

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 006**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/074** (2010.01)

**C12N 5/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2010 PCT/US2010/054408**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2011 WO11059725**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2010 E 10830437 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2494035**

54 Título: **Células madre pluripotentes**

30 Prioridad:

**29.10.2009 US 256149 P**

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

**24.04.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FUNG, RAMIE y  
FRYER, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 665 006 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 madre pluripotentes****Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona métodos para producir células madre pluripotentes a partir de células adultas. En particular, la presente invención proporciona métodos para producir células madre pluripotentes a partir de células somáticas sin el uso de una capa de células sustentadoras o un agente que aumenta la eficacia de la transfección retroviral.

**ANTECEDENTES**

Los avances en la terapia de reemplazo celular para la diabetes mellitus tipo I y la escasez de islotes de Langerhans trasplantables han centrado el interés en desarrollar fuentes de células insulinas productoras, o células  $\beta$ , apropiadas para el injerto. Un enfoque es la generación de células  $\beta$  funcionales a partir de células madre pluripotentes, tales como, por ejemplo, células madre embrionarias, o células madre pluripotentes generadas a partir de células adultas.

Células madre pluripotentes generadas a partir de células adultas, o "células madre pluripotentes inducidas", o "células IPS" son un tipo de célula madre pluripotente derivada artificialmente a partir de una célula no pluripotente, tal como, por ejemplo, una célula somática adulta, mediante la inducción de una expresión "forzada" de ciertos genes. Se cree que las células madre pluripotentes inducidas son idénticas a las células madre pluripotentes naturales, tales como las células madre embrionarias en muchos aspectos, tales como la expresión de ciertos genes y proteínas de células madre, patrones de metilación de la cromatina, tiempo de duplicación, formación de cuerpos embrioides, formación de teratomas, formación de quimera viable, y potencia y diferenciabilidad.

En un ejemplo, Takahashi *et al* declaran que "demostramos la inducción de células madre pluripotentes a partir de fibroblastos embrionarios o adultos de ratón mediante la introducción de cuatro factores, Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4, en condiciones de cultivo de células ES". (Cell 126: 663 - 676, 2006).

En otro ejemplo, Li *et al* declaran que "revelamos reprogramación genética combinada y condiciones químicas que generan y mantienen iPSCs de ratas (riPSCs) que pueden dar lugar a teratomas y contribuyen ampliamente a las ratas quiméricas. La misma estrategia también es suficiente para generar iPSCs humanos atípicos (hiPSCs) que exhiben morfología de colonias y requisitos de autorrenovación similares/respuestas de señalización como las de los mESCs". (Cell Stem Cell 4:16-19, 2009).

En otro ejemplo, Maherali *et al* afirman que la expresión [e]ctópica de los cuatro factores de transcripción Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4 es suficiente para conferir un estado pluripotente al genoma de los fibroblastos, generando un tallo pluripotente inducido (iPS). Se desconoce si la reprogramación nuclear inducida por estos cuatro factores reestablece globalmente las diferencias epigenéticas entre las células diferenciadas y pluripotentes. Aquí, utilizando nuevos enfoques de selección, hemos generado células iPS de fibroblastos para caracterizar su estado epigenético. Las células iPS femeninas mostraron reactivación de una cromosoma X silenciada somáticamente y sometida a inactivación aleatoria de X tras la diferenciación. El análisis genómico de dos modificaciones clave de histonas indicó que las células iPS son muy similares a las células ES. De acuerdo con estas observaciones, las células iPS dieron lugar a quimeras viables de alto grado con contribución a la línea germinal. Estos datos muestran que la reprogramación inducida por factores de transcripción conduce a la reversión global del epigenoma somático en un estado de tipo ES". (Cell Stem Cell 1: 55 - 70, 2007).

En otro ejemplo, Stadtfeld *et al* declaran que "[hemos] generado un sistema lentiviral inducible por doxiciclina para expresar transitoriamente los cuatro factores de reprogramación c-Myc, Klf4, Oct4 y Sox2 en fibroblastos". (Cell Stem Cell 2: 230 - 240).

En otro ejemplo, Nakagawa *et al* afirman que "aquí describimos un protocolo modificado para la generación de células iPS que no requiere el retrovirus Myc. Con este protocolo, obtuvimos una cantidad significativamente menor de células de fondo que no son iPS, y las células iPS generadas fueron consistentemente de alta calidad. Los ratones derivados de células Myc-iPS no desarrollaron tumores durante el período de estudio. El protocolo también permitió el aislamiento eficiente de células iPS sin selección de fármacos. Además, generamos células iPS humanas de fibroblastos dérmicos adultos sin MYC". (Nature Biotechnology 26: 101-106, 2008).

Ning Sun *et al* 2009 describe una derivación libre de alimento de células madres pluripotentes inducidas de células adiposas humanas adultas (PNAS 106; 37; 15720-15725).

En otro ejemplo, Takahashi *et al* declaran que "demostramos la generación de células iPS a partir de fibroblastos dérmicos humanos adultos con los mismos cuatro factores: Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc". (Cell 131: 861-872, 2007).

En otro ejemplo, Okita *et al* han demostrado previamente que las células madre pluripotentes pueden inducirse a partir de fibroblastos de ratón mediante la introducción retroviral de Oct3/4 (también llamada Pou5f1), Sox2, c-Myc y Klf4, y selección subsecuente para la expresión Fbx15 (también llamada Fbxo15). Estas células del tallo pluripotente inducido (iPS) (en lo sucesivo llamadas células Fbx15 iPS) son similares a las células madre embrionarias (ES) en morfología, proliferación y formación de teratoma, sin embargo, son diferentes respecto a la expresión génica y los patrones de metilación del ADN, y no producen quimeras adultas. Aquí mostramos que la selección de la expresión de Nanog resulta en células iPS competentes para línea germinal con expresión génica incrementada de tipo célula ES y patrones de metilación de ADN con células Fbx15 iPS". (Nature 448: 313-317, 2007).

En otro ejemplo, los fibroblastos de Wernig *et al.* pueden reprogramarse a un estado pluripotente en Oct4, Sox2 y Klf4 en ausencia de c-Myc." (Cell Stem Cell 2: 10-12, 2008).

En otro ejemplo, Park *et al* afirman que "hemos derivado células iPS de células primarias humanas fetales, neonatales y adultas, que incluyen fibroblastos dérmicos aislados a partir de una biopsia de piel de un sujeto de investigación saludable". (Nature 451:141-146, 2008).

En otro ejemplo, Yu *et al* declaran que "Mostramos que cuatro factores (OCT4, SOX2, NANOG y LIN28) son suficientes para reprogramar células somáticas humanas a células madre pluripotentes que exhiben las características esenciales de las células madre embrionarias (ES)" (Science 318: 1917-1920, 2007).

Sin embargo, esta promesa aún no se ha aprovechado completamente debido, en parte, a la dificultad de derivar, pasar y mantener rutinariamente células madre pluripotentes derivadas de células somáticas en un estado pluripotente. Una limitación característica del cultivo estable y consistente a largo plazo de células madre pluripotentes derivadas de células somáticas es el requisito de que las células madre pluripotentes se deriven en una capa de células sustentadoras. Las células sustentadoras, generalmente fibroblastos mitóticamente inactivos, proporcionan una fuente de componentes de cultivo definidos de forma incompleta que soportan la adhesión, el crecimiento y el paso de células madre pluripotentes derivadas de células somáticas. Sin embargo, debido a las variables inherentes a las células sustentadoras, el cultivo de la capa de alimentación presenta un obstáculo para la estandarización de las condiciones de cultivo y también para la diferenciación dirigida de las células madre pluripotentes derivadas de las células somáticas. Como resultado, las células madre pluripotentes derivadas de células somáticas se convierten generalmente de cultivo basado en alimentador a cultivo libre de alimentador en una capa absorbida compuesta de proteína(s) de matriz extracelular para un cultivo y diferenciación completamente caracterizados y controlados. Desafortunadamente, el proceso de conversión de células madre pluripotentes derivadas de células somáticas de un cultivo en células sustentadoras a un sistema sin alimentador hace hincapié en las células y puede dar lugar a una diferenciación espontánea y/o inestabilidad cariotípica.

Por lo tanto, todavía existe una necesidad significativa de generar células madre pluripotentes inducidas de suficiente calidad y que se pueden ampliar para abordar las necesidades clínicas actuales. La presente invención utiliza un enfoque alternativo para producir células madre pluripotentes inducidas, en donde las células madre pluripotentes se forman a partir de células somáticas sin el uso de una capa de células sustentadoras.

## RESUMEN

En una realización, la presente invención proporciona un método para producir células madre pluripotentes a partir de células somáticas sin el uso de una capa de células sustentadoras o un agente que aumenta la eficacia de la transfección viral de acuerdo con las reivindicaciones.

En particular la invención proporciona un método para producir células madres pluripotentes de células derivadas de fluido amniótico humano sin el uso de capa de células sustentadoras y sin el uso de un agente que incrementa la eficiencia de transfección retroviral, que comprende;

a) sembrar células derivadas de fluido amniótico humano en un sustrato de cultivo tisular;

b) transducir células derivadas de fluido amniótico sembradas con al menos un retrovirus que contiene ácido nucleico que codifica SOX2, OCT4, LIN28, y NANOG;

c) cultivar las células transducidas, trasladando las células transducidas a placas de cultivo tisular revestidas con una proteína de matriz extracelular, y cultivar las células transferidas en medio suplementado con un agente que inhibe actividad de quinasa Rho, y bFGF, durante una semana; y

d) pasar las células cultivadas a placas de cultivo tisular revestidas con una proteína de matriz extracelular y cultivar las células subcultivadas en medio condicionado que contiene factores solubles derivados de células sustentadoras y suplementados con bFGF, en el que las células son transducidas para introducir SOX2, OCT4, LIN28, y NANOG en las células

La invención también proporciona un método para producir células que están diferenciadas, por ejemplo células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo y/o células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático y/o células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático utilizando un método de acuerdo con las reivindicaciones.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 muestra la expresión de genes asociados con pluripotencia en células de la línea de células madre embrionarias humanas HI y células madre pluripotentes derivadas de la línea celular CRL2522.

La Figura 2 muestra la morfología de las colonias de células madre pluripotentes. Los paneles A y B muestran micrografías representativas de colonias de células madre pluripotentes que se derivaron de células derivadas de líquido amniótico. Los paneles C y D muestran células madre pluripotentes derivadas de células derivadas de líquido amniótico (AFD1) después de cinco pases. El panel E muestra células derivadas de fluido amniótico no transducidas.

La Figura 3 muestra la expresión de genes asociados con la pluripotencia en células madre pluripotentes derivadas de células derivadas de líquido amniótico.

La Figura 4 muestra la expresión de genes asociados con la pluripotencia en células madre pluripotentes derivadas de células derivadas de líquido amniótico (AFD1), tal como se detectó mediante citometría de flujo en los números de pases indicados.

La Figura 5 muestra la expresión de genes asociados con la pluripotencia en células madre pluripotentes derivadas de células derivadas de líquido amniótico (AFD1), detectadas mediante inmunofluorescencia en el paso 5.

La Figura 6 muestra la expresión de genes asociados con la pluripotencia en diversas células madre pluripotentes derivadas de la línea celular CRL2522.

La Figura 7 muestra la expresión de marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en dos poblaciones de células madre pluripotentes derivadas de células derivadas de líquido amniótico.

La Figura 8 muestra la expresión de marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo en una población de células madre pluripotentes derivadas de la línea celular CRL2522.

La Figura 9 muestra la expresión de marcadores característicos del linaje endocrino pancreático en una población de células madre pluripotentes derivadas de células derivadas de líquido amniótico.

La Figura 10 muestra cuerpos embrioides formados utilizando células madre pluripotentes derivadas de células derivadas de fluido amniótico, células CRL2522 y células de la línea de células madre embrionarias humanas HI. También se muestra una comparación del perfil de expresión génica de los diversos cuerpos embrioides.

La Figura 11 muestra el crecimiento y la unión de células madre pluripotentes derivadas de células derivadas de líquido amniótico a una superficie que carece de una capa de células sustentadoras y una capa de absorción.

La Figura 12 muestra la expresión de genes asociados con la pluripotencia en células madre pluripotentes derivadas de células derivadas de líquido amniótico que se han cultivado en una superficie que carece de una capa de células sustentadoras y una capa de absorción.

La Figura 13 muestra la expresión de marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en una población de células madre pluripotentes derivadas de células derivadas de líquido amniótico que se han cultivado en una superficie que carece de una capa de células sustentadoras y una capa de absorción.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA**

Para claridad de la divulgación, 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**

Las células madre son células indiferenciadas definidas por su capacidad a nivel de célula individual para autorenovarse y diferenciarse para producir células de progenie, incluyendo progenitores autorrenovadores,

progenitores no renovadores y células diferenciadas terminalmente. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse in vitro en células funcionales de varios linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, si no todos, los tejidos después de la inyección en blastocistos.

Las células madre se clasifican por su potencial de desarrollo como: (1) totipotentes, lo que significa que pueden dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias; (2) pluripotentes, es decir, capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias; (3) multipotentes, es decir, capaces de dar lugar a un subconjunto de linajes celulares pero dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico en particular (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir progenie que incluye HSC (autorrenovación), células progenitoras oligopotentes restringidas a células sanguíneas, y todos los tipos y elementos celulares (p.ej., plaquetas) que son componentes normales de la sangre); (4) oligopotentes, es decir, capaces de dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes celulares que las células madre multipotentes; y (5) unipotentes, lo que significa que pueden dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

La diferenciación es el proceso por el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada como, por ejemplo, una célula nerviosa o una célula muscular. Una célula diferenciada o inducida por diferenciación es aquella que ha adquirido una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término "comprometido", cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha avanzado en la ruta de diferenciación hasta un punto en el que, en circunstancias normales, continuará diferenciándose en un tipo específico de célula o subconjunto de tipos de células, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o revertir a un tipo de célula menos diferenciada. La desdiferenciación se refiere al proceso por el cual una célula revierte a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Como se usa en el presente documento, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células proviene y de qué células puede originarse. El linaje de una célula coloca a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un marcador específico de linaje se refiere a una característica específicamente asociada con el fenotipo de células de un linaje de interés y se puede usar para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida con el linaje de interés.

"Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo", o "Células de etapa 1", o "Etapa 1", como se usa en el presente documento, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox de tipo mezcla, FGF4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 u OTX2. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo incluyen células precursoras de rayas primitivas, células de rayas primitivas, células de mesendodermo y células de endodermo definitivas.

