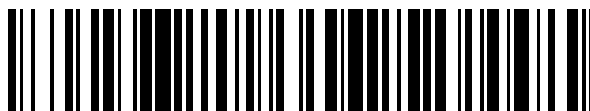


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 434**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2008 PCT/US2008/071775**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2009 WO09048675**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2008 E 08837420 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2185691**

54 Título: **Diferenciación de células madre pluripotentes usando células alimentadoras humanas**

30 Prioridad:

31.07.2007 US 952937 P

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

25.04.2018

73 Titular/es:

**LIFESCAN, INC. (100.0%)
1000 GIBRALTAR DRIVE
MILPITAS, CA 95035, US**

72 Inventor/es:

O'NEIL, JOHN, J.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 665 434 T3

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

Diferenciación de células madre pluripotentes usando células alimentadoras humanas**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere al campo de la diferenciación de células madre pluripotentes. La presente invención se refiere a métodos para la diferenciación de células madre pluripotentes en una capa de células alimentadoras humanas. En particular, la presente invención se refiere a un método mejorado para la diferenciación de células madre pluripotentes en células pancreáticas endocrinas usando una capa de células alimentadoras humanas.

ANTECEDENTES

Las células madre pluripotentes, como, por ejemplo, las células madre embrionarias tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos de células adultas. Como tales, las células madre embrionarias pueden ser una fuente de células de reemplazo y tejido para órganos que se han dañado como resultado de enfermedad, infección o anomalías congénitas. El potencial de que las células madre embrionarias se empleen como una fuente de células de reemplazo está obstaculizado por la dificultad de diferenciar eficientemente las células madre embrionarias en el tipo de célula de elección.

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

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

Micallef et al. informa que el ácido retinoico puede regular el cometido de células embrionarias para formar endodermo pancreático positivo Pdx1 (Diabetes 54:301, 2005).

Skoudy et al. informa que la activina A (un miembro de la superfamilia TGF β) regula al alza la expresión de los genes pancreáticos exocrinos (p48 y amilasa) y los genes endocrinos (Pdx1, insulina, y glucagón) en células madre embrionarias de ratón (Biochem. J. 379: 749, 2004).

Shiraki et al. estudió los efectos de los factores de crecimiento que aumentan específicamente la diferenciación de células madre embrionarias en células Pdx1 positivas. Observaron que la capacidad de reproducción produjo una proporción más alta de células Pdx1 positivas (Genes Cells. 2005 Jun; 10(6): 503-16.).

Gordon et al. demostró que la inducción de células del endodermo brachyury⁺/HNF-3beta⁺ de células madre embrionarias de ratón en ausencia de suero y en presencia de activina junto con un inhibidor de la señalización Wnt (US 2006/0003446A1).

Gordon et al. (PNAS 103: 16806, 2006) afirma que "se requerían la señalización Wnt y TGF-beta/ nodal/ activina simultáneamente para la generación de la línea primitiva anterior".

Thomson et al. aislaron células madre embrionarias a partir de blastocitos humanos (Science 282:114, 1998). Concurrentemente, Gearhart y sus compañeros de trabajo derivaron líneas celulares del germen embrionario humano (hEG) de tejido gonadal fetal (Shamblott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998). A diferencia de las células madre embrionarias de ratón, que se puede evitar que se diferencien simplemente cultivándolas con Factor Inhibidor de la Leucemia (LIF), las células madre embrionarias humanas deben mantenerse bajo condiciones muy especiales (Patente U.S. N° 6.200.806; WO 99/20741; WO 01/51616).

D'Amour et al. describe la producción de cultivos enriquecidos de endodermo definitivo derivado de células madre embrionarias humanas en presencia de una alta concentración de activina y suero bajo (Nature Biotechnology 2005). El trasplante de estas células bajo la cápsula renal de ratones resultó en la diferenciación en células más maduras con características de algunos órganos endodérmicos. Las células de endodermo definitivas derivadas de células madre embrionarias humanas pueden diferenciarse adicionalmente en células Pdx1 positivas tras la adición de FGF-10 (US 2005/0266554A1).

D'Amour et al. (Nature Biotechnology - 24, 1392 - 1401 (2006)) afirma: "Hemos desarrollado un proceso de diferenciación que convierte células madre embrionarias humanas (hES) a células endocrinas capaces de sintetizar las hormonas pancreáticas insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático y grelina. Este proceso imita la organogénesis pancreática *in vivo* dirigiendo células a través de estadios que se asemejan la endodermo definitivo, endodermo del tubo digestivo, endodermo pancreático y precursor endocrino camino a células que expresan

hormonas endocrinas".

En otro ejemplo, Fisk *et al.* informa de un sistema para producir células de los islotes pancreáticos a partir de células madre embrionarias humanas (US2006/0040387A1). En este caso, la vía de diferenciación se dividió en tres etapas. Primero se diferenciaron las células madre embrionarias humanas al endodermo usando una combinación de butirato de sodio y activina A. Luego se cultivaron las células con antagonistas de TGF β como Noggin en combinación con EGF o beta-celulina para generar células Pdx1 positivas. La diferenciación terminal se indujo por nicotinamida.

En un ejemplo, Benvenisty *et al.* afirma: "Hemos concluido que la sobre-expresión de Pdx1 aumentó la expresión de genes pancreáticos enriquecidos, la inducción de la expresión de insulina puede requerir señales adicionales que sólo están presentes in vivo" (Benvenisty et al, Stem Cells 2006; 24:1923-1930).

En otro ejemplo, Condie *et al.* divulgan: "las capas alimentadoras que contienen o expresan ligandos u otros compuestos que inhiben la gamma-secretasa o la señalización Notch para aumentar el mantenimiento de células pluripotentes en un estado pluripotente las capas alimentadoras que contienen o expresan ligandos u otros compuestos que inhiben la gamma-secretasa o la señalización Notch para aumentar el mantenimiento de células pluripotentes en un estado pluripotente" (WO2004090110).

En otro ejemplo, Mitalipova *et al.* divulgan: "Las células madre embrionarias humanas se cultivan con células alimentadoras de granulosa humanas, células musculares, células epiteliales ductales de Falopio, células del estroma de la médula ósea, y fibroblastos de la piel y las células madre embrionarias mantienen su fenotipo pluripotente" (US20050037488).

En otro ejemplo, Xu *et al.* divulgan: "líneas celulares mesenquimales y similares a fibroblastos obtenidas a partir de tejido embrionario o diferenciadas de células madre embrionarias. Se describen métodos para derivar tales líneas celulares, medios de procesamiento, y cultivo de células madre usando las células alimentadoras o medios condicionados" (US20020072117).

Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad significativa para desarrollar condiciones para establecer líneas de células madre pluripotentes que puedan expandirse para abordar las necesidades clínicas actuales, a la vez que mantienen el potencial de diferenciarse en células pancreáticas endocrinas, células que expresan hormonas pancreáticas, o células que secretan hormonas pancreáticas. Hemos tomado un enfoque alternativo para mejorar la eficiencia de diferenciar células madre pluripotentes hacia células pancreáticas endocrinas.

SUMARIO

La presente invención se refiere al campo de la diferenciación de células madre pluripotentes. La presente invención se refiere a métodos para la diferenciación de células madre pluripotentes en una capa de células alimentadoras humanas. En particular, la presente invención se refiere a un método mejorado para la diferenciación de células madre pluripotentes en células pancreáticas endocrinas usando una capa de células alimentadoras humanas.

En una realización, la presente invención proporciona un método para diferenciar células madre pluripotentes de acuerdo con las reivindicaciones, comprendiendo los pasos de:

- a. Cultivar las células madre pluripotentes,
- b. Colocar en placas las células madre pluripotentes sobre una capa de células alimentadoras humanas, y
- c. Tratar las células madre pluripotentes con por lo menos un factor que promueva la diferenciación de las células madre pluripotentes.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la expresión de marcadores asociados con la diferenciación: CXCR4, Sox-17, FoxA2, HNF-4a, HNF6 y AFP en poblaciones de la línea de células madre embrionarias humanas H9, en el pase 46, cultivado en MATRIGEL con medio condicionado MEF y comparado con células transferidas a fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), fibroblastos embrionarios de ratón comercialmente disponibles (MEF-SM), fibroblastos dérmicos humanos (D551), fibroblastos de prepucio humanos (Hs27) y células estromales derivadas del páncreas humano (HP).

La Figura 2 muestra los efectos de capas de células alimentadoras humanas en la diferenciación de células madre embrionarias humanas en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo. La figura muestra la expresión de CXCR4, Sox-17, y FoxA2, como se determina por PCR en tiempo

real en poblaciones de la línea de células madre embrionarias humanas H1, en el pase 48, diferenciadas en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), fibroblastos embrionarios de ratón comercialmente disponibles (MEF-SM), fibroblastos dérmicos humanos (D551), fibroblastos de prepucio humanos (Hs27) y células estromales derivadas del páncreas humano (HP).

La Figura 3 muestra los efectos de capas de células alimentadoras humanas en la formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático. La figura muestra la expresión de FoxA2, HNF-4a, HNF-6 y PDX-1, como se determina por PCR en tiempo real en poblaciones de la línea de células madre embrionarias humanas H1, en el pase 48, diferenciadas en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), fibroblastos embrionarios de ratón comercialmente disponibles (MEF-SM), fibroblastos dérmicos humanos (D551), fibroblastos de prepucio humanos (Hs27) y células estromales derivadas del páncreas humano (HP).

La Figura 4 muestra los efectos de capas de células alimentadoras humanas en la formación de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino. La figura muestra la expresión de FoxA2, HNF-4a, HNF-6, NeuroD1, Nkx 2.2, Pax-4, Nkx 6.1, PDX-1, glucagón (GCG), e insulina (INS), como se determina por PCR en tiempo real en poblaciones de la línea de células madre embrionarias humanas H1, en el pase 48, diferenciadas en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), fibroblastos embrionarios de ratón comercialmente disponibles (MEF-SM), fibroblastos dérmicos humanos (D551), fibroblastos de prepucio humanos (Hs27) y células estromales derivadas del páncreas humano (HP).

La Figura 5 muestra los efectos de capas de células alimentadoras humanas en la diferenciación de células madre embrionarias humanas en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo. La figura muestra la expresión de CXCR4, Sox-17, y FoxA2, como se determina por PCR en tiempo real en poblaciones de la línea de células madre embrionarias humanas H9, en el pase 46, diferenciadas en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), fibroblastos embrionarios de ratón comercialmente disponibles (MEF-SM), fibroblastos dérmicos humanos (D551), fibroblastos de prepucio humanos (Hs27) y células estromales derivadas del páncreas humano (HP).

La Figura 6 muestra los efectos de capas de células alimentadoras humanas en la formación de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático del endodermo. La figura muestra la expresión de FoxA2, HNF-4a, HNF-6 y PDX-1, como se determina por PCR en tiempo real en poblaciones de la línea de células madre embrionarias humanas H9, en el pase 46, diferenciadas en células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático del endodermo, cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), fibroblastos embrionarios de ratón comercialmente disponibles (MEF-SM), fibroblastos dérmicos humanos (D551), fibroblastos de prepucio humanos (Hs27) y células estromales derivadas del páncreas humano (HP).

La Figura 7 muestra los efectos de capas de células alimentadoras humanas en la formación de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino. La figura muestra la expresión de FoxA2, HNF-4a, HNF-6, NeuroD1, Nkx 2.2, Pax-4, Nkx 6.1, PDX-1, glucagón (GCG), e insulina (INS), como se determina por PCR en tiempo real en poblaciones de la línea de células madre embrionarias humanas H9, en el pase 46, diferenciadas en células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino, cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), fibroblastos embrionarios de ratón comercialmente disponibles (MEF-SM), fibroblastos dérmicos humanos (D551), fibroblastos de prepucio humanos (Hs27) y células estromales derivadas del páncreas humano (HP).

DESCRIPCION DETALLADA

Por 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 al nivel celular individual de auto-renovarse y diferenciarse para producir células de progenie, incluyendo progenitoras autorenovables, progenitoras no renovables y células terminalmente diferenciadas. Las células madre también están caracterizadas por su capacidad de diferenciarse in vitro en células funcionales de varios linajes celulares a partir de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales tras el trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, si no a todos, de los tejidos tras la inyección en blastocistos.

