibronectina, y e-cadherina. Tiene un papel tanto en la coagulación con la angiogenesis y se encuentra principalmente en las plaquetas y células B y T activadas.

15

"CD49e" también se conoce como "VLA-5" y sirve como un receptor para la fibronectina y fibrinógeno. CD49e se expresa principalmente en las plaquetas, monocitos y neutrófilos.

"CD49f" también se conoce como "integrina $\alpha 6$ " y "VLA-6", y se asocia con la subunidad de integrina beta 1 para la unión de laminina. CD49f se expresa principalmente en las células epiteliales, trofoblastos, plaquetas y monocitos.

20

"CD90" también se conoce como "Thy-1" y se expresa principalmente en células madre hematopoyéticas, células del tejido conectivo, y diversas células fibroblásticas y estromales.

25

"CD91" también se conoce como receptor de alfa-2-marcoglobulina y se une a las lipoproteínas y también sirve como un receptor de superficie para las proteínas de choque térmico. CD91 se expresa principalmente sobre los fibroblastos, células dendríticas y macrófagos.

"CD95" también se conoce como "FAS" o "APO-1" y es el receptor para el ligando FAS. Se expresa principalmente en células B y T activadas y en ciertos tipos de células epiteliales.

30

"CD105" también se conoce como "endoglina" y se expresa principalmente en células endoteliales, monocitos, macrófagos, células estromales, y las células mesenquimales de médula ósea.

35

"NCAM" se refiere a Molécula de Adhesión de Célula Neural, también conocida como "CD56", es una molécula de adhesión celular independiente Ca^{2+} expresada en muchos tejidos, incluyendo el sistema nervioso y tejido pancreático.

"PECAM" se refiere a Molécula de Adhesión Celular de Plaquetas/Endotelial y pertenece a la familia de moléculas de adhesión celular que son glicoproteínas de la superficie celular, que participan en interacciones célula-célula.

40

"EPCAM" se refiere a molécula de adhesión celular epitelial que es una glicoproteína de superficie celular implicada en las interacciones célula-célula, principalmente en las células epiteliales.

"c-MET" se refiere al receptor para el factor de crecimiento de hepatocitos.

45

"CD44" también se conoce como "antígeno Hermes" y es el principal receptor de la superficie celular de ácido hialurónico. Este CD se expresa principalmente en la mayoría de tipos de células, a excepción de tejidos/células, tales como hepatocitos, algunas células epiteliales, y músculo cardiaco.

50

"CD73" también se conoce como "ecto-5'-nucleotidasa" y se expresa principalmente en un subconjunto de células B y T, células estromales de médula ósea, varias células epiteliales, fibroblastos y células endoteliales.

"CD81" también se conoce como diana de un anticuerpo antiproliferativo (TAPA1) y se expresa principalmente en linfocitos, células endoteliales y epiteliales.

55

"CD 124" también se conoce como receptor de la interleucina 4 y se expresa en células maduras B, células T, precursores hemopoyéticos, fibroblastos, y células endoteliales.

"CD 138" también se denomina proteoglicano de heparina de sulfato o sindecan-1 que media la adhesión celular y está asociada con las etapas posteriores de la diferenciación de células B. Se encuentra comúnmente en precursores de células B, células plasmáticas, y algunos tipos de células epiteliales.

60

Se ha sugerido que "CD 151" modifica la función de la integrina y la señalización y se encuentra típicamente en el endotelio, las plaquetas, megacariocitos, y el epitelio.

65

"CD 166" también se conoce como molécula de adhesión celular de leucocitos activada (ALCAM) y está implicado en la extensión de neuritas neuronales, la hematopoyesis embrionaria y la angiogenesis embrionaria. CD166 se expresa principalmente en las neuronas, las células T activadas y monocitos, células epiteliales, y fibroblastos.

"CD 184" también se denomina CXCR4 o Factor 1 derivado de células estromales (SDF1). Es el receptor de la quimioquina CXC SDF 1 y se encuentra en todas las células sanguíneas maduras, progenitores de sangre, células endoteliales y epiteliales, astrocitos y neuronas.

5 "c-Kit" y "CD117" se refieren a una quinasa de tirosina de receptor de superficie celular que tiene una secuencia descrita en el N° de Acceso de Genbank X06182, o una secuencia variante de origen natural de la misma (por ejemplo, variante alélica).

10 "CD45" se refiere al antígeno común de leucocitos que tiene una secuencia descrita en el N° de Acceso de Genbank Y00638, o una secuencia variante de origen natural de la misma (por ejemplo, variante alélica).

"CD133" se refiere a un antígeno de células madre hematopoyéticas de cinco transmembranas que tiene una secuencia descrita en el N° de Acceso de Genbank NM 006017.

15 "Fosfatasa alcalina" es una enzima producida en el hígado, los huesos y la placenta y normalmente presente en altas concentraciones en hueso en crecimiento y en la bilis. Una característica distintiva de las células madre pluripotentes no diferenciadas es su expresión de altos niveles de fosfatasa alcalina (AP) en su superficie celular.

20 Por "medio de cultivo celular básico definido" se entiende un suero libre o suero que contiene, medio de crecimiento celular químico definido. Tal medio incluye, pero no se limita a, Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), Medio Esencial Mínimo modificado alfa (MMEM alfa), Medio Basal Esencial (BME), CMRL 1066, RPMT 1640, medio M199, medio nutriente F10 de Ham y DMEM/F12. Estos y otros medios útiles están disponibles en GIBCO, Grand Island, Nueva York, EE.UU., por ejemplo. Varios de estos medios son revisados en *Methods in Enzymology*, volumen LVIII, "Cell Culture", pp. 62-72, editado por William B. Jakoby y Ira H. Pastan, publicado por Academic Press Inc.

25 "Vehículo farmacéutico" se refiere a un material poroso biodegradable o no degradable o matriz no porosa que puede actuar como un portador para el trasplante de células de mamífero.

30 "Trasplante", tal como se usa en este documento, puede incluir las etapas de introducir una célula o una población de células o tejidos en un mamífero tal como un paciente humano. "Trasplante" también puede incluir la incorporación de células o tejido en un vehículo farmacéutico, y la implantación de la portadora en un mamífero tal como un paciente humano.

35 **Aislamiento de células estromales adultas derivadas del páncreas**

En un aspecto de la presente invención, células estromales derivadas del páncreas se aíslan por un método de múltiples etapas, que se representa en la **Figura 1**. Este método implica esencialmente:

- 40 - La perfusión de un páncreas de cadáver, páncreas de donante vivo o autólogo, con una solución enzimática,
- Disociación mecánica del páncreas perfundido,
- Colocar en capas el tejido digerido sobre un gradiente de densidad, tal como polisucrosa o Ficoll, seguido por centrifugación para producir tres interfaces distintas,
- Extracción de los tejidos y las células en cada interfaz,
- 45 - El cultivo de los tejidos y células en placas de cultivo de tejido estándar en un medio de selección rico en nutrientes que contiene menos de 5% de suero,
- Dejar el cultivo en reposo durante hasta aproximadamente dos hasta aproximadamente cuatro semanas sin ningún cambio de medios de comunicación.

50 La perfusión de un páncreas de cadáver se puede lograr con cualquiera de las soluciones enzimáticas bien conocidos por los expertos en la técnica. Un ejemplo de una solución enzimática adecuada para uso en la presente invención contiene LIBERASE HI™ (Roche 0,5 mg/ml) y ADNasa 1 (0,2 mg/ml).-

55 La disociación mecánica del tejido pancreático puede efectuarse rápidamente, por el uso de un procesador de tejidos. AlteARNtivamente, la disociación mecánica del tejido pancreático puede llevarse a cabo utilizando una cámara de Ricordi u otro aparato equivalente que permite una disociación menos destructiva de los tejidos, en comparación con otros procedimientos.

60 Los tejidos pancreáticos digeridos se someten a continuación a una polisucrosa o gradiente de centrifugación de Ficoll para producir tres interfaces distintas, que se enriquecen en células de islotes, el tejido ductal y el tejido acinar, respectivamente. En una realización, los tejidos y las células se retiran de cada interfaz y se cultivan por separado. En una realización alteARNtiva, los tejidos y las células de todas las interfaces se combinan y se cultivan. Se ha determinado de acuerdo con la presente invención que células estromales adultas derivadas del páncreas se pueden derivar de cualquiera de las tres interfaces. AlteARNtivamente, el tejido pancreático digerido se puede aplicar a un gradiente de densidad continuo en el que el tejido enriquecido por islotes, tejido ductal y el tejido acinar también pueden ser recogidos.

65 Según la presente invención, los tejidos y las células recogidas de una o más de las interfaces se cultivan en un medio de selección para enriquecer selectivamente células estromales adultas derivadas del páncreas en la población celular. El medio de selección es rico en nutrientes y contiene niveles bajos de glucosa y suero. En general, el medio de

selección contiene menos de 5% de suero, de forma alterna, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3% de suero, de forma alterna, de aproximadamente 2% de suero. El medio de selección contiene glucosa de menos de 30 mM. En una realización, el medio de selección se complementa con 2% de suero que se deriva de la misma especie de mamífero del que se recogió el páncreas del donante. Alternativamente, el suero fetal de ternero o, suero de otras especies, u otros suplementos de suero o reemplazos se puede utilizar para complementar el medio de selección. Un ejemplo de un medio de selección adecuado se compone de DMEM (glucosa 5 mM), 2% de suero fetal bovino (FBS), 100 U/μG penicilina/estreptomicina, insulina-transferrina-selenio (ITS), 2 mM L-glutamina, 0,0165 mM ZnSO₄, y 0,38 μM 2-mercaptoetanol.

10 Durante el cultivo en un medio de selección ("la fase de selección"), las células pueden ser cultivadas bajo condiciones hipóxicas o normóxicas. Bajo condiciones de hipoxia, los niveles de oxígeno son menores que 20%, alterna, menores que 10%, alterna, inferiores al 5%, pero más del 1%.

15 En una realización, el cultivo se mantiene en la selección de medios en reposo durante aproximadamente dos a aproximadamente cuatro semanas sin ningún cambio de medios de comunicación, en cuyo momento las células típicamente se han convertido en adherente al sustrato de cultivo utilizado. La fase de selección se considera completa cuando no hay más aumento en el número de células adherentes.

20 Se ha descubierto que los métodos de la cosecha de tejidos y el cultivo de acuerdo con la presente invención dan como resultado una población de células enriquecida en células estromales adultas derivadas del páncreas. Por "enriquecido" se entiende que células estromales adultas derivadas del páncreas representan al menos aproximadamente 30%, alterna, de aproximadamente 40%, alterna, aproximadamente el 50% de todas las células en la población.

25 Con posterioridad a la fase inicial de la selección y la fijación de las células, las células (enriquecidas con células estromales adultas derivadas del páncreas) se expanden en condiciones como las que se describen a continuación.

30 Si se desea, la población de células enriquecida en células estromales adultas derivadas del páncreas puede ser expuesta, por ejemplo, a un agente (tal como, por ejemplo, un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador proteico expresado por células estromales, para identificar y seleccionar células estromales adultas derivadas del páncreas, obteniendo de este modo una población sustancialmente pura de células estromales adultas derivadas del páncreas.

35 **Caracterización de células estromales adultas aisladas derivadas del páncreas**

Los métodos para evaluar la expresión de proteínas y marcadores de ácido nucleico en células cultivadas o aisladas son comunes en la técnica. Incluyen la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa inversa (RT-PCR), transferencias Northern, hibridación *in situ* (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, Eds. 2001 suplemento)), y los inmunoensayos, tales como, por ejemplo, el análisis inmunohistoquímico de material seccionado, transferencia Western, y para los marcadores que son accesibles en células intactas, análisis de citometría de flujo (FACS) (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Using Antibodies: a Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

45 Ejemplos de anticuerpos útiles para la detección de ciertos marcadores de proteínas se enumeran en la **Tabla II** y la **Tabla V**. Se debe observar que otros anticuerpos dirigidos a los mismos marcadores son reconocidos por los anticuerpos listados en la **Tabla II** y la **Tabla V**, están disponibles o se pueden desarrollar fácilmente. Tales otros anticuerpos también pueden emplearse para evaluar la expresión de marcadores en las células aisladas de acuerdo con la presente invención.

50 Características de las células del linaje de células β son bien conocidas para los expertos en la técnica, y características adicionales del linaje células β continúan identificándose. Estas características se pueden utilizar para confirmar que las células estromales adultas derivadas del páncreas aisladas de acuerdo con la presente invención se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje de células β. características específicas de linaje de células β incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción tales como, por ejemplo, insulina, PDX-1 (de páncreas y homeobox duodenal gen 1), NGN-3 (neurogenina 3), HLXB9, Nkx6, Isl 1, Pax6, NeuroD, HNF-1α, HNF6, HNF-3 Beta, y MafA, entre otros. Estos factores de transcripción están bien establecidos en la técnica para la identificación de células endocrinas. Véase, por ejemplo, Edlund (*Nature Reviews Genetics* 3: 524 632 (2002)).

60 Los presentes inventores han identificado y aislado una población de células estromales adultas del páncreas de mamífero que tienen la capacidad de proliferar durante hasta aproximadamente 20 duplicaciones de la población mientras se mantiene el potencial de diferenciarse en células con características de un linaje de células β. En una realización alterna, los presentes inventores han identificado y aislado una población de células estromales de adultos de los páncreas de mamíferos que tienen la capacidad de proliferar durante hasta aproximadamente 50 duplicaciones de la población mientras se mantiene el potencial de diferenciarse en células con características de un linaje de células β. En una realización alterna, los presentes inventores han identificado y aislado una población de células estromales de adultos de los páncreas de mamíferos que tienen la capacidad de proliferar durante hasta aproximadamente 70 duplicaciones de la población mientras se mantiene el potencial de diferenciarse en células con características de un linaje de células β.

En particular, las células estromales adultas derivadas del páncreas aisladas de acuerdo con la presente invención se caracterizan por, entre otros, carecer de los siguientes marcadores de proteínas: NCAM, ABCG2, citoqueratina 7, 8, 18, o 19. Las células también pueden carecer de CD117. Las células estromales adultas derivadas del páncreas aisladas de acuerdo con la presente invención se caracterizan como positivas para al menos uno de los siguientes marcadores de proteínas: CD44, CD73, CD90, o CD105, y, opcionalmente, CD49b, CD49e, CD81, CD95, CD151 o CD166.

Expansión de las células estromales adultas derivadas del páncreas

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para la expansión de las células estromales adultas derivadas del páncreas obtenidas de acuerdo con la presente invención. Como se ha descrito anteriormente en este documento, digesto pancreático, que puede contener una mezcla heterogénea de islotes, fragmentos ductales y tejido exocrino, se cultivan en un medio de selección de bajo suero durante aproximadamente dos a aproximadamente cuatro semanas, de preferencia sin ningún cambio de los medios, para enriquecer selectivamente las células estromales adultas deseadas derivadas del páncreas. La población de células resultante, ahora enriquecida con células estromales adultas derivadas del páncreas, a continuación, se conmuta a un medio de crecimiento para expandir las células estromales adultas derivadas del páncreas en la población celular.

El medio de crecimiento adecuado para uso en la presente invención puede estar compuesto de medios tales como, por ejemplo, DMEM que contenía penicilina/estreptomina (P/S) y suero a una concentración de 2% a 20%, preferiblemente de aproximadamente 5%. En una realización específica, el medio de crecimiento se compone de DMEM (2750 mg/l D-glucosa; 862 mg/l de glutamina), suero bovino fetal al 5%, y sulfato de zinc 0,0165 mM. En una realización específica, el medio de crecimiento se suplementa con suero que se deriva de las mismas especies de mamífero de las que se recogió el páncreas del donante. Altemativamente, el suero fetal o de ternero, u otros suplementos de suero o sustituciones, tales como, por ejemplo, albúmina de suero, se puede utilizar como complemento a los medios de cultivo.

Además, las células estromales adultas derivadas del páncreas se pueden expandir mediante el cultivo en un medio de crecimiento definido que contiene agente que estimula la proliferación de las células de la presente invención. Estos factores pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, miembros de la familia TGF- β , incluyendo TGF- β 1, 2, y 3, proteínas óseas morfogénicas (BMP2, 4, 6, 7, 11, 12, y 13), albúmina de suero, familia de factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento derivado de plaquetas -AA, y -BB, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-I, II) factor de diferenciación de crecimiento (GDF-5, 6, 8, 10, 11), tipo glucagón de péptido-I y II (GLP-I y II), mimético cuerpo GLP-1 y GLP-2, exendina-4, ácido retinoico, hormona de paratiroidea, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina, mercaptoctanol beta, factor de crecimiento epidérmico (EGF), gastrina I y II, quelantes de cobre, tales como pentamina trietilenglicol, TGF- α , forskolina, Na-Butirato, Activina-A, betacelulina, insulina/transferencia/selenio (ITS), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), extracto de pituitaria bovina, proteína de islote asociada por neogénesis (INGAP), inhibidores de proteasoma, inhibidores de la vía de muesca, inhibidores de sonic hedgehog, o combinaciones de los mismos. Altemativamente, las células estromales adultas derivadas del páncreas pueden expandirse mediante el cultivo en medios acondicionados. Por "medios acondicionados" se entiende que una población de células se cultiva en un medio básico de cultivo celular definido y contribuye factores solubles al medio. En uno de tales usos, las células se retiraron del medio, mientras que los factores solubles producidos por las células permanecen. Este medio se utiliza para alimentar una población diferente de células.

En ciertas realizaciones, las células estromales adultas derivadas del páncreas se cultivan en placas de cultivo de tejido estándar. Altemativamente, las placas de cultivo pueden estar recubiertas con proteínas de matriz extracelular, tales como, por ejemplo, MATRIGEL®, factor de crecimiento reducido MATRIGEL®, laminina, colágeno, gelatina, tenascina, fibronectina, vitronectina, trombospondina, extractos de placenta o combinaciones de los mismos.

Además, las células estromales adultas derivadas del páncreas se pueden expandir *in vitro* bajo condiciones hipóxicas o normóxicas.

Bajo las condiciones de crecimiento superiores para la expansión, las células estromales adultas derivadas del páncreas aisladas de acuerdo con la presente invención pueden ampliarse durante más de aproximadamente 20 duplicaciones de la población, altemativamente, más de aproximadamente 50 duplicaciones de la población, altemativamente, más de aproximadamente 70 duplicaciones de la población, manteniendo el potencial de diferenciarse en células con características de un linaje de células β .

Diferenciación de las células estromales adultas derivadas del páncreas

En un aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones capaces de diferenciar las células estromales adultas expandidas derivadas del páncreas de esta invención en las células que llevan marcadores característicos del linaje de células β .

Un medio de cultivo definido básico, cuando se suministran con uno o más componentes, que apoyan el crecimiento de células estromales adultas derivadas del páncreas y con cantidades inductoras de diferenciación de uno o más factores de crecimiento, se conoce como un "medio de inducción." El medio de inducción contiene menos que o igual a 2% de suero. En una realización, suero de ternera fetal puede ser utilizado. Altemativamente, suero bovino fetal puede ser

reemplazado por el suero de cualquier mamífero, o por albúmina humana, albúmina de bovino o de otros compuestos que permiten o mejoran la diferenciación de células estromales adultas derivadas del páncreas para el linaje de células I. *AlteARN*tivamente, el medio de inducción puede ser medio condicionado.