"Células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático", como se usa en el presente documento, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: PDX1, FTNF1 beta, PTF1 alfa, FTNF6, NKX6.1 o HB9. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático incluyen las células del endodermo pancreático, las células del tubo digestivo primitivo y las células del intestino anterior.

"Endodérmico definitivo", como se usa en el presente documento, se refiere a células que tienen las características de las células que surgen del epiblasto durante la gastrulación y que forman el tracto gastrointestinal y sus derivados. Las células de endodermo definitivas expresan los siguientes marcadores: HNF3 beta, GATA4, SOX 17, Cerberus, OTX2, goosecoide, C-Kit, CD99 y MIXL1.

"Marcadores", como se usan en el presente documento, son moléculas de ácido nucleico o polipéptido que se expresan diferencialmente en una célula de interés. En este contexto, expresión diferencial significa un nivel aumentado para un marcador positivo y un nivel disminuido para un marcador negativo. El nivel detectable del ácido nucleico marcador o polipéptido es suficientemente más alto o más bajo en las células de interés en comparación con otras células, de modo que la célula de interés se puede identificar y distinguir de otras células usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica.

"Célula endocrina pancreática", o "célula que expresa la hormona pancreática", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula capaz de expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

### **Generación de las células madre pluripotentes inducidas**

En una realización, las células madre pluripotentes de la presente invención se derivan de células somáticas sin el uso de una capa de células sustentadoras mediante la introducción de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: SOX2, OCT4, LI28 y NANOG. El al menos un gen se puede introducir en las células somáticas mediante cualquier medio adecuado, tal como, por ejemplo, transfección de ácidos nucleicos,

transducción viral o introducción directa de las proteínas codificadas por al menos un gen.

5 En el caso en el que al menos un gen se introduce por transducción viral, las células somáticas se pueden transducir usando un retrovirus. Cualquier retrovirus capaz de introducir el al menos un gen en la célula somática es adecuado para su uso en la presente invención. En una realización, el retrovirus es un lentivirus.

10 En una realización alternativa, las células somáticas pueden transducirse usando un virus. Cualquier virus capaz de introducir el al menos un gen en la célula somática es adecuado para su uso en la presente invención. Por ejemplo, el virus usado en los métodos de la presente invención puede ser un adenovirus. Alternativamente, el virus usado en los métodos de la presente invención puede ser un baculovirus.

15 Los agentes que aumentan la eficacia de la transfección viral o retroviral actúan neutralizando la repulsión de carga entre los viriones y el ácido siálico en la membrana celular de las células somáticas. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, polibreno.

20 El al menos un retrovirus puede contener un ácido nucleico que codifica uno o más de uno de al menos un gen. En una realización, las células somáticas se transducen utilizando retrovirus que contienen ácido nucleico que codifica al menos un gen individualmente.

En una realización, el medio condicionado se acondiciona usando fibroblastos embrionarios de ratón.

25 En una realización, las células somáticas sembradas se transducen con lentivirus que contiene ácido nucleico que codifica al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: SOX2, OCT4, LIN28 y NANOG. En una realización alternativa, las células somáticas sembradas se transducen con lentivirus que contiene ácido nucleico que codifica SOX2, OCT4, LIN28 y NANOG. En una realización alternativa, las células somáticas sembradas se transducen con al menos un lentivirus que contiene ácido nucleico que codifica SOX2, OCT4, LIN28 y NANOG individualmente.

30 En una realización, el agente que inhibe la actividad de quinasa Rho se selecciona del grupo que consiste en: Y-27632, Fasudilo, (S)-(+)-4-Glicilo-2-metilo-1-[(4-metilo-5)-isoquinolinilo]sulfonilo]-hexahidro-1H-1,4-dihidrocloruro de diazepam (denominado aquí H1152-glicilo) e Hidroxifasudilo.

35 La matriz extracelular puede ser, por ejemplo, fibronectina, vitronectina, laminina, colágeno, gelatina, trombospondina y similares. En una realización, la matriz extracelular es MATRIGEL.

En una realización, las células somáticas pueden ser las células derivadas de fluido amniótico descritas en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 11/420.895, asignada a LifeScan, Inc.

40 En una realización alternativa, las células somáticas pueden ser las células derivadas de fluido amniótico descritas en el documento WO2003/042405.

En una realización alternativa, las células somáticas pueden ser las células derivadas de líquido amniótico descritas en la Solicitud de Patente Publicada de los Estados Unidos US 2005/0054093.

45 En una realización alternativa, las células somáticas pueden ser células derivadas de líquido amniótico descritas en Int' Anker *et al*, Blood 102: 1548-1549, 2003.

50 En una realización alternativa, las células somáticas pueden ser células derivadas de líquido amniótico descritas en Tsai *et al*, Human Reproduction 19, 1450-1456, 2004.

En una realización alternativa, las células somáticas pueden ser las células derivadas de vellosidades coriónicas descritas en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 1 1/762,714, asignada a LifeScan, Inc.

55 En una realización alternativa, las células somáticas pueden ser las células derivadas de vellosidades coriónicas descritas en Chang & Jones, Prenatal Diagnosis 8: 367-378, 1988.

En una realización alternativa, las células somáticas pueden ser las células derivadas de vellosidades coriónicas descritas en Rong-Hao *et al*, Human Reproduction 11:1328-1333, 1996.

60 En una realización alternativa, las células somáticas pueden ser las células derivadas de vellosidades coriónicas descritas en el documento WO2003/042405.

En una realización alternativa, las células somáticas pueden ser las células derivadas del páncreas descritas en WO2006/094286, asignadas a LifeScan, Inc.

65 En una realización alternativa, las células madre pluripotentes se pueden formar a partir de las células

descritas en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 12/108.872, asignada a LifeScan, Inc.

En una realización, el medio acondicionado se genera mediante un método que esencialmente implica:

- 5 a. Cultivar células que suministran factores condicionantes,
- b. Agregar un medio base a las células,
- c. Exponer el medio base a las células durante un período de tiempo suficiente para acondicionar el medio, y
- 10 d. Eliminar el medio acondicionado.

En una realización, el medio acondicionado se genera mediante un método que esencialmente implica:

- 15 a. Cultivar células que suministran factores condicionantes,
- b. Inactivar las células,
- c. Resembrar las células que suministran factores acondicionadores,
- 20 d. Agregar un medio base a las células,
- e. Exponer el medio base a las células por un período de tiempo suficiente para acondicionar el medio,
- 25 f. Eliminar el medio acondicionado, y
- g. Eliminar el medio acondicionado.

30 "Medio base" como se usa en el presente documento se refiere a una solución de sales y nutrientes que es eficaz para soportar el crecimiento de células no pluripotentes en cultivo.

"Medio acondicionado" como se usa en el presente documento se refiere a un medio base que se complementa con factores solubles derivados de células sustentadoras.

35 "Células sustentadoras", como se usa en el presente documento, se refiere a células madre no pluripotentes en las que se siembran células madre pluripotentes. Las células madre no pluripotentes proporcionan un entorno propicio para el crecimiento de las células madre pluripotentes en placas.

40 El medio base utilizado para el acondicionamiento puede tener cualquiera de varias fórmulas diferentes. El medio debe ser capaz de soportar la propagación de al menos la línea celular utilizada para el acondicionamiento del medio. Es conveniente que el medio también soporte la propagación de las células madre pluripotentes después del acondicionamiento. Sin embargo, como alternativa, el medio puede complementarse con otros factores o procesarse después del acondicionamiento para adaptarlo a la propagación de las células madre pluripotentes.

45 Para propagar células madre pluripotentes en un cultivo sin alimentador, se pueden preparar medios de base adecuados, a partir de los siguientes componentes, tales como, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Gibco nº 11965-092; medio de Eagle knockout modificado por Dulbecco (KO DMEM), Gibco nº 10829-018; Medio base DMEM F12/50% de Ham; 200 mM de L-glutamina, Gibco nº 15039-027; solución de aminoácidos no esenciales, Gibco 11140-050;  $\beta$ -mercaptoetanol, Sigma nº M7522; factor de crecimiento de fibroblastos básicos humanos recombinantes (bFGF), Gibco nº 13256-029.

50 El medio base se combina con las células usadas para acondicionar el medio en un entorno que permite que las células liberen en el medio los componentes que propagan las células madre pluripotentes. Opcionalmente, las células usadas para acondicionar el medio pueden inactivarse (es decir, hacerse incapaces de replicación sustancial) mediante, por ejemplo, radiación, tratamiento con un inactivador químico, tal como, por ejemplo, mitomicina c, o mediante cualquier otro método eficaz. La inactivación de las células no es necesaria en los casos en que el medio se separa de las células acondicionadoras antes de su uso en el soporte de cultivos de células madre pluripotentes.

60 Las células usadas para acondicionar el medio se cultivan en el medio durante el tiempo suficiente para permitir una concentración adecuada de factores liberados (o el consumo de componentes de los medios) para producir un medio que apoya la propagación de células madre pluripotentes sin diferenciación. Típicamente, el medio acondicionado mediante cultivo durante 24 horas a 37°C produce un medio que permite el cultivo de células madre pluripotentes durante 24 horas. Sin embargo, el período de cultivo puede ajustarse hacia arriba o hacia abajo, determinando empíricamente (o analizando la concentración de factores esenciales) lo que constituye un período adecuado. Después de recoger un lote de medio acondicionado, las células se pueden usar para acondicionar un

lote adicional de medio durante un período de cultivo adicional, durante tantos ciclos como se desee, siempre que las células conserven su capacidad para acondicionar el medio de una manera adecuada.

### Expansión y cultivo de las células madre pluripotentes inducidas

Las células madre pluripotentes pueden expresar uno o más de los antígenos embrionarios de etapa específica (SSEA) 3 y 4, y marcadores detectables usando anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81 (Thomson *et al.*, Science 282: 1 145, 1998). La diferenciación de células madre pluripotentes *in vitro* da como resultado la pérdida de expresión de SSEA-4, Tra 1-60 y Tra 1-81 (si está presente) y una expresión aumentada de SSEA-1. Las células madre pluripotentes indiferenciadas típicamente tienen actividad de fosfatasa alcalina, que puede detectarse fijando las células con paraformaldehído al 4%, y luego desarrollándose con Vector Red como sustrato, según lo descrito por el fabricante (Vector Laboratories, Burlingame Calif). Las células madre pluripotentes indiferenciadas también expresan típicamente OCT4 y TERT, tal como se detecta mediante RT-PCR.

Otro fenotipo deseable de células madre pluripotentes propagadas es un potencial para diferenciarse en células de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y tejidos de ectodermo. La pluripotencia de las células madre pluripotentes se puede confirmar, por ejemplo, inyectando células en ratones inmunodeficientes combinados (SCID), fijando los teratomas que se forman usando paraformaldehído al 4% y examinándolos histológicamente para detectar la presencia de tipos de células de las tres capas germinales. Alternativamente, la pluripotencia puede ser determinada por la creación de cuerpos embrioides y evaluando los cuerpos embrioides para la presencia de marcadores asociados con las tres capas germinales.

Las líneas de células madre pluripotentes propagadas se pueden cariotipar usando una técnica estándar de bandas G y se pueden comparar con cariotipos publicados de las especies de primates correspondientes. Es deseable obtener células que tengan un "cariotipo normal", lo que significa que las células son euploides, en donde todos los cromosomas humanos están presentes y no se alteran notablemente.

#### Cultivo de células madre pluripotentes

Células madre pluripotentes formadas por los métodos de la presente invención se cultivan sobre una capa de células sustentadoras que apoyan las células madre pluripotentes de diversas maneras. Alternativamente, las células madre pluripotentes formadas por los métodos de la presente invención se cultivan en un sistema de cultivo que está esencialmente libre de células sustentadoras, pero no obstante soporta la proliferación de células madre pluripotentes sin experimentar una diferenciación sustancial. El crecimiento de las células madre pluripotentes formadas por los métodos de la presente invención en un cultivo libre de alimentadores sin diferenciación se apoya usando un medio acondicionado mediante el cultivo previo con otro tipo de célula. Alternativamente, el crecimiento de las células madre pluripotentes formadas por los métodos de la presente invención en un cultivo sin alimentador sin diferenciación se apoya usando un medio químicamente definido.

Por ejemplo, Reubinoff *et al.* (Nature Biotechnology 18: 399 - 404 (2000)) y Thompson *et al.* (Science, 6 de noviembre de 1998: Vol. 282, n° 5391, páginas 1145 - 1147) describen el cultivo de líneas de células madre pluripotentes de blastocistos humanos usando una capa de células sustentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón.

Richards *et al.* (Stem Cells 21: 546-556, 2003) evaluaron un panel de 11 diferentes capas de células sustentadoras adultas, fetales y neonatales humanas por su capacidad para soportar el cultivo de células madre pluripotentes humanas. Richards *et al.* afirman: "las líneas de células madre embrionarias humanas cultivadas en alimentadores de fibroblastos de piel adulta retienen la morfología de células madre embrionarias humanas y permanecen pluripotentes".

El documento US20020072117 da a conocer líneas celulares que producen medios que soportan el crecimiento de células madre pluripotentes de primates en un cultivo sin alimentación. Las líneas celulares empleadas son líneas celulares mesenquimales y similares a fibroblastos obtenidas de tejido embrionario o diferenciadas de células madre embrionarias. El documento US20020072117 también describe el uso de las líneas celulares como una capa primaria de células sustentadoras.

En otro ejemplo, Wang *et al.* (Stem Cells 23: 1221-1227, 2005) describen métodos para el crecimiento a largo plazo de células madre pluripotentes humanas en capas de células sustentadoras derivadas de células madre embrionarias humanas.

En otro ejemplo, Stojkovic *et al.* (Stem Cells 2005 23: 306-314, 2005) describen un sistema de células sustentadoras derivado de la diferenciación espontánea de células madre embrionarias humanas.

En un ejemplo adicional, Miyamoto *et al.* (Stem Cells 22: 433-440, 2004) describen una fuente de células sustentadoras obtenidas de placenta humana.



Amit *et al.* (Biol. Reprod 68: 2150-2156, 2003) describen una capa de células sustentadoras derivada del prepucio humano.

5 En otro ejemplo, Inzunza *et al.* (Stem Cells 23: 544-549, 2005) describen una capa de células sustentadoras de fibroblastos de prepucio humanos postnatales.

