

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 493**

51 Int. Cl.:

A61K 35/39 (2015.01)

C12N 11/00 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61P 5/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2009** **PCT/US2009/064459**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.05.2010** **WO10057039**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2009** **E 09826863 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018** **EP 2356227**

54 Título: **Encapsulación de células pancreáticas derivadas de células madre humanas pluripotentes**

30 Prioridad:

14.11.2008 US 114857 P

09.12.2008 US 121086 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.05.2018

73 Titular/es:

VIACYTE, INC. (100.0%)

**3550 General Atomics Court Building No 2-503
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

MARTINSON, LAURA;

GREEN, CHAD;

KROON, EVERT;

AGULNICK, ALAN;

KELLY, OLIVIA y

BAETGE, EMMANUEL E.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 667 493 T3

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

DESCRIPCIÓN

Encapsulación de células pancreáticas derivadas de células madre humanas pluripotentes

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a los campos de la medicina y la biología celular. En particular, la presente invención se refiere a la encapsulación de células derivadas de células madre embrionarias humanas y otras células humanas pluripotentes.

Antecedentes de la invención

10 Las células madre embrionarias humanas (hES) y las células madre pluripotentes inducidas (iPS) a partir de células diferenciadas adultas son especialmente apropiadas para aplicaciones en terapia celular ya que son pluripotentes y auto-renovables. Debido a la gran variedad de tipos de células que pueden conseguir una diferenciación pluripotente en cultivos de células madre, el éxito para alcanzar la eficacia dirigida a la diferenciación, es útil para la aplicación terapéutica de células madre pluripotentes humanas. Es necesaria la diferenciación dirigida eficaz de las células madre pluripotentes humanas hacia varios tipos de células intermedias que incluyen células de líneas pancreáticas que emplean varios factores de crecimiento y señalización y moléculas pequeñas.

15 La Patente WO93/21902 se refiere a dispositivos implantables, biocompatibles que poseen al menos una cavidad en la que se pueden introducir células vivas y mantenerlas vivas cuando se implantan. La Patente WO96/32076 describe ensamblajes de implante implantables en hospedadores mamíferos. Los implantes están hechos de dos membranas semi permeables y un elemento termoplástico para crear un cierre periférico para el acoplamiento mecánico de la primera y la segunda membranas a la vez. El implante tiene al menos una cámara interna dispuesta
20 entre las dos membranas para mantener a las células vivas. La Patente WO91/10425 se refiere a unos sistemas de extrusión de cápsulas celulares. Las células están co-extruidas con disoluciones poliméricas y selladas en diferentes partes del implante para un implante compuesto de diferentes cámaras que comprende células (véase la fig.4). La Patente US 5.026.365 se refiere a cámaras de difusión selladas con paredes de al menos una membrana semi-permeable y que comprende células viables que pueden liberar agentes al hospedador. La cámara comprende dos
25 cierres en cada extremo. La Patente WO09/059072 describe la encapsulación de células derivadas del páncreas adulto denominadas células madre de proliferación intermedia "P3" que son células diferenciadas completamente que tienen una función islote normal.

Compendio

30 El alcance de la presente invención se define mediante las reivindicaciones, y cualquier información que no esté dentro de las reivindicaciones se proporciona sólo como información. Las divulgaciones descritas en la presente memoria se refieren a métodos para producir insulina en un mamífero proporcionando una cámara implantable en un mamífero hospedador, proporcionando a dicha cámara una célula progenitora pancreática derivada de una célula madre pluripotente humana (por ejemplo, células hES o iPS), madurando la célula progenitora pancreática a una célula que secreta la hormona pancreática madura, en donde la célula que secreta la hormona pancreática es una
35 célula que secreta insulina que produce insulina en respuesta a la estimulación *in vivo* de glucosa, produciendo así insulina *in vivo* en el mamífero. En algunos aspectos, la cámara se implanta en el mamífero antes de introducir la célula progenitora pancreática. En otros aspectos, a la cámara se le deja vascularizarse antes de introducirla en la célula progenitora pancreática. En otros aspectos, la célula se introduce en la cámara antes de la implantación.

40 Un aspecto se refiere a un método para producir insulina en un mamífero, que comprende: (a) proporcionar una población de células progenitoras pancreáticas positivas PDX1 pancreáticas en un dispositivo semi-permeable implantable; (b) madurar la población celular en dicho dispositivo hacia un islote, en donde el islote comprende células endocrinas y acinares, y en donde la célula endocrina es al menos una célula que secreta insulina que produce insulina en respuesta a la estimulación de glucosa *in vivo*, produciendo así insulina *in vivo* en el mamífero.

45 Otra divulgación se refiere a un ensamblaje de encapsulación celular para implantar una población celular en un hospedador mamífero. En un aspecto, el ensamblaje comprende un cierre periférico que determina al menos una cámara para la encapsulación de células vivas. En otro aspecto, el ensamblaje comprende una pared que tiene un puente periférico, en donde el ensamblaje comprende un primer cierre en el puente periférico de la pared, formando así el ensamblaje de encapsulación. En algunos aspectos, el ensamblaje comprende un segundo cierre que reduce eficazmente el volumen de la cámara.

50 Otra divulgación se refiere a una población de células progenitoras pancreáticas humanas crioconservadas. En un aspecto de la divulgación, la población celular es adecuada para el trasplante en un mamífero.