5 Factores apropiados para uso en el medio de inducción pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, miembros de la familia TGF, incluyendo TGF-B1, 2, y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP-2, -4, 6, -7, -11, -12, y -13), suero albúmina, familia de factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento derivado de plaquetas-AA, y -BB, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-I, II) factor de diferenciación de crecimiento (GDF-5, -6, -8, -10, 11), el glucagón como mimético cuerpo péptido-I y II (GLP-I y II), GLP-1 y GLP-2, exendina-4, ácido retinoico, hormona de paratiroidea, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina, beta mercaptoetanol, factor de crecimiento epidérmico (EGF), gastrina I y II, quelantes de cobre, tales como pentamina trietilenglicol, TGF- α , forskolina, Na-Butirato, Activina-A, betacelulina, ITS, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), extracto de pituitaria bovina, proteína de islote asociada a neogenesis (INGAP), inhibidores de proteasoma, inhibidores de la deacetilasa de histona, inhibidores de vía de Notch, inhibidores de sonic hedgehog, o combinaciones de los mismos.

En un aspecto de la presente invención, una combinación de factores de crecimiento y agentes químicos, incluyendo suplementos de bFGF, Activina-A, FGF-5, N2 y B27 (Gibco, CA), alcaloide esteroide tal como, por ejemplo, ciclopamina (EMD, CA) que inhibe señalización sonic hedgehog, y un inhibidor del proteasoma tal como, por ejemplo MG132 (EMD, CA), se suministra a un medio básico definido para apoyar la diferenciación de células estromales adultas derivadas del páncreas en un linaje de células β . En un aspecto, las células se cultivan en un medio de inducción compuesto por DMEM (baja glucosa, 5,5 mM) que contiene 10 micromolares MG132 durante uno aproximadamente a aproximadamente dos días, seguido de incubación adicional durante aproximadamente tres a aproximadamente siete días en un medio de inducción suplementado con IX B27 (Gibco, CA) y IX N2 (Gibco, CA) y se suplementó adicionalmente con ciclopamina (10 μ M; EMD, CA), bFGF (20 ng/ml; R&D Systems, MN), Activina A (20 nM; R&D Systems, MN) o FGF5 (20 ng/ml; R&D Systems, MN) para cinco días adicionales.

En otro aspecto de la presente invención, una combinación de factores de crecimiento y agentes químicos, incluyendo un inhibidor del proteasoma tal como, por ejemplo MG132 (EMD, CA), se suministra a un medio básico definido para apoyar la diferenciación de células estromales adultas derivadas del páncreas en un linaje de células β . En un aspecto, las células se cultivan en medios de inducción compuestos de DMEM (baja glucosa, 5,5 mM) que contiene un intervalo de concentraciones MG132 de uno a diez micromolares durante aproximadamente uno a aproximadamente dos días, seguido de incubación adicional durante aproximadamente uno a aproximadamente dos días con un inhibidor de la desacetilasa de histona tal como, por ejemplo, tricostatina A (Sigma, MO). Después de la eliminación de estos inhibidores, las células se cultivan en un medio de inducción suplementado con factores apropiados para uso en el medio de inducción que puede incluir, por ejemplo, nicotinamida, miembros de la familia TGF- β , incluyendo TGF- β 1, 2, y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP-2, 4, 6, 7, 11, 12, y 13), albúmina de suero, familia de factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento derivado de plaquetas -AA, y -BB, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-I, II) de crecimiento factor de diferenciación (GDF-5, 6, 8, 10, 11), el glucagón como péptido-I y II (GLP-I y II), mimético cuerpo GLP-1 y GLP-2, exendina-4, ácido retinoico, hormona de paratiroidea, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina, beta mercaptoetanol, factor de crecimiento epidérmico (FUE), gastrina I y II, los quelantes de cobre tales como pentamina trietilenglicol, TGF- α , forskolina, Na-Butirato, Activina-A, betacelulina, ITS, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KUF), extracto de pituitaria bovina, proteína de islote asociada a neogenesis (INGAP), inhibidores de proteasoma, inhibidores de deacetilasa de histona, inhibidores de la vía de muesca, inhibidores de sonic hedgehog, o combinaciones de los mismos por un período adicional de tiempo para conseguir el grado deseado de diferenciación a un linaje de células β .

La combinación y las concentraciones de factores de crecimiento, la longitud del cultivo, y otras condiciones de cultivo pueden optimizarse por los expertos en la técnica para conseguir la diferenciación eficaz mediante, por ejemplo, el seguimiento del porcentaje de células que se han diferenciado en células característicos del linaje de células β . El uno o más factores de crecimiento se pueden añadir en una cantidad suficiente para inducir la diferenciación de las células estromales pancreáticas de la presente invención en las células que llevan marcadores de un linaje de células β durante un período de tiempo de aproximadamente una a cuatro semanas.

55 *AlteARN*tivamente, las células estromales adultas derivadas del páncreas de la presente invención se pueden utilizar en un ensayo *in vitro* para la prueba de agentes que son capaces de inducir células para diferenciarse en un linaje de células β . Las células pueden ponerse en contacto con uno o más de un agente y cambios en la expresión génica monitorizados con el tiempo. Un ejemplo del método que se puede emplear se describe en el **Ejemplo 9** a continuación.

60 **Uso terapéutico de las células de la presente invención.**

Se encontró que las células estromales adultas derivadas del páncreas aisladas y expandidas de acuerdo con los métodos de esta invención mantienen la capacidad de diferenciarse en células de un linaje de células β de páncreas. Las células de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento de diabetes de tipo 1 y 2.

65 En un aspecto, las células de la presente invención se usan en el tratamiento de un mamífero que padece de, o está en riesgo de desarrollar diabetes de tipo 1. Esto implica el cultivo de células estromales adultas aisladas derivadas del páncreas, la expansión de la población aislada de células, y la diferenciación de las células cultivadas *in vitro* en un

linaje de células β . Las células diferenciadas se pueden utilizar terapéuticamente por implantación ya sea directamente o en un vehículo farmacéutico en el mamífero, aunque este paso no forma parte de la invención. Si es apropiado, agentes farmacéuticos o bioactivos que facilitan la supervivencia y la función de las células trasplantadas se pueden usar además para tratar el mamífero. Estos agentes pueden incluir, por ejemplo, la insulina, los miembros de la familia TGF- β , incluyendo TGF- β 1, 2, y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP-2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, y 13), el crecimiento de factores de fibroblastos 1 y 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas -AA, y -BB, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-I, II) factor de diferenciación de crecimiento (GDF-5, 6, 8, 10, 15), factor de crecimiento derivadas de células vasculares endoteliales (VEGF), pleiotrofina, endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, glucagón como péptido-I (GLP-I) y II, GLP-1 y 2 mimeticuerpo, exendina-4, ácido retinoico, hormona de paratiroidea, inhibidores de MAPK, tales como, por ejemplo, compuestos descritos en la solicitud publicada de EE.UU. 2004/0209901 y la solicitud publicada de EE.UU. 2004/0132729.

En aún otro aspecto, esta invención proporciona células para su uso en el tratamiento de un mamífero que padece de, o está en riesgo de desarrollar diabetes de tipo 2. Esto implica el cultivo de células estromales adultas aisladas derivadas del pancreas de acuerdo con la presente invención, la expansión de la población aislada de células, y la diferenciación de las células cultivadas *in vitro* en un linaje de células β . Las células diferenciadas se pueden utilizar terapéuticamente por implantación ya sea directamente o en un vehículo farmacéutico en el mamífero, aunque este paso no forma parte de la invención.

En otra realización más, las células estromales adultas derivadas del pancreas de la presente invención se pueden utilizar terapéuticamente por el trasplante de islotes maduros de la misma o diferentes especies de animales para mejorar la supervivencia de las células estromales o para inducir una mayor diferenciación de las células estromales en un linaje de células β .

La fuente del tejido pancreático de la que se aíslan las células estromales de la presente invención puede ser autóloga con respecto al mamífero que se somete al tratamiento terapéutico. AlteARNtivamente, la fuente puede ser alogénica o xenogénica. Las células para uso en el tratamiento de un mamífero también pueden modificarse genéticamente para aumentar la proliferación y/o diferenciación o prevenir o disminuir el riesgo de rechazo inmunológico. AlteARNtivamente, las células estromales adultas derivadas del pancreas obtenidas de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para modular la respuesta inmune del receptor, antes del trasplante de células diferenciadas preparadas de acuerdo con la presente invención. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.328.960, Patente de EE.UU. 6.281.012.

Las células estromales adultas derivadas del pancreas de la presente invención pueden ser completamente diferenciadas en una célula productora de insulina, antes de su uso en la terapia de trasplante en un receptor. En una realización específica, las células estromales adultas derivadas del pancreas de la presente invención están completamente diferenciadas en células β , antes de su uso en la terapia de trasplante en un receptor. AlteARNtivamente, las células estromales adultas derivadas del pancreas de la presente invención se pueden utilizar en la terapia de trasplante en un receptor en un estado no diferenciado o parcialmente diferenciado. La diferenciación adicional puede tener lugar en el receptor.

Las células, no diferenciadas o de otro tipo, pueden ser utilizadas como células dispersadas o formadas en grupos que se pueden infundir en la vena portal hepática. AlteARNtivamente, las células se pueden proporcionar en soportes poliméricos degradables biocompatibles, dispositivos no degradables porosos o encapsulados para protegerse de la respuesta inmune del huésped. Las células se pueden utilizar en la terapia por implantación en un sitio apropiado en un recipiente. Los sitios de implantación incluyen, por ejemplo, el hígado, el páncreas natural, espacio renal subcapsular, omento, peritoneo, espacio subseroso o un bolsillo subcutáneo.

Para mejorar aún más la diferenciación, la supervivencia o la actividad de las células implantadas, los factores adicionales, tales como factores de crecimiento, antioxidantes o agentes antiinflamatorios, se pueden utilizar en terapia mediante la administración antes de, simultáneamente con, o después de las células. En ciertas realizaciones, los factores de crecimiento se utilizan para diferenciar las células administradas *in vivo*. Estos factores pueden ser secretados por células endógenas y se expusieron a las células estromales administradas *in situ*. Células estromales implantadas pueden ser inducidas a diferenciarse mediante cualquier combinación de factores de crecimiento endógenos y administrados exógenamente conocidos en la técnica.

La cantidad de células usada en la terapia por implantación depende de una serie de factores incluyendo la condición del paciente y la respuesta a la terapia, y puede determinarse por un experto en la técnica.

En un aspecto, esta invención proporciona células para su uso en el tratamiento de un mamífero que padece de, o está en riesgo de desarrollar diabetes. Esto incluye el cultivo de células estromales pancreáticas derivadas adultas aisladas de acuerdo con la presente invención, la expansión de la población aislada de células, diferenciándose *in vitro* las células estromales cultivadas en un linaje de células β , y la incorporación de las células en un soporte tridimensional. Las células se pueden mantener *in vitro* sobre este soporte antes de su uso en la terapia por implantación en el mamífero. AlteARNtivamente, el soporte que contiene las células se puede utilizar en la terapia directamente sin cultivo adicional *in vitro*. El soporte opcionalmente se puede incorporar con al menos un agente farmacéutico que facilita la supervivencia, diferenciación y función de las células trasplantadas.

Los materiales de soporte adecuados para su uso para los fines de la presente invención incluyen plantillas de tejidos, conductos, barreras, y embalses útiles para la reparación de tejidos. En materiales particulares, sintéticos y naturales en

forma de espumas, esponjas, geles, hidrogeles, textiles y estructuras no tejidas, que se han usado *in vitro* e *in vivo* para reconstruir o regenerar tejido biológico, así como para suministrar agentes quimiotácticos para inducir el crecimiento del tejido, son adecuados para uso en la práctica de los métodos de la presente invención. Véase, por ejemplo, los materiales descritos en la Patente de EE.UU. 5.770.417, Patente de EE.UU. 6.022.743, Patente de EE.UU. 5.567.612, Patente de EE.UU. 5.759.830, Patente de EE.UU. 6.626.950, Patente de EE.UU. 6.534.084, Patente de EE.UU. 6.306.424, Patente de EE.UU. 6.365.149, Patente de EE.UU. 6.599.323, Patente de EE.UU. 6.656.488, y Patente de EE.UU. 6.333.029. Ejemplos de polímeros adecuados para su uso en la presente invención se describen en la solicitud publicada de EE.UU. 2004/0062753 A1 y Patente de EE.UU. 4.557.264.

Para formar un soporte incorporado con un agente farmacéutico, el agente farmacéutico se puede mezclar con la solución de polímero antes de formar el soporte. Alternativamente, un agente farmacéutico podría ser revestido sobre un soporte fabricado, preferiblemente en presencia de un vehículo farmacéutico. El agente farmacéutico puede estar presente como un líquido, un sólido finamente dividido, o cualquier otra forma física apropiada. Alternativamente, los excipientes se pueden añadir al soporte para alterar la velocidad de liberación del agente farmacéutico. En una realización alternativa, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto antiinflamatorio, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en la patente de EE.UU. 6.509.369.

En una realización, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto antiapoptótico, tales como, por ejemplo, los compuestos descritos en la Patente de EE.UU. 6.793.945.

En otra realización, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacéutico que es un inhibidor de fibrosis, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en la patente de EE.UU. 6.331.298.

En una realización adicional, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacéutico que es capaz de aumentar la angiogénesis, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en la solicitud publicada de EE.UU. 2004/0220393 y solicitud publicada de EE.UU. 2004/0209901.

En todavía otra realización, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto inmunosupresor, tal como, por ejemplo, compuestos descritos en la solicitud publicada de EE.UU. 2004/0171623.

En una realización adicional, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacéutico que es un factor de crecimiento, tal como, por ejemplo, miembros de la familia TGF- β , incluyendo TGF- β 1, 2, y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP-2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, y 13), factores de crecimiento de fibroblastos 1 y 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas -AA, y -BB, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-I, II) factor de diferenciación de crecimiento (GDF-5, 6, 8, 10, 15), factor de crecimiento endotelial vascular derivado de células (VEGF), pleiotrofina, endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, factor inducible por hipoxia 1-alfa, el glucagón como péptido-I y II (GLP 1, 2), mimetocuerpo GLP-1 y GLP-2, exendina-4, ácido retinoico, hormona de paratiroidea, tenascina-C, tropoelastina, péptidos derivados de trombina, catelicidinas, defensinas, laminina, péptidos biológicos que contienen células y dominios de unión a heparina de proteínas adhesivas de la matriz extracelular tales como fibronectina y vitronectina, inhibidores de MAPK, tales como, por ejemplo, los compuestos descritos en la solicitud publicada de EE.UU. 2004/0209901 y solicitud publicada de EE.UU. 2004/0132729.

La incorporación de las células de la presente invención en un andamio se puede lograr mediante el simple depósito de células sobre el andamio. Las células pueden entrar en el andamio por simple difusión (*J. Pediatr. Surg.* 23 (1 Pt 2): 3-9 (1988)). Varios otros enfoques se han desarrollado para mejorar la eficiencia de la siembra de células. Por ejemplo, matraces de agitación se han utilizado en la siembra de condrocitos en los andamios de ácido poliglicólico (*Biotechnol Prog* 14 (2): 193-202 (1998)). Otro enfoque para la siembra de células es el uso de centrifugación, que produce la tensión mínima para las células sembradas y mejora la eficiencia de la siembra. Por ejemplo, Yang *et al.* desarrollaron un método de siembra celular (*J. Biomed Mater Res* 55 (3): 37-986 (2001)), referido como Inmovilización de Células Centrifugacional (CCI).

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero se limita por los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

El establecimiento de líneas celulares estromales humanas adultas derivadas del páncreas

Preparación del páncreas - Páncreas humanos no aptos para el trasplante clínico se obtuvieron del National Disease Research Interchange (Filadelfia, PA), tras el consentimiento apropiado para su uso en investigación. El páncreas se transfirió con una solución de preservación de órganos a un plato de acero inoxidable en hielo y se recortó de todo el tejido extraño. El conducto pancreático se canuló con un catéter de calibre 18 y el páncreas fue inyectado con una solución de enzima, que contenía la enzima LIBERASE HI™ (Roche - 0,5 mg/ml) y ADNasa 1 (0,2 mg/ml), se disolvió en fosfato de solución salina tamponada de Dulbecco (DPBS).

Disociación rápida mecánica seguido por digestión enzimática - Los páncreas infundidos con enzima se homogeneizaron en un procesador de tejidos, pulsados 3 a 5 veces para 3 a 5 segundos/impulso, y el tejido disociado se transfirieron a dos matraces de tripsinización de 500 ml (Bellco) que contienen barras de agitación magnéticas. Después de ello, se añadieron 50 a 100 ml de la solución de enzima a cada matraz. Los matraces se colocaron en un

baño de agua 37°C en placas de agitación sumergibles y se dejaron incubar con una velocidad de agitación intermedia durante 10 minutos. Se detuvo la agitación y se retiró el tejido digerido del matraz y se transfirió a un tubo de 250 ml que contiene DPBS, 5% de suero bovino fetal (FBS) y 0,1 mg/ml de ADNasa I (DPBS +) a 4°C para saciar el proceso de digestión. Los matraces se rellenaron con 50 a 100 ml de la solución de enzima y se devolvieron al baño de agua y se reinició la agitación durante otros diez minutos. Una vez más, los matraces se retiraron y el digesto se recogió y se transfirió a los tubos de 250 ml en hielo. Este proceso se repitió durante 35 veces adicionales hasta que el páncreas se digirió completamente.

Disociación mecánica gradual con digestión enzimática simultánea - Los páncreas infundidos con enzima se procesaron de acuerdo con métodos como se describe en *Diabetes* 37: 413-420 (1988). Brevemente, los páncreas se limpiaron de tejido extraño y se inyecta con la solución de enzima como se describió anteriormente. Los páncreas se colocaron a continuación en una cámara de Ricordi con los granos y se cubren con una pantalla con un tamaño de malla de 400 a 600 μm para retener grandes racimos de tejido. La cámara se cubrió y la solución de enzima se distribuyó a través de la cámara a aproximadamente 37°C y la cámara se agitó para permitir que los granos interrumpieran el tejido pancreático mientras que la enzima digiere el páncreas. Una vez que se alcanzó la disociación y la digestión adecuada, la digestión se terminó y se recogió el tejido.

Separación de tejidos - El tejido recogido se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se aspiró y el tejido se lavó dos veces adicionales en DPBS+. Tras el lavado final, se aplicó el tejido a un gradiente discontinuo para la purificación. El tejido digerido se suspendió en polisucrosa (Mediatech, VA) con una densidad de 1,108 g/ml en una proporción de 1 a 2 ml de sedimento de tejido por 10 ml de solución polisucrosa. A continuación, la suspensión de tejido se transfirió a tubos de centrifuga de policarbonato de fondo redondo y soluciones de polisucrosa con densidades de 1,096 y 1,037 fueron aplicadas cuidadosamente a los tubos. Una capa final de DMEM completó el gradiente de la purificación discontinua. Los tubos de gradiente se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos a 4°C sin freno aplicado. Después de la centrifugación, el tejido se recogió de cada interfaz (tres interfaces) y se lavó varias veces en DPBS+ como se ha descrito anteriormente y se recogió en un tubo de ensayo de 50 ml.