10 El documento US6642048 describe medios que soportan el crecimiento de células de tallo pluripotentes de primates (pPS) en un cultivo sin alimentación, y líneas celulares útiles para la producción de tales medios. El documento US6642048 establece que: "Esta invención incluye líneas celulares mesenquimales y similares a fibroblastos obtenidas de tejido embrionario o diferenciadas de células madre embrionarias. Métodos para derivar tales líneas celulares, medios de procesamiento y células madre en crecimiento utilizando los medios acondicionados se describen e ilustran en esta descripción "

15 En otro ejemplo, el documento WO2005014799 divulga un medio acondicionado para el mantenimiento, la proliferación y la diferenciación de células de mamíferos. El documento WO2005014799 establece que: "El medio de cultivo producido de acuerdo con la presente invención está condicionado por la actividad de secreción celular de células murinas, en particular, aquellos hepatocitos transgénicos diferenciados e inmortalizados, denominados MMH (Met Murine Hepatocyte)".

20 In otro ejemplo, Xu *et al.* (Stem Cells 22: 972-980, 2004) divulga un medio acondicionado obtenido a partir de derivados de células madre embrionarias humanas que han sido genéticamente modificadas para sobreexpresar la transcriptasa inversa de la telomerasa humana.

25 En otro ejemplo, el documento US20070010011 da a conocer un medio de cultivo definido químicamente para el mantenimiento de células madre pluripotentes.

30 Un sistema de cultivo alternativo emplea medio libre de suero complementado con factores de crecimiento capaces de promover la proliferación de células madre embrionarias. Por ejemplo, Cheon *et al.* (BioReprod DOI: 10.1095/biolreprod.105.046870, 19 de octubre de 2005) describen un sistema de cultivo libre de suero libre de alimentación en el que las células madre embrionarias se mantienen en medio de reemplazo sérico (SR) no condicionado complementado con diferentes factores de crecimiento capaces de desencadenar la autorrenovación de células madre embrionarias.

35 En otro ejemplo, Levenstein *et al.* (Stem Cells 24: 568-574, 2006) describen métodos por el cultivo a largo plazo de las células madre embrionarias humanas en ausencia de fibroblastos o medio acondicionado, utilizando medios suplementados con bFGF.

40 En otro ejemplo, US20050148070 da a conocer un método de cultivo de células madre embrionarias humanas en medio definido sin suero y sin células sustentadoras de fibroblastos, comprendiendo el método: el cultivo de las células madre en un medio de cultivo que contienen la albúmina, aminoácidos, vitaminas, minerales, al menos una transferrina o sustituto de transferrina, al menos una insulina o sustituto de insulina, el medio de cultivo esencialmente libre de suero fetal de mamífero y que contiene al menos aproximadamente 100 ng/ml de un factor de crecimiento de fibroblastos capaz de activar un receptor de señalización de factor de crecimiento de fibroblastos, en el que el factor de crecimiento proviene de una fuente diferente a capa de alimentación de fibroblastos, el medio apoyó la proliferación de células madre en un estado indiferenciado sin células sustentadoras o medio acondicionado.

45 En otro ejemplo, US20050233446 da a conocer un medio definido útil en el cultivo de células madre, incluyendo células madre primordiales de primates no diferenciadas. En solución, el medio es sustancialmente isotónico en comparación con las células madre que se cultivan. En un cultivo dado, el medio particular comprende un medio de base y una cantidad de cada uno de bFGF, insulina y ácido ascórbico necesarios para soportar el crecimiento sustancialmente indiferenciado de las células madre primordiales.

50 En otro ejemplo, US6800480 afirma que "En una realización, se proporciona un medio de cultivo celular para el cultivo de células madre primordiales de primates derivado en un estado sustancialmente no diferenciado que incluye una presión osmótica baja, medio básico de endotoxina baja que es eficaz para apoyar la crecimiento de células madre primordiales derivadas de primates. El medio básico se combina con un suero nutriente efectivo para apoyar el crecimiento de células madre primordiales derivadas de primates y un sustrato seleccionado del grupo que consiste en células sustentadoras y un componente de matriz extracelular derivado de células sustentadoras. El medio incluye además aminoácidos no esenciales, un antioxidante y un primer factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en nucleósidos y una sal de piruvato.

55 En otro ejemplo, US20050244962 afirma que: "En un aspecto, la invención proporciona un método de cultivo de células madre embrionarias de primates. Se cultiva las células madre en un cultivo esencialmente libre de suero fetal de mamífero (preferiblemente también esencialmente libre de cualquier suero animal) y en presencia de factor de crecimiento de fibroblastos que se suministra desde una fuente que no sea simplemente una capa de

alimentación de fibroblastos. En una forma preferida, la capa de alimentación de fibroblastos, previamente requerida para mantener un cultivo de células madre, se vuelve innecesaria mediante la adición de suficiente factor de crecimiento de fibroblastos".

5 En un ejemplo adicional, WO2005065354 da a conocer un medio de cultivo definido isotónico que es esencialmente libre de alimentador y libre de suero, que comprende: a. un medio basal; b. una cantidad de bFGF suficiente para soportar el crecimiento de células madre de mamífero sustancialmente indiferenciadas; c. una cantidad de insulina suficiente para soportar el crecimiento de células madre de mamífero sustancialmente indiferenciadas; y d. una cantidad de ácido ascórbico suficiente para soportar el crecimiento de células madre de mamífero sustancialmente indiferenciadas.

10 En otro ejemplo, WO2005086845 da a conocer un método para el mantenimiento de una célula madre indiferenciada, dicha reunión comprende la exposición de una célula madre a un miembro de la familia de proteínas beta del factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), un miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o nicotinamida (NIC) en una cantidad suficiente para mantener la célula en un estado indiferenciado en una cantidad suficiente para lograr un resultado deseado.

15 Las células madre pluripotentes formadas por los métodos de la presente invención pueden ser sembradas sobre un sustrato de cultivo adecuado. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es un componente de matriz extracelular, tal como, por ejemplo, los derivados de membrana basal o que pueden formar parte de acoplamiento de ligando-receptor de molécula de adhesión. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es MATRIGEL® (Becton Dickenson). MATRIGEL® es una preparación soluble de las células tumorales Engelbreth-Holm Swarm que se gelifica a temperatura ambiente para formar una membrana basal reconstituida.

20 Otros componentes de la matriz extracelular y el componente de mezclas son adecuados como una alternativa. Dependiendo del tipo de célula que se prolifera, esto puede incluir laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, sulfato de heparano, y similares, solos o en diversas combinaciones.

25 Las células madre pluripotentes formadas por los métodos de la presente invención pueden ser sembradas sobre el sustrato en una distribución adecuada y en presencia de un medio que promueve la supervivencia celular, propagación, y la retención de las características deseables. Todas estas características se benefician de una cuidadosa atención a la distribución de siembra y pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la técnica.

30 Medios de cultivo adecuados pueden estar hechos de los siguientes componentes, tal como, por ejemplo, medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), Gibco n° 11965-092; medio Eagle modificado Knockout de Dulbecco (KO DMEM), Gibco n° 108 29-018; Medio basal DMEM de Ham F12/50%; 200 mM de L-glutamina, Gibco n° 15039-027; solución de aminoácidos no esencial, Gibco 11140-050;  $\beta$ -mercaptoetanol, Sigma n° M7522; factor de crecimiento de fibroblastos básico humano recombinante (bFGF), Gibco n° 13256-029.

#### 40 **Diferenciación de células madre pluripotentes generadas utilizando los métodos de la presente invención**

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

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

50 En otro ejemplo, las células madre pluripotentes formadas utilizando los métodos de la presente invención pueden diferenciarse en hepatocitos de acuerdo con las métodos descritos en la Patente de Estados Unidos 6.458.589.

#### 55 *La diferenciación de células madre pluripotentes formadas utilizando los métodos de la presente invención en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo*

Las células madre pluripotentes formadas utilizando los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante cualquier método en la técnica.

60 Por ejemplo, las células madre pluripotentes formadas utilizando los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos descritos en D'Amour *et al*, Nature Biotechnology 23, 1534 - 1541 (2005).

65 Por ejemplo, las células madre pluripotentes formadas utilizando los métodos de la presente invención se

pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos describen en Shinozaki *et al*, Desarrollo 131, 1651 -1 662 ( 2004).

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

10 Por ejemplo, las células madre pluripotentes formadas utilizando los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos descritos en D'Amour *et al*, Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

15 En otro ejemplo, las células madre pluripotentes formadas utilizando los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 1 1/736,908, asignada a LifeScan, Inc.

En otro ejemplo, las células madre pluripotentes formadas utilizando los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 1 1/779,31 1, asignada a LifeScan, Inc.

20 En otro ejemplo, las células madre pluripotentes formadas utilizando los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 12/493.741, asignada a LifeScan, Inc.

25 En otro ejemplo, las células madre pluripotentes formadas utilizando los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 12/494.789, asignada a LifeScan, Inc.

30 Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo puede determinarse ensayando por la presencia de los marcadores antes y después de seguir un protocolo particular. Las células madre pluripotentes típicamente no expresan tales marcadores. Por lo tanto, la diferenciación de células pluripotentes se detecta cuando las células comienzan a expresarlas.

35 *La diferenciación de células madre pluripotentes formadas utilizando los métodos de la presente invención en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático*

Las células madre pluripotentes formadas utilizando los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático mediante cualquier método en la técnica.

40 Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático según los métodos descritos en D'Amour *et al*, Nature Biotechnology 24, 1392 -1 401 (2006).

45 Por ejemplo, células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con un factor de crecimiento de fibroblastos y el inhibidor de la vía de señalización de hedgehog KAAD-ciclopamina, retirando luego el medio que contiene el factor de crecimiento de fibroblastos y KAAD-ciclopamina y, posteriormente, se cultivan las células en un medio que contiene ácido retinoico, un factor de crecimiento de fibroblastos y KAAD-ciclopamina. Un ejemplo de este método se describe en Nature Biotechnology 24, 1392 -1 401 (2006).

55 Por ejemplo, células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian además en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con ácido retinoico un factor de crecimiento de fibroblastos durante un período de tiempo, de acuerdo con las métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/736,908, asignada a LifeScan, Inc.

60 Por ejemplo, células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo obtenido de acuerdo con métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con ácido retinoico (Sigma-Aldrich, MO) y la exendina 4 , retirando luego el medio que contiene DAPT (Sigma-Aldrich, MO) y exendina 4 y posteriormente cultivando las células en medio que contiene exendina 1, IGF-1 y HGF. Un ejemplo de este método se describe en Nature Biotechnology 24, 1392 -1 401 (2006).

65

Por ejemplo, células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el cultivo de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene exendina 4, retirando luego el medio que contiene exendina 4 y cultivando posteriormente las células en medio que contiene exendina 1, IGF-1 y HGF. Un ejemplo de este método se describe en D'Amour *et al*, Nature Biotechnology, 2006.

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

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenidos según los métodos de la presente invención están además diferenciados en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el cultivo de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene exendina 4. Un ejemplo de esto método se describe en D'Amour *et al*, Nature Biotechnology, 2006.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la ruta de señalización de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/736,908, asignada a LifeScan, Inc.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la ruta de señalización de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/779,311, asignada a LifeScan, Inc.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la ruta de señalización de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 60/953,178, asignada a LifeScan, Inc.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la ruta de señalización de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 60/990,529, asignada a LifeScan, Inc.

Los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se seleccionan del grupo que consiste en SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox de tipo mezcla, FGF4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 y OTX2. Adecuada para uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo es una célula precursora de raya primitiva. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje definitivo del endodermo es una célula mesendodérmica. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje definitivo del endodermo es una célula endodérmica definitiva.

Los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se seleccionan del grupo que consiste en PDX1, HNF1 beta, PTF1 alfa, HNF6, HB9 y PROX1. Adecuada para el uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático es una célula endodérmica pancreática.

*La diferenciación de células madre pluripotentes formadas utilizando los métodos de la presente invención en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático*

Las células madre pluripotentes formadas utilizando los métodos de la presente invención se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático mediante cualquier reunión de la técnica.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el cultivo de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene exendina 4, eliminando luego el medio que contiene exendina 4 y, posteriormente, cultivando las células en medio que contiene exendina 1, IGF-1 y HGF. Un ejemplo de este método se describe en D'Amour *et al*, Nature Biotechnology, 2006.

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

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

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la ruta de señalización de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/736,908, asignada a LifeScan, Inc.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la ruta de señalización de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/779,311, asignada a LifeScan, Inc.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con métodos de la presente invención están además diferenciadas en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la ruta de señalización de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 60/953,178, asignada a LifeScan, Inc.

Por ejemplo, células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la ruta de señalización de Notch, de acuerdo con los objetivos descritos en la solicitud de patente de EE. UU. No. 60/990,529, asignada a LifeScan, Inc.

Los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo que consiste en NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4, NGN3 y PTF-1 alfa. En una realización, una célula endocrina pancreática es capaz de expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático. Adecuada para uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endocrino pancreático es una célula endocrina pancreática. La célula endocrina pancreática puede ser una célula que expresa una hormona pancreática. Alternativamente, la célula endocrina pancreática puede ser una célula secretora de la hormona pancreática.

En un aspecto de la presente invención, la célula endocrina pancreática es una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células  $\beta$ . Una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células  $\beta$  expresa PDX1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN3, NKX2.2, NKX 6.1, NEUROD, ISL1, HNF3 beta, MAFA, PAX4 y PAX6. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células  $\beta$  es una célula  $\beta$ .

## Terapias

En un aspecto, se proporcionan métodos para el tratamiento de un paciente que padece o está en riesgo de desarrollar diabetes tipo 1. En una realización, el diámetro exterior conocido implica la generación de células madre pluripotentes a partir de células somáticas, cultivando las células madre pluripotentes, diferenciando las células madre pluripotentes *in vitro* en un linaje de células  $\beta$  e implantando las células de un linaje de células  $\beta$  en un paciente.

Si es apropiado, el paciente puede ser tratado adicionalmente con agentes farmacéuticos o bioactivos que facilitan la supervivencia y la función de las células trasplantadas. Estos agentes pueden incluir, por ejemplo, insulina, miembros de la familia TGF- $\beta$ , que incluyen TGF- $\beta$ 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, -7, -8, -10, -15), factor de crecimiento derivado de células endoteliales vasculares (VEGF) pleiotrofina, endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, péptido similar a glucagón-I (GLP-1) y II, el mimeticuerpo GLP-1 y 2, Exendina-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, inhibidores de MAPK, tales como, por ejemplo, compuestos divulgados en la solicitud publicada de EE.UU. 2004/0209901 y la solicitud publicada de EE.UU. 2004/0132729.

Las células madre pluripotentes generadas a partir de células somáticas se pueden diferenciar en una célula que produce insulina antes del trasplante en un receptor. En una realización específica, las células madre pluripotentes generadas a partir de células somáticas se diferencian completamente en células  $\beta$ , antes del trasplante en un receptor. Alternativamente, las células madre pluripotentes se pueden trasplantar a un receptor en un estado indiferenciado o parcialmente diferenciado. Una mayor diferenciación puede tener lugar en el receptor.