Las células madre se clasifican por su potencial de desarrollo como : (1) totipotentes, es decir capaces de dar lugar a todos los tipos celulares embrionarios y extraembrionarios; (2) pluripotentes, es decir capaces de dar lugar a todos los tipos celulares embrionarios; (3) multipotentes, es decir capaces de dar lugar a todo un subconjunto de linajes celulares, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir progenie que incluye HSC (autorenovación), progenitoras oligopotentes restringidos de células sanguíneas y todos los tipos celulares y elementos (por ejemplo, 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, es decir capaces de dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

La diferenciación es el proceso por el que una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada como, por ejemplo, una célula nerviosa o célula muscular. Una célula diferenciada o inducida a diferenciación es una que ha tomado una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término "comprometido", cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha procedido en la vía de diferenciación a un punto donde, bajo circunstancias normales, continuará diferenciándose en un tipo de célula específica o subconjunto de tipos de células, y no puede, bajo circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o volver a un tipo de célula menos diferenciada. La des-diferenciación se refiere al proceso por el que una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Como se usa en la presente, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células viene y a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula coloca la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un marcador específico del linaje se refiere a una característica asociada específicamente con el fenotipo de las células de un linaje de interés y puede usarse para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida con el linaje de interés.

Se usan varios términos para describir células en cultivo. "Mantenimiento" se refiere generalmente a células colocadas en un medio de cultivo bajo condiciones que facilitan el crecimiento y/o división celular, que puede o no dar lugar a una población más grande de células. "Efectuar pases" se refiere al proceso de retirar las células de un recipiente de cultivo y colocarlas en un segundo recipiente de cultivo bajo condiciones que facilitan el crecimiento y/o división celular.

Una población específica de células, o una línea celular, se refiere algunas veces a o se caracteriza por el número de veces que le han efectuado pases. Por ejemplo, una población celular cultivada a la que se han efectuado pases diez veces puede ser referida como un cultivo P10. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo tras el aislamiento de las células del tejido, se designa P0. Tras el primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (P1 o pase 1). Después del segundo subcultivo, las células se vuelven un cultivo terciario (P2 o pase 2), y así sucesivamente. Se entenderá por los expertos en la técnica que puede haber duplicaciones de población durante el periodo de pases; por lo tanto el número de duplicaciones de población de un cultivo es mayor que el número de pases. La expansión de las células (es decir, el número de duplicaciones de población) durante el periodo entre pases depende de muchos factores, incluyendo pero no limitado a densidad de la siembra, sustrato, medio, condiciones de crecimiento, y tiempo entre pases.

El "linaje celular β " se refiere a células con expresión génica positiva para el factor de transcripción PDX-1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN-3, Nkx2.2, Nkx6.1, NeuroD, Isl-1, HNF-3 beta, MAFA, Pax4, y Pax6. Las células que expresan marcadores característicos del linaje celular β incluyen células β .

Las "células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo" como se usan en la presente se refieren a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX-17, GATA-4, HNF-3 beta, GSC, Cer1, Nodal, FGF8, Brachyury, Proteína homeobox similar a Mix, FGF4 CD48, eomesodermin (EOMES), DKK4, FGF17, GATA-6, CXCR4, C-Kit, CD99, o OTX2. Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo incluyen células precursoras de la línea primitiva, células de la línea primitiva, células de mesendodermo y células del endodermo definitivas.

Las "células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático" como se usan en la presente se refieren a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: PDX-1, HNF-1beta, HNF-3beta, PTF-1 alfa, HNF-6, o HB9. Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático incluyen células del endodermo pancreático.

Las "células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático" como se usan en la presente se refieren a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: NGN-3, NeuroD, Islote-1, PDX-1, NKX6.1, Pax-4, o PTF-1 alfa. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático incluyen células pancreáticas endocrinas, células que expresan hormonas pancreáticas, y células que secretan hormonas pancreáticas, y células del linaje celular β .

"Endodermo definitivo" como se usa en la presente se refiere a células que tienen las características de células que surgen del epiblasto durante la gastrulación y que forman el tracto gastrointestinal y sus derivados. Las

células del endodermo definitivo expresan los siguientes marcadores: CXCR4, HNF-3 beta, GATA-4, SOX-17, Cerberus, OTX2, goosecoide, c-Kit, CD99, y Mixl1.

"Endodermo extraembrionario" como se usa en la presente se refiere a una población de células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX-7, AFP, y SPARC.

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

"Célula del mesendodermo" como se usa en la presente se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: CD48, eomesodermina (EOMES), SOX-17, DKK4, HNF-3 beta, GSC, FGF17, GATA-6.

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

"Célula secretora de hormonas pancreáticas" como se usa en la presente se refiere a una célula capaz de secretar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina, y polipéptido pancreático.

"Célula de línea pre-primitiva" como se usa en la presente se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: Nodal, o FG8.

"Célula de línea primitiva" como se usa en la presente se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: Brachyury, proteína homeobox similar a Mix, o FGF4.

La presente invención se refiere al campo de la diferenciación de células madre pluripotentes. La presente invención se refiere a métodos para la propagación de células madre pluripotentes en una capa de células alimentadoras humanas. La presente invención también se refiere a métodos para la diferenciación de células madre pluripotentes en una capa de células alimentadoras humanas. En particular, la presente invención se refiere a un método mejorado para la diferenciación de células madre pluripotentes en células pancreáticas endocrinas usando una capa de células alimentadoras humanas.

En una realización, la presente invención proporciona un método de acuerdo con las realizaciones, para diferenciar células madre pluripotentes, que comprende los pasos de:

- a. Cultivar las células madre pluripotentes,
- b. Colocar en placas las células madre pluripotentes sobre una capa de células alimentadoras humanas, y
- c. Tratar las células madre pluripotentes con por lo menos un factor que promueva la diferenciación de las células madre pluripotentes.

El método de la presente invención proporciona un método mejorado para diferenciar células madre pluripotentes, en el que las células madre pluripotentes se colocan en placas sobre una capa de células alimentadoras humanas antes de diferenciar las células madre pluripotentes. Las células madre pluripotentes pueden cultivarse por cualquier método adecuado de la técnica. De igual manera, las células madre pluripotentes pueden colocarse en placas sobre la capa de células alimentadoras humanas por cualquier método adecuado de la técnica. Las células madre pluripotentes pueden tratarse con al menos un factor que promueve la diferenciación de las células madre pluripotentes inmediatamente después de colocarlas en placas sobre la capa de células alimentadoras humanas. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden tratarse con al menos un factor que promueve la diferenciación de las células madre pluripotentes después de que las células madre pluripotentes se hayan cultivado en presencia de la capa de células alimentadoras humanas durante un periodo de tiempo. Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en presencia de la capa de células alimentadoras humanas durante un periodo de tiempo suficiente para que las células madre pluripotentes formen una monocapa.

Las células madre pluripotentes pueden colocarse en placas sobre la capa de células alimentadoras humanas a cualquier densidad. La densidad óptima, sin embargo, puede depender de factores como, por ejemplo la célula madre pluripotentes usada, las células que comprenden la capa de células alimentadoras humanas, el tipo de célula diferenciado, el tamaño del recipiente de cultivo, y similares. En una realización, las células madre pluripotentes se colocan en placas a una densidad tal que las células madre pluripotentes sean de aproximadamente

el 60% a aproximadamente el 80% confluentes tras 5 días de cultivo en la capa de células alimentadoras humanas.

Las células madre pluripotentes adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores característicos de células pluripotentes: ABCG2, cripto, CD9, FoxD3, Connexin43, Connexin45, Oct4, Sox2, Nanog, hTERT, UTF-1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tral-60, Tral-81.

Las células que comprenden la capa de células alimentadoras humanas pueden ser cualquier célula humana que sea capaz de promover la diferenciación de células madre pluripotentes. Las células que comprenden la capa de células alimentadoras humanas pueden ser células adultas. Alternativamente, las células que comprenden la capa de células alimentadoras humanas pueden ser fetales o embrionarias. En una realización, la capa de células alimentadoras humanas está compuesta de células de fibroblastos. En una realización, las células de fibroblastos son fibroblastos dérmicos. Los fibroblastos dérmicos pueden ser la línea celular de fibroblastos dérmicos Detroit 551 (CCL-110 ATCC). En otra realización, las células de fibroblastos son fibroblastos de prepucio. Los fibroblastos de prepucio humano pueden ser la línea de fibroblastos de prepucio humano Hs27 (CRL-1634 ATCC).

Alternativamente, la capa de células alimentadoras humanas se compone de células estromales derivadas del páncreas. En una realización, las células estromales derivadas del páncreas son las células divulgadas en la US20040241761. En una realización alternativa, las células estromales derivadas del páncreas son las células divulgadas en Science 306: 2261-2264, 2004. En una realización alternativa, las células estromales derivadas del páncreas son las células divulgadas en Nature Biotechnology 22: 1115 - 1124, 2004. En una realización alternativa, las células estromales derivadas del páncreas son las células divulgadas en la US20030082155. En una realización alternativa, las células estromales derivadas del páncreas son las células divulgadas en la US5834308. En una realización alternativa, las células estromales derivadas del páncreas son las células divulgadas en Proc Nat Acad Sci 97: 7999-8004, 2000. En una realización alternativa, las células estromales derivadas del páncreas son las células divulgadas en la WO2004011621. En una realización alternativa, las células estromales derivadas del páncreas son las células divulgadas en la WO03102134. En una realización alternativa, las células estromales derivadas del páncreas son las células divulgadas en la US2004015805. En una realización alternativa, las células estromales derivadas del páncreas son las células divulgadas en la US6458593. En una realización alternativa, las células estromales derivadas del páncreas son las células divulgadas en la WO2006094286. En una realización alternativa, las células estromales derivadas del páncreas son las de la línea celular H5f3P6 a las que se les ha asignado el N° ATCC PTA-6974.

Generación de una Capa de Células Alimentadoras

Las capas de células alimentadoras humanas descritas en esta solicitud son útiles para diferenciar células madre pluripotentes. Se reconoce que otros tipos de células pueden beneficiarse al diferenciarse en estas capas de células alimentadoras, y la composición de esta divulgación puede usarse para tales propósitos sin restricción.

En un aspecto de la presente invención, una capa de células alimentadoras se genera por un método, de acuerdo con las reivindicaciones, que esencialmente implica:

- a. Cultivar las células que formarán la capa alimentadora, y
- b. Inactivar las células.

Las células que formarán la capa de células pueden cultivarse en un sustrato de cultivo adecuado. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es un componente de la matriz extracelular como, por ejemplo, los derivados de membrana basal o que pueden formar parte de acoplamiento receptor-ligando de moléculas de adhesión. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es MATRIGEL® (Becton Dickenson). El MATRIGEL® es una preparación soluble de células tumorales Engelbreth-Holm-Swarm que se gelifica a temperatura ambiente para formar una membrana basal reconstituida. En otra realización, el sustrato de cultivo adecuado es gelatina (Sigma).

Como alternativa son adecuados otros componentes y mezclas de componentes de la matriz extracelular. Dependiendo del tipo de célula a proliferar, estos pueden incluir laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, heparán sulfato, y similares, solos o en varias combinaciones.

Las células usadas para formar la capa de células alimentadoras pueden ser inactivadas (es decir, vueltas incapaces de replicación sustancial) por, por ejemplo, radiación, tratamiento con inactivador químico como, por ejemplo, mitomicina c, o por cualquier otro método efectivo.

El medio usado para cultivar las células usadas para formar la capa de células alimentadoras puede tener cualquiera de varias fórmulas diferentes. El medio debe ser capaz de apoyar la propagación de al menos la línea

celular usada para formar la capa de células alimentadoras. Es conveniente que el medio también apoye la propagación de las células madre pluripotentes. Sin embargo, como una alternativa el medio puede suplementarse con otros factores o procesarse de otra manera para adaptarlo para propagar las células madre pluripotentes.

En una realización, las células estromales derivadas del páncreas con las células divulgadas en la WO2006094286.