Disociación de racimo de grupo de célula - Opcionalmente, se puede disociar adicionalmente grandes grupos de células obtenidas utilizando el protocolo anterior en grupos más pequeños o suspensiones de células individuales. Después del lavado final, el tejido de cada fracción se suspendió en 10 ml de solución 1X tripsina/EDTA que contiene 200 U/ml de ADNasa I. Se colocaron los tubos en el baño de agua y repetidamente se aspiraron y se descargaron de una pipeta serológica de 10 ml de 5 a 6 minutos hasta lograr una suspensión próxima de células individuales. La digestión se inactivó con la adición de 4°C DPBS+ y los tubos se centrifugaron a 800 rpm durante 5 minutos. Las suspensiones de células se lavaron con DPBS+ y se cultivaron como se describe a continuación.

Cultivo de células de páncreas - Tras el lavado final, las células de cada interfaz se resuspendieron en DMEM, FBS al 2%, 100 U/ μg penicilina/estreptomicina, ITS, 2 mM de L-glutamina, 0,0165 mM ZnSO_4 (Sigma), y 0,38 μM 2-mercaptoetanol (Invitrogen, CA) (en adelante "el medio de selección"). Se sembró seis ml de la suspensión celular en matraces de cultivo tisular de T25 y 12 ml de la suspensión celular se sembró en matraces T75. Los matraces se colocaron en incubadores de 37°C con 5% de CO_2 . Después de dos a aproximadamente cuatro semanas de cultivo, un cambio de medio completo se llevó a cabo y se devolvieron las células adherentes al cultivo en DMEM (2.750 mg/l D-glucosa, 862 mg/l glutamine) (Gibco, CA) con 5% FBS (HyClonc, UT), 1% P/S, ZnSO_4 0,0165 mM (en adelante "el medio de crecimiento") y se dejó llegar cerca de la confluencia (esta etapa se conoce como "paso 0" o "P0"), momento en el que se sometieron a pases. El cultivo posterior de las células fue en 5000 células/ cm^2 en el medio de crecimiento. Los cultivos se pasaron cada siete a diez días a aproximadamente 70 a 90% de confluencia. La Figura 2 representa la morfología típica de las células estromales adultas derivadas del páncreas de la presente invención.

Ejemplo 2

Tiempo de duplicación de población

Células estromales adultas de pasos 10 y 12 derivadas del páncreas aisladas y expandidas de acuerdo con el Ejemplo 1 anterior se sembraron a 10.000 células/pocillo de una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos (Coming, MA) en el medio de crecimiento. En varios puntos de tiempo, las células se retiraron de tres pocillos de la placa usando TRYPLE™ Express (Invitrogen, CA) y se contaron usando un sistema de análisis de células de Guava PCA-96 y el reactivo VIACOUNT® (Guava, CA). La **Figura 3** representa la curva de crecimiento de células de paso 10 cultivadas en condiciones de normoxia. La fase lineal de la gráfica log se utilizó para estimar el tiempo de duplicación de la población de las células. El tiempo de duplicación de población de células de paso 10 y 12 era de 36 h y 38 h, respectivamente.

Ejemplo 3

Potencial de expansión de células estromales adultas derivadas del páncreas

Células estromales adultas derivadas del páncreas aisladas según el Ejemplo 1 se cultivaron en un matraz de cultivo tratado con tejido de 75 cm^2 (Coming, MA) en condiciones de normoxia (5% de CO_2 , 20% O_2 , y 75% de N_2) durante 3 semanas en el medio de selección. Los cultivos fueron luego cambiados a medio de crecimiento y se alimentaron dos a tres veces por semana. Las células se dejaron alcanzar cerca de la confluencia, momento en el que se sometieron a pasajes. Los cultivos se pasaron cada 7-14 días en aproximadamente 70 a 95% de confluencia para los primeros 9 pasajes tiempo durante el cual el tiempo de duplicación de población de células era mayor que 100 horas. Después del

décimo pasaje, la velocidad de crecimiento celular se incrementó y el tiempo de duplicación de la población se redujo a aproximadamente 40 horas con las células pasadas cada 4 a 6 días. Las células se recogieron de los matraces en cada pasaje usando TRYPLE™ Express (Invitrogen, CA) y se contaron usando un sistema de análisis de células de Guava PCA-96 y el reactivo VIACOUNT® (Guava, CA). Las células continúan proliferando en cultivo de los medios de expansión para 132 días, alcanzando actualmente 40 duplicaciones de la población y un aumento proyectado de 10^{12} veces en el número de células. (Véase **Figura 6**).

Ejemplo 4

Potencial de expansión de un número de líneas celulares estromales adultas derivadas del páncreas

Células estromales adultas derivadas del páncreas aisladas según el **Ejemplo 1** se cultivaron o en condiciones hipóxicas (5% de CO₂, 3% de O₂, y 92% de N₂) o en condiciones de normoxia (5% de CO₂, 20% de O₂, y 75% de N₂) durante dos a cuatro semanas en el medio de selección. Los cultivos se cambiaron entonces a los medios de crecimiento y se alimentaron dos a tres veces por semana. Después del período de cultivo inicial, se observaron las células adherentes en placas cultivadas en condiciones hipóxicas y de normoxia. Además, después de los primeros dos a cuatro semanas de cultivo, había muy pocas estructuras de tipo islote restantes o ductales en las placas.

Se examinó el potencial de expansión *in vitro* de líneas de células estromales adultas derivadas del páncreas aisladas de una serie de páncreas de donantes, utilizando una variedad de medios de comunicación. Las células de las fracciones 3, 4 y 5 se cultivaron en condiciones de normoxia tratadas de cultivo de matraces de tejido, en medios que comprenden DMEM, FBS al 5%, 25mM HEPES, 0,0165 mM ZnSO₄. Poblaciones paralelas de células fueron cultivadas en CMRL1066, 10% de FBS, 25 mM HEPES, o DMEM, FBS al 10%, 25 mM HEPES, todos los cultivos se suplementaron con antibióticos. Se permitió que los cultivos alcanzaran confluencia antes del paso. Tabla VI describe el tiempo de duplicación de la población (PDT), el número total de duplicaciones de la población (PD) y el número de células proyectado, de los cultivos de líneas celulares en las condiciones ensayadas.

Ejemplo 5

Selección de células positivas CD105

En aproximadamente el 70% de confluencia, las células P0 adultas derivadas del páncreas aisladas según el **Ejemplo 1** fueron liberadas utilizando la solución TRYPLE™ Express (Invitrogen, CA), seguido de lavado con el medio de crecimiento (DMEM, FBS al 5%, 0,0165 mM ZnSO₄ y 1% P/S). La suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 1400 rpm, y se descartó el sobrenadante. El sedimento celular resultante se resuspendió en solución salina tamponada con fosfato (PBS), suplementado con albúmina de suero bovino 0,5% (BSA) y 2 mM EDTA. Las células fueron seleccionadas para una población de CD105 positivos siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, CA). El aislamiento de fracción positiva de CD105 se confirmó mediante el uso de citometría de flujo y a través del anticuerpo etiquetado con CD105PE de ratón antihumano (Santa Cruz, CA). La fracción positiva se cultivó en medio de crecimiento. La fracción positiva de CD105 consistió principalmente de la proliferación de células estromales adultas derivadas del páncreas.

Ejemplo 6

Análisis de clasificación de células activada con fluorescencia (FACS)

Células adheridas se eliminaron de placas de paso de 912 por incubación cinco minutos con la solución expresa TRYPLE™ (Gibco, CA). Células liberadas se resuspendieron en DMEM suplementado con FBS al 10% y se recuperó por centrifugación, seguido de lavado y resuspensión de las células en un tampón de tinción que consiste en 2% de BSA, 0,05% de azida de sodio (Sigma, MO) en PBS. Si es apropiado, las células se bloquearon por receptor Fc utilizando una solución de 0,1% γ -globulina (Sigma) durante 15 minutos. Las alícuotas (aproximadamente 10^5 células) se incubaron con anticuerpos monoclonales conjugados por ficoeritirina (PE) o alofococianina (APC) (anticuerpo 5 μ l por 10^6 células), como se indica en la **Tabla II-A**, o con un anticuerpo primario no conjugado. Los controles incluyeron anticuerpos apropiados de isotipo emparejado, células no teñidas, y sólo las células teñidas con anticuerpo secundario conjugado. Todas las incubaciones con anticuerpos se llevaron a cabo durante 30 minutos a 4°C, después de lo cual las células se lavaron con el tampón de tinción. Las muestras que se tiñeron con anticuerpos primarios no conjugados se incubaron durante 30 minutos adicionales a 4°C con anticuerpos marcados con PE o APC secundarios conjugados. Véase la Tabla 11B para obtener una lista de los anticuerpos secundarios utilizados. Las células lavadas se sedimentaron y se resuspendieron en el tampón de tinción y las moléculas de la superficie celular se identificaron mediante el uso de una matriz de FACS (BD Biosciences) mediante la recopilación de al menos 10.000 eventos.

Para la tinción intracelular, las células se fijaron primero durante 10 minutos con 4% paraformaldehído, seguido de dos enjuagues en el tampón de tinción, la centrifugación de las células y resuspensión de las células en tampón de permeabilización que contienen 0,5% de Triton X (Sigma) en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente (RT). Las células permeabilizadas se lavaron dos veces con un tampón de aclarado, se centrifugaron, y se resuspendieron en el tampón de tinción y se incubaron con un anticuerpo conjugado apropiado (5 μ l de anticuerpo por 10^6 células), como se indica en la **Tabla II-C** durante 30 min a 4°C. Las muestras que se tiñeron con anticuerpos primarios no conjugados se incubaron durante 30 minutos adicionales a 4°C con PE conjugado secundario o anticuerpos APC marcados (**Tabla II**

B). Las células lavadas se sedimentaron y se resuspendieron en el tampón de tinción y las proteínas inteARNs se identificaron mediante el uso de una matriz de FACS (BD Biosciences) mediante la recopilación de al menos 10.000 eventos. El nivel de expresión de la superficie examinada y marcadores internos se enumeran en la **Tabla III** y la **Tabla IV**. La **Figura 4** representa un perfil de muestra de FACS de células de paso 9.

5

Ejemplo 7

Inmuntinción de células estromales adultas derivadas del páncreas

10.000 células/cm² de células estromales adultas de pasaje 10 derivadas del páncreas, cultivadas de acuerdo con el **Ejemplo 1**, fueron sembradas en platos de cristal de fondo 35 mM de micropocillos (Matek Corp, MA) en medio de crecimiento. Después de tres días en cultivo, las células se fijaron durante 10 minutos con 4% de paraformaldehído, seguido de dos enjuagues en la PBS, y adición de un tampón de permeabilización que contiene 0,5% de Triton X (Sigma) durante 5 minutos a temperatura ambiente (RT), seguido de tres enjuagues adicionales con PBS. Las células fijadas y permeabilizadas fueron bloqueadas con albúmina o bien 1% de suero bovino (BSA) o 4% suero de las especies en las que el anticuerpo secundario se planteó en (cabra, burro, o conejo). Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se enumeran en la **Tabla V A-B**. Las muestras de control incluyen reacciones con el anticuerpo primario omitido o donde el anticuerpo primario fue sustituido con inmunoglobulinas correspondientes a la misma concentración como los anticuerpos primarios. Muestras teñidas se enjuagaron con un reactivo de antidispersión PROLONG® (Invitrogen, CA) que contiene diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI) para contrarrestar el manchado del núcleo. Las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio invertido Nikon Confocal Eclipse C-1 (Nikon, Japón) y un objetivo de 60X. Durante la fase de expansión, una mayoría de las células teñidas positivas para actina de músculo liso, nestina, vimentina, tubulina beta III, y GATA4 (**Figura 5**), una minoría de células (menos de 5%) se tiñó positiva para GFAP, y ninguna de las células se tiñeron positivas para CK 7 o CK 19.

25

Ejemplo 8

Análisis por PCR de células estromales adultas derivadas del páncreas

30 Se extrajeron células de ARN de paso 9 cultivadas en el medio de crecimiento. ARN recogida de páncreas humano se utilizó como control positivo; y se utilizaron células mesenquimales derivadas de médula ósea (Cambrex, MD) como controles negativos para la expresión de genes clave implicados en el desarrollo pancreático.

35 *Extracción de ARN, purificación, y síntesis de ADNc.* Las muestras de ARN se purificaron a través de su unión a una membrana de gel de sílice (RNeasy Mini Kit, Qiagen, CA) en presencia de un tampón que contiene etanol, de alta sal; mientras que los contaminantes se lavaron de distancia. El ARN se purificó adicionalmente mientras se unía a la columna por tratamiento con ADNasa I (Qiagen, CA) durante 15 minutos. A continuación, ARN de alta calidad se eluyó en agua. El rendimiento y la pureza se evaluaron mediante lecturas de A260 y A280 en el espectrofotómetro. Copias de ADNc se hicieron a partir de ARN purificado utilizando un kit de archivo ADNc ABI (ABT, CA) de alta capacidad.

40

45 *Amplificación PCR en tiempo real y análisis cuantitativo.* A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos fueron adquiridos de Applied Biosystems. Reacciones en tiempo real de PCR se realizaron usando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7000. TAQMAN® UNIVERSAL PCR MASTER MIX® (ABI, CA) se utilizó con 20 ng de ARN transcrito inverso en un volumen de reacción total de 20 µl. Cada muestra de ADNc se realizó por duplicado para corregir los errores de pipeteo. Los cebadores y sondas TAQMAN® etiquetadas por FAM se utilizaron a concentraciones de 200 nM. El nivel de expresión de cada gen diana se normalizó usando ARN ribosomal 18S del Applied Biosystem predesarrollado o kit de control endógeno de fosfato humano gliceraldehído-3-deshidrogenasa (GAPDH). Los cebadores y sondas fueron diseñadas ya sea utilizando software ABI PRISM PRIMER EXPRESS™ o kit de análisis de gen ABI utilizado predesarrollado. Para cada gen, ya sea uno de los cebadores o la sonda fueron diseñados para ser cubrir el borde exon. Esto eliminó la posibilidad de la unión de los cebadores/sondas a cualquier ADN genómico presente. Los conjuntos de cebadores y sondas se enumeran del siguiente modo Nkx2.2 (Hs00159616), Pdx-1 (Hs00426216), Nkx6.1 (Hs00232355), NGN-3 (Hs00360700), Pax4 (Hs00173014), Pax6 (Hs00240871), insulina (Hs00355773), G1u2 (Hs00165775), glucagón (Hs00174967), Isl-1 (Hs00158126), somatostatina (Hs00174949), FoxA2 (Hs00232764), HlxB9 (Hs00232128), GATA-4 (Hs00171403), GFAP (Hs00157674), MAP2 (Hs00159041), Olig2 (Hs00377820) y Oct4 (CGACCATCTGCCGCTTTGAG (SEQ ID NO: 1) y CCCCTGTCCCCA TTCCTA (SEQ ID NO: 2)) Rex1 (CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT (SEQ ID NO: 3) y GCGTACGCAAATTAACCTCCAGA (SEQ ID NO: 4)). Después de un inicial 50°C durante 2 min, y 95°C durante 10 min, las muestras se sometieron a ciclos 40 veces en dos etapas una etapa de desnaturalización a 95°C durante 15 s, seguido de una etapa de hibridación/extensión a 60°C durante 1 min. El análisis de datos se realizó utilizando el software de sistema de detección de secuencias GENEAMP®7000. Para cada conjunto de cebador/sonda, un valor C se determinó como el ciclo en el cual la intensidad de la fluorescencia alcanzó un valor específico en el medio de la región exponencial de amplificación. Los niveles de expresión génica relativa se calcularon utilizando el método C_t comparativo. Brevemente, para cada muestra de ADNc, el valor de control endógeno C_t se restó del gen de interés C_t para dar el valor C_t delta (ACT). La cantidad normalizada de diana se calculó como 2^{-ΔC_t} asumiendo una eficiencia de amplificación de 100%. Los datos finales se expresaron en relación a una muestra del calibrador. El método comparativo C_t sólo es válido si eficiencias de amplificación de control de diana y endógeno son aproximadamente iguales. Por lo tanto, experimentos de validación preliminares se realizaron para cada conjunto de cebador/sonda mediante la amplificación de muestras de ADNc diluidas en serie y la determinación de los valores ΔC_t. Estos valores ΔC_t permanecen constantes en toda el rango de diluciones si las eficiencias de amplificación son iguales.

65

Los datos PCR obtenidos a partir de células estromales adultas derivadas del pancreas se cultivaron en DMEM + 2% de FBS, o DMEM + 10% de FBS, o CMRL + 10% de FBS mostraron que las células expresaron PDX-1, insulina y HNF-3 β inicialmente, después del aislamiento. Sin embargo, la expresión de estos genes disminuyó rápidamente, de manera que mediante el paso 9, la expresión de estos genes era indetectable por PCR en tiempo real (**Figuras 7-19**). La expresión de estos genes permaneció indetectable durante un máximo de paso 30. Estos datos sugieren que las células estromales adultas derivadas del pancreas aisladas como se describe anteriormente permanecieron células completamente diferenciadas mientras se cultivaron en condiciones de crecimiento.

10 Ejemplo 9

Protocolos de diferenciación

1x10⁴ células/cm² de paso 13 células estromales adultas derivadas del pancreas se sembraron en una placa de 24 pocillos (Corning, CA) y se cultivaron en condiciones estándar a 37°C en un incubador de CO₂ al 5% en el medio de crecimiento hasta 100% de confluencia, después de lo cual se cultivaron durante 24 horas en DMEM (1000mg/L D-glucosa) con 10 μ M de MG132 (EMD, CA) durante 24 horas. Las células se lavaron una vez con PBS y se cultivaron en DMEM (1000 mg/l D-glucosa) suplementado con 1X B27 (Gibco, CA) y 1X N2 (Gibco, CA) y se complementó adicionalmente con Ciclopamina (10 μ M; EMD, CA), bFGF (20 ng/ml; R&D Systems, MN), Activina A (20 nM; R&D Systems, MN) o FGF5 (20 ng/ml; R&D Systems, MN) durante 5 días adicionales. ARN se recogió a partir de células y se analizaron para la expresión de PDX-1 y la insulina por métodos descritos en el Ejemplo 7. Estas condiciones de cultivo indujeron la expresión de PDX-1, pero no de insulina.

En un experimento separado, células estromales adultas derivadas del pancreas de paso 12 y el paso 19 de la fracción 3 se sembraron a 10 células/pocillo en placas de cultivo tisular de 6 pocillos (BD Falcon, NJ) y se dejó alcanzar la confluencia después de lo cual 1 o 10 μ M del inhibidor de secretasa gamma de InSolution™ MG-132 (Calbiochem, CA) se añadió durante 1 día. ARN se recogió a partir de células y se analizaron para la expresión de HNF3 β , PDX-1, Nkx6.1 e insulina. El tratamiento con MG-132 InSolution™ solo no dio lugar a la expresión de genes clave de linaje de células β tales como HNF-3 β , PDX-1, Nkx6.1 o insulina. Después del tratamiento InSolution™ MG-132 durante 1 día, las células se trataron con 1,25 o 2,5 μ M del inhibidor de deacetilasa de histona tricostatina A (Sigma, MO) durante un día. ARN se recogió a partir de células y se analizaron para la expresión de HNF-3 β , PDX-1, Nkx6.1 y la insulina. La combinación de los dos agentes resultó en la expresión de HNF-3 β , PDX-1, Nkx6.1, y la insulina (**Tabla VII y la Figura 20**).