Las células endodérmicas definitivas o, alternativamente, células endodérmicas pancreáticas, o, alternativamente, las células  $\beta$  pueden implantarse como células dispersas o formarse en grupos que pueden infundirse en la vena porta hepática. Alternativamente, las células se pueden proporcionar en soportes poliméricos biocompatibles degradables, dispositivos porosos no degradables o encapsularse para proteger frente a la respuesta inmune del huésped. Las células se pueden implantar en un sitio apropiado en un receptor. Los sitios de implantación incluyen, por ejemplo, el hígado, el páncreas natural, el espacio subcapsular renal, el epiplón, el peritoneo, el espacio subseroso, el intestino, el estómago o un bolsillo subcutáneo.

Para mejorar la diferenciación adicional, la supervivencia o la actividad de las células implantadas, factores adicionales, tales como factores de crecimiento, antioxidantes o agentes antiinflamatorios, pueden administrarse antes, simultáneamente o después de la administración 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 expuestos a las células administradas *in situ*. Las células implantadas pueden ser inducidas para diferenciarse por cualquier combinación de factores de crecimiento administrados endógena y exógenamente conocidos en la técnica.

La cantidad de células utilizadas en la implantación depende de varios factores diversos que incluyen la condición del paciente y la respuesta a la terapia, y puede ser determinada por un experto en la técnica.

En un aspecto, esta invención proporciona un método para el tratamiento de un paciente que sufre de, o está en riesgo de desarrollar diabetes. Este método implica el cultivo de células madre pluripotentes, diferenciando las células cultivadas *in vitro* en un linaje de células  $\beta$  e incorporando las células en un soporte tridimensional. Las células pueden mantenerse *in vitro* en este soporte antes de la implantación en el paciente. Alternativamente, el soporte que contiene las células puede ser implantado directamente en el paciente sin cultivo adicional *in vitro*. El soporte puede incorporarse opcionalmente con al menos un agente farmacéutico que facilita la supervivencia y la función de las células trasplantadas.

Los materiales de soporte adecuados para uso para los fines de la presente invención incluyen modelos tisulares, conductos, barreras y depósitos útiles para la reparación de tejidos. En particular, materiales sintéticos y naturales en forma de espumas, esponjas, geles, hidrogeles, textiles y estructuras no tejidas, que se han utilizado *in vitro* e *in vivo* para reconstruir o regenerar tejido biológico, así como para administrar agentes quimiotácticos para inducir el crecimiento del tejido, son adecuados para uso en la práctica de los métodos de la presente invención. Véanse, por ejemplo, los materiales descritos en la patente de EE.UU. 5.770.417, la patente de EE.UU. 6.022.743, la patente de EE.UU. 5.567.612, la patente de EE.UU. 5.759.830, la patente de EE.UU. 6.626.950, la patente de EE.UU. 6.534.084, la patente de EE.UU. 6.306.424, la patente de EE.UU. 6.365.149, la patente de EE.UU. 6.599.323, patente de EE.UU. 6.656.488, solicitud publicada de EE.UU. 2004/0062753 A1, patente de EE.UU. 4.557.264 y patente de EE.UU. 6.333.029.

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 revestirse 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, se pueden agregar excipientes 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, compuestos descritos en la patente de EE.UU. 6.509.369.

El soporte se puede incorporar con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto anti-apoptótico, tales como, por ejemplo, los compuestos descritos en la patente US 6.793.945.

El soporte también se puede incorporar con al menos un compuesto farmacéutico que es un inhibidor de fibrosis, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en la patente US 6.331.298.

El soporte también se puede incorporar con al menos un compuesto farmacéutico que es capaz de aumentar la angiogénesis, tal como, por ejemplo, compuestos descritos en la solicitud publicada de EE.UU. 2004/0220393 y la solicitud publicada de EE.UU. 2004/0209901.

El soporte también se puede incorporar con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto inmunosupresor, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en la solicitud publicada de EE.UU. 2004/0171623.

El soporte también se puede incorporar con al menos un compuesto farmacéutico que es un factor de crecimiento, tal como, por ejemplo, miembros de la familia TGF- $\beta$ , incluyendo TGF- $\beta$ 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 derivado de células endoteliales vasculares (VEGF), pleiotrofina, endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, factor 1-alfa inducible por hipoxia, péptido-1 similar a glucagón (GLP-1), mimeticuerpo GLP-1 y GLP-2, y II, Exendina-4, nodal, noggin, NGF, ácido retinoico, hormona paratiroidea, tenascina-C, tropoelastina, péptidos derivados de trombina, catelicidinas, defensinas, laminina, péptidos biológicos que contienen dominios de unión celular y heparina de proteínas adhesivas de la matriz extracelular como fibronectina y vitronectina, inhibidores de MAPK, tales como, por ejemplo, los compuestos divulgados en la solicitud publicada de EE.UU. 2004/0209901 y la 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 en el andamio. Las células pueden entrar en el andamio por difusión simple (J. Pediatr. Surg. 23 (1 Pt 2): 3-9 (1988)). Varios otros enfoques se han desarrollado para mejorar la eficacia de la siembra celular. Por ejemplo, se han usado matraces giratorios en la siembra de condrocitos sobre andamios de ácido poliglicólico (Biotechnol. Prog. 14 (2): 193-202 (1998)). Otro enfoque para sembrar células es el uso de centrifugación, que produce un estrés mínimo para las células sembradas y mejora la eficacia de la siembra. Por ejemplo, Yang *et al.* desarrollaron un método de siembra de células (J. Biomed. Mater. Res. 55(3): 379-86 (2001)), denominado Inmovilización Centrifugacional de Células (ICC).

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero no se limita a los siguientes ejemplos.

## EJEMPLOS

### Ejemplo de referencia 1

#### Generación de células madre pluripotentes a partir de células somáticas con células sustentadoras usando el kit de factor de transfección humana STEMAGENT™

Usando el método indicado en el kit de factor de transfección humano Stemgent™, se generaron células madre pluripotentes de células fibroblásticas adultas de prepucio, utilizando el Stemgent™ Human TF Lentivirus Set (Cat. N° 00-0005). Las células CRL2522 de ATCC (fibroblastos de prepucio humano denominados células "BJ" en el protocolo Stemgent) se plaquearon en una placa de 6 pocillos en medio de crecimiento a una densidad de 100.000 células/pocillo que resultó en una confluencia de 40-50%. Los medios de crecimiento consistieron en 450 ml de EMEM, 50 ml de FBS codificado por ES, 5 ml de 10mM de aminoácidos no esenciales, 5 ml de penicilina (10.000 U/ml)-estreptomicina (10.000  $\mu$ g/ml), 5 ml de 200 mM de L-glutamina, y 0,9 ml de 55 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol (denominado aquí medio de crecimiento de células BJ). El día después de plaquear las células, los medios se cambiaron a medio de crecimiento de células BJ frescas más polibreno y lentivirus en un volumen total de 2,5 ml (Condiciones n.º 1 y n.º 2, tabla 1). El fabricante determinó el título vírico de Lentivirus utilizando el ensayo ELISA de antígeno de cápside p24. Los títulos virales fueron los siguientes: título de SOX2-Lentivirus: 68,80 g/ml; Título de OCT4-Lentivirus: 6,64ng/ml; título de LIN28-Lentivirus- 68,80ng/ml; y título de NANOG-Lentivirus- 82,80ng/ml.

Después de asegurar que el medio se distribuyó uniformemente por balanceo suave de la placa de cultivo celular, las células se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Veinticuatro horas después de la transducción, las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 200 xg durante 5 minutos, se resuspendieron en medio de crecimiento de células BJ, y re-sembraron en 3 pocillos de un pocillo 6 a una proporción de siembra de 1 a 3 en las células sustentadoras CF-1 MEF sembradas el día anterior. Las células CRL2522 viralmente transducidas se incubaron en las células sustentadoras durante la noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Veinticuatro horas después de volver a sembrarse, se reemplazó el medio de crecimiento de células BJ por medio de cultivo celular ES/iPS humano (que comprende medio DMEM-F12-200 ml, sustituto de suero knockout- 50ml, 200mM de L-glutamina + solución 2-mercaptoetanol- 1,25 ml, aminoácidos no esenciales Solución 100X - 2,5 ml, y Solución B-FGF- 4ng/ml concentración final). El medio de cultivo de células ES/iPS se cambió todos los días durante los primeros siete días. Después de siete días, el medio se reemplazó por medio acondicionado MEF (MEFCM). MEFCM se generó al exponer el medio de cultivo celular ES/iPS a fibroblastos embrionarios de ratón.

Después de treinta y ocho días en cultivo las células se pasaron enzimáticamente con dispasa a MATRIGEL™ en MEFCM suplementado con 10ng/ml de bFGF y 5µM del inhibidor de quinasa Rho Y27632. A partir de entonces, las células se alimentaron diariamente con MEFCM fresco complementado con 10 ng/ml de bFGF. 42 días después de la inducción viral se observaron las primeras colonias pluripotentes pequeñas. El paso de células continuó hasta que mostraron una morfología ES humana típica. Doce líneas clonales fueron generadas. Las líneas celulares se almacenaron y se criopreservaron en el paso 6, y 3 clones ahora han sido pasados en cultivo 15 veces. Los clones mantienen la morfología pluripotente y las características de las células madre pluripotentes. Además, las células pueden ser diferenciadas a las tres capas germinales utilizando el ensayo del cuerpo embrioide, y su diferenciación puede ser dirigida específicamente para formar un endodermo definitivo usando un protocolo definido. Las micrografías de las colonias de células madre pluripotentes típicas se muestran en la Figura 1.

## Ejemplo 2

### Generación de células madre pluripotentes de células somáticas utilizando el kit de factor de transfección humana STEMAGENT™ sin el uso de células sustentadoras

100.000 células derivadas de líquido amniótico aislado de acuerdo con los métodos descritos en la Solicitud de Patente de EE.UU. 1 1/420,895 se sembraron en medios AMNIOMAX™ en un pocillo de 10 cm<sup>2</sup> de una placa de seis pocillos. El día siguiente las células se transdujeron con virus de lentivirus de acuerdo con la condición n° 7 de la tabla 1. Los medios se cambiaron a medio AMNIOMAX™ fresco más lentivirus en un volumen total de 2,5 ml. El fabricante determinó el título vírico de Lentivirus mediante el ensayo de ELISA de antígeno de cápsida p24. Los títulos virales fueron los siguientes: título de SOX2-Lentivirus- 68,80ng/ml; título de OCT4-Lentivirus- 6,64ng/ml; título de LIN28-Lentivirus - 68,80ng/ml; y título de NANOG-Lentivirus- 82,80ng/ml.

La transducción viral utilizada en este ejemplo no usó el agente potenciador de la transducción, polibreno (el día siguiente las células se transdujeron con virus lentivirus de acuerdo con la condición n° 7, tabla 1). El día 3, las células se dividieron y se sembraron en una superficie recubierta con una dilución 1:30 de MATRIGEL™ con MEFCM suplementado con 8 ng/ml de bFGF (MEFCM8) y 5µM del inhibidor ROCK Y27632 para el paso cero (p0). Las células se sembraron en placas y se alimentaron a diario a partir de entonces con MEFCM8 fresco.

Después de una semana en cultivo, las células se pasaron a placas frescas revestidas con MATRIGEL™ 1:30 (primer paso = pi). 10 días más tarde se observaron aproximadamente 20 colonias de células madre embrionarias humanas (Figura 2, A y B). Las colonias más densas de "células madre embrionarias" se seleccionaron manualmente y se combinaron para su aprobación. Este cultivo fue designado como línea AFD1 (Figura 2, C y D). Una colonia individual se seleccionó manualmente para el paso y se designó AFD2.

Las líneas celulares AFD1 y 2 se almacenaron y criopreservaron en el paso 5 y ahora han sido pasadas en cultivo de 11-12 veces y han mantenido morfología pluripotente y las características de las células madre pluripotentes.

## Ejemplo 3

### Generación de células madre pluripotentes de células somáticas usando el kit de factor de transfección humana STEMAGENT™ sin el uso de células sustentadoras

No fue posible derivar células pluripotentes usando una capa alimentadora de células MEF sin el uso de polibreno en células sustentadoras (véanse las Condiciones n.º 3-6, Tabla 1). Las células CRL22429 (células de fibroblastos de prepucio, ATCC, Manassas VA EE.UU.) o células AF se sembraron a una concentración de 100.000 células en pocillos separados de 10 cm<sup>2</sup> de una placa de seis pocillos durante la noche. Al día siguiente, las células se trataron con medio fresco que contenía la cantidad recomendada de virus durante 24 horas sin polibreno. El tercer día las células se trataron con TrypLE y se pasaron a células MEF en medio celular hESC/iPS con 5µM del inhibidor ROCK Y27632 para promover la adhesión. Las poblaciones paralelas de células también se trataron con tres compuestos que se ha informado que mejoran la formación de colonias de células madre pluripotentes: CHIR99021 a 100nM, BIX01294 a 1µM, y R (T)Bay K 8644 a 2µM. Los medios se cambiaron cada día durante 14 días. Los pocillos que contienen alimentadores y células AF exhibieron una muerte significativa después de 14 días en cultivo.

En un intento de rescatar las células, se pasaron por colagenasa a una nueva capa alimentadora en la célula hESC/iPS sin compuestos suplementarios. No se observaron colonias después de tiempo adicional en cultivo. Los pocillos que contenían CRL2429 y las células sustentadoras permanecieron viables después de 6 semanas en cultivo. Después de 6 semanas en cultivo, las células se pasaron a matrigel 1:30 con colagenasa, sin embargo, no se observaron colonias. Independientemente de la adición del compuesto, se observó una muerte celular significativa en cocultivos de células AF con alimentadores en comparación con cocultivos con células CRL2429 y alimentadores.

## Ejemplo 4



### **Caracterización de las células madre pluripotentes derivadas según los métodos de la presente invención**

Las células madre pluripotentes se obtuvieron de acuerdo con los métodos descritos en los Ejemplos 1 y 2. Las células madre pluripotentes se caracterizaron por qRT-PCR, inmunofluorescencia, citometría de flujo y microscopía de contraste de fase para confirmar la expresión génica y la morfología común de las células madre pluripotentes.