Aislamiento de células derivadas del páncreas: Las células del páncreas pueden aislarse por un método multi-etapa, que esencialmente implica:

- a. Perfusión de un páncreas de cadáver, páncreas de donante vivo o autólogo, con una solución enzimática,
- b. Disociación mecánica del páncreas perfundido,
- c. Estratificación del tejido digerido sobre una polisacarosa o gradiente de Ficoll, seguido por centrifugación para producir tres interfaces distintas,
- d. Retirar los tejidos y células en cada interfaz,
- e. Cultivar los tejidos y células en placas de cultivo de tejido estándar en un medio de selección rico en nutrientes que contiene menos del 5% de suero, y
- f. Dejar el tejido sin perturbaciones durante de 2 a 4 semanas sin ningún cambio de medio.

La perfusión de un páncreas de cadáver puede lograrse con las soluciones enzimáticas bien conocidas por los expertos en la técnica. un ejemplo de una solución enzimática adecuada para su uso en la presente invención contiene LIBERASE HI™ (Roche - 0,5 mg/ml) y DNasa I (0,2 mg/ml).

La disociación mecánica del tejido pancreático puede llevarse a cabo rápidamente por el uso de un procesador de tejido. Alternativamente, la disociación mecánica del tejido pancreático puede llevarse a cabo usando una Cámara de Ricordi u otro aparato equivalente que permita una disociación menos destructiva del tejido, en comparación con otros procedimientos.

Los tejidos pancreáticos digeridos se someten luego a una centrifugación en polisacarosa o gradiente de Ficoll para producir tres interfaces distintas, que se enriquecen en células de islotes, el tejido ductal y el tejido acinar, respectivamente. En una realización, los tejidos y células se retiran de cada interfaz y se cultivan por separado. En una realización alternativa, los tejidos y células de todas las interfaces se combinan y cultivan. Se ha determinado de acuerdo con la presente invención que las células estromales pancreáticas pueden derivarse de cualquiera de las tres interfaces. Alternativamente, puede emplearse un gradiente continuo y la población celular de elección seleccionada para generar las células estromales pancreáticas.

De acuerdo con la presente invención, los tejidos y células recogidos de una o más de las interfaces se cultivan en un medio de selección para enriquecer selectivamente células estromales en la población celular. El medio de selección es rico en nutrientes y contiene niveles bajos de glucosa y suero. Hablando de manera general, el medio de selección contiene menos del 5% de suero, alternativamente 1-3% de suero, alternativamente aproximadamente 2% de suero; y menos de 30 mM de glucosa. En una realización, el medio de selección se suplementa con 2% de suero que se deriva de la misma especie mamífera de la que se recolectó el páncreas donante. Alternativamente, puede usarse suero fetal o de ternera, suero de otras especies o suplementos o reemplazos del suero de otras especies para suplementar el medio de selección. Un ejemplo de un medio de selección adecuado está compuesto de DMEM (5 mM de glucosa), 2% de suero bovino fetal (FBS), 100 U/μg de penicilina/estreptomicina, insulina-transferrina-selenio (ITS, 2 mM de L-Glutamina, 0,0165 mM de ZnSO₄ y 0,38 μM de 2-mercaptoetanol.

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

Preferiblemente, el cultivo debería mantenerse en el medio de selección sin perturbar durante aproximadamente de 2 a 4 semanas sin ningún cambio de medio, en ese punto las células se habrán vuelto típicamente adherentes al sustrato de cultivo usado. Se considera que la fase de selección se ha completado cuando no hay aumento adicional en el número de células adherentes.

Se ha descubierto que los métodos de recolección y cultivo de tejidos resultan en una población celular enriquecida en células estromales pancreáticas. Por "enriquecido" se entiende que las células estromales pancreáticas representan al menos aproximadamente el 30%, alternativamente aproximadamente el 40%,

alternativamente aproximadamente el 50% de todas las células en la población.

Alternativamente, los tejidos y células recogidas de una o más de las interfaces se cultivan en un medio de selección para enriquecer selectivamente las células estromales en la población celular. El medio de selección es rico en nutrientes y contiene niveles bajos de glucosa. Hablando de manera general, el medio de selección contiene menos del 20% de suero, alternativamente del 10 al 5% de suero, alternativamente aproximadamente el 10% de suero; y menos de 30 mM de glucosa. En una realización, el medio de selección se suplementa con 10% de suero que está derivado de la misma especie mamífera de la que se recolectó el páncreas donante. Alternativamente, puede usarse suero fetal o de ternera, suero de otras especies u otros suplementos o reemplazos del suero de otras especies para suplementar el medio de selección. Un ejemplo de un medio de selección adecuado está compuesto de DMEM (5 mM de glucosa), 10% de suero bovino fetal (FBS), 100 U/μg de penicilina/estreptomicina.

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

Bajo estas condiciones de cultivo, el medio se reemplaza regularmente a intervalos de 2-4 días.

Se ha descubierto que los métodos de recolección y cultivo de tejido resultan en una población celular enriquecida en células estromales pancreáticas. Por "enriquecido" se entiende que las células estromales pancreáticas representan al menos aproximadamente el 30%, alternativamente aproximadamente el 40%, alternativamente aproximadamente el 50% de todas las células en la población.

Posterior a la fase inicial de selección y unión celular, las células (enriquecidas con células estromales) se expanden bajo condiciones como se describe adicionalmente en lo sucesivo.

Si se desea, la población celular enriquecida en células estromales puede exponerse, por ejemplo, a un agente (como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteína expresado por células estromales, para identificar y seleccionar células estromales pancreáticas, obteniendo de este modo una población sustancialmente pura de células estromales pancreáticas.

Caracterización de las células estromales pancreáticas aisladas: Los métodos para evaluar la expresión de marcadores de proteínas y ácidos nucleicos en células cultivadas o aisladas son los estándar en la técnica. Estos incluyen reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR), transferencias Northern, hibridación i (ver por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 2001 suplemento), e inmunoensayos, como análisis inmunohistoquímico de material seccionado, transferencia Western, y para marcadores que son accesibles en células intactas, análisis de citometría de flujo (FACS) (ver, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

Las células estromales aisladas pancreáticas se caracterizan por, entre otros, carecer sustancialmente de al menos uno de los siguientes marcadores de proteínas: CD117, NCAM, ABCG2, citoqueratina 7, 8, 18, o 19. En ciertas realizaciones específicas, las células estromales pancreáticas aisladas de acuerdo con la presente invención se caracterizan por ser sustancialmente positivas para al menos uno de los siguientes marcadores de proteínas: CD44, CD73, CD90 y CD105.

Expansión de células estromales pancreáticas: En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para expandir las células estromales pancreáticas obtenidas de acuerdo con la presente invención. Como se describe anteriormente, las digestiones pancreáticas, que pueden contener una mezcla heterogénea de islotes, fragmentos ductales y tejido exocrino, se cultivan un medio de selección bajo en suero durante 2-4 semanas, preferiblemente sin ningún cambio de medio, para enriquecer selectivamente las células estromales deseada. La población celular resultante, ahora enriquecida con células estromales pancreáticas, se cambia luego a un medio de crecimiento para expandir las células estromales pancreáticas en la población celular.

El medio de crecimiento adecuado para su uso en la presente invención puede estar compuesto de medio como DMEM que contiene penicilina/estreptomicina (P/S) y suero a una concentración del 2% al 20%, alternativamente aproximadamente del 5 al 10%. En una realización, el medio de crecimiento está compuesto de DMEM (1000 mg/l de D-glucosa; 862 mg/l de glutamina), y suero bovino fetal al 10%. En una realización alternativa, el medio de crecimiento se suplementa con suero que se deriva de la misma especie mamífera de la que se recolectó el páncreas donante. Alternativamente, puede usarse suero fetal o de ternera, u otros suplementos o reemplazos del suero como, por ejemplo albumina sérica para suplementar el medio de crecimiento.

Además, las células estromales pueden expandirse cultivándolas en un medio de crecimiento definido que contiene agentes que estimulan la proliferación de las células de acuerdo con la presente invención. Estos factores pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, miembros de la familia TGF-β, que incluyen TGF-β1, 2 y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP-2, -4, 6, -7, -11, -12 y -13), albúmina sérica, familia del factor de crecimiento de

fibroblastos, factor de crecimiento derivado de plaquetas-AA y -BB, plasma rico en plaquetas, factor de diferenciación del crecimiento del factor de crecimiento de la insulina (IGF-I, II) (GDF-5, -6, -8, -10, 11), péptido-I y II tipo glucagón (GLP-I y II), mimetocuerpo GLP-1 y GLP -2, Exendina-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina, beta mercaptoetanol, factor de crecimiento epidérmico (EGF), gastrina I y II, quelantes de cobre como trietilen pentamina, TGF- α , forskolina, Na-Butirato, activina, betacelulina, insulina/transferencia/selenio (ITS), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), extracto de hipófisis bovina, proteína asociada a neogénesis de islotes (INGAP), inhibidores de proteasoma, inhibidores de la vía de Notch, inhibidores sónicos de hedgehog o combinaciones de los mismos. Alternativamente, las células estromales pueden expandirse cultivándolas en medio condicionado. Por "medio condicionado" se entiende que una población de células se cultiva en un medio de cultivo celular definido básico y aporta factores solubles al medio. En tal caso, las células se retiran del medio, mientras que los factores solubles que producen las células permanecen. este medio se usa luego para nutrir a una población de células diferente.

En ciertas realizaciones, las células estromales pancreáticas se cultivan en placas de cultivo de tejido estándar. Alternativamente, las placas de cultivo pueden recubrirse con proteínas de la matriz extracelular como, por ejemplo, MATRIGEL®, MATRIGEL® con factor de crecimiento reducido, laminina, colágeno, gelatina, tenascina, fibronectina, vitronectina, trombospondina, extractos de placenta o combinaciones de los mismos.

Además, las células estromales pancreáticas pueden expandirse in vitro bajo condiciones hipóxicas o normóxicas.

Diferenciación de Células Madre Pluripotentes

En una realización de la presente invención las células madre pluripotentes se propagan en cultivo, mientras mantienen su pluripotencia. Las células madre pluripotentes se transfieren luego sobre capas de células alimentadoras humanas antes de la diferenciación. Los cambios en la pluripotencia de las células con tiempo puede determinarse detectando cambios en los niveles de expresión de los marcadores asociados con la pluripotencia. Alternativamente, los cambios en la pluripotencia pueden monitorizarse detectando cambios en los niveles de expresión de marcadores asociados con la diferenciación, o marcadores asociados con otro tipo celular.

Las células pluripotentes se tratan con al menos un factor que promueve su diferenciación en otro tipo celular. El otro tipo celular puede ser una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo. Alternativamente, el tipo celular puede ser una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático. Alternativamente, el tipo celular puede ser una célula que expresa marcadores característicos del linaje pancreático endocrino. Alternativamente, el tipo celular puede ser una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células β .

Las células madre pluripotentes tratadas de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden diferenciarse adicionalmente en una variedad de otros tipos celulares por cualquier método adecuado de la técnica. Por ejemplo, las células madre pluripotentes tratadas de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden diferenciarse adicionalmente en células neurales, células cardíacas, hepatocitos y similares.

Por ejemplo, las células madre pluripotentes tratadas de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden diferenciarse adicionalmente en progenitoras neurales y cardiomiocitos de acuerdo con los métodos divulgados en la WO2007030870.

En otro ejemplo, las células madre pluripotentes tratadas de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden diferenciarse adicionalmente en hepatocitos de acuerdo con los métodos divulgados en la patente U.S. 6.458.589.

Diferenciación de Células Madre Pluripotentes en Células que Expresan Marcadores Característicos del Linaje Pancreático Endocrino

En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino se forman a partir de células madre pluripotentes por un método multietapa, de acuerdo con las reivindicaciones, que comprende los pasos de:

a. Cultivar las células madre pluripotentes,

b. Colocar en placas las células pluripotentes sobre una capa de células alimentadoras humanas,

c. Diferenciar las células madre pluripotentes en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo,

d. Diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, y

5 e. Diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino.