En un experimento separado, células estromales adultas derivadas del pancreas de paso 18 de la fracción 3 se sembraron a 1 células/pocillo en de 6 pocillos placas de cultivo tisular (BD Falcon, NJ) y se dejó alcanzar la confluencia después de lo cual 10 μ M del inhibidor de gamma secretasa [(2R, 4R, 5 S) 2Benzyl5 (Bocamino) 4hydroxy6phenylhexanoyl] LenPheNH₂ (Sigma, MO, en lo sucesivo, B5306) se añadió durante 1, 3, 7, 10, y 14 días. ARN se recogió a partir de células y se analizaron para la expresión de HNF3 β , PDX-1, Nkx6.1 e insulina. El tratamiento con B5306 solo no dio lugar a la expresión de genes de linaje de células β tales como HNF-3 β , PDX-1, Nkx6.1 o insulina. Después del tratamiento B5306 durante 1,7, o 14 días las células se trataron con 1,25 o 2,5 μ M del inhibidor de desacetilasa de histona tricostatina A (Sigma, MO) durante un día. ARN se recogió a partir de células y se analizaron para la expresión de HNF3 β , PDX-1, Nkx6.1 e insulina. La combinación de los dos agentes resultó en la expresión de HNF3 β , PDX-1, Nkx6.1, pero no a la insulina (**Tabla VIII**).

En un experimento separado, células estromales adultas derivadas del pancreas de paso 5 se sembraron en placas de cultivo tisular de 6 pocillos en 1 células/pocillo y se incubaron con los medios de inducción enumerados en la **Tabla IX** para dos semanas con un cambio de medio completo dos veces a la semana. Después de dos semanas de incubación, el ARN se recogió a partir de pozos representativos y se analizó para la expresión de genes pancreáticos. Se encontró que las células eran positivas para glucagón, Nkx6.1, Pax6, y la somatostatina, pero no a la insulina, PDX-1, o HNF-3 β (véase la columna de diferenciación **Tabla X**). En un experimento paralelo, se examinaron los efectos de la agregación de células en la expresión génica de páncreas. Después de la incubación de dos semanas con los diferentes medios de inducción, los medios de inducción se eliminaron y las células estromales adultas derivadas del pancreas se trataron con 0,05% de tripsina/EDTA (Invitrogen, CA) durante dos minutos después de lo cual se eliminó. El medio libre de suero que consiste en CMRL 1066 (Invitrogen, CA), 1% de BSA (Sigma, MO), y ITS (Invitrogen, CA) se añadió luego a cada uno de los pocillos restantes. Al día siguiente las células se habían formado de agregados de tipo islote y el ARN se recogió y se analizó para la expresión de genes pancreáticos. Se encontró que las células eran positivas para insulina y HNF3 β por métodos descritos en el **Ejemplo 7 (véase Tabla X - columna de agregación)**.

En un experimento separado, células estromales adultas derivadas del pancreas de paso 13 se sembraron en placas de cultivo tisular de 6 pocillos en 10⁵ células/pocillo y se incubaron con los medios de inducción enumerados en la **Tabla IX** para dos semanas con un cambio de medio completo dos veces a la semana. Después de dos semanas de incubación, el ARN se recogió a partir de pozos representativos y se analizó para la expresión de genes pancreáticos. Se encontró que las células eran positivas para glucagón, Nkx6.1, Pax6, y la somatostatina, pero no a la insulina, PDX-1, o HNF3 β (**véase Tabla X - columna de diferenciación**). En un experimento paralelo, se examinaron los efectos de la agregación de células en la expresión génica de páncreas. Después de la incubación de dos semanas con los diferentes medios de inducción, los medios de inducción se retiraron y las células se trataron con 0,05% de tripsina/EDTA (Invitrogen, CA) durante dos minutos después de lo cual se eliminó. El medio libre de suero que consiste en CMRL 1066 (Invitrogen,

CA), 1% de BSA (Sigma, MO), y ITS (Invitrogen, CA) se añadió luego a cada uno de los pocillos restantes. Al día siguiente las células se habían formado de agregados de tipo islote y el ARN se recogió y se analizó para la expresión de genes pancreáticos. Se encontró que las células eran positivas para insulina y HNF-3B por métodos descritos en el Ejemplo 7 (véase **Tabla X** - columna de agregación).

Tomados en conjunto, estos datos sugieren que las células estromales adultas derivadas del páncreas de la presente invención son capaces de diferenciarse hacia células del linaje de células β .

Ejemplo 10

Criopreservación de células estromales adultas derivadas del páncreas

Células estromales adultas derivadas del páncreas aisladas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1 se recogieron en el número de fragmento deseado y se resuspenden en 1 a 2 ml de 90% de FBS (Hyclone, UT) y 10% de DMSO (Sigma, MO) a una concentración de 1 a 5×10^6 células/ml. La suspensión celular se dividió en alícuotas en viales criogénicos (Corning, NY) y se transfiere a un recipiente de congelación Nalgene Cryo de 1°C y se coloca en un congelador -80°C durante un mínimo de 4 horas. Los viales se retiraron de 80°C y se transfirieron a la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido hasta que se necesite. Las células se descongelaron mediante la eliminación de los viales criogénicos de la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido y la transferencia inmediatamente a un baño de agua de 37° y durante 1 a 2 minutos o hasta que sólo un pequeño cristal de hielo se mantuvo. Las células se lavaron con medio de cultivo y se colocaron en cultivo de 37°C como se describe en los ejemplos anteriores. Las células luego se pasaron como sea necesario. Los datos mostrados en la **Figura 21** demostraron que la criopreservación tuvo poco efecto sobre el potencial de expansión y tasa de crecimiento.

Ejemplo 11

Efectos de la privación de nutrientes en crecimiento de células estromales adultas derivadas del páncreas

Células estromales adultas derivadas del páncreas aisladas de acuerdo con los métodos descritos en el **Ejemplo 1** fueron sometidas a diferentes condiciones de cultivo y evaluadas por los efectos de estas condiciones en posteriores dinámicas de crecimiento celular. Las células aisladas de la fracción pobre en islotes/rica en acinares, H8F5 se cultivó en DMEM, 5,5 mM glucosa (Invitrogen, CA), 10% de FBS (HyClone, UT), 2 mM de Glutamax, 25 mM HEPES y 1X AB/AM (Invitrogen, CA). En un cultivo, las células se alimentaron con medio fresco cada 2 a 3 días y por día 8 células habían alcanzado la confluencia. Las células se pasaron una vez a la semana a partir de entonces al alcanzar confluencia en el matraz de cultivo. En el segundo cultivo, se dejó que las células crecieran durante 7 días antes de la sustitución de los medios que resultaron en un menor grado de unión y la expansión en comparación con las células volvieron a alimentarse con más frecuencia. Este cultivo no alcanzó confluencia hasta los 12 días después de sembrar el matraz en cuyo momento en el que se sometieron las células a paseje. A partir de entonces, se alimentaron las células cada 2 a 3 días y se pasaron al llegar a la confluencia. Las células se contaron en cada paso y el número proyectado de células se calculó a partir del número de células sembradas inicialmente en el matraz y las recuperadas.

Inicialmente las células proliferadas al mismo ritmo como se ve en la **Figura 22**. Sin embargo, tras los primeros pocos pasajes, las células que habían sido privadas de reemplazo de los medios de comunicación en su cultivo temprano demostraron un aumento en la tasa de crecimiento en comparación con las células que se sometieron a un cambio completo de medio cada 2 a 3 días después de establecerse el cultivo. Como se muestra en la **Figura 22**, el tiempo de duplicación de la población se calculó como 84,2 h de este primer cultivo y 58,5 h para las células privadas de medios durante los primeros 7 días después de su establecimiento en cultivo. Estos resultados sugieren que la privación de nutrientes es un medio para establecer selectivamente células estromales adultas derivadas del páncreas con una mayor capacidad para expandirse en comparación a técnicas de cultivo celular convencionales.

Ejemplo 12

Análisis citogéneo de una población representativa de células estromales adultas derivadas del páncreas de la presente invención.

Células estromales adultas derivadas del páncreas de paso 13 se sometieron a análisis citogenético realizado en cumplimiento con las Food and Drug Administration Good Laboratory Practice Regulations establecidas en la Parte 58 del Título 21, CFR. Las células se cultivaron en monocapas en matraces de cultivo tisular T-75 con DMEM, 5,5 mM glucosa (Invitrogen, CA), 10% de FBS (Hyclone, UT), 2 mM de Glutamax, 25 mM HEPES y 1X AB/AM (Invitrogen, CA). Cuando los cultivos tenían una cantidad adecuada de células mitóticas, se realizaron cosechas cromosómicas. Las células fueron tratadas con Colcemida (0,02-0,03 $\mu\text{g/ml}$) durante 2 a 18 horas a 37°C. A partir de entonces, las células se tripsinizaron, se centrifugaron durante 6 a 7 minutos a 200 x g, y se eliminó el sobrenadante.

Las células se resuspendieron en solución hipotónica caliente a 37°C durante 10 a 16 minutos y luego se centrifugaron como se describe anteriormente. Después las células se fijaron con fijador de Carnoy (3: 1 de metanol: ácido acético glacial) a temperatura ambiente durante 36 a 50 minutos y se lavaron con fijador de Carnoy s dos veces, y luego se volvieron a suspender en fijador recién preparado para producir una suspensión de células opalescentes. Las gotas de la suspensión celular final se colocaron en portaobjetos limpios y se secaron al aire.

Número de cromosomas por 100 metafases. La distribución de los números cromosómicos que se encuentran en las 100 metafases analizadas se muestra en la **Tabla XII**. El número de cromosomas varió de 45 a 46 cromosomas por la metafase con un número de cromosomas modal de 46. Seis metafases de poliploidía (0,6%) fueron grabadas por 1.000 células analizadas.

Aberración cromosómica. Los datos de aberración de cromosomas para las 100 metafases analizadas se resumen en la **Tabla XIII**. Los datos citogéneticos incluyen el número total de células analizadas con respecto a aberraciones, el número total de células aberrantes, y el número total de las aberraciones. Ninguna aberración cromosómica se encontró en las 100 células analizadas.

Análisis/cariotipo cromosómico de banda G. Se prepararon cinco cariotipos (Cariotipo humano N° 1 a N° 5). Análisis citogénetico muestra que la línea celular es de origen humano (véanse las **Figuras 23 a 27**). Autosomas normales estaban presentes en todos los cariotipos al igual que los cromosomas X e Y. Todos los cromosomas no identificables y reordenamientos se clasificaron como cromosomas no identificables (UC). Dos de los cinco cariotipos analizados contenían una UC por cariotipo.

Ejemplo 13

Análisis de micromatriz de células estromales adultas derivadas del páncreas de las fracciones 3, 4, y 5 de un páncreas humano.

Línea de páncreas H5 humana se procesa de acuerdo con los métodos esbozados en el **Ejemplo 1**. Las células en el paso 68 aisladas a partir de la fracción rica en islotes (fracción 3), fracción rica en ductales (fracción 4), y fracción rica en exocrinos (fracción 5) se utilizaron para perfiles de expresión génica. ARN total fue aislado de la línea H5 humana (fracciones 3, 4, y 5) y el ARN de páncreas humano (Ambion) usando un kit RNeasy mini (Qiagen). La preparación de la muestra, la hibridación y el análisis de imágenes se realizó de acuerdo con el Sistema de CodeLink™ (GE Healthcare, Amersham Biosciences, NJ). Se usaron matrices CodeLink™ Human Whole Genome. Se compone de aproximadamente sondas 55 000 30-meras diseñadas para exones conservados a través de las transcripciones de genes dirigidos. El chip contiene ~45000 ID Unigene únicos. Tras la normalización y una transformación logarítmica, el análisis de datos se realizó usando software OmniViz® (MA) y GENESIFTER (VizX Labs, WA). La transformación de estabilización de varianza junto con la normalización de la muestra transversal se aplicó en el conjunto de datos de ensayo de registro de transformado. La variabilidad dentro de cada línea celular y entre las diferentes líneas celulares se comparó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Para cada línea celular, se utilizaron tres réplicas biológicas y dos técnicas. Para todas las muestras analizadas, el coeficiente de correlación dentro de una línea celular era mayor en comparación con aquellas entre las líneas. La variación en los perfiles de expresión génica entre los diferentes tipos de células se representan en la **Figura 28**. Las diferencias significativas en la expresión génica entre los tipos de células se evaluaron usando análisis de varianza y una prueba F con valor de p ajustado de $\leq 0,05$. Las **Tablas XIV-XVI** enumeran los genes que son expresados diferencialmente al menos 5 veces por encima entre las diversas líneas celulares.

Ejemplo 14

Análisis de micromatriz de células estromales adultas derivadas del páncreas de dos páncreas representativos de donantes.

Dos páncreas humanos de donantes fueron procesados conforme a los métodos descritos en el **Ejemplo 1**. Las células estromales adultas derivadas del páncreas en el paso 9-11 aisladas a partir de la fracción rica en islotes (fracción 3) fueron utilizadas para perfiles de expresión génica. ARN total fue aislado de las células utilizando un kit RNeasy mini (Qiagen). Se purificó ARN, ARNc fue etiquetado y fragmentado como por los fabricantes de protocolos (Affymetrix, CA). ARNc marcado se hibridó con los chips de genes humanos Affymetrix U133 2.0 plus, que se escaneó usando un Analizador de GeneChip Affymetrix. Para cada línea celular, se utilizaron tres réplicas biológicas y dos técnicas. Los datos se analizaron usando el software OmniViz® (MA) y GENESIFTER (VizX Labs, WA). El coeficiente de correlación promedio entre las réplicas H8 era 0,893 (0,892-0,895, n = 3) y era 0,906 (0,903-0,909, n = 3) para réplicas H9. El diagrama de dispersión de comparación de perfil de expresión génica de células H8F3 vs. H9 F3 se representa en la **Figura 29**.

TABLA I. COMPARACIÓN DE LA CÉLULA DE LA PRESENTE INVENCION CON CÉLULAS MADRE PANCREÁTICAS DE LA TÉCNICA.

	Célula 1	Célula 2	Célula 3	Célula 4	Célula 5	Célula 6	Célula 7	Célula 8	Célula 9	Célula indiferenciada Presente invención
Amilasa										POS
α 1-antitripsina								P05		
α 3 integrina										POS
α integrina				POS						
ABCG2				POS						NEG
β 6 integrina				POS						
β 111 tribulina										POS
c-Met										NEG
C/EBP α								P05		
C/EBP β								P05		
CD1d										NEG
CD9										POS
CD13										POS
CD34				NEG						
CD44										POS
CD4				NEG						NEG
CD49b										POS
CD49e										POS
CD49f										NEG
CD73										POS
CD81										POS
CD90		P05						POS		POS
CD91										NEG
CD9S										POS
CD105		P05								POS
CD117				POS						NEG
CD124										NEG
CD133				NEG						NEG
CD138										NEG
CD1S1										POS
CD166										POS
CD184										NEG
CD221										NEG
Citoqueratina 5										NEG

ES 2 627 419 T3

(continúa)

citoqueratina 6										NEG
citoqueratina 7		NEG						POS		NEG
citoqueratina 8								POS		NEG
citoqueratina 10										NEG
citoqueratina 13										NEG
citoqueratina 14										NEG
citoqueratina 15										NEG
citoqueratina dieciséis										NEG
citoqueratina 18								POS		NEG
citoqueratina 19		NEG		NEG				POS		NEG
F-Cadherina										NEG
EpCAM										NEG
ErbB2	NEG									
ErbB3	POS									
ErbB4	POS									
GATA4										POS
GLP-1 R				POS						NEG
Glut-2										NEG
glucoquinasa										NEG
HCS-1				POS						NEG
HNF-1								POS		NEG
HNF3 β										NEG
HNF4 α										NEG
HNF6										NEG
Insulina										NEG
Islote-1										POS
IPF-1						POS				
Kir 6.2				POS						
latrofilina				POS						
MDR-1				POS						
MHC I				NEG						
MHC II				NEG						
MMP2		NEG						NEG		
Msx-2	NEG									
NCAM									POS	NEG
nestina		NEG	NEG	POS						POS
NeuroD										NEG
NGN-3			NEG							
NKX2.2										NEG
Nkx6.1										NEG

ES 2 627 419 T3

(continúa)

Oct 3				POS					
Oct 4				POS					
Par-2									NEG
Pax4									NEG
Pax6									NEG
P4HA1		POS							
PDX-1			POS			POS			NEG
PECAM									NEG
pi-GST							POS		
Pref-1						POS			
PC 1/3									NEG
actina de músculo liso		POS							POS
Snai1		NEG							
Snai2		POS							
Somatostatina									NEG
Sox-2			POS						
SSTR234				POS					
Sur-1				POS					
trombina vimentina		POS							NEG POS

TABLA II A. ANTICUERPOS A RECEPTORES DE SUPERFICIE

Anticuerpo	Proveedor	Isotipo	Clon
integrina A3	Santa Cruz Biotechnology (CA)	Ratón IgG1	P1B5
fosfatasa de alcalino	R&D Systems (NM)	Ratón IgG1	B4-78
transportador de casete de unión a ATP (ABCG2)	BD Pharmingen (CA)	IgG2b de ratón, Kappa	5133
CD1d	BD Pharmingen (CA)	Ratón IgG1, kappa	M-T101
CD9	BD Pharmingen (CA)	Ratón IgG1, kappa	M-L13
CD13	Santa Cruz Biotechnology (CA)	Ratón IgG1	WM-47
CD49b	BD Pharmingen (CA)	IgG2a de ratón, kappa	12F1-H6
CD49e	BD Pharmingen (CA)	Ratón IgG1, kappa	11A1
CD81	BD Pharmingen (CA)	Ratón IgG1, kappa	JS-81
CD90	BD Pharmingen (CA)	Ratón IgG1, kappa	5E10
CD95	BD Pharmingen (CA)	Ratón IgG1, kappa	DX2
CD 124	BD Pharmingen (CA)	Ratón IgG1, kappa	hIL4R-M57
CD 138	Miltenyi Biotec	Ratón IgG1	B-B4
CD151	BD Pharmingen (CA)	Ratón IgG1, kappa	14A2.H1
CD 166	BD Pharmingen (CA)	Ratón IgG1, kappa	3A6
CD184	BD Pharmingen (CA)	IgG2b de ratón, kappa	12G5
CD105 (endoglina)	Santa Cruz Biotechnology (CA)	Ratón IgG1	P3D1
CD 117 (c-Kit)	BD Pharmingen (CA)	Ratón IgG1, kappa	YB5.B8
CD133	Miltenyi Biotec (CA)	Ratón IgG1	AC133
CD44	BD Pharmingen (CA)	IgG2b de ratón, Kappa	G44-26
CD45	BD Pharmingen (CA)	Ratón IgG1, Kappa	Hi30
CD49f	BD Pharmingen (CA)	IgG2a de rata, Kappa	GoH3
CD56 (NCAM)	BD Pharmingen (CA)	Ratón IgG1, Kappa	B159
CD73	BD Pharmingen (CA)	Ratón IgG1, Kappa	AD2
CD90	BD Pharmingen (CA)	Ratón IgG1, kappa	5E10
CD95	BD Pharmingen (CA)	Ratón IgG1, Kappa	DX2
molécula de adherencia epitelial (EpCAM)	BD Pharmingen (CA)	Ratón IgG1	EBA-1

ES 2 627 419 T3

(continúa)

Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF o c-Met)	R&D Systems (MN)	Ratón IgG2a	95309
par2	Santa Cruz Biotecology (CA)	Ratón IgG2a	Sam11
Molécula de adhesión celular de plaquetas/endotelios -1 (PECAM-1)	Santa Cruz Biotecology (CA)	Ratón IgG1	WM-59
trombina	Santa Cruz Biotecology (CA)	Ratón IgG1	ATAP2

TABLA II B. LISTA DE ANTICUERPOS CONJUGADOS SECUNDARIOS UTILIZADOS PARA ANÁLISIS DE FACS

Anticuerpo secundario conjugado	Proveedor	Dilución
IgG APC conjugado anti-ratón de cabra	Jackson ImmunoResearch (PA)	1: 200
IgG PE conjugado anti-ratón de cabra	Jackson ImmunoResearch (PA)	1: 200
PE o APC conjugado anti-conejo de burro	Jackson ImmunoResearch (PA)	1: 200
PE o APC conjugado anti-conejo de burro	Jackson ImmunoResearch (PA)	1: 200

TABLA II C. LISTA DE ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES INTRACELULARES

Anticuerpo	Proveedor	Isotipo	Clon
Nestina	R&D Systems (MN)	Ratón IgG1	HSGO2
Citoqueratina 5/8	Santa Cruz Biotecology (CA)	Ratón IgG1	C50
Vimentina	Santa Cruz Biotecology (CA)	Ratón IgG1	V9
Pan-citoqueratina (4, 5, 6, 8, 10, 13, 18)	Santa Cruz Biotecology (CA)	Ratón IgG1	C11
Periferina	Santa Cruz Biotecology (CA)	Policlonal de cabra	C19
Proteína fibrilar Gial ácido (GFAP)	Santa Cruz Biotecology (CA)	Policlonal de cabra	N-18
Pan-citoqueratina (14, 15, 16, y 19)	BD Pharmingen (CA)	Ratón IgG1, Kappa	KA4
Beta tubulina III	Chemicon International (CA)	Ratón IgG1	TU-20

TABLA III. NIVEL DE EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE SUPERFICIE DE CÉLULAS ESTROMALES ADULTAS DERIVADAS DEL PANCREAS EN EL PASO 10.