Mediante el uso de qRT-PCR (Figura 3) observamos que la expresión de genes característicos de la pluripotencia (OCT4, NANOG, SOX2, TERT y CRIPTO) en la línea celular AFD1 en el pase 4 (p4) estaba en niveles comparables a la línea de células madre embrionarias humanas HI (establecida en un nivel de expresión de 1,0). También notamos que la población original de células AF (AFD), 13 días después de la transducción viral en el pase 1 (pi) pero antes de la aparición de colonias pluripotentes de células, no tenía expresión significativa de SOX2, TERT y CRIPTO, y tenía una expresión muy inferior de NANOG que AFD1 en p4. Estos resultados indican que la expresión de SOX2 y NANOG observada en p4 se debió a la expresión endógena, y no a la construcción viral que es consistente con las observaciones publicadas de que la conversión completa de una célula somática a un estado pluripotente después de la transducción viral requiere silenciamiento del constructo viral. Curiosamente, la expresión de AFD de OCT4 en pi estaba en niveles comparables a la línea hESC HI y se mantuvo alta en p4, lo que sugiere que la expresión de OCT4 temprana y sostenida es necesaria para la adopción de un estado pluripotente.

De manera similar, las células madre pluripotentes derivadas de células CRL2522 también expresaron genes característicos de las células pluripotentes: OCT4, NANOG, FGF4 y CDH1 se expresaron en niveles comparables a la línea de células madre embrionarias humanas HI (ajustada a un nivel de expresión de 1,0) y se expresaron a niveles significativamente más altos que los niveles de expresión observados en la línea celular original CRL2522.

Las células también se caracterizaron mediante microscopía de fase (Figura 2) demostrando que las colonias de células madre pluripotentes AFD1 tenían un centro denso con bordes suaves consistentes con la apariencia de colonia de células madre embrionarias humanas, y una morfología significativamente diferente de la población original de células AF. Cuando se analizaron mediante citometría de flujo en los pasajes 4, 5 y 6, observamos que las células AFD1 tenían una alta expresión superficial de los marcadores característicos de las células madre pluripotentes, incluidas SSEA3, SSEA4, CD9, TRA-160 y TRA-181 (Figura 4), proteínas no expresadas en las células AF originales. También observamos la expresión de SSEA4 por inmunofluorescencia, y los patrones de expresión fueron similares a los observados para OCT4 (Figura 5). Estos resultados fueron consistentes con los patrones de expresión encontrados en la línea de células madre embrionarias humanas HI, y también se replicaron con células madre pluripotentes derivadas de células CRL2522 (Figura 1). Además, la densidad nuclear de las células era significativamente mayor que las células fibroblásticas originales CRL2522 no transducidas, que fueron negativas para la expresión de SSEA4 (Figura 1).

Cuando se analizó mediante citometría de flujo en el pase 6, se observó que las células madre pluripotentes derivadas de células CRL2522 tenían una alta expresión superficial de marcadores característicos de células madre pluripotentes, incluidas SSEA3, SSEA4, CD9, TRA-160 y TRA-181 (Figura 6), proteínas no expresadas en células CRL2522 originales. También observamos la expresión de SSEA4 por inmunofluorescencia, y los patrones de expresión fueron similares a los observados para OCT4 (Figura 1). Estos resultados fueron consistentes con los patrones de expresión encontrados en la línea hESC HI, e indican que derivamos células madre pluripotentes de células de fibroblastos de prepucio humano CRL2522 "BJ" (Figura 1).

### **Ejemplo 5**

#### **Diferenciación de las células madre pluripotentes derivadas según los métodos de la presente invención**

Las células madre pluripotentes generadas a partir de fibroblastos de prepucio humanos o células de líquido amniótico de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferenciaron usando varios diferentes métodos para confirmar su pluripotencia. Las células madre pluripotentes se diferenciaron a las células que expresan marcadores característicos del linaje definitivo del endodermo y las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático. Además, las células madre pluripotentes producidas por los métodos de la presente invención formaron cuerpos embrioides cuando se colocaron en un cultivo en suspensión no adherente.

Las células madre pluripotentes de la presente invención se diferenciaron en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo (DE) tratando las células madre pluripotentes con medio DE, que comprende medio RPMI 1640 que contiene 2% de albumina sérica bovina libre de ácidos grasos (FAFBSA), 20 ng/ml de Wnt3a, 8 ng/ml de bFGF, y 100 ng/ml de activina A. En el día 2 y el día 3 de diferenciación, Wnt3a se eliminó de los medios DE. Después de 3 días en cultivo, las muestras se eliminaron mediante tratamiento con TrypLE™ y se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión del marcador CD184 (la proteína CXCR4) que se correlaciona con la formación de endodermo definitivo. Las células madre pluripotentes derivadas de líquido amniótico 1 y 2 (AFD1 y AFD2) expresaron niveles similares de CXCR4 y CD99, en comparación con las células

madre embrionarias humanas HI cuando se dirigen a diferenciar al endodermo definitivo. Estos resultados fueron confirmados por qRT-PCR, lo que mostró una inducción sorprendentemente similar de los genes característicos de DE (CXCR4, SOX17, GSC, CER1 y FOXA2) frente a la línea HI humana ES (Figura 7).

Se observaron resultados similares con fibroblastos de prepucio humano, células madre pluripotentes derivadas de CRL2522. Se diferenciaron 8 clones de células madre pluripotentes derivadas de CRL2522 en endodermo definitivo, y cada uno expresó niveles elevados del marcador DE, CXCR4, con niveles de expresión que oscilaban entre 23,4% y 58,3% positivos frente a un control celular HI hES que era 60% positivo para CXCR4. (Tabla 2). También se observó que las muestras de células madre pluripotentes derivadas de CRL2522 diferenciadas a DE expresan altos niveles detectados por inmunofluorescencia de SOX 17, un factor de transcripción característico y necesario para el endodermo definitivo (Figura 8). Estos resultados indican que las células madre pluripotentes derivadas de AF y CRL2522 forman un endodermo definitivo, medido por citometría de flujo, qRT-PCR e inmunofluorescencia, a una tasa consistente con la formación de DE por la línea de células madre embrionarias humanas, HI.

En el desarrollo normal, el endodermo definitivo contribuye a múltiples linajes incluyendo pulmón, intestino, hígado, páncreas, timo y tiroides. Dirigimos la diferenciación de DE a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático mediante un protocolo que se ha demostrado que promueve un destino pancreático en células madre embrionarias humanas HI. Las etapas de diferenciación adicional más allá de la primera etapa de formación de DE incluyeron: Etapa 2: medio RPMI 1640 que contiene 2% de FAF BSA, 0,25  $\mu$ M de Sant-1 y 50 ng/ml de FGF-7 durante dos días; Etapa 3: medios de glucosa alta DMEM que contienen 0,5X ITS, 0,1% de BSA, 0,25 $\mu$ M de Sant-1, 50ng/ml de FGF-7, 100 ng/ml de Noggin, 20 ng/ml de Activina A, y 2 $\mu$ M de RA durante cuatro días; Etapa 3.5 - DMEM con alto contenido de glucosa que contiene 0,5X ITS, 0,1% de BSA, 10 ng/ml de FGF-7, y 100 ng/ml de Noggin durante 3 días; Etapa 4-DMEM glucosa alta que contiene 0,5X ITS, 0.1% BSA, 10 ng/ml FGF-7, 100ng/ml Noggin, y 1  $\mu$ M de inhibidor ALK5 durante 3 días; y Etapa 5: medio de glucosa DMEM que contiene 0,5X ITS, 0,1% de BSA, 100 ng/ml de Noggin y 1  $\mu$ M de inhibidor de ALK5 durante 7 días.

Mediante el uso de este método se observó un aumento significativo en la expresión de las hormonas pancreáticas; insulina, glucagón y somatostatina, y un aumento en los factores de transcripción comunes a las células beta de los islotes pancreáticos, incluidos NKX6.1, PDX1 y NEUROD como se ha medido por qRT-PCR en PSCs derivados de tanto líquido amniótico como células CRL2522 (Tabla 3). También observamos la expresión de NKX6.1 y la expresión de PDX1 en células madre pluripotentes derivadas de líquido amniótico diferenciadas a través de la Etapa 5, medida por inmunofluorescencia (Figura 9). Estos resultados indican que las células madre pluripotentes derivadas de células AF o CRL2522 son competentes para formar la capa germinal del endodermo, y pueden ser diferenciadas a un destino pancreático.

Además de determinar la pluripotencia de las células madre pluripotentes derivadas de AF y CRL2522 por diferenciación dirigida, se ensayó si las células podían formar las tres capas germinales usando el ensayo de formación de cuerpos embrioides. Las células madre pluripotentes derivadas de células AF o CRL2522 se cultivaron en una superficie de cultivo revestida con matrigel y se levantaron de la superficie incubando las células con una solución de dispasa al 0,1%, lavando las células con medio DMEM suplementado con 10% de SFB, levantando las células con un raspador de goma y transfiriendo a continuación las células en medio DMEM suplementado con 10% de FBS a una placa de cultivo de unión baja para cultivo en suspensión no adherente. Las células madre pluripotentes cultivadas en cultivo en suspensión en medios que contienen alto suero formarán espontáneamente cuerpos embrioides; estructuras esféricas multicelulares compuestas de los tres linajes de la capa germinal. La formación de los linajes se confirma mediante el ensayo qRT-PCR para la expresión génica común a cada uno de los linajes (mesodermo, endodermo y ectodermo). Las células madre pluripotentes derivadas de células AF o CRL2522 formaron cuerpos embrioides y tenían patrones de expresión génica que indicaban que las tres capas germinales estaban presentes (Figura 10).

Los marcadores de linajes neuronales/ectodérmicos (CDH2 y OTX) fueron elevados, mientras que los marcadores tempranos para mesendodermo (T) y endodermo definitivo (SOX17, AFP, FOXA2 y CXCR4) también fueron elevados, como lo eran los marcadores comunes a mesodermo y endodermo definitivo (GSC, CER1, GATA4 y MIXL1) y también un marcador que se encuentra en las neuronas motoras y las células de los islotes beta (MNX). (Figura 10). Estos resultados indican que las células madre pluripotentes generadas a partir de células AF o CRL2522 eran de hecho pluripotentes y competentes para generar tejidos de cada una de las tres capas germinales.

## Ejemplo 6

### Los efectos de la inhibición de quinasa Rho en el cultivo de las células madre pluripotentes de la presente invención, cuando las células se cultivan en ausencia de células sustentadoras o proteínas de matriz extracelular

La línea de células madre pluripotentes AFD1, se mantuvo en medios condicionados MEF en las placas Nunclon Delta™ tratadas con una dilución 1:30 de MATRIGEL™ reducido por factor de crecimiento antes del estudio. Las células se disociaron de la superficie para el paso mediante una disociación de dispasa de 1 mg/ml.

Después, las células AFD1 se sembraron en pocillos no tratados de placa 4 modificada en superficie (formato de 6 pocillos). En paralelo, las células AFD1 también se sembraron en placas Nunclon Delta™ tratadas con una dilución 1:30 de MATRIGEL™ reducido por factor de crecimiento para proporcionarse como controles positivos. En todos los tratamientos, las células se mantuvieron en medios acondicionados MEF.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

Las células AFD1 sembradas en la placa 4 modificada superficialmente se unieron, sin embargo, la eficacia de unión fue mucho menor que en las placas de control (Figura 11). La eficacia de unión se incrementó en gran medida mediante la adición de un inhibidor de quinasa Rho a los medios. La adición de Y-27632 a una concentración de 10 µM o H1152-glicilo a una concentración de 3µM durante las primeras 24 horas en cultivo aumentó significativamente la eficacia de placas de las células a una tasa similar observada con las placas de control (Figura 11). Después, las células se mantuvieron en una concentración constante de 10 µM de Y-27632 o una concentración reducida de 1µM de H1152-glicilo, respectivamente, con un cambio diario de los medios.

Las células se pasaron dos veces en la placa de superficie modificada 4 en presencia de cualquiera de Y-27632 o H1152-glicilo y se ensayaron para determinar la expresión de genes asociados con la pluripotencia de QRT-PCR (Figura 12). La expresión de genes asociados y requeridos para la pluripotencia (OCT4, NANOG, SOX2, TERT y CRIPTO/TGDF) se mantuvo en células AFD1 cultivadas en superficie modificada 4 frente a células cultivadas en placas de control. También observamos que la expresión relativa de varios genes (AFP, HAND2 y GATA2) asociada con la diferenciación espontánea a ectodermo extra-embriónico o un destino de trofoblasto se redujo significativamente. Esto puede deberse a una mayor expresión de NANOG, que inhibe la diferenciación mediante la supresión de la expresión de genes asociados a ectodermo o a trofoblasto extra embrionarios. Además, esta disminución en la expresión de genes asociados a ectodermo o a trofoblasto extra embrionarios podría ocurrir a través de la adhesión diferencial y la proliferación de células más pluripotentes, y menos diferenciadas, en la superficie modificada 4 frente a placas de control.

La pluripotencia de las células cultivadas en la superficie modificada 4 también se confirmó al examinar su capacidad para diferenciar al endodermo definitivo. Observamos que las células diferenciadas a DE después de cultivar varios pasajes en superficie modificada 4 en medios de cultivo acondicionado MEF complementado con inhibidor de quinasa Rho mostraron una expresión robusta de genes asociados con diferenciación DE, comparable a los niveles de expresión y patrones observados con diferenciación H1 hES a DE (Figura 13). Además, cuando se analizaron mediante citometría de flujo, las células AFD1 cultivadas durante dos pasos con inhibidor de quinasa Rho y diferenciadas en superficie modificada 4 tuvieron 63% de expresión positiva de CXCR4, una proteína de superficie que se correlaciona con la formación definitiva de endodermo, y este nivel de expresión fue constante con niveles de expresión observados en células H1 hES diferenciadas a DE (60% de CXCR4 positivo, Tabla 2).