10 Los marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se seleccionan del grupo que consiste de SOX-17, GATA4, Hnf-3beta, GSC, Cerl, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox similar a Mix, FGF4 CD48, eomesodermin (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99, y OTX2. Adecuada para su uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es una célula precursora de la línea primitiva. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es una célula del mesendodermo. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es una célula del endodermo definitivo.

20 Los marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se seleccionan del grupo que consiste de Pdx1, HNF-1beta, PTF1a, HNF-6, HB9 y PROX1. Adecuada para el uso es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático. En un aspecto de la presente invención una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático puede ser una célula del endodermo pancreático.

25 Los marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se seleccionan del grupo que consiste de NGN-3, NeuroD, Islote-1, Pdx-1, NKX6.1, Pax-4, y PTF-1 alfa. Una célula pancreática endocrina puede ser capaz de expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático. Adecuada para el uso es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje pancreático endocrino. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endocrino pancreático puede ser una célula endocrina pancreática. La célula endocrina pancreática puede ser una célula que expresa la hormona pancreática. Alternativamente, la célula pancreática endocrina puede ser una célula que secreta la hormona pancreática.

35 En un aspecto de la presente invención, la célula endocrina pancreática puede ser una célula que expresa marcadores característicos del linaje celular β . Una célula que expresa marcadores característicos del linaje celular β expresa Pdx1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN-3, Nkx2.2, Nkx6.1, NeuroD, Isl-1, HNF-3 beta, MAFA, Pax4, y Pax6. Una célula que expresa marcadores característicos del linaje celular β puede ser una célula β .

40 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en célula que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino de acuerdo con los métodos divulgados en D'Amour et al, Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

45 *Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo:* Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan los marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo por cualquier método de la técnica o por cualquier método propuesto en esta divulgación.

50 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo de acuerdo con los métodos divulgados en D'Amour et al, Nature Biotechnology 23, 1534 - 1541 (2005).

55 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo de acuerdo con los métodos divulgados en Shinozaki et al, Development 131, 1651 - 1662 (2004).

60 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo de acuerdo con los métodos divulgados en McLean et al, Stem Cells 25, 29 - 38 (2007).

65 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo de acuerdo con los métodos divulgados en D'Amour et al, Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo cultivando las células madre pluripotentes en medio que contiene activina A en ausencia de suero, luego cultivando las células con activina A y suero, y luego cultivando las células con activina A y suero de una concentración diferente. Un ejemplo de este método se divulga en Nature

Biotechnology 23, 1534 - 1541 (2005).

Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo cultivando las células madre pluripotentes en medio que contiene activina A en ausencia de suero, luego cultivando las células con activina A con suero de otra concentración. Un ejemplo de este método se divulga en D'Amour et al, Nature Biotechnology, 2005.

Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo cultivando las células madre pluripotentes en medio que contiene activina A y un ligando Wnt en ausencia de suero, luego retirando el ligando Wnt y cultivando las células con activina A y suero. Un ejemplo de este método se divulga en Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático: Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo por cualquier método de la técnica o por cualquier método propuesto en esta invención.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático de acuerdo con los métodos divulgados en D'Amour et al, Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo del linaje del endodermo definitivo con un factor de crecimiento de fibroblastos y el inhibidor de la vía de señalización hedgehog KAAD-ciclopamina, luego retirando el medio que contiene el factor de crecimiento de fibroblastos y el KAAD-ciclopamina y posteriormente cultivando las células en medio que contiene ácido retinoico, un factor de crecimiento de fibroblastos y KAAD-ciclopamina. Un ejemplo de este método se divulga en Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

Formación de células que expresan marcadores del linaje pancreático endocrino: Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino por cualquier método de la técnica o por cualquier método propuesto en esta invención.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino de acuerdo con los métodos divulgados en D'Amour et al, Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino, cultivando las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en medio que contiene DAPT y exendina 4, luego retirando el medio que contiene DAPT y exendina 4 y posteriormente cultivando las células en medio que contiene exendina 1, IGF-1 y HGF. Un ejemplo de este método se divulga en Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino, cultivando las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en medio que contiene exendina 4, luego retirando el medio que contiene exendina 4 y posteriormente cultivando las células en medio que contiene exendina 4, IGF-1 y HGF. Un ejemplo de este método se divulga en D'Amour et al, Nature Biotechnology, 2006.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino, cultivando las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en medio que contiene DAPT y exendina 4. Un ejemplo de este método se divulga en D'Amour et al, Nature Biotechnology, 2006.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino, cultivando las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en medio que contiene exendina 4. Un ejemplo de este método se divulga en D'Amour et al, Nature Biotechnology, 2006.

Aislamiento, Expansión y cultivo de Células Madre Pluripotentes

Caracterización de Células Madre Pluripotentes

Las células madre pluripotentes pueden expresar uno o más antígenos embrionarios específicos del estadio (SSEA) 3 y 4, y marcadores detectables usando anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81. La diferenciación de células madre pluripotentes in vitro da lugar a la pérdida de la expresión de SSEA-4, Tra-1-60 y Tra-1-81 (si están presentes) y la expresión aumentada de SSEA-1. Las células madre pluripotentes indiferenciadas tienen típicamente actividad de fosfatasa alcalina, que puede detectarse fijando las células con 4% de paraformaldehído, y luego desarrollando con Vector Red como sustrato, como se describe por el fabricante (Vector Laboratories, Burlingame Calif.). Las células madre pluripotentes indiferenciadas también expresan típicamente Oct-4 y TER, como se detecta por PCR en tiempo real.

Otro fenotipo deseable de células madre pluripotentes propagadas es un potencial para diferenciarse en células de las tres capas germinales: tejidos del endodermo, mesodermo y ectodermo. La pluripotencia de las células madre pluripotentes puede confirmarse, por ejemplo, inyectando células en ratones inmunodeficientes combinados severos (SCID), fijando los teratomas que forman usando un fijador como 4% de paraformaldehído, y después examinándolas histológicamente para evidencias de tipos celulares de las tres capas germinales. Alternativamente, se puede determinar la pluripotencia 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 pueden cariotiparse usando una técnica de bandedo G estándar y comparando con cariotipos publicados de las especies de primate correspondientes. Es deseable obtener células que tengan un "cariotipo normal", lo que significa que las células son euploides, en las que todos los cromosomas humanos están presente y no alterados notablemente.

Cultivo de Células Madre Pluripotentes

En una realización, las células madre pluripotentes se cultivan típicamente en una capa de células alimentadoras que apoyan las células madre pluripotentes de varias maneras. Alternativamente, las células madre pluripotentes se cultivan en un sistema de cultivo que está esencialmente libre de células alimentadoras, pero sin embargo apoya la proliferación de células madre pluripotentes sin experimentar diferenciación sustancial. El crecimiento de células madre pluripotentes en medios libre de alimentadoras sin diferenciación se apoya usando un medio condicionado cultivando anteriormente con otro tipo de célula. Alternativamente, el crecimiento de células madre pluripotentes en cultivo libre de alimentadoras sin diferenciación se apoya usando un medio definido químicamente.

Por ejemplo, Reubinoff et al (Nature Biotechnology 18: 399 - 404 (2000)) y Thompson et al (Science 6 de Noviembre de 1998: Vol. 282. Nº. 5391, pp. 1145 -1147) divulgan el cultivo de líneas de células madre pluripotentes a partir de blastocistos humanos usando una capa de células alimentadoras de fibroblastos embrionarias de ratón.

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

La US20020072117 divulga líneas celulares que producen medio que apoya el crecimiento de células madre pluripotentes de primate en cultivo libre de alimentadoras. Las líneas celulares empleadas son líneas celulares mesenquimales y similares a fibroblastos obtenidas de tejido embrionario o diferenciadas a partir de células madre embrionarias. La US20020072117 también divulga el uso de líneas celulares como una capa de células alimentadoras primaria.

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

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

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

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

En otro ejemplo, Inzunza et al (Stem Cells 23: 544-549, 2005) divulgan una capa de células alimentadoras

de fibroblastos de prepucio postnatal humano.

La US6642048 divulga medios que apoyan el crecimiento de células madre pluripotentes de primate (pPS) en cultivo libre de alimentadoras, y líneas celulares útiles para la producción de tales medios. La US6642048 afirma: "Esta invención incluye líneas celulares mesenquimales y similares a fibroblastos obtenidas de tejido embrionario o diferenciado a partir de células madre embrionarias. Se describen e ilustran en esta divulgación métodos para derivar tales líneas celulares, medio de procesamiento, y cultivar células madre usando el medio condicionado."

En otro ejemplo, la WO2005014799 divulga medio condicionado para el mantenimiento, proliferación y diferenciación de células mamíferas. La WO2005014799 afirma: "El medio de cultivo producido de acuerdo con la presente invención está condicionado por la actividad de secreción celular de células murinas, en particular, las diferenciadas y hepatocitos transgénicos inmortalizados, denominados MMH (Hepatocito Murino Met)."

En otro ejemplo, Xu et al (Stem Cells 22: 972-980, 2004) divulga medio condicionado obtenido a partir de derivados de células madre embrionarias humanas que se han modificado genéticamente para sobre expresar transcriptasa inversa de telomerasa humana.

En otro ejemplo, la US20070010011 divulga un medio de cultivo químicamente definido para el mantenimiento de células madre pluripotentes.

Un sistema de cultivo alternativo emplea medio libre de suero suplementado 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) divulgan un sistema de cultivo libre de alimentadoras, libre de suero en el que las células madre embrionarias se mantienen en medio de reemplazo de suero no condicionado (SR) suplementado con diferentes factores de crecimiento capaces de activar la auto-renovación de las células madre embrionarias.

En otro ejemplo, Levenstein et al (Stem Cells 24: 568-574, 2006) divulgan métodos para el cultivo a largo plazo de células madre embrionarias humanas en ausencia de fibroblastos o medio condicionado, usando medio suplementado con bFGF.

En otro ejemplo, la US20050148070 divulga un método para cultivar células madre embrionarias humanas en medio definido sin suero y sin células alimentadoras de fibroblastos, el método comprende: cultivar las células madre en un medio de cultivo que contiene 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 mamífero y conteniendo al menos aproximadamente 100 ng/ml de un factor de crecimiento de fibroblastos capaz de activar un receptor de la señalización del factor de crecimiento de fibroblastos, en donde el factor de crecimiento se suministra desde una fuente que no sea sólo una capa alimentadora de fibroblastos, el medio apoyó la proliferación de células madre en un estado indiferenciado sin células alimentadoras o medio condicionado.

En otro ejemplo, la US20050233446 divulga un medio definido útil en el cultivo de células madre, que incluye células madre primordiales de primate indiferenciadas. En solución, el medio es sustancialmente isotónico en comparación con las células madre que se están cultivando. en un cultivo dado, el medio particular comprende un medio base y una cantidad de cada uno de bFGF, insulina, y ácido ascórbico necesaria para apoyar sustancialmente el crecimiento indiferenciado de las células madre primordiales.

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

En otro ejemplo, la US20050244962 afirma: "En un aspecto la invención proporciona un método para cultivar células madre embrionarias de primate. Se cultivan las células madre en un cultivo esencialmente libre de suero fetal 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 solo una capa alimentadora de fibroblastos. En una forma preferida, la capa alimentadora de fibroblastos, requerida anteriormente para sostener un cultivo de células madre, se vuelve innecesaria por la adición de suficiente factor de crecimiento de fibroblastos."

En un ejemplo adicional, la WO2005065354 divulga un medio de cultivo isotónico, definido que está esencialmente libre de alimentadores y libre de suero, que comprende: a. un medio basal; b. una cantidad de bFGF

suficiente para apoyar el crecimiento de células madre mamíferas sustancialmente indiferenciadas; c. una cantidad de insulina suficiente para apoyar el crecimiento de células madre mamíferas sustancialmente indiferenciadas; y d. una cantidad de ácido ascórbico suficiente para apoyar el crecimiento de células madre mamíferas sustancialmente indiferenciadas.

En otro ejemplo, la WO2005086845 divulga un método para el mantenimiento de una célula madre indiferenciada, comprendiendo dicho método exponer una célula madre a un miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento transformante beta (TGF β), un miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), o nicotamida (NIC) en una cantidad suficiente para mantener la célula en un estado indiferenciado durante una cantidad de tiempo suficiente para lograr un resultado deseado.