El nivel de expresión se asigna en función de la magnitud de la media geométrica de la población en comparación con controles de isotipo. "+" se refiere a una población que tiene un nivel medio geométrico de al menos 10X mayor que un control de isotipo emparejado y se refiere a una población que tiene una media geométrica de nivel dentro de 3X del control de isotipo emparejado.

Marcador	Nivel de expresión
ABCG2	-
Fosfatasa alcalina	+
CD105 (endoglina)	+
CD117 (C-Kit)	-
CD133	-
CD44	+
Los CD4	-
CD49f	-
CD56 (NCAM)	-
CD73 (GPI glicoproteína)	+
CD90 (Thy-1)	+
CD95 (receptor Fas)	+
CD151	+
EpCAM	-
receptor HGF (c-Met)	-
PECAM (CD31)	-

TABLA IV. NIVEL DE EXPRESIÓN DE MARCADORES INTERNOS DE CÉLULAS ESTROMALES ADULTAS DERIVADAS DEL PANCREAS EN EL PASO 10.

Nivel de expresión se asigna en función de la magnitud de la media geométrica de la población en comparación con controles de isotipo. "+" Se refiere a una población que tiene un nivel medio geométrico de al menos 10X mayor que un isotipo de control emparejado y se refiere a una población que tiene una media geométrica de nivel dentro de 3X del isotipo de control emparejado.

Marcador	Nivel de expresión
Citoqueratina pan: 5,6,8, 10, 13, 14, 15, 16, 18, 19	-
GFAP	-
Actina de músculo liso alfa	+
MHC	-
Periferina	-
Beta III tubulina	+
Vimentina	+
Nestina	+

TABLA V A. LISTA DE ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA TINCIÓN DE INMUNOFLUORESCENCIA.

Anticuerpo primario	Proveedor	Isotipo	Concentración	Clon
Beta tubulina III	R&D Systems (MN)	IgG2a de ratón	5 µg/ml	Tuj-1
Nestina	R&D Systems (MN)	IgG1 de ratón	5 µg/ml	196908
Actina de músculo liso alfa (SMA)	Sigma (MO)	IgG2a de ratón	5 µg/ml	1A4
C-Péptido	Linco (MO)	IgG de conejo	1: 100	
Amilasa	Santa Cruz (CA)	IgG de cabra	1: 100	C-20
GATA4	Santa Cruz (CA)	IgG2a de ratón	1: 100	G-4
Prohormona convertasa 1,3	Biológica de EE.UU. (MA)	Suero de conejo	1: 100	
HNF313	Santa Cruz (CA)	IgG de cabra	1: 100	M-20
c-Met				
E-cadherina				
Proteína ácida fibrilar glijal (GFAP)	Chemicon International (CA)	Suero de conejo	1: 500	
Beta tubulina III	Chemicon International (CA)	IgG1 de ratón	1: 100	TU-20
Neurofilamentos M-145 kD (NFM)	Chemicon International (CA)	Suero de conejo	1: 100	
Vimentina	Sigma (MO)	IgG de cabra	1: 100	
Insulina	Santa Cruz (CA)	IgG de conejo	1: 100	H-86
Glucagón	Chemicon International (CA)	Suero de conejo	1: 100	
Somatostatina	Dako (CA)	IgG de conejo	1: 100	
PDX-1	Santa Cruz (CA)	IgG de cabra	1: 100	N-18
GLUT-2	Santa Cruz (CA)	IgG de cabra	1: 100	C-19
glucoquinasa	Santa Cruz (CA)	IgG de conejo	1: 100	H-88
Amilasa	Santa Cruz (CA)	IgG de cabra	1: 100	C-20
citoqueratina 7	Sigma (MO)	Ratón IgG1	1: 100	SUD-68
citoqueratina 19	Sigma (MO)	Ratón IgG1	1: 100	A53-B/A2
citoqueratina pan	Santa Cruz (CA)	Ratón IgG1	1: 100	C-11
Proteína asociada a microtúbulos (MAP2)	Chemicon International (CA)	Suero de conejo	1: 100	

TABLA V B. ANTICUERPOS CONJUGADOS SECUNDARIOS UTILIZADOS PARA INMUNOTINCIÓN.

Anticuerpo conjugado secundario	Proveedor	Dilución
IgG Alexa Fluor de cabra anti-ratón 488 o 594	Molecular Probes (OR)	1: 200
IgG Alexa Fluor 488 de burro anti-cabra o - 594	Molecular Probes (OR)	1: 200
IgG 488, -594 de anti-pollo de ratón	Molecular Probes (OR)	1: 200
IgG 488, -594 de pollo anti-cabra	Molecular Probes (OR)	1: 200
IgG 488, -594 de conejo anti-pollo	Molecular Probes (OR)	1: 200
IgG488, -594 de conejo anti-ratón	Molecular Probes (OR)	1: 200

ES 2 627 419 T3

TABLA VI. CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO CELULAR DE LÍNEAS CELULARES ESTROMALES ADULTAS DERIVADAS DEL PANCREAS

Línea celular	Medios	Proyectado celular # @ Terminación Electiva	Nº Total de PD	Total PDT (h)
H4F3	2DDHL	1,87E + 24	55,3	54,3
H453	OMEM	5,52E + 12	15,3	155,3
H453	CMRL	2,558 + 14	24,5	122,2
H5F3	2DDHL	9,31 E + 22	55,5	530
H6F3	LJMEM	1,31 E + 25	57,3	524
H6F3	2DDHL	3,53E + 17	35,5	759
H7F3	2DDHL	8,66E + 12	22,0	145,4
H8F3	OMEM	3,79E + 17	34,3	70 1
HSF3	CMRL	1,21 8 + 16	25,5	55,2
H9F3	OMEM	2,37E + 15	31,1	487
H9F3	CMRL	1,05E + 13	15,7	85,3
H454	2DDHL	1,108 + 14	25,0	154,3
H4F4	OMEM	3,51 E + 12	19,3	155,5
H4F4	CMPL	8,83E + 11	17,2	175,7
H564	2DDHL	1,58E + 20	47,4	703
H554	OMEM	2,07E + 24	60,8	64,7
H5F4	2DDHL	1,84E + 14	25,5	152,4
H7F4	2DDHL	2,15Ei-09	10,2	231,5
H8F4	OMEM	1,58E + 18	33,3	351
H9F4	OMEM	5,78E + 14	25,0	54,8
H455	2DDHL	1,69E + 14	25,1	135,5
H4F5	OMEM	2,50E + 17	37,1	154,3
H4F5	CMPL	1,76 E + 15	30,2	144,4
H565	OMEM	7,52E + 23	58,1	682
HESS	2DDHL	2,25E + 15	31,6	53,4
H8F5	OMEM	1,14E + 17	33,5	342
H9F5	OMEM	4,54E + 12	18,4	45,7
H5F5O1	OMEM	1,278 + 20	44,5	72,1
H5F552	OMEM	3,47E + 21	49,4	575
H55583	OMEM	2,30E + 21	45,1	55,1
1-15F5E4	OMEM	3,74E + 18	39,8	754
1-16FS85	OMEM	2,58E + 19	43,0	87,5
1-15F555	OMEM	9,79E + 17	38,5	727
H55587	OMEM	1,47E + 18	35,6	57,5
1-15F588	OMEM	4,15E + 17	37,2	71 0
H5F589	OMEM	4,52E + 18	41,1	84,3
1-1565810	OMEM	1,49E + 19	42,5	553
H555511	OMEM	1,05E + 18	35,2	58,2
1-15F5812	OMEM	1,68E + 17	35,4	507
1-15F5813	OMEM	1,46E + 17	38,0	456
1-15F5614	OMEM	1,85E + 17	36,0	527
1-15F5816	OMEM	2,75E + 15	30,4	55,5
1-15F5815	OMEM	2,23E + 14	25,3	574
H555517	OMEM	5,83E + 14	25,4	51,6
1-15F5818	OMEM	7,44E + 13	24,9	49,2
1-15F5819	OMEM	3,35E + 13	24,0	450
H555520	OMEM	4,44E + 12	20,8	38,0

TABLA VII. EXPRESIÓN DEL GEN TRAS DIFERENCIACIÓN SECUENCIAL DE CÉLULAS ESTROMALES ADULTAS DERIVADAS DEL PANCREAS

Descripción celular	HNF3B		PDX-I		NKX6.1		INS	
	Muestra Ct	% Pancreas						
HSF3P12 DL no tratado	-	-	-	-	37,6	0,01	-	-
H5F3P12 -1uM MG 132 x 1d	-	-	-	-	36,6	0,02	-	-
H5F3P12-10uM MG 132x1d	-	-	-	-	33,5	0,29	-	-
H5F3P12 -1,25uM TSA x 1d	-	-	-	-	36,8	0,02	-	-
H5F3P12 -2,5uM TSA x 1d	34,8	0,02	34,0	0,13	30,2	2,76	-	-
H5F3P12 -d2 no tratado	-	-	-	-	39,1	0,01	-	-
H5F3P12 - 1uM MG-132 x 1d + 1,25 uM TSA x 1d	34,3	0,01	34,1	0,05	29,5	1,61	-	-
H5F3P12 - 1uM MG-132 x 1d + 1,25 uM TSA x 1d	32,6	0,09	32,9	0,27	28,8	6,65	35,9	1,77 E-05
HSF3P12 -1uM MG-132 x 1d + 2,5 uM ISA x 1d	34,3	0,01	33,2	0,10	29,6	1,90	-	-
HSF3P12 - 10uM MG-132 x 1d + 2,5 uM TSA x 1d	33,6	0,03	31,9	0,35	30,9	1,05	-	-

Descripción celular	HNF3B		PDX-I		NKX6.1		INS	
	Muestra Ct	% Pancreas						
H5F3P19-d1 no tratado	-	-	-	-	-	-	-	-
H5F3P19-1uM MG 132 x 1d	-	-	-	-	-	-	-	-
H5F3P19-10uM MG 132 x 1d	-	-	-	-	36,3	0,04	-	-
H5F3P19 -1,25uM TSA x 1d	34,1	0,05	34,6	0,08	30,6	3,38	-	-
H5F3P19 -2,5uM TSA x 1d	32,9	0,08	32,6	0,19	29,3	5,46	-	-
H5F3P19 -d2 no tratado	-	-	-	-	-	-	-	-
HSF3P19 - 1uM MG-132 x 1d + 1,25 uM TSA x 1d	33,8	0,05	32,8	0,22	29,7	5,29	-	-
H5F3P19 - 10uM MG-132 x 1d + 1,25 uM TSA x 1d	31,7	0,69	32	1,10	29,7	15,83	-	-
H5F3P19 -1 uM MG-132 x 1d + 2,5 uM TSA x 1d	33,4	0,07	32,3	0,30	29,1	7,98	-	-
H5F3P19 - 10 uM MG-132 x 1d + 2,5uM TSA x 1d	31,2	0,92	31,6	1,41	29,4	18,33	-	-

TSA = tricostatina A, 1d = 1 día

H = Número de páncreas de donantes, F = número de fracción, P = número de pases

TABLA VIII. EXPRESIÓN DEL GEN TRAS DIFERENCIACIÓN SECUENCIAL DE CÉLULAS ESTROMALES ADULTAS DERIVADAS DEL PANCREAS

Descripción celular	HNF3B		POX-I		NKX6.I	
	Mues tra Ct	% Pancr eaas	Mues tra Ct	% Pancr eaas	Mues tra Ct	% Pancr eaas
H5F3P18-d1 no tratado	-	-	-	-	-	-
H5F3P18-10 uM B5306 x 1d	-	-	-	-	-	-
H5F3P18 -d2 no tratado	-	-	-	-	-	-
H5F3P18 -DMEM x 1d + 1,25 TSA x 1d	32,8	0,59	33,8	1,18	30,9	18,17
H5F3P18 -10 uM B5306 x 1d 1,25 uM TSA x 1d	33,1	0,14	34,5	0,22	30,9	5,56
H5F3P18 -10 uM B5306 x 1d 2,5 uM TSA x 1d	33,3	0,17	34,0	0,41	30,8	8,42
H5F3P18 -D3 no tratado	-	-	-	-	-	-
H5F3P18 -10 uM B5306 x 3d	-	-	-	-	-	-
H5F3P18 -d7 no tratado	-	-	-	-	-	-
H5F3P18 -10 uM B5306 x 7d	-	-	-	-	-	-
H5F3P18 -d8 no tratado	-	-	-	-	-	-
H5F3P18 -DMEM x 7d 1,25 uM TSA x 1d	31	0,09	31,5	0,24	28,2	3,46
H5F3P18 -DMEM x 7d 2,5 uM TSA x 1d	31,1	0,12	31,4	0,37	28,4	4,51
H5F3P18 -10 uM B5306 x 7d 1,25 uM TSA x 1d	31,9	0,07	32,5	0,17	28,4	4,16
H5F3P18 -10 uM B5306 x 7d 2,5 uM TSA x 1d	31,1	0,06	31,3	0,20	28	2,81
H5F3P18 -d10 no tratado	-	-	-	-	-	-
H5F3P18-10 uMB5306x10d	-	-	-	-	-	-
H5F3P18 -d14 no tratado	-	-	-	-	-	-
H5F3P18-10 uMB5306x14d	-	-	-	-	-	-
H5F3P18 -d15 no tratado	-	-	-	-	-	-
H5F3P18 -DMEM x 14d + 1.25 uM TSA x 1d	33,8	0,07	33,7	0,14	30,1	2,39
HSF3P18-DMEMx14d + 2.S uM TSA x 1d	-	-	-	-	n/A	n/A
H5F3P18 - 10 uM B5306 x 14d 1,25 uM TSA x 1d	35,3	0,04	34,9	0,08	30,5	2,60
H5F3P18 -10 uM B5306 x 14d 2,5 uM TSA x 1d	34,9	0,03	33,7	0,14	29,9	2,78

TSA = tricostatina A, 1d = 1 día

H = número de páncreas de donantes, F = número de fracción, P = número de pases

ES 2 627 419 T3

TABLA IX. FORMULACIONES DE MEDIOS PARA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS ESTROMALES ADULTAS DERIVADAS DEL PANCREAS

DM #	DMEM HG	DM #	DMEM HG
DM # 1	1% de FBS Activina-AA -20 ng/mL Betacelulina - 10 ng/mL bFGF - 20 ng/mL GLP-1 R agonista - 50 nM Nicotinamida - 10 mM	DM # 6	1% de FBS EGF - 0,3 ug/mL Gastrina - 1,0 ug/mL
DM # 2	DMEM - LG 1% de FBS Activina-A-20 ng/mL Betacelulina - 10 ng/mL bFGF - 20 ng/mL GLP-1 R agonista - 50 nM Nicotinamida - 10 mM	DM # 7	DMEM HG 1% de FBS EGF 0,3 ug/mL Gastrina 1,0 ug/mL GLP-1 R agonista - 50 nM Nicotinamide- 10 mM
DM # 3	DMEM/F12 N2 B27 Laminina I ug/ml bFGF - 20 ng/mL Nicotinamida 10 mM	DM # 8	DMEM/F12 B27 N2 EGF - 0,3 ug/mL Gastrina 1,0 ug/mL Exendina-4 - 20 nM Nicotinamida - 10 mM
DM # 4	DMEM/F12 B27 bFGF -20 ng/ml EGF-20 ng/mL	DM # 9	DMEM/F12 B27 Exendina-4 - 20 nM Nicotinamida - 10 mM
DM # 5	DMEM/F12 B27 GLP-1 R agonista - 50 nM Nicotinamida - 10 mM	DM # 10	CMRL - 1066 1% de BSA ITS-x Na piruvato

TABLA X. RESULTADOS PCR DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS ESTROMALES ADULTAS DERIVADAS DEL PANCREAS DE FRACCIÓN 3 PASO 5 CON MEDIOS de DIFERENCIACIÓN DM#1 DM#10.

Medios de diferenciación	Diferenciación a las 2 semanas	Agregación
DM # 1	Gluc = 37 Nkx6.1 = 36 Pax6 = 34 Somat = 34	INS = 36 HNF3B = 27
DM # 2	Nkx6.1 = 36 Pax6 = 35 Somat = 36	PDX = 36
DM # 3	Ins = 31 Nkx6.1 = 37 Pax6 = 34 Somat = 38	ND
DM # 4	Ins = 33 Pax6 = 36 Somat = 37	ND
DM # 5	Pax6 = 34	ND
DM # 6	Pax6 = 35	PDX = 35 HNF3B = 38
DM # 7	Pax6 = 34	PDX = 34 INS = 35 HNF3B = 30
DM # 8	Pax6 = 34	ND
DM # 9	Pax6 = 33	ND
DM # 10	Nkx6.1 = 37 Pax6 = 33	PDX = 35 HNF3B = 28

ND = No realizado

TABLA XI. RESULTADOS PCR DE DIFERENCIACIÓN DE LA FRACCIÓN 3 PASO 13 PARA AADULTOS CON DERIVADAS DEL PANCREAS CON DIFERENCIACIÓN DE MEDIOS DM#1 - DM#10.