**Tabla 1: Resumen de las condiciones de transducción utilizadas en la presente invención**

Condición N°	Célula	Alimentador/Matrigel	3 compuestos*	Inhibidor ROCK	Polibreno	PSC	Relación de transducción (vol)
1	CRL2522	Alimentador	no	si <sup>^</sup>	Si <sup>^</sup>	+	1:1:1:1
2	CRL2522	Alimentador	no	si <sup>^</sup>	Si <sup>^</sup>	-	5:1:1:1
3	AF	Alimentador	no	no	no	-	10:1:1:1
4	CRL2429	Alimentador	no	no	no	-	10:1:1:1
5	AF	Alimentador	si	no	no	-	10:1:1:1
6	ARL2429	Alimentador	si	no	no	-	10:1:1:1
7	AF	Matrigel	no	no	no	+	10:1:1:1

<sup>^</sup>2,5µl Polibreno por  
2,5 ml medio

Volumen total  
a 2,5 ml w/  
medio EMEM

	hOCT4	hSOX2	hNANOG	hLIN28
Relación de transducción 1:1:1:1	0,1ml	0,1ml	0,1ml	0,1ml
Relación de transducción 5:1:1:1	0,5ml	0,1ml	0,1ml	0,1ml
Relación de transducción 10:1:1:1	0,5ml	0,05ml	0,05ml	0,05ml

Compuestos*	Conc.
CHIR99021	100nM
BIX01294	1µM
R(T)Bay K 8644	2µM

**Tabla 2: Expresión de marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo tras la diferenciación de células madre pluripotentes derivadas de células CRL2522**

Nº de clon	% CXCR4 positivo	% de H1 normalizado
CL-2	40,2	67,00
CL-3	23,4	39,00
CL-4	39,1	65,17
CL-5	32,2	53,67
CL-6	55,9	93,17
CL-7	48,2	80,33
CL-10	58,3	97,17
CL-12	53,6	89,33
H1 hES	60	100,00

**Tabla 3: Expresión de marcadores característicos del linaje endocrino pancreático tras la diferenciación de células madre pluripotentes derivadas de CRL2522 y células derivadas del fluido amniótico**

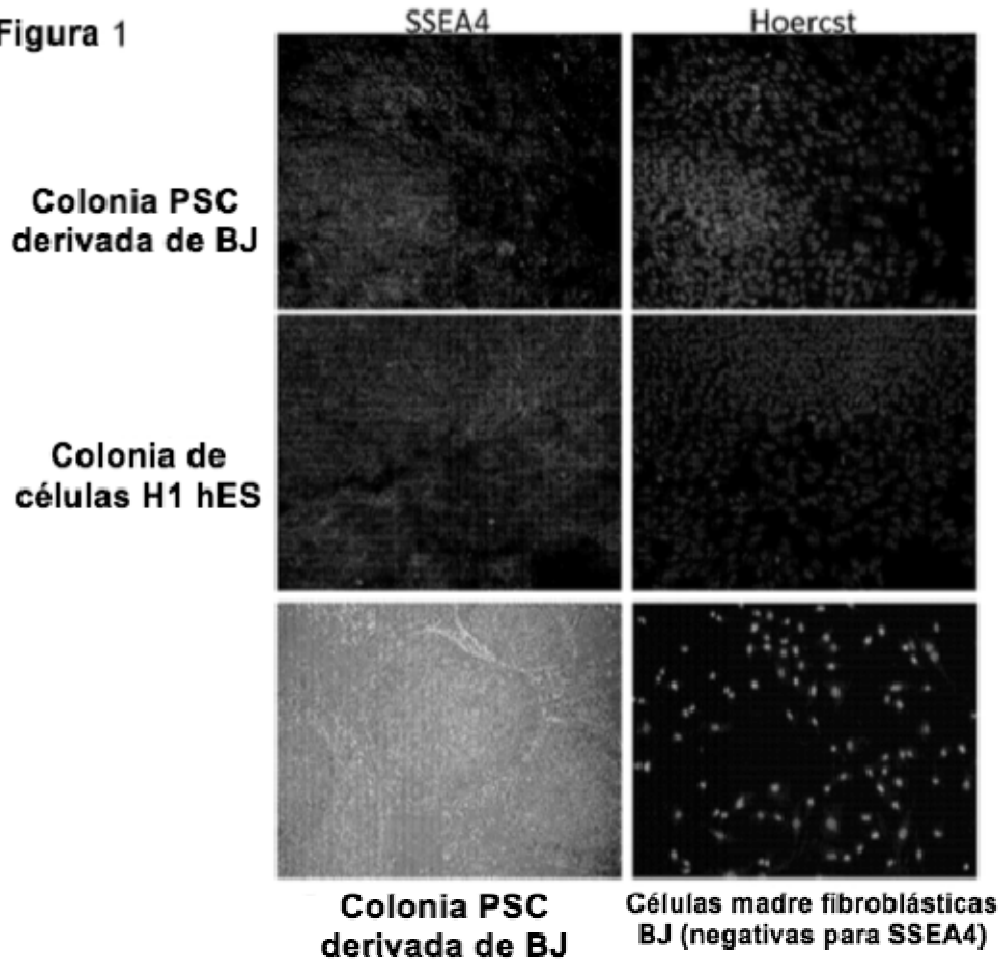
	SST	PDX1	PAX6	PAX4	NKX6.1	NEUROD	INSULINA	GLUCAGON
CL-3	142	4	112	0,0	132	64	1	109
CL-4	182	6	187	0,7	198	74	129	59
CL-5	133	10	212	0,0	190	73	1.000	263
Clones mezclados (N>50)	185	100	122	3,5	162	108	15.566	2.072
AFD1	125	179	83	2	632	218	1.413	2.312
AFD2	110	307	20	12	62	165	2.499	149
H1 diferenciada	8.300	4.164	455	635,3	842	11.824	27.540.234	77.671.635
H1 hES	1	1	1	1,0	1	1	1	1

**Reivindicaciones**

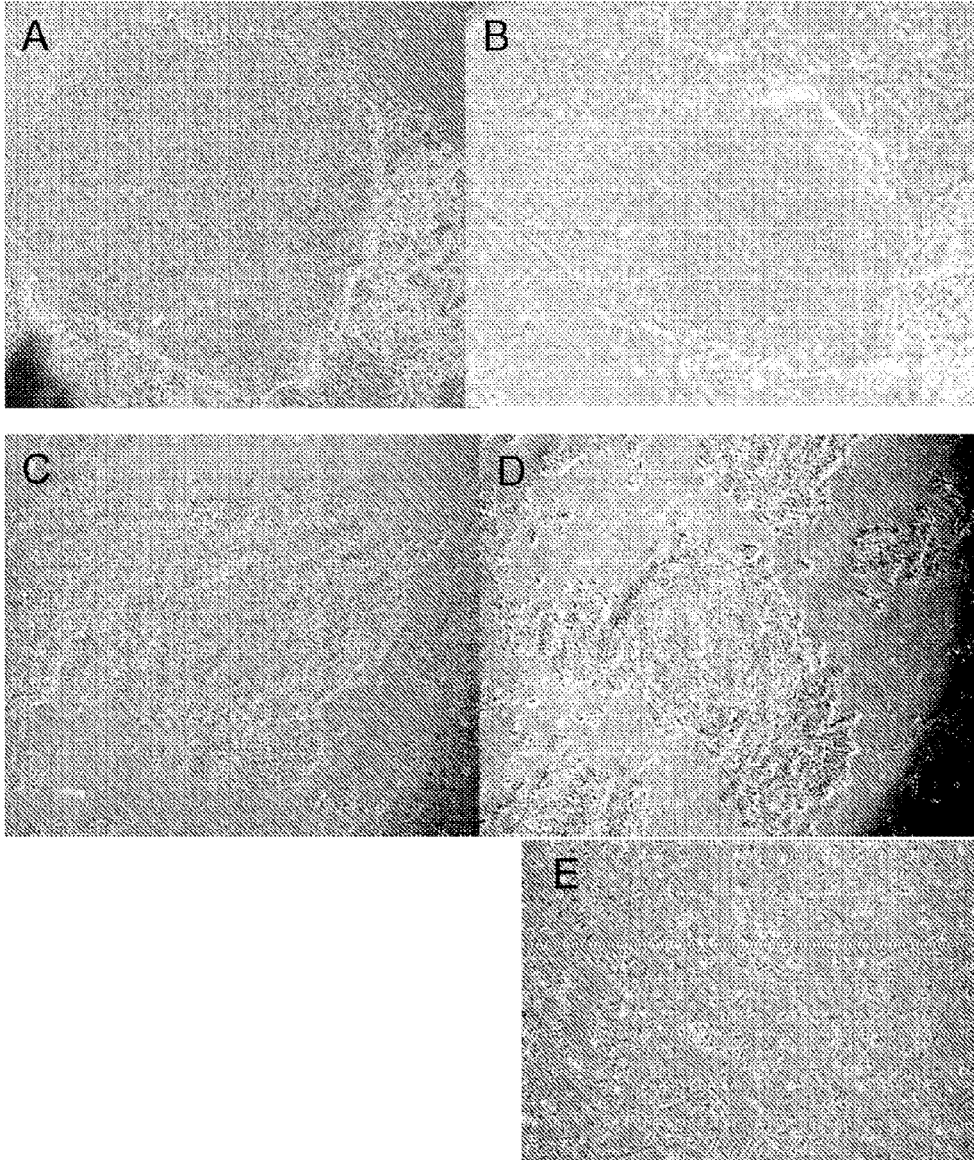
- 5 **1.** Un método para producir células madre pluripotentes de células derivadas del fluido amniótico sin el uso de una capa de células alimentadoras y sin el uso de un agente que aumente la eficiencia de transfección retroviral, comprendiendo;
- 10 a) sembrar células humanas derivadas del fluido amniótico en un sustrato de cultivo de tejido;  
 b) transducir las células sembradas derivadas del fluido amniótico con al menos un retrovirus que contiene ácido nucleico que codifica SOX2, OCT4, LIN28, y NANOG;  
 10 c) cultivar las células transducidas, luego transferir las células transducidas en placas de cultivo de tejidos recubiertas de una proteína de matriz extracelular, y cultivar las células transferidas en medio suplementado con un agente que inhibe la actividad de quinasa Rho, y bFGF, durante una semana; y  
 15 d) pasar las células cultivadas en placas de cultivo de tejido recubiertas de una proteína de matriz extracelular y cultivar las células pasadas en medio acondicionado que contiene factores solubles derivados de células alimentadoras y suplementados con bFGF, en donde las células son transducidas para introducir SOX2, OCT4, LIN28 y NANOG en las células.
- 2.** El método de la reivindicación 1, en donde el retrovirus es un lentivirus.
- 20 **3.** El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde el medio acondicionado es condicionado mediante el uso de fibroblastos embrionarios de ratón.
- 25 **4.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente que inhibe la actividad de quinasa Rho se selecciona del grupo que consiste de: Y-27632, Fasudil, (S)-(+)-4--Glicilo-2-metilo-1-[(4-metilo-5-isoquinolinilo)sulfonilo]-hexahidro-1H-1,4-dihidrocloruro de diazepam (denominada aquí H1152-glicilo) y Hidroxifasudilo.
- 30 **5.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la matriz extracelular comprende uno o más componente(s) del grupo que consiste de: fibronectina, citronectina, laminina, colagen, gelatina, trombospondina o MATRIGEL.
- 6.** El método de la reivindicación 5, en donde la matriz extracelular es MATRIGEL.
- 35 **7.** Un método para producir células que están diferenciadas, por ejemplo células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo y/o células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático y/o células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático utilizando un método que comprende el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