Las células madre pluripotentes pueden colocarse en palcas sobre un sustrato de cultivo adecuado. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es un componente de la matriz extracelular como, por ejemplo, los derivados de la membrana basal o que pueden formar parte de los acoplamientos receptor-ligando de las moléculas de adhesión. En una realización, un sustrato de cultivo adecuado es MATRIGEL® (Becton Dickinson). El MATRIGEL® es una preparación soluble de células tumorales Engelbreth-Holm-Swarm que se gelifica a temperatura ambiente para formar una membrana basal reconstituida.

Como alternativa son adecuados otros componentes y mezclas de componentes de la matriz extracelular. Dependiendo del tipo de célula a proliferar, estos pueden incluir laminina, fibronectina, gelatina, proteoglicano, entactina, heparán sulfato, y similares, solos o en varias combinaciones.

Las células madre pluripotentes pueden colocarse en placas sobre el sustrato en una distribución adecuada y en presencia de un medio que promueve la supervivencia, propagación y retención celular de las características deseables. Todas estas características se benefician de la atención cuidadosa a la distribución del sembrado y pueden determinarse fácilmente por el experto en la técnica.

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

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

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Establecimiento de Líneas Celulares Pancreáticas Humanas

Preparación del Páncreas - Se obtuvieron páncreas humanos no adecuados para trasplante clínico de The National Disease Research Interchange (Filadelfia, PA), tras el consentimiento apropiado para uso en investigación. El páncreas se transfirió con solución de preservación de órganos a una bandeja de acero inoxidable en hielo y se recortó todo el tejido extraño. Se introdujo una cánula en el ducto pancreático con un catéter de calibre 18 y se inyectó al páncreas una solución enzimática, que contenía enzima LIBERASE HI™ (Roche - 0,5 mg/ml) y DNasa I (0,2 mg/ml), disuelta en Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco (DPBS).

Disociación Mecánica Rápida Seguida por Digestión Enzimática - Los páncreas infundidos por enzimas se homogeneizaron en un procesador de tejido, pulsados 3-5 veces durante 3-5 segundos/pulso, y el tejido disociado se transfirió a dos matraces de tripsinización de 500 ml (Bellco) que contenía barras de agitación magnéticas. Posteriormente, se añadieron 50-100 ml de la solución enzimática a cada matraz. Los matraces se colocaron en un baño de agua a 37° C en placas de agitación sumergibles y se permitió que incubase con una velocidad de agitación intermedia durante 10 minutos. La agitación se paró y se retiró el tejido fino digerido del matraz y se transfirió a un tubo de 250 ml que contenía DPBS, 5% de Suero Bovino Fetal (FBS), y 0,1 mg/ml de DNasa I (DPBS+) a 4° C para neutralizar el proceso de digestión. Los matraces se repusieron con 50100 ml de solución enzimática y se devolvieron al baño de agua y se reinició la agitación durante diez minutos adicionales. De nuevo, los matraces se retiraron y la digestión fina se recogió y transfirió a los tubos de 250 ml en hielo. Este proceso se repitió 3-5 veces adicionales has que el páncreas estaba completamente digerido.

Disociación Mecánica Gradual con Digestión Enzimática Simultánea - Los páncreas infundidos por enzimas se procesaron de acuerdo con los métodos descritos en Diabetes 37:413-420 (1988). Brevemente, los páncreas se limpiaron de tejido extraño y se les inyectó la solución enzimática como se ha descrito anteriormente. Los páncreas se colocaron luego en una Cámara de Ricordi con perlas y se cubrieron con una pantalla con un tamaño de malla de 400-600 μ m para mantener grupos más grandes de tejido. La cámara se cubrió y la solución enzimática se hizo

circular a través de la cámara a aproximadamente 37° C y se agitó la cámara para permitir que las perlas alterasen el tejido pancreático mientras el enzima digería el páncreas. Una vez se hubo logrado la disociación y digestión adecuadas, se terminó la digestión y se recogió el tejido.

5 Separación de Tejido - El tejido recogido se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos a 4° C. Se aspiró el sobrenadante y el tejido se lavó dos veces adicionales en DPBS+. Tras el lavado final, el tejido se aplicó a un gradiente discontinuo para purificación. El tejido digerido se suspendió en polisacarosa (Mediatech, VA) con una densidad de 1,108 g/ml a una proporción de 1-2 ml de pellet de tejido por 10 ml de solución de polisacarosa. La suspensión de tejido se transfirió luego a tubos de centrifuga de policarbonato de fondo redondo y se aplicaron con

10 cuidado soluciones de polisacarosa con densidades de 1,096 y 1,037 a los tubos. Una capa final de DMEM completó el gradiente de purificación discontinuo. Los tubos de gradiente se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos a 4° C sin aplicar freno. Tras la centrifugación, el tejido se recogió de cada interfaz (tres interfaces) y se lavó varias veces en DPBS+ como se describe anteriormente y se recogió en un tubo de pruebas de 50 ml.

15 Disociación del Grupo Celular Adicional - Opcionalmente, se pueden disociar adicionalmente grupos celulares grandes obtenidos usando el protocolo anterior en grupos más pequeños o suspensiones celulares individuales. Tras el lavado final, el tejido de cada fracción se suspendió en 10 ml de suspensión 1X tripsina/EDTA que contenía 200U/ml de DNasa I. Los tubos se colocaron en el baño de agua y se aspiraron repetidamente y se

20 descargaron de una pipeta serológica de 10 ml durante 5-6 minutos hasta que se logró una suspensión celular casi individual. La digestión se neutralizó con la adición de DPBS+ a 4° C y los tubos se centrifugaron a 800 rpm durante 5 minutos. Las suspensiones celulares se lavaron con DPBS+ y se cultivaron como se describe a continuación.

25 Cultivo Celular Pancreático - Tras el lavado final, las células de cada interfaz se resuspendieron en DMEM, 2% de FBS, 100 U/μg de penicilina/estreptomicina, ITS 2mM de L-Glutamina, 0,0165 mM de ZnSO₄ (Sigma), y 0,38 μM de 2-mercaptoetanol (Invitrogen, CA) (en lo sucesivo "el medio de selección"). Se sembraron seis ml de la suspensión celular en matraces de cultivo de tejido T-25 y se sembraron 12 ml de la suspensión celular en matraces T-75. Los matraces se colocaron en incubadoras a 37° C con 5% de CO₂. Tras 2-4 semanas de cultivo, se realizó un cambio de medio completo y las células adherentes se devolvieron al cultivo en DMEM (2750 mg/l de D-Glucosa, 862 mg/l de glutamina) (Gibco, CA) con 5% de FBS (Hyclone, UT), 1% de P/S, 0,0165 mM de ZnSO₄ (en lo sucesivo "el medio de cultivo") y se permitió que llegase casi a la confluencia (esta etapa se refiere como "pase 0" o "P0"), momento en el que se sometieron a pases. El cultivo posterior de las células fue a 5000 células/cm² en el medio de crecimiento. Los cultivos se sometieron a pases cada 7-10 días a aproximadamente el 70-90% de confluencia. Se demostró que las células estromales se aislaron de cada una de las tres fracciones presentes tras el gradiente de purificación.

Ejemplo 2

Cultivo de Células Pancreáticas Estromales

40 Células pancreáticas aisladas de acuerdo con el Ejemplo 1 se cultivaron bajo condiciones hipóxicas (5% de CO₂, 3% de O₂, y 92% de N₂) o condiciones normóxicas (5% de CO₂, 20% de O₂, y 75% de N₂) durante 2-4 semanas en el medio de selección. Los cultivos se cambiaron luego al medio de crecimiento y se alimentaron de dos a tres veces por semana. Tras el periodo de cultivo inicial, se observaron células adherentes en las placas cultivadas bajo condiciones hipóxicas y normóxicas. Además, tras las 2-4 semanas iniciales de cultivo, había muy pocas

45 estructuras tipo isleta o ductales restantes en las placas.

Ejemplo de Referencia 3

Expresión de Genes Asociados con la Diferenciación en Células Madre Pluripotentes Cultivadas en Capas de Células Alimentadoras

50 Se obtuvo la línea de células madre embrionarias humana H9 del WiCell Research Institute, Inc., (Madison, WI) y se cultivó de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el instituto de origen. Las células madre embrionarias humanas H9 indiferenciadas que se habían mantenido en fibroblastos embrionarios de ratón primarios (MEF) inactivados se criopreservaron en 60% de FBS, 20% de DMSO, y 20% de DMEM/F12 (Invitrogen/GIBCO) suplementado con 20% de reemplazo de suero knockout, 100 nM de MEM aminoácidos no esenciales, 0,5 mM de beta-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina con 4 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico humano (bFGF) (todos de Invitrogen/GIBCO) a una velocidad de -1° C/min y se almacenaron en vapor de nitrógeno. Las células se descongelaron y se colocaron en placas sobre fibroblastos dérmicos humanos D551 tratados con mitocina

55 c sembrados a una densidad de 52.000 células/cm². Tras tres pases en las células D551, las células pluripotentes se recolectaron y luego se transfirieron en MATRIGEL en medio condicionado desde los cultivos de MEF inactivado suplementado con 8 ng/ml de bFGF. Las células madre embrionarias humanas colocadas en placas en MATRIGEL (1:30) se cultivaron a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂ dentro de una incubadora de cultivo de tejido humidificada en placas de cultivo de tejido de 60 mm. Cuando confluyeron (aproximadamente 5-7 días tras la colocación en placas), las células madre embrionarias humanas se trataron con 1 mg/ml de dispasa

60

65

(Invitrogen/GIBCO) durante 25-40 minutos. Una vez que las células se liberaron de la placa, se pipetearon repetidamente con una pipeta serológica de 2 ml hasta que se alcanzó el tamaño de colonia deseado. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, y el pellet se resuspendió y colocó en placas a una proporción de 1:3 a 1:4 de células en medio de cultivo nuevo sobre placas de cultivo celular recubiertas con MATRIGEL. Después de cinco a diez pases en MATRIGEL, las células H9 pluripotentes se transfirieron a una variedad de células alimentadoras diferentes. Brevemente, las células se cultivaron en las alimentadoras en medio celular ES que consistía de DMEM/F12 (Invitrogen/GIBCO) suplementado con 20% de reemplazo de suero knockout, 100 nM de MEM aminoácidos no esenciales, 0,5 mM de beta-mercaptoetanol, 2mM de L-glutamina con 4 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos humanos (bFGF) (todos de Invitrogen/GIBCO) en placas de 6 pocillos tratadas con cultivo de tejido. Las placas se preparan recubriéndolas con 0,1% de gelatina (Sigma) e incubando a 37° C durante un mínimo de 4 horas antes de sembrar las alimentadoras. Justo antes del sembrado la gelatina se aspira y la suspensión de células alimentadoras se administra a cada pocillo de las placa de 6 pocillos. Se permitió que las células se expandiesen durante 5 días antes de iniciar el protocolo de diferenciación.

Se evaluó la capacidad de la línea celular de fibroblastos dérmicos humanos D551 (ATCC No. CCL-110), la línea celular de fibroblastos de prepucio humano Hs27 (ATCC No. CRL-1634), y la línea celular estromal derivada de páncreas humano (divulgada en la WO2006094286) de mantener la pluripotencia. Las células alimentadoras humanas D551 se cultivaron en EMEM (ATCC 30-2003) suplementado con 10% de FBS. Una vez que confluyeron, las células se inactivaron por tratamiento con mitomicina-C y se criopreservaron en EMEM, 10% de FBS, y 5% de DMSO a una velocidad de -1° C/minutos y se almacenaron en vapor de nitrógeno. Las células se descongelaron a 37° C y se sembraron sobre placas de cultivo de tejido recubiertas con gelatina a 52.000/cm² en EMEM con 10% de FBS. Las células alimentadoras humanas Hs27 se cultivaron en DMEM (ATCC 30-2002) suplementado con 10% de FBS. Una vez que confluyeron, las células se inactivaron por tratamiento con mitomicina-C y se criopreservaron en DMEM, 10% de FBS, y 5% de DMSO a una velocidad de -1° C/minutos y se almacenaron en vapor de nitrógeno. Las células se descongelaron a 37° C y se sembraron en placas de cultivo de tejido recubiertas con gelatina a 55.000/cm² en DMEM con 10% de FBS. La línea de células estromales derivadas del páncreas se cultivaron en DMEM y 10% de FBS hasta que confluyeron y se trataron con mitomicina-C. Las células se criopreservaron en 90% de FBS y 10% de DMSO a una velocidad de -1° C/min y se almacenaron en vapor de nitrógeno. Las células se descongelaron a 37° C y se sembraron sobre placas de cultivo de tejido recubiertas con gelatina a 43.000/cm² en DMEM con 10% de FBS. Los cultivos de células madre embrionarias humanas, se colocaron en placas sobre fibroblastos embrionarios de ratón comercialmente disponibles (MEFSM), y se incluyeron como controles fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) recién derivados.