Medios de diferenciación	Diferenciación de 2 semanas	Agregación
DM # 1	todos negativos	Nkx6.1 = 38 Somat = 33
DM # 2	todos negativos	Somat = 33
DM # 3	todos negativos	todos negativos
DM # 4	todos negativos	ND
DM # 5	todos negativos	ND
DM # 6	todos negativos	todos negativos
DM # 7	todos negativos	Ins = 36 Pax6 = 36 Somat = 34
DM # 8	todos negativos	ND
DM # 9	todos negativos	ND
DM # 10	todos negativos	ND

ND = No realizado

TABLA XII: DISTRIBUCIÓN DE LOS NÚMEROS DE CROMOSOMA EN LAS 100 METAFASAS ANALIZADAS EN UNA LÍNEA REPRESENTATIVA DE CÉLULAS ESTROMALES ADULTAS DERIVADAS DEL PANCREAS.

Número de cromosomas	Número de metafases
45	4
46	96

TABLA XIII. DATOS DE ABERRACIÓN DE CROMASOMAS PARA UNA LÍNEA REPRESENTATIVA DE CÉLULAS ESTROMALES ADULTAS DERIVADAS DEL PANCREAS A.

Tipo de aberración						
Cromátida		Cromosoma		Célula dañada severamente	Número de células aberrantes	Número total de aberraciones
Supresión	Insertión	Supresión	Insertio norte			
0	0	0	0	0	0	0

ES 2 627 419 T3

TABLA XIV: GENES QUE SE EXPRESAN DIFERENCIALMENTE AL MENOS 5 VECES ENTRE CÉLULAS ESTROMALES ADULTAS DERIVADAS DEL PANCREAS DE LAS FRACCIONES F3 Y F5 DE PÁNCREAS HUMANO DE UN DONANTE

Identificador de gen	Nombre del gen	Relación (F3/F5) Dirección	adj, valor p
NM_033439	Homo sapiens cromosoma 9 marco de lectura abierto 26 (NF-HEV) (C9orf26), ARNm	169,79 Arriba	2,17E-04
NM_015973	Homo sapiens galanina (GAL), ARNm	6754 Arriba	2,09E-05
NM_005525	Homo sapiens hidroxesteroide (11-beta) deshidrogenasa 1 (HSD1 1 B1), variante de transcripción 1, ARNm	37,62 Arriba	1,30E-05
NM_007193	Homo sapiens anexina A1 0 (ANXA1 0), ARNm	27,82 Arriba	1,02E-04
NM_005525	Homo sapiens hidroxesteroide (11-beta) deshidrogenasa 1 (HSD1 1 Bi), variante de transcripción 1, ARNm	24,43 Arriba	1,25E-04
NM_014178	Homo sapiens syntaxina proteína de unión 6 (amisyn) (STXBP6), ARNm	20 Arriba	1,81E-05
NM_002422	Homo sapiens matriz metaloproteínase 3 (estromelina 1, progelatinasa) (MMP3), ARNm	16,5 Arriba	4,37E-05
NM_000640	Homo sapiens interleucina receptor 13, alfa 2 (IL13RA2), ARNm	15,93 Arriba	2,28E-04
NM_018894	Homo sapiens proteína de matriz 1 extracelular de tipo fibulina que contiene EGF (EFEMP1), variante de transcripción 2, mARN	14,85 Arriba	1,25E-04
NM_000735	Homo sapiens hormonas de glicoproteínas, polipéptido alfa (CGA), ARNm	14,7 Arriba	1,81E-05
NM_000584	Homo sapiens interleucina 8 (1L8), ARNm	13,7 Arriba	1,97E-03
NM_005807	Homo sapiens proteoglicano 4 (PRG4), ARNm	12,53 Arriba	6,38E-04
BE904671	Homo sapiens 601498784F1 NIH_MGC_70 ADNc clon IMAGEN: 39007175, secuencia de ARNm	12,38 Arriba	3,79E-04
NM_001086	Homo sapiens arilacetamida desacetilasa (esterasa) (AADAC), ARNm	11,98 Arriba	1,01E-03
NM_018371	Homo sapienschondroitin beta1,4 N-acetilgalactosaminiltransferasa (ChGn), ARNm	11,9 Arriba	6,00E-04
NM_053044	Homo sapiens proteasa de serina HTRA3 (HTRA3), ARNm	11,09 Arriba	3,46E-04
D29453	queratinocito epidérmico humano HUMNK566 Homo sapiens clon de ADNc 566, secuencia de ARNm	10,25 Arriba	1,24E-04
R41565	yf88e01.s1 cerebro infantil 1NIB Homo sapiens clon de ADNc IMAGEN: 29531 3, secuencia de ARNm	10,23 Arriba	8,47E-05
NM_005127	Homo sapiens lectina de tipo C (dominio dependiente de calcio de reconocimiento de carbohidratos), superfamilia de miembro 2 (inducida por activación) (CLECSF2), ARNm	10,11 Arriba	8,47E-05

ES 2 627 419 T3

NM_0020 89	Homo sapiens quimiocina (motivo CXC) ligando 2 (CXCL2), ARNm	9,87 Arriba	6,92E-04
NM_0123 10	Homo sapiens miembro de la familia de quinesina 4A (KIF4A), ARNm	9,85 Arriba	1,10E-03
A1215024	qg66e11.x1 Soares_testis_NHT Homo sapiens ADNc clon IMAGEN: 1840172 3, secuencia de ARNm	9,43 Arriba	1,48E-04
NM_1532 56	Homo sapiens cromosoma 10 de marco de lectura abierto 47 (CIOorf47), ARNm	9,34 Arriba	2,44E-04
NM_0059 51	Homo sapiens metalotioneína 1 H (MT1 H), mARN	9,09 Arriba	1,79E-04
NM_00621 1	Homo sapiens proencefalina (PENK), ARNm	8,78 Arriba	1,30E-03
NM_1985 38	Homo sapiens HJAR698 (UNQ698), ARNm	8,72 Arriba	3,45E-04
NM_0061 83	Homo sapiens neurotensina (NTS), ARNm	8,19 Arriba	3,72E-04
BU536871	AGENCOURT_10224340 NIH_MGC_141 Homo sapiens ADNc clon IMAGEN: 6565454 5, secuencia de ARNm	8,16 Arriba	1,23E-03
NM00069 3	Homo sapiens deshidrogenasa de aldehído familia 1, miembro de A3 (ALDH1A3), ARNm	7,99 Arriba	1,56E-03
NM00595 0	Homo sapiens metalotioneína 1G (MT1G), ARNm	7,89 Arriba	2,51E-03
NM_1452 44	Homo sapiens transcripción inducible por daño de ADN tipo 4 (DDIT4L), ARNm	7,8 Arriba	2,17E-04
BF514016	UI-H-BW1-amv-f-04-0-UI.s1 NCI_CGAP_Sub7 Homo sapiens ADNc clon IMAGEN: 3071 359 3, secuencia de ARNm	7,73 Arriba	5,09E-05
NM_0046 75	Homo sapiens ras homólogo familia de genes, miembro I (ARHI), ARNm	7,71 Arriba	2,32E-03
NM_0178 05	Homo sapiens Ras proteína de interacción 1 (RASIP1), ARNm	7,66 Arriba	4,22E-04
AA662240	nu89c01.s1 NCI_CGAP_Alvi Homo sapiens ADNc IMAGEN clon: 1217856, secuencia de ARNm	7,44 Arriba	2,30E-04
NM_0024 26	Homo sapiens metaloproteínasa de la matriz 12 (elastasa de macrófagos) (MMP12), ARNm	7,41 Arriba	2,28E-03
NM00017 0	Homo sapiens deshidrogenasa de glicina (descarboxilación; glicina descarboxilasa, proteína de sistema de corte de glicina P) (GLDC), ARNm	7,35 Arriba	1,53E-04
CB160856	K-EST0220612 L18POOL1n1 Homo sapiens ADNc clon LI8POOL1n1-33-Fi2 5, secuencia de ARNm	7,33 Arriba	2,17E-04
NM_0328 49	Homo sapiens proteína hipotética FLJ14834 (FLJ14834), ARNm	7,07 Arriba	1,75E-04
BM988338	UI-H-DHO-asd-f-i0-0-UI.sl NCI_CGAP-DH0 Homo sapiens ADNc clon IMAGEN: 5857545 3, secuencia de ARNm	7,01 Arriba	4,12E-04
NM_1450 33	Homo sapiens cromosoma 21 marco de lectura abierto 100 (C21orf100), ARNm	6,91 Arriba	8,47E-05
NM_0331 20	Homo sapiens cutícula desnuda homólogo 2 de (Drosophila) (NKD2), ARNm	6,83 Arriba	2,17E-04
NM_0803 88	Homo sapiens S100proteína de unión de calcio A16 (S100A16), ARNm	6,67 Arriba	2,13E-03
AA813769	ai69h12.s1 Soares_testis_NHT Homo sapiens clon de ADNc 1376135 3, secuencia de ARNm	6,62 Arriba	1,48E-04

ES 2 627 419 T3

NM_19838 9	Homo sapiens glicoproteína asociada a membrana de pulmón de tipo I (T1A-2), variante de transcripción 2, ARNm	6,55 Arriba	2,78E-04
AK024865	Homo sapiens ADNc: FLJ21212 fis, clon C0L00502	6,54 Arriba	2,34E-04
AW294090	UI-H-B12-ahg-b-i2-0-UI.si NCI_CGAP_Sub4 Homo sapiens ADNc clon IMAGEN: 2726734 3, secuencia ARNm	6,53 Arriba	2,19E-04
AA553336	nk61e11.s1 NCI_CGAP_Sch1 Homo sapiens ADNc clon IMAGEN: 1018028 3, secuencia de ARNm	6,46 Arriba	9,15E-04
NM_00627 3	Homo sapiens quimiocina (motivo C-C) ligando 7 (CCL7), ARNm	6,45 Arriba	3,45E-04
BG206063	RST25498 Athersys Biblioteca RAGE Homo sapiens ADNc, secuencia de ARNm	6,41 Arriba	2,09E-05
NM_02215 4	Homo sapiens familia de transportadores de soluto 39 (transportador zinc), miembro 8 (SLC39A8), ARNm	6,28 Arriba	1,02E-03
NM_00224 5	Homo sapiens canal de potasio, subfamilia K, miembro 1 (KCNK1), ARNm	6,24 Arriba	3,68E-04
NM_02283 3	Homo sapiens cromosoma 9 de marco de lectura abierto 88 (C9orf88), ARNm	6,24 Arriba	3,27E-04
NM_01777 9	Homo sapiens dominio DEP que contiene 1 (DEPDC1), ARNm	6,04 Arriba	2,26E-03
NM_01232 0	Homo sapiens lisofosfolipasa 3 (fosfolipasa lisosomal A2) (LYPLA3), ARNm	5,98 Arriba	3,46E-04
BM977193	UI_CF_DUI-ads-h-16-0-UI.sl UI-CF-DIU Homo sapiens clon de ADNc UI-CF-DU1-ads-h-16-0-UI 3, secuencia de ARNm	5,97 Arriba	3,45E-04
NM_00192 8	Homo sapiens componente D del complemento (Adipsina) (DF), mARN	5,89 Arriba	9,04E-04
NM_01473 6	Homo sapiens KIAA0101 (KIAA0101), ARNm	5,84 Arriba	1,25E-04
NM_00249 7	Homo sapiens NIMA (nunca en gen de mitosis a) - quinasa relacionada 2 (Nek2), ARNm	5,81 Arriba	2,17E-04
NM_02280 9	Homo sapiens ciclo de división celular 25C (CDC25C), variante de transcripción 2, ARNm	5,81 Arriba	4,37E-05
NM_13848 4	Homo sapiens Shugoshin tipo 1 (S. pombe) (SGOL1), ARNm	58 Arriba	1,24E-04
NM_00397 5	Homo sapiens SH2 proteína de dominio 2A (SH2D2A), ARNm	5,68 Arriba	2,46E-04
NM_02067 5	Homo sapiens proteína kinetochore Spc25 (Spc25), ARNm	5,68 Arriba	1,26E-04
NM_00165 7	Homo sapiens anfirregulina (factor de crecimiento derivado de schwannoma) (AREG), ARNm	5,62 Arriba	2,30E-04
NM_14569 7	Homo sapiens ciclo de división celular asociada 1 (CDCA1), variante de transcripción 1, ARNm	5,59 Arriba	3,75E-04
NM_00521 3	Homo sapiens cistatina A (estefina A) (CSTA), ARNm	5,51 Arriba	1,02E-04
AW968578	E3T380654 resecuencias IMAGEN, MAGJ Homo sapiens ADNc, secuencia de ARNm	5,43 Arriba	1,68E-04
NM_00292 2	Homo sapiens regulador de señalización 1 de proteína G (RGS1), ARNm	5,38 Arriba	7,97E-04

ES 2 627 419 T3

BC044933	Homo sapiens, clon IMAGEN: 4540326, ARNm, parcial cds	5,37 Arriba	4,22E-04
AA043255	zk49f07.s1 Soares_pregnant_uterus_NbH PU Homo sapiens ADNc clon IMAGEN: 4861 81 3, secuencia de ARNm	5,31 Arriba	8,47E-05
NM_199414	Homo sapiens regulador de la proteína de citocinesis 1 (PRC1), variante de transcripción 3, ARNm	5,29 Arriba	2,09E-05
AK093618	Homo sapiens ADNc FLJ36299 fis, clon THYMU2004356	5,26 Arriba	5,30E-04
NM_152759	Homo sapiens proteína hipotética MGC35140 (MGC35140), ARNm	5,23 Arriba	1,75E-04
NM_006438	Homo sapiens colectina subfamilia miembro 10 (lectina de tipo C) (COLEC10), ARNm	5,22 Arriba	3,45E-04
CA310410	UI-H-FE1-bei-b-08-0-UI.s2 NCI_CGAP_FE1 Homo sapiens ADNc clon UI-H-FE1-bei-b-08-0-UI 3, secuencia de ARNm	5,2 Arriba	8,47E-05
NM_020242	Homo sapiens quinesina de tipo 7 (KNSL7), ARNm	5,18 Arriba	1,68E-04
AB058769	Homo sapiens ARNm para KIAA1 866 proteínas, cds parcial	5,18 Arriba	4,64E-04
A1807813	wf5OhO8.xl Soares_NFL_T_GBC_S1 Homo sapiens clon de ADNc IMAGEN: 2359071 3, secuencia de ARNm	5,17 Arriba	2,72E-04
NM_018944	Homo sapiens cromosoma 21 marco de lectura abierto 45 (C21orf45), ARNm	5,17 Arriba	3,46E-04
NM_018136	Homo sapiens asp microcefalia de tipo (huso anormal) asociada (Drosophila) (ASPM), ARNm	5,16 Arriba	3,48E-04
NM-001353	Homo sapiens reductasa aldo-ceto familia 1, miembro C1 (deshidrogenasa de dihidrodiol 1; 20-alfa (3-alfa) - deshidrogenasa hidroxisteroide) (AKR1C1), ARNm	5,1 Arriba	8,62E-05
NM_001809	Homo sapiens centrómero proteína A, 17kDa (CENPA), ARNm	5,02 Arriba	4,44E-04
NM_002009	Homo sapiens factor de crecimiento fibroblástico 7 (factor de crecimiento de queratinocitos) (FGF7), ARNm	5 Arriba	2,32E-03
NM_002474	Homo sapiens miosina, polipéptido pesado 11, músculo liso (MYH 11), variante de transcripción SM1, ARNm	18,05 abajo	1,02E-04
BG571477	602592765F1 NIH_MGC_79 Homo sapiens ADNc clon IMAGEN: 4720025 5, secuencia de ARNm	13,35 abajo	4,10E-03
NM_206927	Homo sapiens sinaptotagmina de tipo 2 (SYTL2), variante de transcripción c, ARNm	9,94 abajo	3,13E-03
NM_014476	Homo sapiens PDZ y dominio LIM 3 (PDLIM3), ARNm	9,51 abajo	2,32E-03
AK124751	Homo sapiens ADNc FLJ42761 fis, clon BRAWH3002574, altamente similar a Calpaína 2, amplio precursor de subunidad[Catalítica] (CE 3.4.22.17)	9,09 abajo	5,54E-04
AF269162	Homo sapiens c2lorf7 ARNm forma B, cds completo	7,75 abajo	1,03E-02
NM_003617	Homo sapiens regulador de señalización de G-proteína 5 (RGS5), ARNm	7,59 abajo	6,56E-03
NM_139211	Homo sapiens proteína de sólo homeodominio (HOP), variante de transcripción 2, ARNm	7,55 abajo	2,34E-04
NM_015234	Homo sapiens receptor acoplado a proteína G 116 (GPR116), ARNm	7,47 abajo	1,97E-03

ES 2 627 419 T3

NM_0122 78	Homo sapiens proteína de unión integrina beta 1 (melusina) 2 (ITGB1BP2), ARNm	7,05 abajo	1,09E-03
AL713608	DKFZp686O179_r1 686 (sinónimo: hlcc3) Homo sapiens ADNc clon DKFZp68GO179 5, secuencia de ARNm	7,03 abajo	6,29E-03
BQ439091	Agencourt 7761 579 NIH MGC70 Homo sapiens clon de ADNc IMAGEN: 6020085 5, secuencia de ARNm	6,92 abajo	3,27E-04
BX640908	Homo sapiens ARNm; ADNc DKFZp686J18113 (de clon DKFZp686J18113)	6,87 abajo	1,03E-03
NM_0245 86	Homo sapiens oxisterol en proteínas de unión de tipo 9 (OSBPL9), variante de transcripción 6, ARNm	6,69 abajo	1,30E-02
NM_0121 37	Homo sapiens dimetilarginina de dimetilarginina 1 (DDAH1), ARNm	6,22 abajo	1,36E-02
BX119527	BX1 19527 Soares_fetal_liver_spleen_1 NFLS_S1 Homo sapiens clon ADNc IMAGp998O214529; IMAGEN: 1851 116, secuencia de ARNm	5,99 abajo	1,94E-03
NM_02115 4	Homo sapiens fosfoserina aminotransferasa 1 (PSAT1), variante de transcripción 2, ARNm	5,83 abajo	2,32E-02
NM_0036 17	Homo sapiens regulador de señalización de G-proteína 5 (RGS5), ARNm	5,68 abajo	4,22E-04
H08012	y191b08.rl Soares cerebro infantil 1NIB Homo sapiens clon de ADNc IMAGEN: 45474 5, secuencia de ARNm	5,54 abajo	1,03E-03
AA608841	af83g04.sl Soares_testis_NHT Homo sapiens ADNc clon IMAGEN: 1048662 3, secuencia de ARNm	5,39 abajo	8,01E-03
NM_0162 03	Homo sapiens quinasa de proteína, AMP activado, subunidad no catalítica gamma 2 (PRKAG2), ARNm	5,38 abajo	5,05E-03
BE697175	RC1-CT0414-260700-011-a03 CT0414 Homo sapiens ADNc, secuencia de ARNm	5,37 abajo	1,89E-03
NM_0147 99	Homo sapiens hefaestina (HEPH), variante de transcripción 2, ARNm	5,36 abajo	1,11E-02
NM_0212 29	Homo sapiens netrina 4 (NTN4), ARNm	5,35 abajo	4,06E-02
AA844712	ai70e12.sl Soares_testis_NHT Homo sapiens clon ADNc IMAGEN: 1376206 3, secuencia de ARNm	5,35 abajo	3,21E-03
NM_0065 87	Homo sapiens corina, proteasa de serina (CORIN), ARNm	5,11 abajo	7,77E-03
NM_0210 98	Homo sapiens canal de calcio, dependiente de voltaje, subunidad alfa 1H (CACNA1H), variante de transcripción 1, ARNm	5,06 abajo	2,80E-02

TABLA XV: GENES QUE SON EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN AL MENOS 5 VECES ENTRE CÉLULAS ESTROMALES ADULTAS DERIVADAS DEL PANCREÁS DERIVADAS DE FRACCIONES F4 Y F5 UN PÁNCREAS HUMANO DONANTE INDIVIDUAL.