40

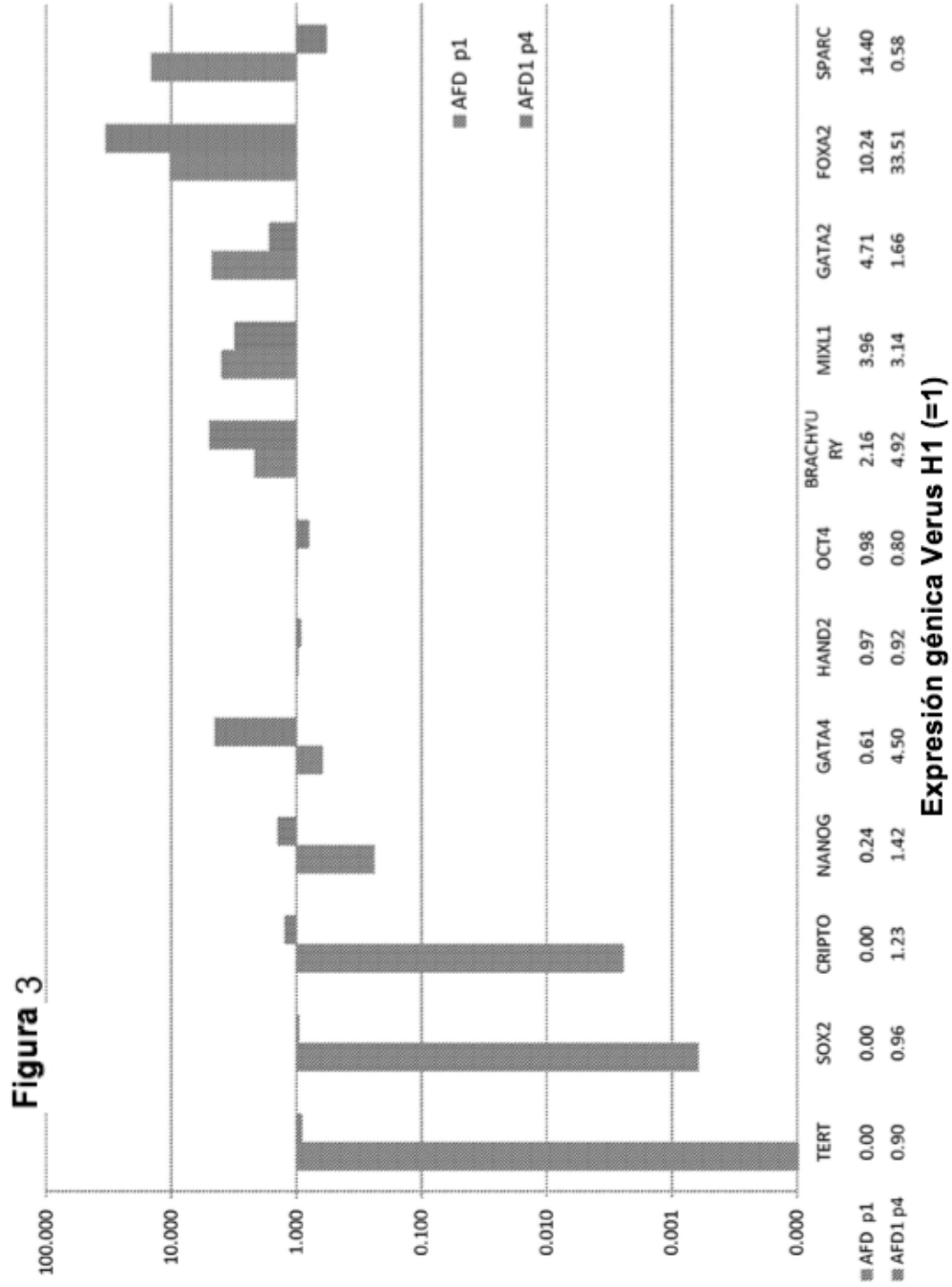
**Figura 1**



**Figura 2**

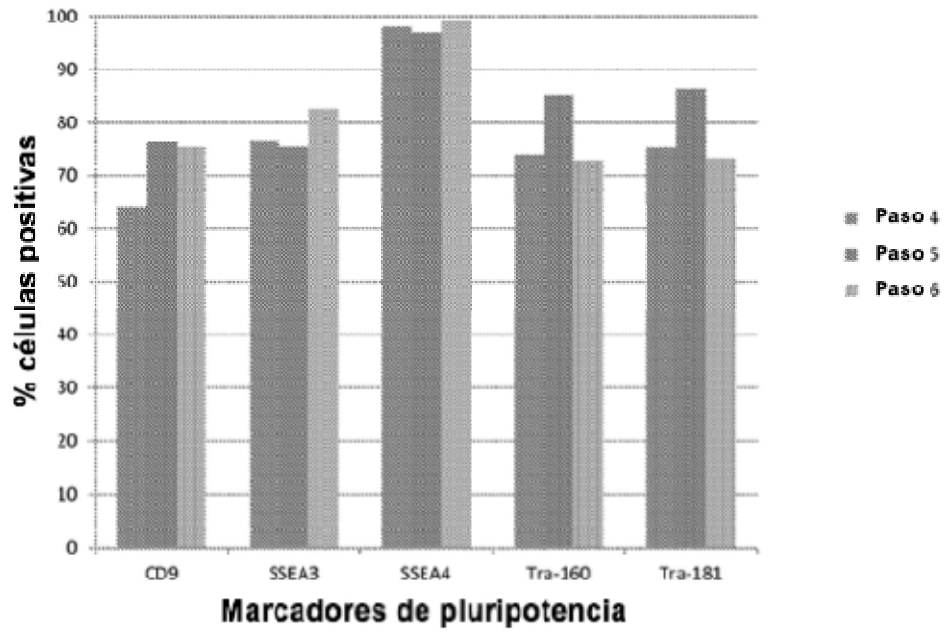






**Figura 4**

**Marcadores de pluripotencia AFD1  
por citometría de flujo**



**Figura 5**

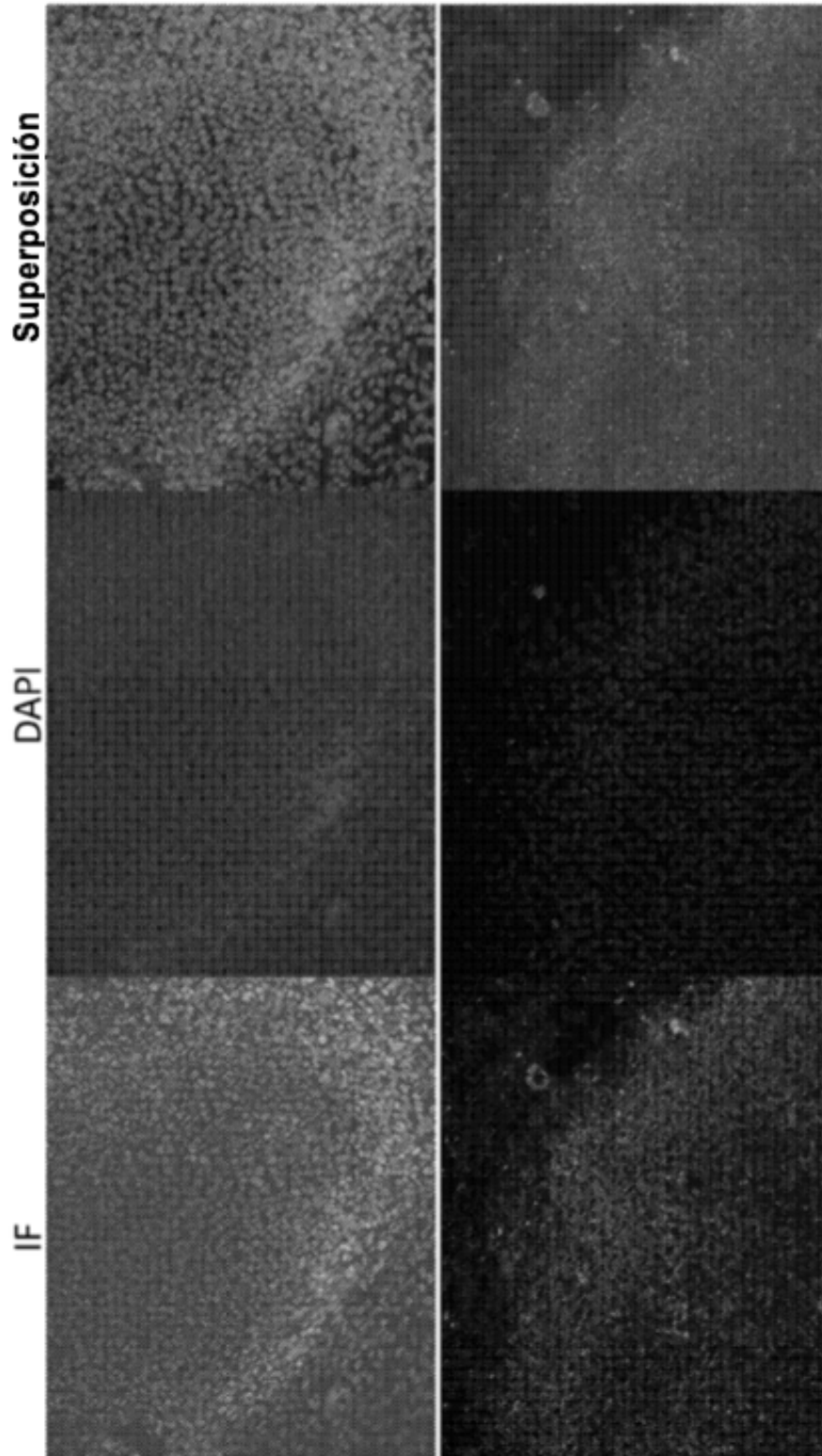


Figura 6

**Expresión PSC derivada hFF (BJ)  
de marcadores de pluripotencia**

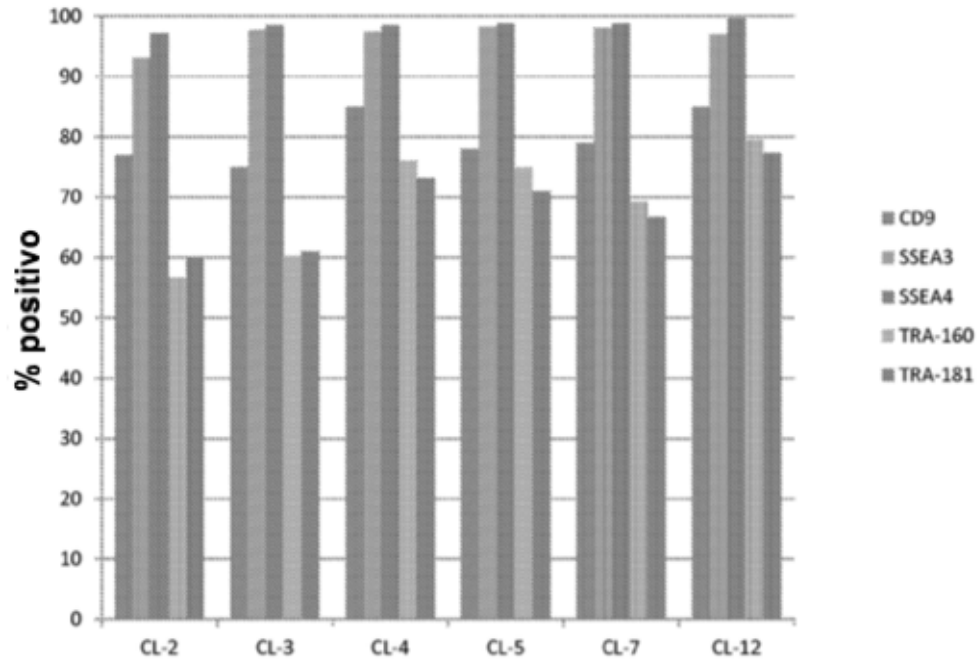
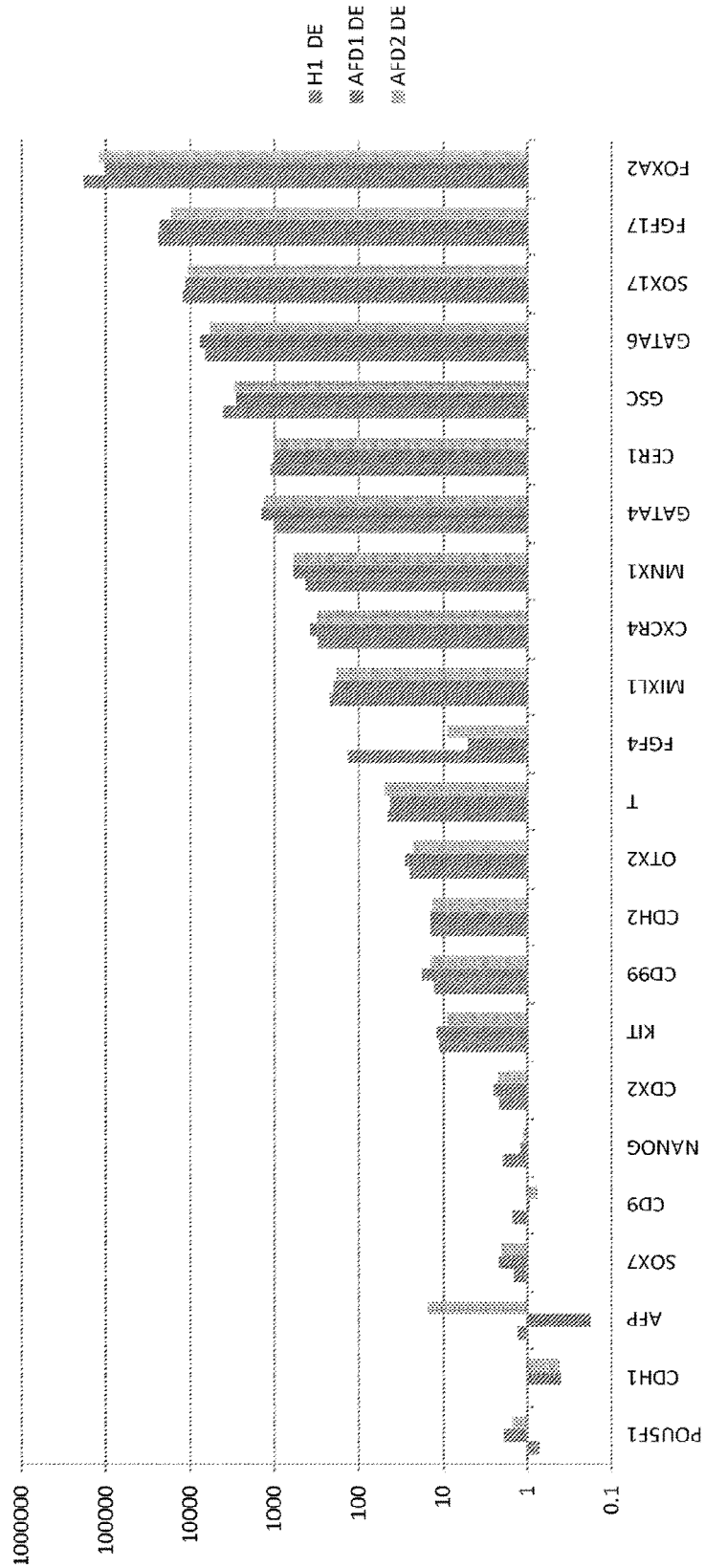