Las placas de células alimentadoras humanas inactivadas se lavaron con PBS y se sembraron con células madre embrionarias en medio ES. Las células madre embrionarias se cultivaron en las capas de células alimentadoras humanas durante 5 días. Después de este tiempo, se determinó la expresión de CXCR4, Sox-17, Fox-A2, HNF-4a, HNF-6 y AFP por PCR en tiempo real de células madre embrionarias humanas cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, Figura 1), fibroblastos embrionarios de ratón comercialmente disponibles (MEF-SM, Figura 1), fibroblastos dérmicos humanos (D551, Figura 1), fibroblastos de prepucio humanos (Hs27, Figura 1) y la línea de células estromales derivadas del páncreas humanas divulgada en la WO2006094286 (HP, figura 1). Los resultados de un experimento representativo se muestran en la Figura 1. Los resultados se normalizaron a células madre embrionarias humanas cultivadas en MATRIGEL (Off MG, Figura 1). Los CXCR4, Sox-17, Fox-A2, HNF-4a, HNF-6 y AFP son marcadores asociados con la diferenciación. El cultivo de células madre embrionarias humanas en la capa de células alimentadoras humanas resultó en la disminución en la expresión de estos marcadores. Estos datos sugieren que la línea de células de fibroblastos dérmicos humanos D551, los fibroblastos de prepucio humano Hs27, y la línea de células estromales derivadas del páncreas divulgada en la WO2006094286 mantienen la pluripotencia de las células madre embrionarias humanas.

Ejemplo de Referencia 4

Diferenciación de Células Madre Embrionarias Humanas en Células que Expresan Marcadores Característicos del Linaje Pancreático Endocrino en Capas de Células Alimentadoras Humanas.

Las líneas de células madre embrionarias humanas H1 y H9 se obtuvieron de WiCell Research Institute, Inc., (Madison, WI) y se cultivaron de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el instituto de origen. Las células madre embrionarias humanas H1 y H9 indiferenciadas que se habían mantenido en fibroblastos embrionarios de ratón primarios inactivados (MEF) se criopreservaron en 60% de FBS, 20% de DMSO, y 20% de DMEM/F12 (Invitrogen/GIBCO) se suplementaron con 20% de reemplazo de suero knockout, 100 nM de MEM aminoácidos no esenciales, 0,5 mM de betamercaptoetanol, 2mM de L-glutamina con 4 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico humano (bFGF) (todos de Invitrogen/GIBCO) a una velocidad de -1° C/min y se almacenaron en vapor de nitrógeno. Las células se descongelaron y se colocaron en placas sobre fibroblastos dérmicos humanos D551 tratados con mitocina C sembrados a una densidad de 52.000 células/cm². Tras tres pases en las células D551, las células pluripotentes se recolectaron y luego se transfirieron en MATRIGEL en medio condicionado desde los cultivos de MEF inactivado suplementado con 8 ng/ml de bFGF. Las células madre embrionarias humanas colocadas en placas en MATRIGEL (1:30) se cultivaron a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂ dentro de una

incubadora de cultivo de tejido humidificada en placas de cultivo de tejido de 60 mm. Cuando confluyeron (aproximadamente 5-7 días tras la colocación en placas), las células madre embrionarias humanas se trataron con 1 mg/ml de dispasa (Invitrogen/GIBCO) durante 25-40 minutos. Una vez que las células se liberaron de la placa, se pipetearon repetidamente con una pipeta serológica de 2 ml hasta que se alcanzó el tamaño de colonia deseado. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, y el pellet se resuspendió y colocó en placas a una proporción de 1:3 a 1:4 de células en medio de cultivo nuevo sobre placas de cultivo celular recubiertas con MATRIGEL. Después de once pases en MATRIGEL, las células H1 y H9 pluripotentes se transfirieron a una variedad de células alimentadoras diferentes descritas a continuación. Brevemente, las células se cultivaron en las alimentadoras en medio celular ES que consistía de DMEM/F12 (Invitrogen/GIBCO) suplementado con 20% de reemplazo de suero knockout, 100 nM de MEM aminoácidos no esenciales, 0,5 mM de beta-mercaptoetanol, 2mM de L-glutamina con 4 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos humanos (bFGF) (todos de Invitrogen/GIBCO) en placas de 6 pocillos tratadas con cultivo de tejido. Las placas se preparan recubriéndolas con 0,1% de gelatina (Sigma) e incubando a 37° C durante un mínimo de 4 horas antes de sembrar las alimentadoras. Justo antes del sembrado la gelatina se aspira y la suspensión de células alimentadoras se administra a cada pocillo de las placa de 6 pocillos. Se permitió que las células se expandiesen durante 5 días antes de iniciar el protocolo de diferenciación.

Se evaluó la capacidad de las capas de células alimentadoras humanas de apoyar la diferenciación de células madre embrionarias humanas. Las células madre embrionarias se cultivaron en las capas de células alimentadoras humanas inactivas con mitomicina C durante 5 días. Se incluyeron como controles cultivos de células madre embrionarias humanas, colocadas en placas sobre fibroblastos embrionarios de ratón comercialmente disponibles (MEF-SM), y fibroblastos embrionarios de ratón recién derivados (MEF).

Se evaluó la capacidad de fibroblastos dérmicos humanos (D551, Figuras 2 y 5), fibroblastos de prepucio humano (HS27, Figuras 2 y 5), y la línea de células estromales derivadas del páncreas humanas divulgada en la WO2006094286 (HP, Figuras 2 y 5) de apoyar la diferenciación de poblaciones de la línea de células madre embrionarias humanas H9 (Figura 2) y H1 (Figura 5) en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo. Se incluyeron como controles poblaciones de células madre embrionarias humanas cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón comercialmente disponibles (MEF-SM, Figuras 2 y 5), y fibroblastos embrionarios de ratón recién derivados (MEF, Figuras 2 y 5). Se añadió activina A (100 ng/ml) a las poblaciones de células madre embrionarias humanas cultivadas en las capas de células alimentadoras. Las células se cultivaron continuamente en presencia de activina A y se recolectaron después de 3 días. Se analizó el nivel de expresión de los marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo por PCR en tiempo real (Figuras 2 y 5). Los resultados mostrados en las Figuras 2 y 5 están normalizados a las células antes del inicio del protocolo de diferenciación (D0).

La activina A evoca un aumento en la expresión de CXCR4, Sox-17 y Fox-A2, en células cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón y capas de células alimentadoras humanas. Estos datos sugieren que las capas de células alimentadoras humanas son capaces de apoyar la diferenciación de células madre embrionarias humanas en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo.

Se evaluó la capacidad de fibroblastos dérmicos humanos (D551, Figuras 3 y 6), fibroblastos de prepucio humano (HS27, Figuras 3 y 6), y la línea de células estromales derivadas del páncreas humanas divulgada en la WO2006094286 (HP, Figuras 3 y 6) de apoyar la diferenciación de poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, derivadas de poblaciones de la línea de células madre embrionarias humanas H9 (Figura 3) y H1 (Figura 6) en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático. Se incluyeron como controles poblaciones de células madre embrionarias cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón comercialmente disponibles (MEF-SM, Figuras 3 y 6), y fibroblastos embrionarios de ratón recién derivados (MEF, Figuras 3 y 6). Se añadió 1 μ M de ácido retinoico, 0,25 μ M de KAAD-Ciclopamina y FGF-10 (50 ng/ml) a las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, derivadas de células madre embrionarias humanas cultivadas en las capas de células alimentadoras. Las células se recolectaron después de 8 días. Se analizó el nivel de expresión de los marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo por PCR en tiempo real (Figuras 3 y 6). Los resultados mostrados en las Figuras 3 y 6 están normalizados a la expresión génica D0.

El tratamiento con ácido retinoico 0,25 μ M de KAAD Ciclopamina y FGF-10 evocó un aumento en la expresión de Fox-A2, HNF-4a, HNF-6 y PDX-1, en células cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón, y capas de células alimentadoras humanas. Estos datos sugieren que las capas de células alimentadoras humanas son capaces de apoyar la diferenciación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, derivado de poblaciones de la línea de células madre embrionarias humanas H9 (Figura 3) y H1 (Figura 6) en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático.

Se evaluó la capacidad de fibroblastos dérmicos humanos (D551, Figuras 4 y 7), fibroblastos de prepucio humano (HS27, Figuras 4 y 7), y la línea de células estromales derivadas del páncreas humanas divulgada en la WO2006094286 (HP, Figuras 4 y 7) de apoyar la diferenciación de poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, derivadas de poblaciones de la línea de células madre

embrionarias humanas H9 (Figura 4) y H1 (Figura 7) en células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino. Se incluyeron como controles poblaciones de células madre embrionarias cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón comercialmente disponibles (MEF-SM, Figuras 4 y 7), y fibroblastos embrionarios de ratón recién derivados (MEF, Figuras 4 y 7). Se añadieron el inhibidor de γ -secretasa DAPT a 1 μ M, exendian-4, IGF-1 y HGF (todos 50 ng/ml) a las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, derivadas de células madre embrionarias humanas cultivadas en las capas de células alimentadoras. Tras 9 días de cultivo, se analizó el nivel de expresión de los marcadores característicos del linaje pancreático endocrino por PCR en tiempo real (Figuras 4 y 7). Los resultados mostrados en las Figuras 4 y 7 están normalizados a la expresión génica D0.

El tratamiento con inhibidor de γ -secretasa, exendina-4, IGF-1 y HGF evocó un aumento en la expresión de Fox-A2, HNF-4a, HNF-6, neuro-D1, Nkx2.2, Pax-4, Nkx6.1, PDX-1, glucagón, e insulina, en células cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón, y capas de células alimentadoras humanas. Estos datos sugieren que las capas de células alimentadoras humanas son capaces de apoyar la diferenciación de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino, derivado de poblaciones de la línea de células madre embrionarias humanas H9 (Figura 3) y H1 (Figura 6) en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático. La expresión de insulina y glucagón fue más alta en células cultivadas en capas de células alimentadoras humanas que en capas de células alimentadoras de ratón. Estos datos sugieren que las capas de células alimentadoras humanas son más capaces de apoyar la diferenciación de células madre embrionarias humanas.

Reivindicaciones

1. Un método para diferenciar células madre pluripotentes, que comprende los pasos de:

a. Cultivar las células madre pluripotentes

b. Colocar en placas las células madre pluripotentes sobre una capa de células alimentadoras humanas, y

c. Tratar las células madre pluripotentes sobre la capa de células alimentadoras humanas con por lo menos activina A seguido por tratamiento con por lo menos un factor que promueva la diferenciación en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático o del linaje endocrino pancreático

2. El método de la reivindicación 1, en el que la capa de células alimentadoras humanas comprende células de fibroblastos dérmicos.

3. El método de la reivindicación 1, en el que la capa de células alimentadoras humanas comprende células de fibroblastos de prepucio.

4. El método de la reivindicación 1, en el que la capa de células alimentadoras humanas comprende células estromales derivadas del páncreas.

5. El método de la reivindicación 1, en el que las células madre pluripotentes son células madre embrionarias.

6. El método de la reivindicación 5, en el que las células madre embrionarias son células madre embrionarias humanas.

7. El método de la reivindicación 4, en el que las células estromales derivadas del páncreas son sustancialmente negativas en la expresión de al menos un marcador de proteínas seleccionado del grupo que consiste de NCAM, ABCG2, citoqueratina 7, citoqueratina 8, citoqueratina 18 y citoqueratina 19.