Identificador de gen	Nombre del gen	Relación (F5/F4) Dirección	adj. valor p
NM_033439	Homo sapiens cromosoma 9 marco de lectura abierto 26 (NF-HEV) (C9orf26), ARNm	50,81 Arriba	2,11 E-06
NM_015973	galanina Homo sapiens (GAL), ARNm	19,55 Arriba	4,25E-05
NM_007193	Homo sapiensannexinA10 (ANXA10), ARNm	19,55 Arriba	2,77E-05
NM_005525	Homo sapiens hidroxesteroide (11-beta) deshidrogenasa 1 (HSD11B1), variante de transcripción 1, ARNm	15,43 Arriba	1,78E-05
NM_005525	Homo sapiens hidroxesteroide (11-beta) deshidrogenasa 1 (HSD11B1), variante de transcripción 1, ARNm	12,49 Arriba	4,38E-05
NM_000170	Homo sapiens glicina deshidrogenasa (descarboxilación; glicina descarboxilasa, sistema de escisión de glicina proteína P) (GLDC), ARNm	10,23 Arriba	2,77E-05
NM_018371	Homo sapiens condroitina betal, 4 N-acetilgalactosaminiltransferasa (ChGn), ARNm	9,72 Arriba	1,57E-04
NM_002422	Homo sapiens matriz de metaloproteinasa 3 (estromelisina 1, progelatinasa) (MM P3), ARNm	9,43 Arriba	1,78E-05
NM_145033	Homo sapiens cromosoma 21 marco de lectura abierto100 (C2lorf100), ARNm	8,73 Arriba	4,25E-05
BF514016	UI-H-BW1-amv-f-04-0-UI.sl NCI_CGAP_Sub7 Homo sapiens ADNc IMAGEN clon: 3071359 3, secuencia de ARNm	8,16 Arriba	5,53E-05
NM_005382	Homo sapiens neurofilamentos 3 (150kDa medio) (NEF3), ARNm	8,15 Arriba	1,83E-04
NM000735	Homo sapiens hormonas de glicoproteína, polipéptido alfa (CGA), ARNm	7,8 Arriba	5,48E-04
NM_021992	Homo sapiens timosina, beta, identificada en células de neuroblastoma (TMSNB), ARNm	7,79 Arriba	6,74E-04
NM_001523	Homo sapiens ácido hialurónico sintasa 1 (HAS1), ARNm	7,34 Arriba	2,68E-06
NM_145697	Homo sapiens ciclo de división celular asociado 1 (CDCA1), variante de transcripción 1, ARNm	7,22 Arriba	2,74E-04

ES 2 627 419 T3

BQ2678 06	ij94e04.xi Insulinoma humano Homo sapiens clon ADNc IMAGEN: 5779278 3, secuencia de ARNm	7,2 Arriba	2,57E- 04
NM_001 255	Homo sapiens CDC20ciclo de división celular 20 de homólogos (S. cerevisiae) (CDC20), ARNm	7,2 Arriba	4,28E- 04
NM_017 413	Homo sapiensapelin, AGTRL1 ligando (RSAP), ARNm	7,06 Arriba	5,94E- 05
NM_005 252	Homo sapiens v-fos FBJ murinos oncogén viral osteosarcoma homólogo (FOS), ARNm	6,96 Arriba	1,12E- 02
CB1608 56	K-EST0220612 L18POOL1n1 Homo sapiens ADNc clon L18POOL1n1- 33-F125, secuencia ARNm	6,83 Arriba	6,45E- 05
NM_002 497	Homo sapiens NIMA (nunca en gen de mitosis a) -related quinasa 2 (Nek2), ARNm	6,75 Arriba	4,25E- 05
NM_012 310	Homo sapiens familia cinesina 4A miembro (KIF4A), ARNm	6,75 Arriba	3,90E- 03
NM_ 020675	Homo sapiens proteína kinetochore Sp25 (Sp25), ARNm	6,72 Arriba	4,25E- 05
NM_005 192	Homo sapiens inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 3 (fosfatasa de especificidad dual asociada a CDK2) (CDKN3), ARNm	6,56 Arriba	1,11 E- 04
NM_006 21 1	Homo sapiens proencefalina (PENK), ARNm	6,56 Arriba	3,63E- 04
NM_022 809	Homo sapiens ciclo de división celular 25C (CDC25C), variante de transcripción 2, ARNm	6,43 Arriba	1,78E- 05
NM_i 52694	Homo sapiens dedo de zinc, CCHC dominio que contiene 5 (ZCCHC5), ARNm	6,43 Arriba	2,78E- 04
NM001 657	Homo sapiens anfirregulina (factor de crecimiento derivado de schwannoma) (AREG), ARNm	6,41 Arriba	9,94E- 05
NM_1384 84	Homo sapiens de tipo shugoshin 1 (S. pombe) (SGOL1), ARNm	6,41 Arriba	1,72E- 04
NM_ 001809	Homo sapiens centrómero proteína A, 17kDa (CENPA), ARNm	6,36 Arriba	6,90E- 05
NM_002 421	Homo sapiens matriz de metaloproteinasa 1(Colagenasa intersticial) (MMP1), ARNm	6,36 Arriba	3,50E- 03
NM0240 53	Homo sapiens cromosoma 22 marco de lectura abierto 18 (C22orf1 8), variante de transcripción 1, ARNm	6,3 Arriba	9,40E- 04
NM_181 803	Homo sapiens enzima de conjugación de ubiquitina E2C (UBE2C), variante de transcripción 6, ARNm	6,11 Arriba	4,76E- 04
NM_018 304	Homo sapiens proteína hipotética FLJ11029 (FLJ11029), ARNm	6,09 Arriba	9,77E- 04
NM_ 006681	Homo sapiens neuromedina U (NMU), ARNm	6,07 Arriba	1,57E- 04

ES 2 627 419 T3

NM_012484	Homo sapiens receptor de motilidad mediado hialuronano(RHAMM) (HMMR), variante de transcripción 1, ARNm	6,03 Arriba	2,77E-05
BQ053282	AGENCOURT_6821603 NIH_MGC_106 Homo sapiens ADNc clon IMAGEN: 5934939 5, secuencia de ARNm	6 Arriba	6,90E-05
NM_014736	Homo sapiens KIAA0101 (KIAA0101), ARNm	5,98 Arriba	2,72E-04
NM_006607	Homo sapiens pituitaria de transformación de tumores 2 (PTTG2), ARNm	5,95 Arriba	3,46E-05
AI215024	qg66e11.xl Scares_testis_NHT Homo sapiens ADNc clon IMAGEN: 1840172 3, secuencia de ARNm	5,95 Arriba	1,51E-04
NM_032117	Homo sapiens proteína GAJ (GAJ), ARNm	5,89 Arriba	4,58E-05
NM_002658	Homo sapiens plasminógeno activador, uroquinasa (PLAU), ARNm	5,86 Arriba	4,25E-05
BC069212	Homo sapiens ADNc clon IMAGE: 4871934, cds parcial	5,83 Arriba	2,77E-05
NM_017779	Homo sapiens dominio DEP que contiene 1 (DEPDC1), ARNm	5,79 Arriba	4,26E-03
NM_007280	Homo sapiens proteína que interactúa con Cpa-5 (01P5), ARNm	5,78 Arriba	2,77E-05
NM_001786	Homo sapiens ciclo de división celular 2, G1 a S y G2 a M (CDC2), variante de transcripción 1, ARNm	5,74 Arriba	5,06E-05
NM_018492	Homo-sapiens T-LAK quinasa de proteína de origen celular (TOPK), ARNm	5,7 Arriba	6,90E-05
NM_018454	Homo sapiens y proteína asociada nucleolar y de huso 1 (NUSAP1), ARNm	5,7 Arriba	1,24E-03
NM_004701	Homo sapiens ciclina B2 (CCNB2), ARNm	5,68 Arriba	2,41E-04
NM_003155	Homo sapiens stanniocalcin 1 (STC1), ARNm	5,66 Arriba	6,59E-04
NM_014750	Homo sapiens discos, homólogo grande 7 (Drosophila) (DLG7), ARNm	5,62 Arriba	4,17E-04
NM_006461	Homo sapiens antígeno asociado a esperma 5 (SPAG5), ARNm	5,58 Arriba	5,17E-05
NM_018136	Homo sapiens asp de tipo (huso anormal), (Drosophila) (ASPM) asociada a microcefalia, ARNm	5,54 Arriba	3,76E-04
NM_004217	Homo sapiens quinasa de aurora B (AURKB), ARNm	5,48 Arriba	2,37E-04
NM_016195	Homo sapiens fosfoproteína de fase M 1 (MPHOSPH1), ARNm	5,46 Arriba	1,54E-03
BC044933	Homo sapiens, clon IMAGEN: 4540326, ARNm, cds parcial	5,46 Arriba	2,16E-04
NM-001353	Homo sapiens reductasa aldo-ceto familia 1, miembro C1 (deshidrogenasa de dihidrodiol 1; 20-alfa (3-alfa)-deshidrogenasa de hidroxisteroide) (AKR1C1), ARNm	5,46 Arriba	4,58E-05

ES 2 627 419 T3

NM_145 061	Homo sapiens cromosoma 13 marco de lectura abierto 3 (CI3orf3), ARNm	5,41 Arriba	1,05E-04
AF131784	Homo sapiens clon 25194, secuencia de ARNm	5,41 Arriba	2,51E-04
NM_152 515	Homo sapiens proteína hipotética FLJ40629 (FLJ40629), ARNm	5,36 Arriba	4,28E-04
NM_0210 00	Homo sapiens pituitaria de transformación de tumores 3 (PTTG3), ARNm	5,34 Arriba	3,12E-04
NM_003 318	Homo sapiens quinasa de proteína TTK (TTK), ARNm	5,34 Arriba	2,64E-04
NM_003 259	Homo sapiens adhesión intercelular molécula de 5, telencefalina (ICAM5), ARNm	5,33 Arriba	8,55E-04
NM_199 414	Homo sapiens regulador de la proteína de citocinesis 1 (PRC1), variante de transcripción 3, ARNm	5,32 Arriba	2,24E-05
NM_006845	Homo sapiens miembro de familia cinesina 2C (KIF2C), ARNm	5,28 Arriba	2,09E-04
NM_032 849	Homo sapiens proteína hipotética FLJ14834 (FLJ14834), ARNm	5,28 Arriba	3,44E-04
NM_006 101	Homo sapiens asociado a cinetocoro 2 (KNTC2), ARNm	5,25 Arriba	1,22E-04
AA66224 0	nu89c01.s1 NCI_CGAP_Alv Homo sapiens ADNc clon IMAGEN: 121 7856, secuencia de ARNm	5,24 Arriba	7,33E-04
NM_001 826	Homo sapiens quinasa de proteína CDC28 subunidad reguladora 1B (CKS1B), ARNm	5,21 Arriba	2,51E-04
NM_024 745	Homo sapiens proteína de unión a dominio SHC SH2 1 (SHCBP1), ARNm	5,16 Arriba	4,90E-04
NM_016 426	Homo sapiens G-2 y S-fase expresado 1 (GTSE1), ARNm	5,16 Arriba	4,20E-03
NM_001 813	Homo sapiens proteína de centrómero E, 312kDa (CENPE), ARNm	5,15 Arriba	3,41E-06
NM_031 966	Homo sapiens ciclina B1 (CCNB1), ARNm	5,13 Arriba	4,25E-05
BE7351 15	6015660841 = 1 NIH_MGC_21 Homo sapiens clon ADNc IMAGE.3840837 5, secuencia de ARNm	5,05 Arriba	2,74E-04
BG9396 78	cr60d11.xl células estromales de médula ósea humana Homo sapiens ADNc clon HBMSC_cr60d11 3, secuencia de ARNm	5 Arriba	1,62E-03
NM_002 474	Homo sapiens miosina, polipéptido pesado 11, músculo liso (MYH 11), variante de transcripción SM1, ARNm	95,15 abajo	2,77E-05
BG5714 77	602592765F1 NIH_MGC_79 Homo sapiens clon ADNc IMAGEN: 4720025 5, secuencia de ARNm	13,02 abajo	6,90E-04

ES 2 627 419 T3

NM_002986 AL71 3608	Homo sapiens quimiocina (motivo C-C) ligando 11 (CCL11), ARNm DKFZp686O1 79_ri 686 (Sinónimo: hlcc3) Homo sapiens clon ADNc DKFZpG86O1 79 5, secuencia de ARNm	12,42 abajo 11,81 abajo	3,33E-04 4,28E-04
NM_1532 67 W92068	Homo sapiens dominio MAM que contiene 2 (MAMDC2), ARNm zh48g03.ri Soares_fetal_liver_spleen_INFLS S1 Homo sapiens clon ADNc IMAGEN: 41 5348 5, secuencia de ARNm	10,38 abajo 9,47 abajo	3,46E-05 2,37E-04
NMO1 7680 AA608841	Homo sapiens asporin (LRR clase 1) (ASPN), ARNm af83g04.si Soares_testis_NHT Homo sapiens ADNc clon IMAGEN: 1048662 3, secuencia de ARNm	8,99 abajo 8,59 abajo	4,58E-05 4,37E-04
AL134451	DKFZpS47JO15_ri 547 (Sinónimo: hfbri) Homo sapiens clon ADNc DKFZp547JO15 5, secuencia de ARNm	8,53 abajo	2,51E-04
NM_0067 74	Homo sapiens indoletilamina N-metiltransferasa (INMT), ARNm	8,49 abajo	1,07E-04
NM_006774 AK1 24751	Homo sapiens indoletilamina N-metiltransferasa (INMT), ARNm Homo sapiens ADNc FLJ42761 fis, clon BRAWH3002574, altamente similar a calpaína 2, subunidad grande [catalítica] precursor (EC 3.4.22.17)	8,35 abajo 8,22 abajo	2,51 E-04 9,94E-05
NM_001001 430 BX119527	Homo sapiens troponina T2, cardíaco (TNNT2), variante de transcripción 2, ARNm BX119527 Soares_fetal_liver_spleen_1NFLS-S1 Homo sapiens clon de ADNc IMAGp9980214529; IMAGEN: 1851116, secuencia de ARNm	8,1 abajo 7,44 abajo	4,25E-05 2,88E-04
BF940114	nac68cO6.x1 NCI_CGAP_Brn23 Homo sapiens ADNc IMAGEN clon 3439475 3, secuencia de ARNm	7,4 abajo	6,95E-04
AI221408	qg92cOi.xi Soares_NFL_T_GBC_S1 Homo sapiens clon ADNc IMAGEN: 1842624 3, secuencia de ARNm	7,03 abajo	6,90E-04
NM_012278	Homo sapiens integrina beta 1 de unión de proteína (melusina) 2 (ITGB1BP2), ARNm	6,89 abajo	3,76E-04
NM_025202	Homo sapiens dominio de mano EF que contiene 1 (EFHD1), ARNm	6,87 abajo	4,71 E-05
NM_0009 61	Homo sapiens prostaglandina I2 (Prostaciclina) sintasa (PTGIS), ARNm	6,87 abajo	3,96E-04
D29134	HUMNK158 queratinocito humano epidérmico Homo sapiens clon de ADNc 158, secuencia de ARNm	6,86 abajo	4,28E-04

ES 2 627 419 T3

BX1077 38	BX1 07738 Soares_testis_NHT Homo sapiens clon de ADNc IMAGp998F181825 IMAGEN: 743057, secuencia de ARNm	6,71 abajo	1,65E- 04
NM_ 006587	Homo sapiens corina, proteasa de serina (CORIN), ARNm	6,64 abajo	9,90E- 04
AF07063 2	Homo sapiens clon 24405 secuencia de ARNm	6,47 abajo	9,94E- 05
NM_032 762	Homo sapiens proteína hipotética MGC16121 (MGC16121), ARNm	6,44 abajo	6,95E- 04
NM_002 587	Homo sapiens protocadherina 1 (cadherina de tipo 1) (PCDH1), variante de transcripción 1, ARNm	6,39 abajo	2,77E- 05
AV70062 1	AV700621 GKC Homo sapiens clon de ADNc GKCDKFO9 3, secuencia de ARNm	6,33 abajo	2,84E- 03
R67051	yi30b07.sl Soares placenta Nb2HP Homo sapiens clon de ADNc IMAGEN: 140725 3, secuencia de ARNm	6,29 abajo	6,14E- 04
NM_ 052890	Homo sapiens reconocimiento de peptidoglicano proteína 2 (PGLYRP2), ARNm	6,21 abajo	6,86E- 05
AF22026 3	Homo sapiens MOST2 ARNm, cds completo	6,18 abajo	1,68E- 04
NM_014 476	Homo sapiens PDZ y LIM dominio 3 (PDLIM3), ARNm	6,04 abajo	4,17E- 04
NM_ 000095	Homo sapiens proteína de matriz de cartilago oligomérico (COMP), ARNm	5,96 abajo	4,11 E- 03
A19542 75	wx95c09.xl NCI_CGAP_Mel15 Homo sapiens clon de ADNc IMAGEN: 2551408 3, secuencia de ARNm	5,95 abajo	1,15E- 03
NM_ 005202	Homo sapiens colágeno, tipo VIII, alfa 2, (COL8A2), ARNm	5,76 abajo	2,77E- 05
BX6490 33	Homo sapiens ARNm; ADNc DKFZp686K1098 (a partir del clon DKFZp686K1098)	5,73 abajo	3,96E- 04
AI392805	tg04h03.xl NCI_CGAP_CLL1 Homo sapiens clon de ADNc IMAGEN 2107829 3, secuencia de ARNm	5,63 abajo	3,84E- 04
NM_0022 17	Homo sapiens inter-alfa (globulina) inhibidor de H3 (ITIH3), ARNm	5,54 abajo	4,28E- 04
CA773752	im56f03.yl HR85 islote Homo sapiens clon de ADNc IMAGE.6039292 5, secuencia de ARNm	5,48 abajo	1,62E- 03
NM_003 725	Homo sapiens 3-epimerasa de hidroxiesteroide (RODH), ARNm	5,45 abajo	3,96E- 04
T71557	yd36b08.sl Soares bazo hígado fetal 1NFLS Homo sapiens clon de ADNc IMAGEN: 110295 3, secuencia de ARNm	5,39 abajo	4,17E- 04