Figura 7



**Figura 8**

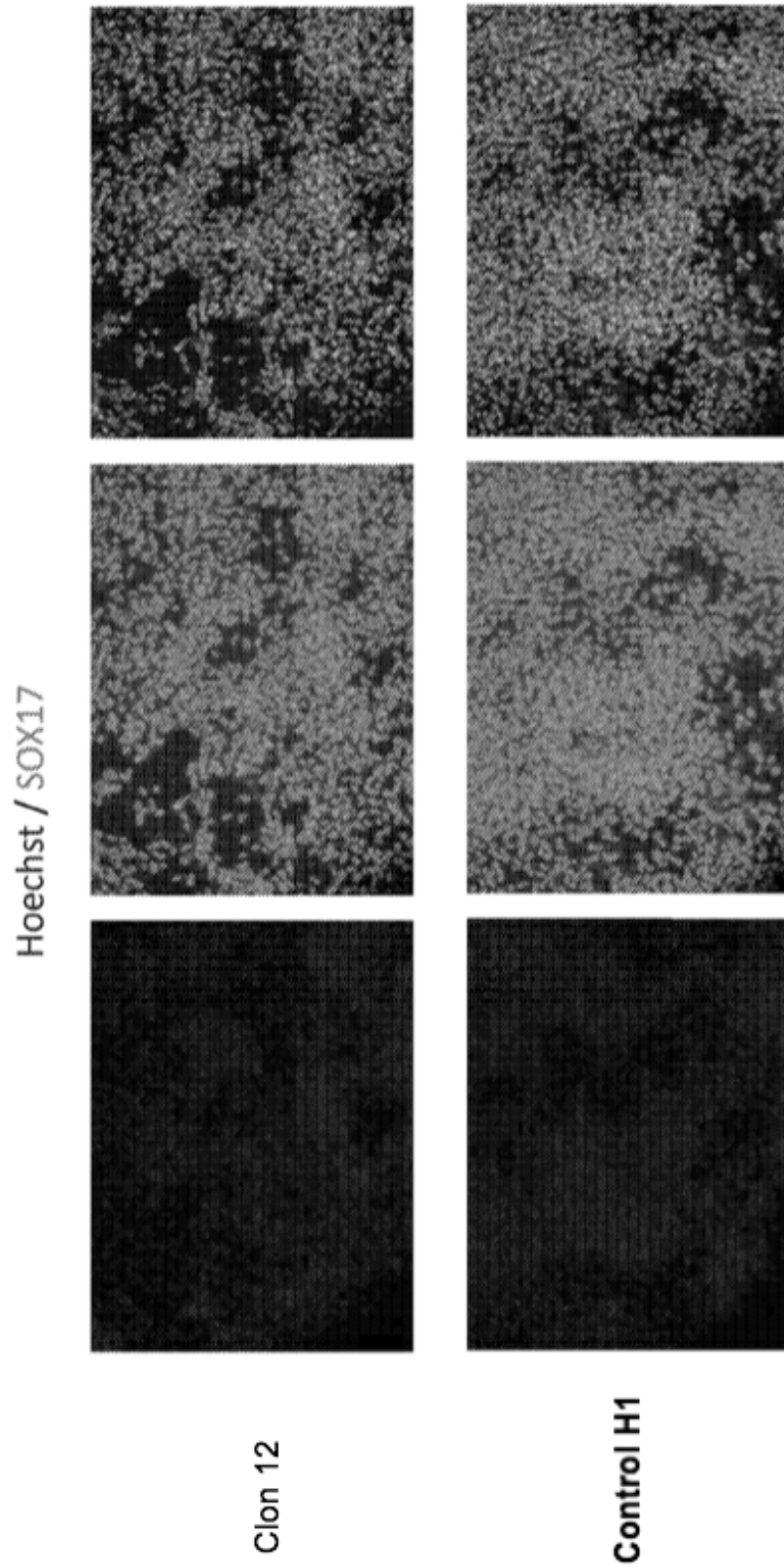


Figura 9

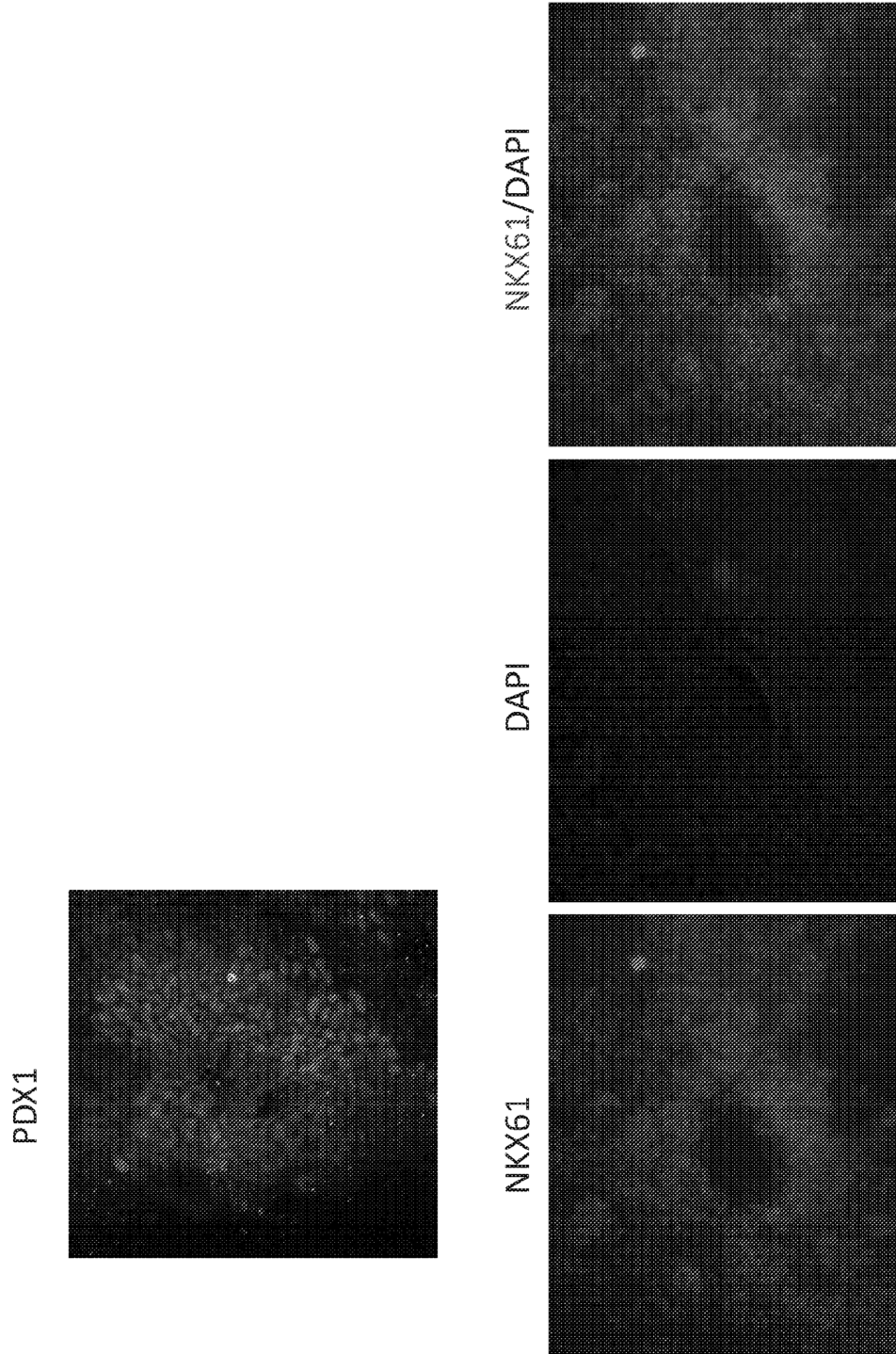
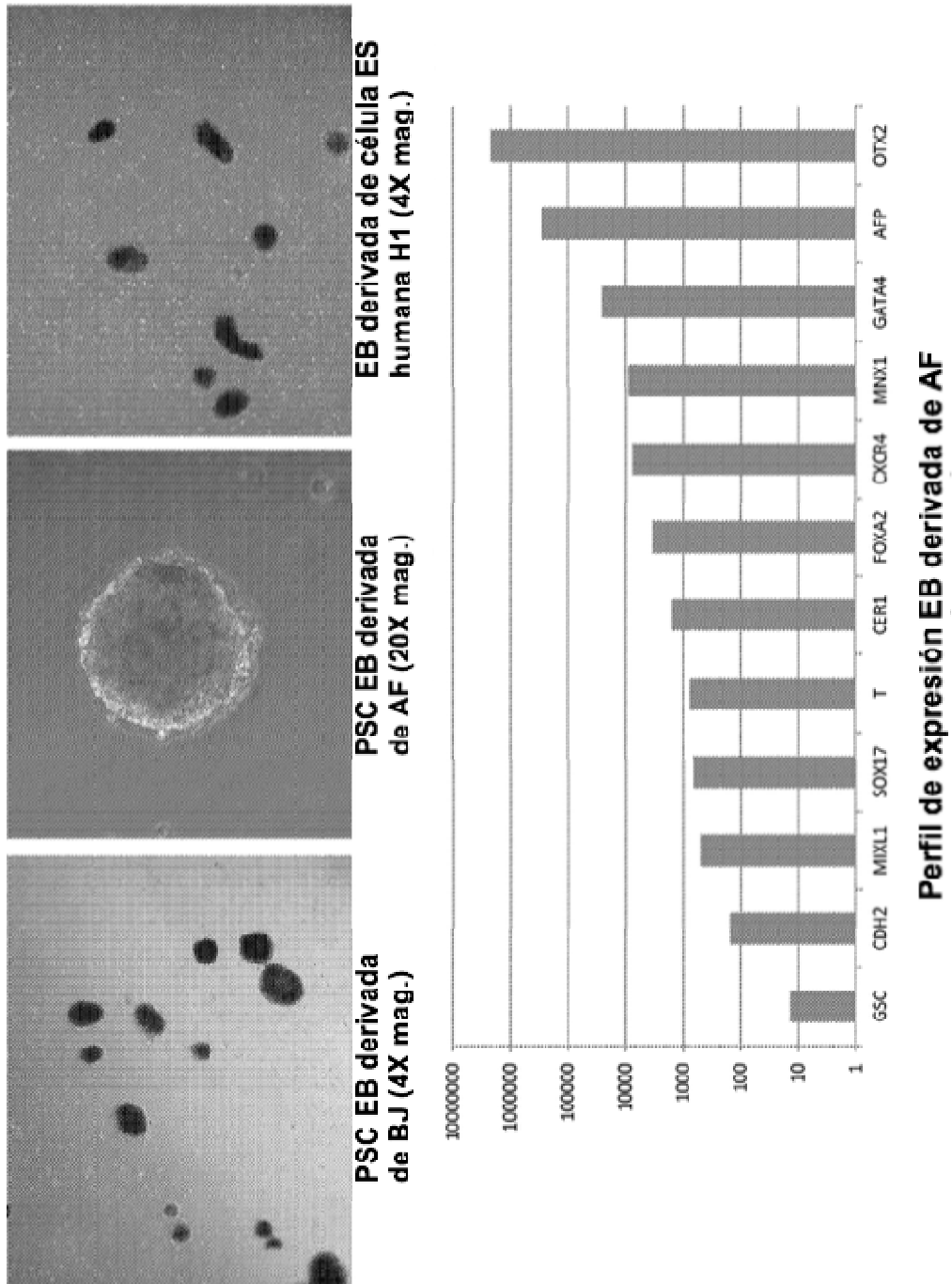


Figura 10





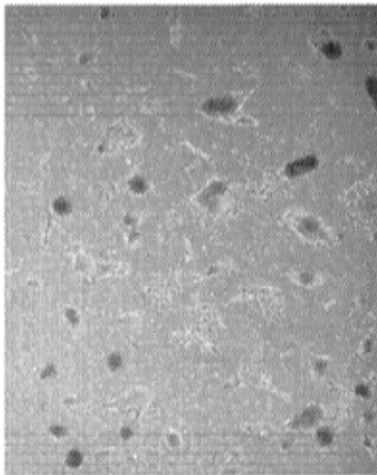
**Figura 11**



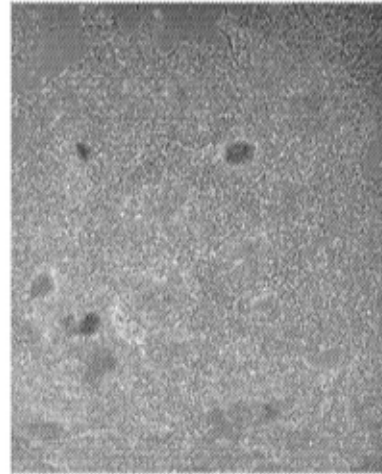
**24 horas-  
Matrigel**



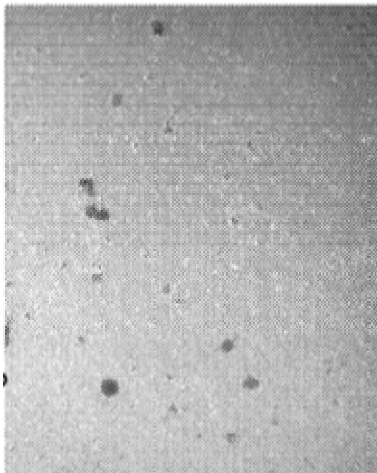
**48 horas-  
Matrigel**



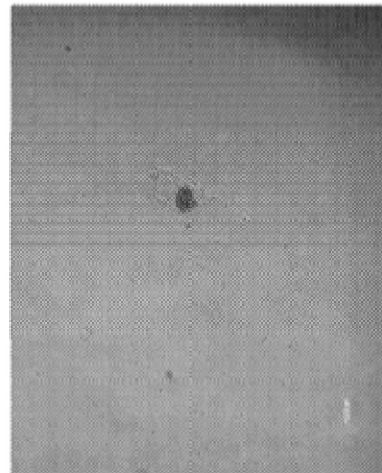
**24 horas + Y-27632  
Superficie nº4**



**48 horas + Y-27632  
Superficie nº4**



**24 horas-  
Superficie nº4**



**48 horas-  
Superficie nº4**

Figura 12

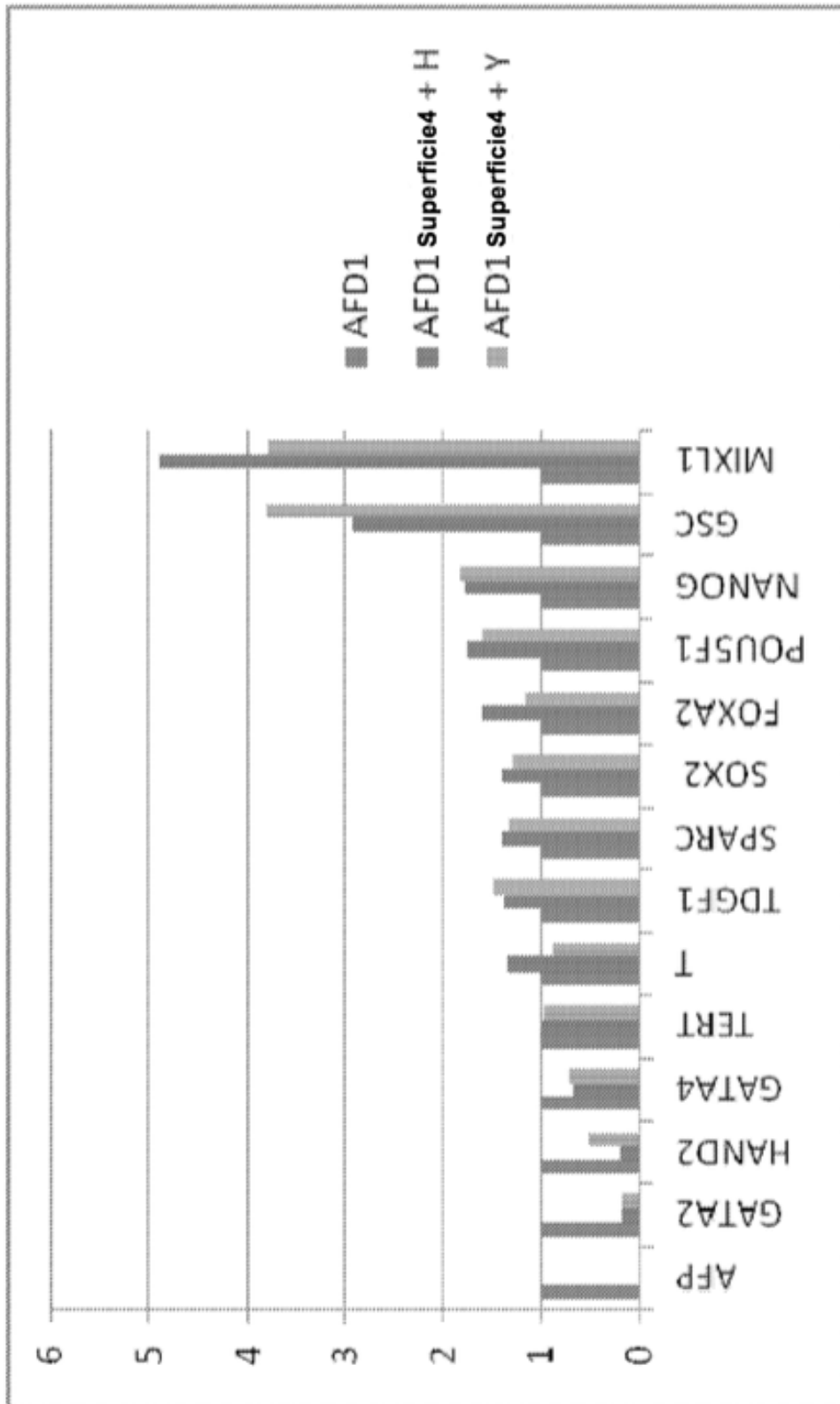


Figura 13