8. El método de la reivindicación 4, en el que las células estromales derivadas del páncreas son sustancialmente positivas en la expresión de al menos un marcador de proteínas seleccionado del grupo que consiste de CD44, CD73, CD90 y CD105.

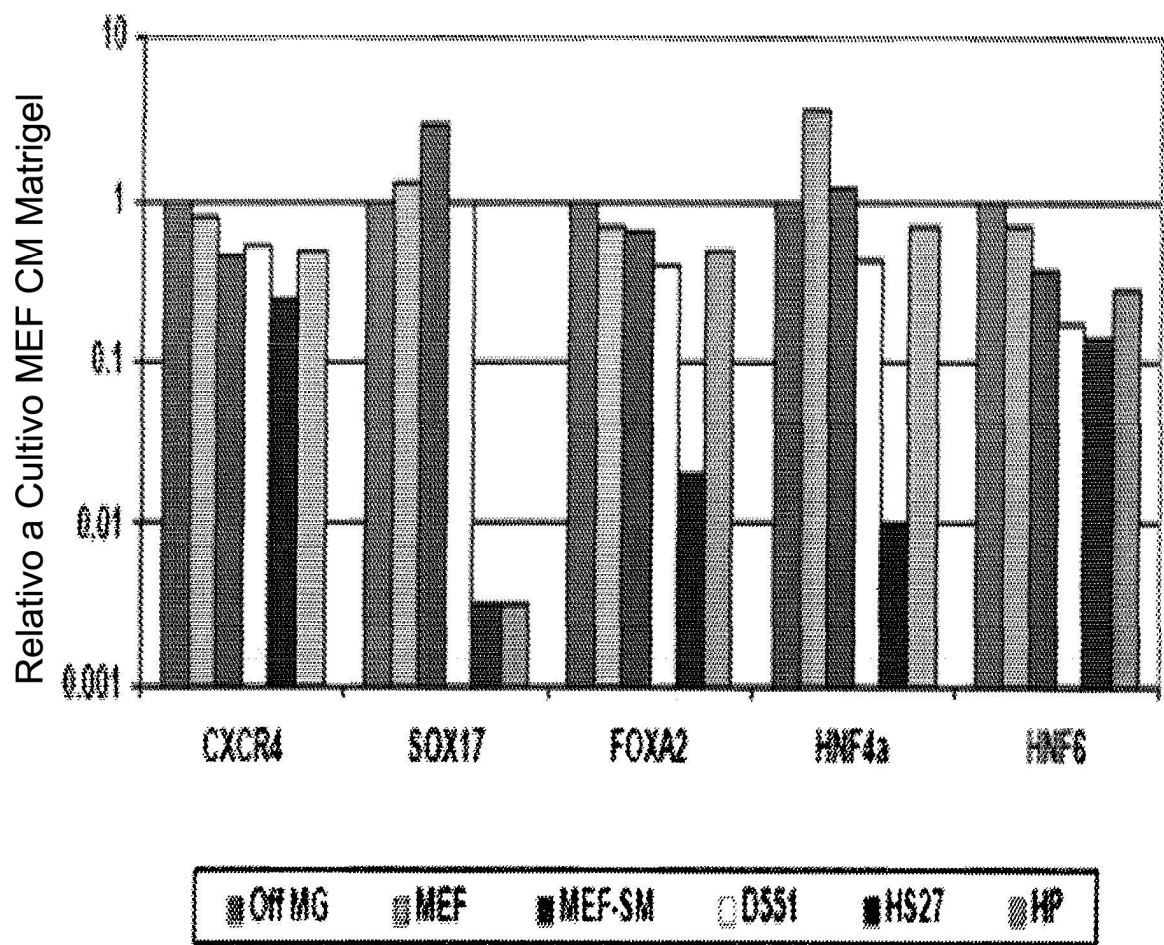
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el paso de cultivar las células madre pluripotentes se logra en una matriz extracelular.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el paso de cultivar las células madre pluripotentes se logra en una capa de células alimentadoras humanas.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el al menos un factor que promueve la diferenciación en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático o del linaje endocrino pancreático se selecciona de ácido retinoico, KAAD Ciclopamina, y un factor de crecimiento de fibroblastos.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el al menos un factor que promueve la diferenciación en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático o del linaje endocrino pancreático se selecciona de exendina-4, IGF-1 y HGF.