ES 2 627 419 T3

AW2979 46	UI-H-BWO-ajn-d-08-0-UI.sl NCI_CGAP_Sub6 Homo sapiens ADNc IMAGEN clon: 2732223 3, secuencia de ARNm	5,39 abajo	2,50E- 03
AK0251 01	Homo sapiens ADNc: FLJ21448 fis, clon COL04473	5,38 abajo	2,87E- 03
NM_ 005725	Homo sapiens tetraspan 2 (TSPAN- 2), ARNm	5,37 abajo	1,24E- 03
AW 136248	UI-H-BI1-act-e-05-0-U I.sl NCI_CGAP_Sub3 Homo sapiens clon de ADNc IMAGEN: 271 53693, secuencia de ARNm	5,37 abajo	1,11 E- 03
NM_001 854	Homo sapiens colágeno, tipo XI, alfa 1 (COL1 1A1), variante de transcripción A, ARNm	5,35 abajo	4,42E- 04
AW0752 98	xa92c06.xl NCI_CGAP_Co17 Homo sapiens clon de ADNc IMAGEN: 2574250 3, secuencia de ARNm	5,33 abajo	6,95E- 04
AA90319 2	ok48d01.s1 NCI_CGAP_Lei2 Homo sapiens clon ADNc IMAGEN: 151 71853, secuencia de ARNm	5,29 abajo	2,97E- 03
AV70021 7	AV700217 GKC Homo sapiens clon de ADNc GKCDNEO3 3, secuencia de ARNm	5,26 abajo	2,31 E- 03
AA633962	ac73h01.s1 pulmón estratageno (# 937210) Homo sapiens clon ADNc IMAGEN: 868273 3 similar a gb: M57627 Interleucina-10 Precursor (Humano); contiene elemento MER16 elemento repetitivo; secuencia de ARNm	5,26 abajo	9,43E- 04
BQ4390 91	AGENCOURT_7761579 NIH_MGC_70 Homo sapiens clon ADNc IMAGEN: 6020085 5, secuencia de ARNm	5,26 abajo	3,33E- 04
H41942	yo60a08.rl Soares mama 3NbHBst Homo sapiens clon ADNc IMAGEN:1822945 similar a contiene Alu elemento repetitivo; que contiene LTR9 elemento repetitivo; secuencia de ARNm	5,25 abajo	9,94E- 05
AK021531	Homo sapiens ADNc FLJ11469 nosotros, clon HEMBA1001658	5,2 abajo	1,04E- 03
AA55870 4	nl42c03.sl NCI CGAP Pr4 Homo sapiens clon ADNc IMAGEN: 1043332, secuencia de ARNm	5,19 abajo	2,31E- 03
AA846538	aj56f12.sl Soares_testis_NHT Homo sapiens clon ADNc IMAGEN: 1394351 3, secuencia de ARNm	5,19 abajo	4,16E- 04
A1766299	wh7lc10.xl NCI_CGAP Kid11 Homo sapiens ADNc clon IMAGEN: 2386194 3, secuencia de ARNm	5,14 abajo	4,48E- 04
BE173027	MRO-HT0559-200400-015- e07_1 HT0559 Homo sapiens ADNc, secuencia de ARNm	5,11 abajo	1,04E- 03

ES 2 627 419 T3

BE6971 75	RC1-CT0414-260700-011-a03 CT0414 Homo sapiens ADNc, secuencia de ARNm	5,1 abajo	4,42E- 04
AI8055 22	tx86b02.xl NCI_CGAP_Ut4 Homo sapiens clon ADNc IMAGEN: 2276427 3, secuencia de ARNm	5,08 abajo	1,50E- 03
NM_003 287	Homo sapiens proteína tumoral 1 tipo D52 (TPD52L1), variante de transcripción 1, ARNm	5,06 abajo	5,00E- 04
CA94848 3	iq27c09.xl HR85 islote Homo sapiens clon de ADNc IMAGEN: 3, secuencia de ARNm	5,05 abajo	1,38E- 03

TABLA XVI: GENES QUE SON EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE AL MENOS 5 VECES ENTRE CÉLULAS ESTROMALES ADULTAS DERIVADAS DEL PANCREAS DERIVADAS DE FRACCIONES F4 Y F3 DE UN SOLO PÁNCREAS HUMANO DE DONANTE.

Identificador de gen	Nombre del gen	Relación (F4/F3) Dirección	adj. valor p
NM_000961	Homo sapiens prostaglandina I2 (Prostaciclina) sintasa (PTGIS), ARNm	19,44 Arriba	7,06E-05
NM_198389	Homo sapiens células de pulmón mecanografiado de glicoproteína asociada a membrana (T1A-2), variante de transcripción 2, ARNm	12,97 Arriba	1,01E-04
NM_018894	Homo sapiens matriz extracelular que contiene EGF de tipo fibulina proteína 1 (EFEMP1), variante de transcripción 2, ARNm	10,65 Arriba	7,32E-04
NM_014178	Homo sapiens proteína unida a syntaxina 6 (Amisyn) (STXBP6), ARNm	10,23 Arriba	5,37E-05
BE904671	601498784F1 NIH_MGC_70 Homo sapiens clon ADNc IMAGEN: 3900717 5, secuencia de ARNm	8,72 Arriba	6,44E-04
NM_003014	Homo sapiens proteína relacionada con frizzled secretadas 4 (SFRP4), ARNm	8,64 Arriba	3,28E-04
NM_001998	Homo sapiens fibulina 2 (FBLN2), variante de transcripción2, ARNm	8,1 Arriba	7,69E-03
R41565	yf88e01.s1 Soares cerebro infantil 1NIB Homo sapiens clon ADNc IMAGEN: 29531 3, secuencia de ARNm	7,68 Arriba	8,31 E-05
NM_153256	Homo sapiens cromosoma 10 marco de lectura abierto 47 (C10orf47), ARNm	7,16 Arriba	5,46E-04
AF010236	Homo sapiens ARNm de región de cromosoma5q31-33	7,12 Arriba	3,72E-04
AB058769	ARNm sapiens Homo para proteínas K1AA1866, cds parcial	7,04 Arriba	2,63E-04
NM_021012	Homo sapiens canal de rectificación de potasio, subfamilia J, miembro 12 (KCNJ12), ARNm	7,02 Arriba	1,09E-03
D29453	HUMNK566 queratinocito epidérmico humano Homo sapiens clon de ADNc 566, secuencia de ARNm	7,02 Arriba	1,53E-04
BX648964	Homo sapiens ARNm; ADNc DKFZp686JO 156 (de clon DKFZp686J0156)	6,86 Arriba	8,31E-05
NM_017805	Homo sapiens Ras proteína interactuante 1 (RASIP1), ARNm	6,56 Arriba	6,43E-04
CA428652	UI-H-FH1-bfe-k-11-0-UI.s1 NCI_CGAP_FH1 Homo sapiens clon de ADNc UI-H-FH1-bfe-k-11-0-UI 3, secuencia de ARNm	6,41 Arriba	1,01E-04

ES 2 627 419 T3

NM_005 213	Homo sapiens cistatina A (estefina A) (CSTA), ARNm	6,24 Arriba	3,33E-05
NM_005 127	Homo sapiens lectina de tipo C (dominio calcio dependiente, de reconocimiento de carbohidrato), miembro de superfamilia 2 (inducida por activación) (CLECSF2), ARNm	6,17 Arriba	1,10E-04
NM_006183	Homo sapiens neurotensina (NTS), ARNm	5,98 Arriba	7,13E-04
AB011538	Homo sapiens ARNm para MEGF5, cds parcial	5,93 Arriba	9,44E-05
AA81376 9	ai69h12.s1 Soares_testis_NHT Homo sapiens clon ADNc 13761353, secuencia de ARNm	5,78 Arriba	1,10E-04
NM_001 276	Homo sapiens quitinasa 1 tipo 3 (glicoproteína de cartílago-39) (CHI3L1), ARNm	5,52 Arriba	3,33E-05
AF07063 2	Homo sapiens clon 24405 secuencia de ARNm	5,47 Arriba	7,80E-05
NM_005807	Homo sapiens proteoglicano 4 (PRG4), ARNm	5,34 Arriba	3,05E-03
NM_002474	Homo sapiens miosina, polipéptido pesado 11, músculo liso (MYH 11), variante de transcripción SM1, ARNm	5,27 Arriba	1,01E-04
BQ4355 80	AGENCOURT_7836890 NIH_MGC_82 Homo sapiens clon ADNc IMAGEN: 6102371 5, secuencia de ARNm	5,24 Arriba	8,31E-05
NM_000 104	Homo sapiens citocromo P450, familia 1, B subfamilia, polipéptido 1 (CYP1B1), ARNm	5,23 Arriba	1,56E-04
AW2940 90	UI-H-B12-ahg-b-12-0-UI.sl NCI_CGAP_Sub4 Homo sapiens clon de ADNc IMAGEN: 2726734 3, secuencia de ARNm	5,2 Arriba	6,44E-04
NM_001 928	Homo sapiens componente D de complemento (adipsina) (DF), ARNm	5,08 Arriba	9,52E-04
NM_002 245	Homo sapiens canal de potasio, subfamilia K, miembro 1 (KCNK1), ARNm	5,05 Arriba	5,46E-04

Aunque los diversos aspectos de la invención se han ilustrado anteriormente por referencia a los ejemplos y realizaciones preferidas, se apreciará que el alcance de la invención se define no por la descripción anterior, sino por las siguientes reivindicaciones adecuadamente interpretadas bajo los principios del derecho de patentes.

Reivindicaciones

- 5 **1.** Una población de células estromales adultas derivadas del pancreas, donde las células son negativas para la expresión de NCAM, ABCG2, citoqueratina 7, citoqueratina 8, citoqueratina 18 y citoqueratina 19, y en que las células de la población son positivas para la expresión de al menos un marcador de proteína seleccionada del grupo que consiste en CD44, CD73, CD90 o CD105.
- 10 **2.** La población de células estromales adultas derivadas del pancreas de acuerdo con la reivindicación 1, capaz de propagar *in vitro*.
- 15 **3.** La población de células estromales adultas derivadas del pancreas de acuerdo con la reivindicación 2, capaz de propagarse en condiciones de hipoxia.
- 20 **4.** La población de células estromales adultas derivadas del pancreas de acuerdo con la reivindicación 1, capaces de diferenciarse en células que presentan las características del linaje celular β .
- 25 **5.** La población de células estromales adultas derivadas del pancreas de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que ha sido modificado genéticamente para expresar más de una proteína.
- 30 **6.** La población de células estromales adultas derivadas del pancreas de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que ha sido manipulada genéticamente para disminuir la expresión de una proteína.
- 35 **7.** Un método de selección de agentes capaces de inducir células estromales derivadas de páncreas adulto de diferenciarse en una célula de un linaje de células β usando las células de la reivindicación 1, 5 o 6 que comprende:
- 40 a. El cultivo de las células estromales adultas derivadas del pancreas de la reivindicación 1, 5 o 6,
- b. La determinación de los niveles de expresión de marcadores pancreáticos en células estromales adultas derivadas del pancreas,
- c. El contacto e incubación de las células estromales adultas derivadas del pancreas con un agente capaz de inducir células a diferenciarse en una célula del linaje de células β ,
- d. La determinación de los niveles de expresión de marcadores pancreáticos en células estromales adultas derivadas del pancreas, y
- e. La vigilancia de los cambios en la expresión de genes a lo largo del tiempo.
- 45 **8.** Un método de selección de agentes capaces de alterar la expresión de un gen o una proteína en las células estromales adultas derivadas del pancreas de la reivindicación 1, 5 o 6, que comprende:
- 50 a. El cultivo de las células estromales adultas derivadas del pancreas de la reivindicación 1, 5 o 6,
- b. La determinación de los niveles de expresión de un gen o una proteína en las células estromales adultas derivadas del pancreas,
- c. El contacto e incubación de las células estromales adultas derivadas del pancreas con un agente capaz de alterar la expresión de dicho gen o dicha proteína,
- d. La determinación de los niveles de expresión de dicho gen dicha proteína en células estromales adultas derivadas del pancreas, y
- e. La vigilancia de los cambios en la expresión de genes a lo largo del tiempo.
- 55 **9.** Un método *in vitro* de obtener una población de células estromales enriquecidas en células de un páncreas humano, en donde las células son negativas para la expresión de NCAM, ABCG2, citoqueratina 7, citoqueratina 8, citoqueratina 18, y citoqueratina 19, que comprende:
- 60 a. Cultivar las células pancreáticas aisladas del páncreas humanos en un medio basal nutriente complementado con suero y glucosa a una concentración de por debajo de aproximadamente 30 mM; y
- b. Permitir que las células crecen en el medio durante aproximadamente dos semanas, obteniendo de ese modo una población de células enriquecidas en células estromales;
- 65 y en el que las células de la población son positivas para la expresión de al menos un marcador de proteína seleccionada del grupo que consiste en CD44, CD73, CD90 o CD105.
- 70 **10.** El método de la reivindicación 9, en el que las células estromales en la población de células son capaces de propagarse *in vitro*.
- 75 **11.** El método de la reivindicación 9, en el que las células estromales en la población de células son capaces de diferenciarse en células que presentan las características del linaje celular P.
- 80 **12.** El método de la reivindicación 9, que comprende además:
- a. Selección y aislamiento de las células estromales a base de al menos un marcador de proteína seleccionado de entre el grupo que consiste en CD44, CD73, CD90 o CD105.

- 5 **13.** El método de la reivindicación 9, que comprende además una etapa (d) de aislar células que se unen específicamente a un determinado agente para un marcador de proteína específicamente expresado en las células estromales adultas derivadas del páncreas, obteniendo de este modo una población pura de células estromales adultas derivadas del páncreas.
- 14.** El método de la reivindicación 13, en el que el marcador de proteína se selecciona entre el grupo que consiste en CD44, CD73, CD90 o CD105.
- 10 **15.** El método de la reivindicación 13, en el que la población de células es negativa para la expresión de NCAM, ABCG2, citoqueratina 7, citoqueratina 8, citoqueratina 18, y citoqueratina 19.
- 16.** El método de la reivindicación 13, en el que la población de células son capaces de propagarse *in vitro*.
- 15 **17.** El método de la reivindicación 13, en el que la población de células son capaces de propagarse en condiciones de hipoxia.
- 18.** El método de la reivindicación 13, en el que la población de células son capaces de diferenciarse en células que presentan las características del linaje de células β .
- 20 **19.** Un método *in vitro* de la obtención de células que presentan las características del linaje celular β , que comprende la obtención de una población pura de células estromales adultas derivadas del páncreas obtenidas a partir de un páncreas humano, y el tratamiento de células estromales adultas derivadas del páncreas de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 con una cantidad eficaz de un agente que induce las células estromales adultas derivadas del páncreas para diferenciarse en células que presentan las características del linaje de células β .
- 25 **20.** El método *in vitro* de la reivindicación 19, en el que la población de células estromales adultas derivadas del páncreas se obtienen por el método, que comprende:
- 30 a. El cultivo de células pancreáticas aisladas de un páncreas humano en un medio nutriente basal complementado con suero y glucosa a una concentración por debajo de aproximadamente 30 mM;
- b. Permitiendo que las células crezcan en el medio durante aproximadamente dos semanas para obtener una población de células enriquecidas en células estromales; y
- 35 c. El aislamiento de las células que se unen específicamente a un determinado agente para un marcador de proteína expresado específicamente en células estromales adultas derivadas del páncreas, obteniendo de este modo una población pura de células estromales adultas derivadas del páncreas.
- 21.** El método de la reivindicación 12, 17 o 20, en el que la concentración en suero está por debajo de aproximadamente 5%.
- 40 **22.** El método de la reivindicación 19, en el que la población de células estromales adultas derivadas del páncreas de un páncreas se expandieron en cultivo antes del tratamiento para inducir la diferenciación.
- 23.** El método de la reivindicación 19, en el que las células que presentan las características del linaje de células β son células productoras de insulina.
- 45 **24.** Las células estromales adultas derivadas del páncreas de cualquiera de las reivindicaciones 16 para su uso en el tratamiento de un paciente con diabetes mellitus o está en riesgo de desarrollar diabetes, en el que las células estromales se obtienen mediante el aislamiento de una población de células estromales adultas derivadas del páncreas a partir de tejido pancreático de donantes, y en el que tras la transferencia de las células estromales adultas derivadas del páncreas en el paciente, las células estromales adultas derivadas del páncreas se diferencian en células productoras de hormona pancreática.
- 50 **25.** Las células progenitoras para su uso en el tratamiento de un paciente con diabetes mellitus o está en riesgo de desarrollar diabetes, donde las células progenitoras se obtienen por un método *ex vivo* que comprende:
- 55 la expansión de células estromales *ex vivo* que han sido aisladas a partir de tejido pancreático de donantes en donde las células son negativas para la expresión de NCAM, ABCG2, citoqueratina 7, citoqueratina 8, citoqueratina 18, y citoqueratina 19, y en la que las células de la población son positivas para la expresión de al menos un marcador de proteína seleccionada del grupo que consiste en CD44, CD73, CD90 o CD105, para producir células progenitoras, y en la que tras la transferencia de las células progenitoras en el paciente, las células progenitoras se diferencian en células productoras de hormona pancreática.
- 60 **26.** Las células para uso de acuerdo a la reivindicación 24 o 25, en las que las células productoras de hormona pancreática son células productoras de insulina.
- 65

27. Las células de un linaje de células β pancreático para uso en el tratamiento de un paciente con diabetes mellitus o está en riesgo de desarrollar diabetes, en el que las células de un linaje de células β pancreático se obtienen mediante un método *in vitro* que comprende:

- 5 (a) la expansión *in vitro* de una población de células estromales adultas derivadas del pancreas que han sido aisladas a partir de tejido pancreático de donantes en donde las células son negativas para la expresión de NCAM, ABCG2, citoqueratina 7, citoqueratina 8, citoqueratina 18 y citoqueratina 19, y en la que las células de la población son positivas para la expresión de al menos un marcador de proteína seleccionada del grupo que consiste en CD44, CD73, CD90 o CD105; y
- 10 (b) diferenciar las células estromales adultas expandidas derivadas del pancreas en un linaje de células de páncreas 1.

28. Las células para uso de acuerdo con la reivindicación 27, en las que las células de linaje de células β pancreáticas son células productoras de insulina.

15

29. Las células para su uso de acuerdo con la reivindicación 25, 26 o 27, en la que el paciente es el donante del tejido pancreático.

30. Las células estromales adultas derivadas del pancreas y islotes de cualquiera de las reivindicaciones 16 para su uso en el tratamiento de un paciente con diabetes mellitus o está en riesgo de desarrollar diabetes, en el que las células estromales y los islotes se obtienen mediante un método que comprende:

20

(a) el aislamiento de una población de células estromales adultas derivadas del pancreas de un donante de tejido pancreático; y

25

(b) la obtención de islotes maduros de un donante, y en la que tras la transferencia tanto de las células estromales adultas derivadas del pancreas como los islotes en el paciente:

(i) los islotes mejoran la supervivencia y la función de células estromales adultas en el paciente derivadas del pancreas;

30

o
(ii) las células estromales adultas derivadas del pancreas mejoran la supervivencia y la función de los islotes en el paciente.

31. Las células para uso de acuerdo con la reivindicación 30, en las que el donante de los islotes maduros es alogénico o xenogénico con respecto al paciente.

35

32. Las células para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24, 25, 27 o 30, en donde las células que se transfieren al paciente se incorporan en un material de soporte polimérico.

33. Las células para uso de acuerdo con la reivindicación 32, en las que el material de soporte polimérico está también cargado con un vehículo farmacéutico o agente bioactivo que facilita la supervivencia y la función de las células en el paciente.

40

45