Figura 1

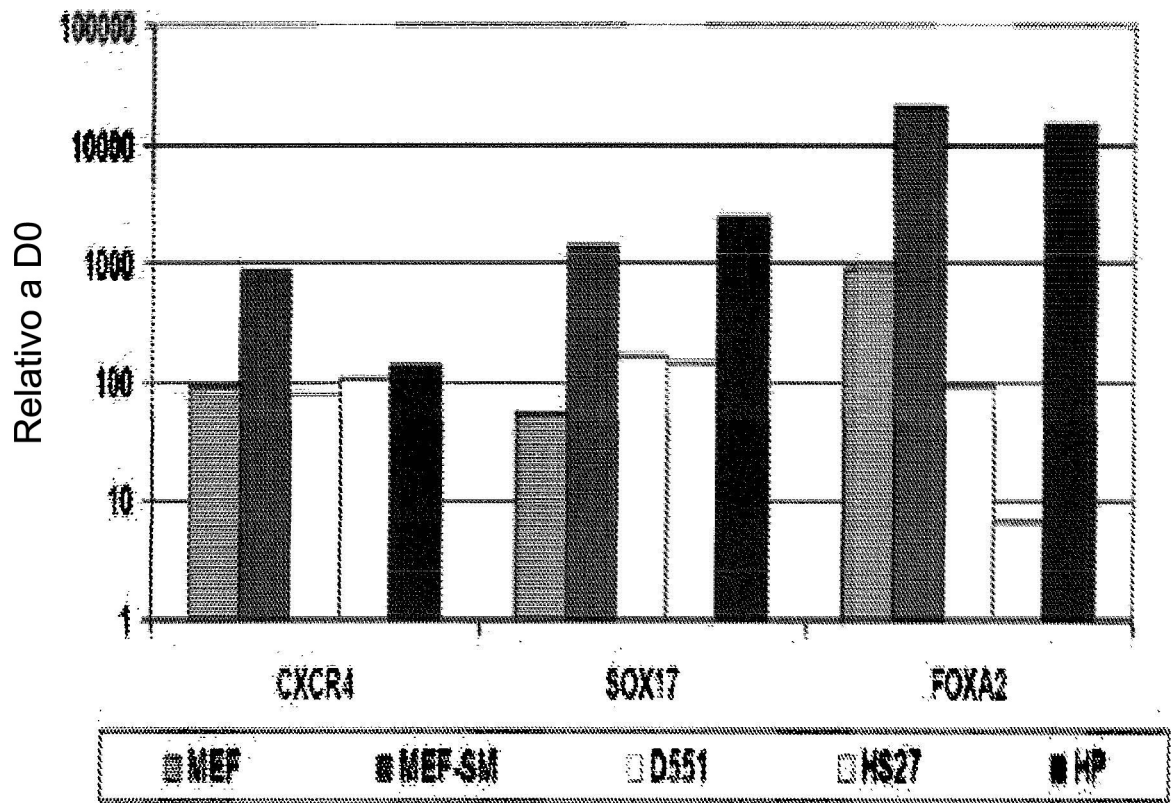


LFS5164USNP

John O'Neil

Diferenciación de Células Madre Pluripotentes

Figura 2

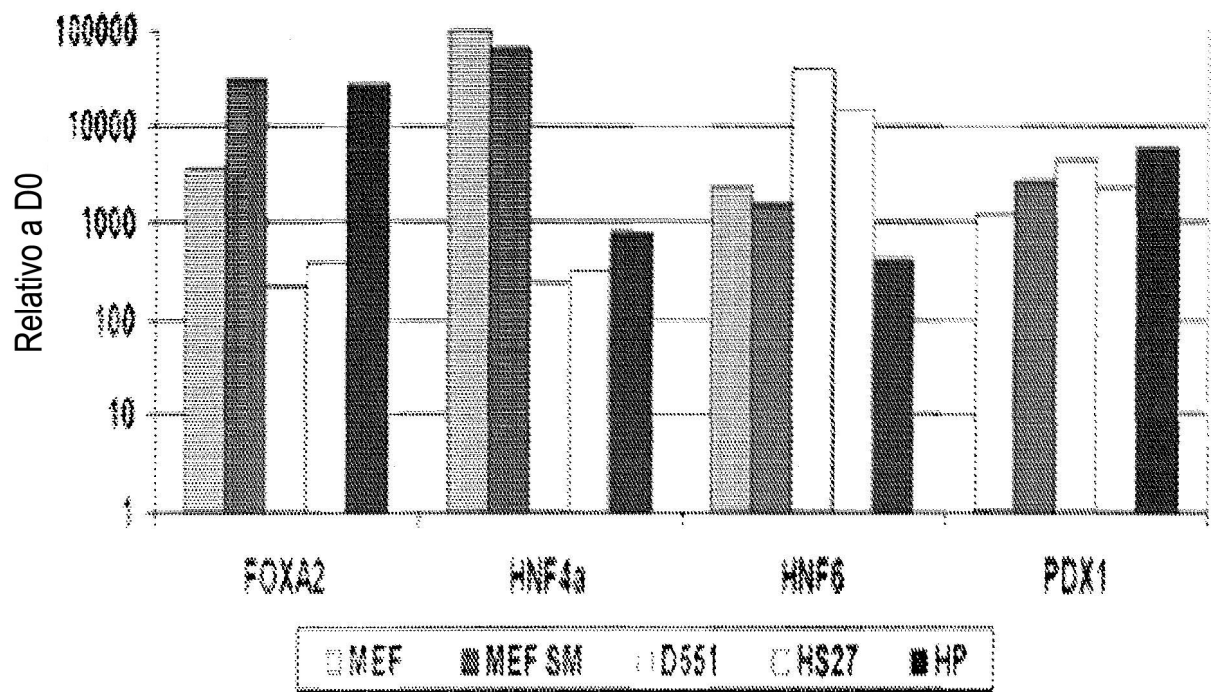


LFS5164USNP

John O'Neil

Diferenciación de Células Madre Pluripotentes

Figura 3

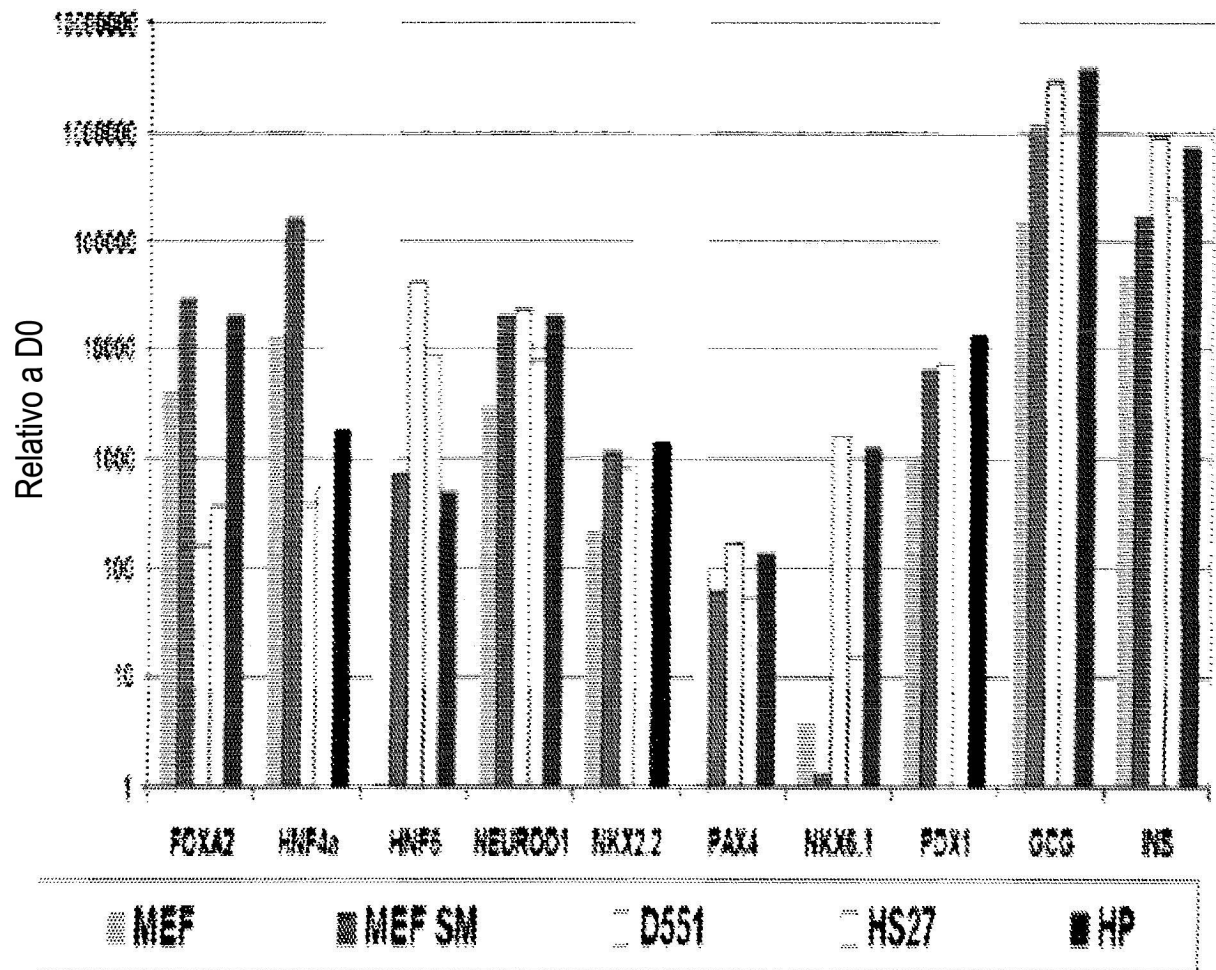


LFS5164USNP

John O'Neil

Diferenciación de Células Madre Pluripotentes

Figura 4

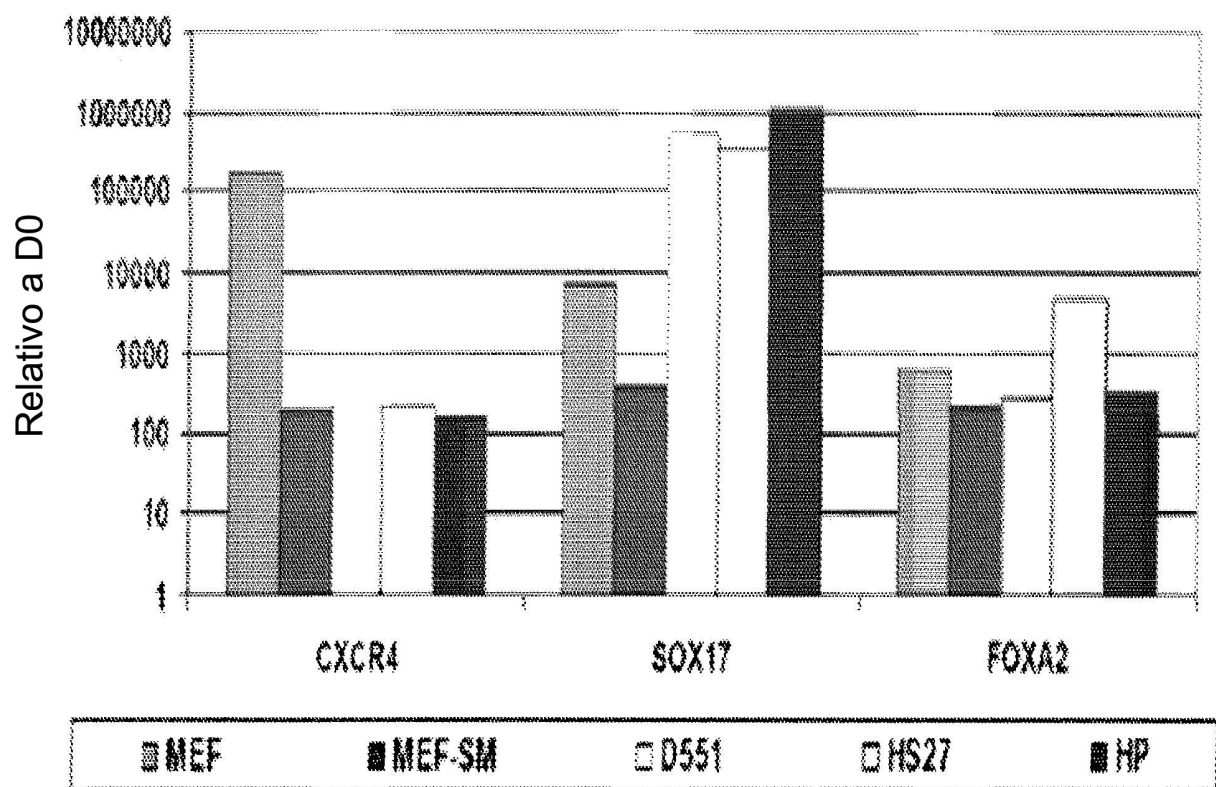


LFS5164USNP

John O'Neil

Diferenciación de Células Madre Pluripotentes

Figura 5

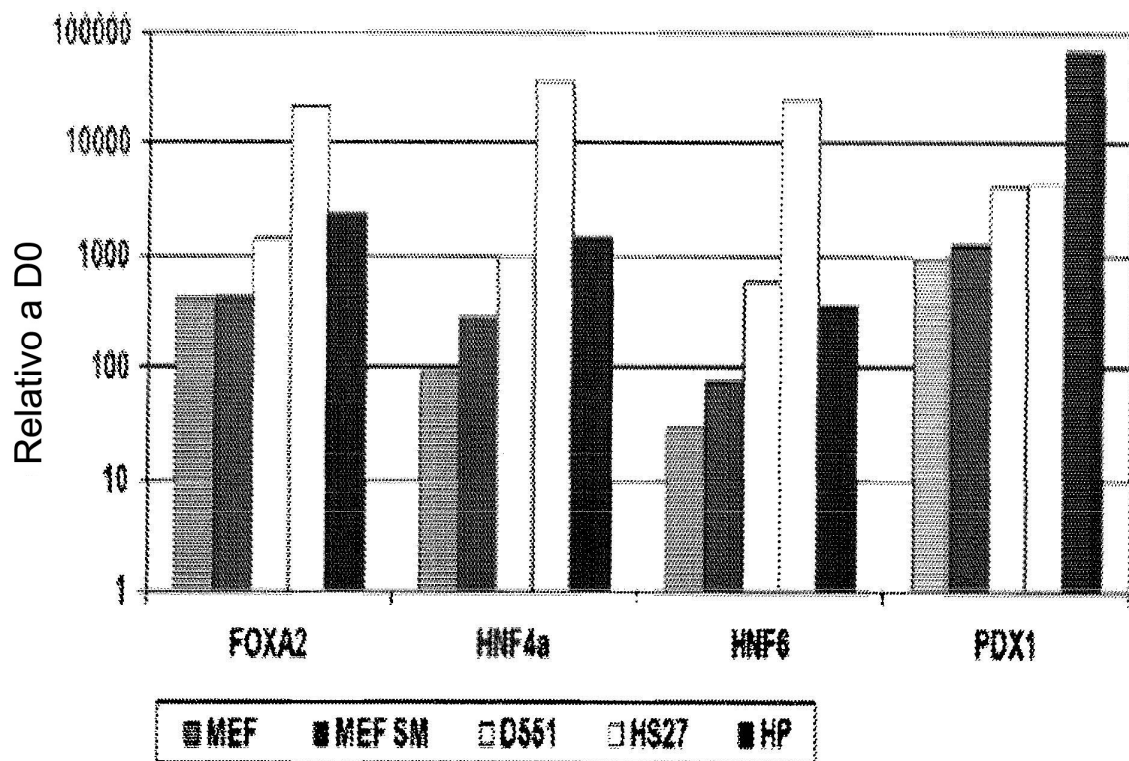


LFS5164USNP

John O'Neil

Diferenciación de Células Madre Pluripotentes

Figura 6

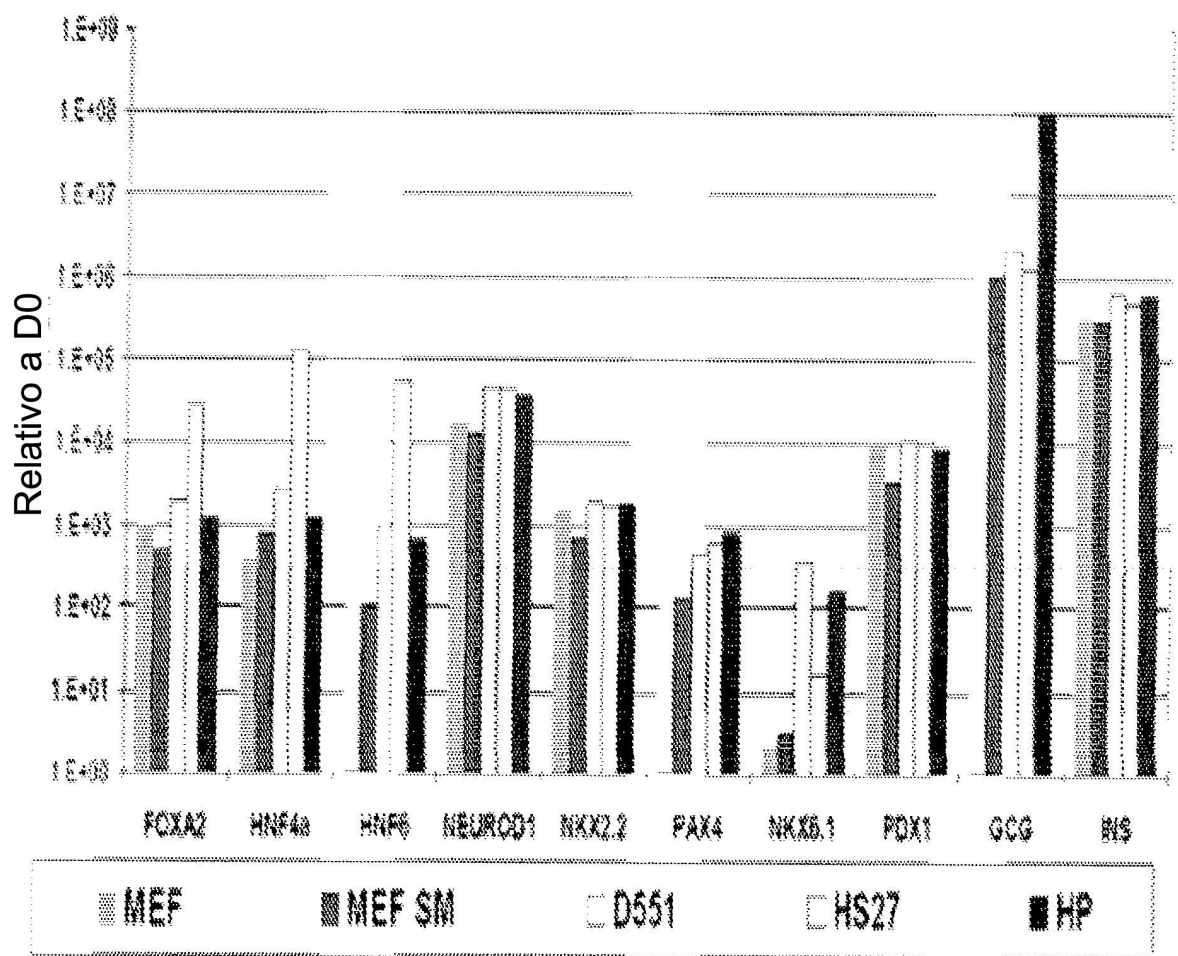


LFS5164USNP

John O'Neil

Diferenciación de Células Madre Pluripotentes

Figura 7



LFS5164USNP

John O'Neil

Diferenciación de Células Madre Pluripotentes