Otra divulgación se refiere a un método para obtener una población de células adecuadas para el trasplante. En un aspecto de la divulgación, las células adecuadas para el trasplante se obtienen mediante un método que comprende: a) poner en contacto una población de células progenitoras pancreáticas humanas con una disolución crioconservada para obtener así una población de células para crioconservación; b) disminuir la temperatura de las
55 células progenitoras para crioconservación hasta aproximadamente -196°C para obtener células crioconservadas; y

c) incrementar la temperatura de las células criopreservadas para obtener así una población de células progenitoras pancreáticas adecuadas para el trasplante. En algunos aspectos la temperatura de las células progenitoras para criopreservación se disminuye a menos de 0°C, -10°C, -20°C, -30°C, -40°C, -50°C, -60°C, -70°C, -80°C, -90°C, -100°C, -110°C, -120°C, -130°C, -140°C, -150°C, -160°C, -170°C, -180°C, -190°C, -200°C, -210°C, -220°C, -230°C, -240°C, -250°C, o -260°C.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista en perspectiva de un dispositivo de encapsulación dual con una soldadura ultrasónica interna para compartimentar el lumen principal.

La Figura 2 es una vista de la sección superior del dispositivo de encapsulación mostrado en la Fig. 1.

La Figura 3 es una vista de la sección lateral del dispositivo de encapsulación mostrado en la Fig. 1 con una sección transversal tomada a través del centro del dispositivo a lo largo de la región de la soldadura ultrasónica interna.

La Figura 4 es una vista lateral del dispositivo de encapsulación mostrado en la Fig. 1 con una sección transversal tomado a través del centro de un lumen compartimentado a lo largo del eje del puerto.

La Figura 5 es una vista del extremo del dispositivo de encapsulación mostrado en la Fig. 1 con una sección transversal tomado a través de los lúmenes compartimentados.

La Figura 6 es una vista en perspectiva de un dispositivo de encapsulación sin puertos de carga y que contiene puntos de soldadura ultrasónico para compartimentar el lumen interno.

La Figura 7 es una vista de la sección transversal superior del dispositivo de encapsulación mostrado en la Fig. 6.

La Figura 8 es una vista lateral del dispositivo de encapsulación mostrado en la Fig. 6 con una sección transversal tomada a través del centro de un lumen compartimentado.

La Figura 9 es una vista desde el extremo del dispositivo de encapsulación mostrado en la Fig. 6 con una sección transversal a través de los lúmenes compartimentados.

La Figura 10 es una vista en perspectiva de un dispositivo de encapsulación sin puertos de carga y que contiene puntos de soldadura ultrasónico continuos para compartimentar el lumen interno. A cada uno de los puntos de soldadura se le ha eliminado el centro para facilitar la vascularización.

La Figura 11 es una vista ampliada del dispositivo de encapsulación mostrado en la Fig. 10.

Descripción detallada

Las divulgaciones descritas en la presente memoria se dirigen a métodos para producir insulina *in vivo* mediante la implantación en un mamífero de células progenitoras pancreáticas humanas derivadas de células madre embrionarias humanas en dispositivos de encapsulación, que incluyen un dispositivo basado en polietilenglicol bio-compatibles y un dispositivo mecánico/médico.

A menos que se indique de otra manera, los términos empleados en la presente memoria son los que se entienden según el uso convencional por los expertos habituales en la técnica pertinente. Además de las definiciones de los términos proporcionados abajo, las definiciones de los términos comunes en biología molecular se pueden encontrar también en Rieger *et al.*, 1991 Glossary of genetics: classical and molecular, 5ª Ed., Berlín: Springer-Verlag; y en Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel *et al.*, Eds., Current Protocols, un proyecto común entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley e Hijos, Inc., (Suplemento 1998). Se entiende que como se emplea en la memoria y en las reivindicaciones, "un" o "uno" puede significar uno o más, dependiendo del contexto en el que se emplee. Por tanto, por ejemplo, en referencia a "una célula" puede significar que se puede utilizar al menos una célula.

En un aspecto, las células derivadas hES se encapsulan empleando un polietilenglicol (PEG) bio-compatibles. La encapsulación basada en PEG se describe en más detalle en la Patente U.S. Nº 7.427.415, titulada IMPLANTATION OF ENCAPSULATED BIOLOGICAL MATERIALS FOR TREATING DISEASES; Patente U.S. Nº 6.911.227, titulada GELS FOR ENCAPSULATION OF BIOLOGICAL MATERIALS; y Patentes U.S. Nºs 6.911.227, 5.529.914, 5.801.033, 6.258.870, tituladas GELS FOR ENCAPSULATION OF BIOLOGICAL MATERIALS.

En otro aspecto, el dispositivo de encapsulación es un dispositivo TheraCyte (Irvine, California). Los dispositivos de encapsulación celular TheraCyte se describen además en las Patentes U.S. Nºs 6.773.458; 6.156.305; 6.060.640; 5.964.804; 5.964.261; 5.882.354, 5.807.406; 5.800.529; 5.782.912; 5.741.330; 5.733.336; 5.713.888; 5.653.756; 5.593.440; 5.569.462; 5.549.675; 5.545.223; 5.453.278; 5.421.923; 5.344.454; 5.314.471; 5.324.518; 5.219.361; 5.100.392; y 5.011.494.

En un aspecto, se describen métodos para producir suspensiones agregadas de células hES a partir de una suspensión celular única de cultivos de células madre pluripotentes o a partir de cultivos de células derivadas de hES. La célula madre pluripotente se puede cultivar inicialmente sobre alimentadores de fibroblastos, o puede estar libre del alimentador. Los métodos para aislar las células hESC y cultivarlas en células de alimentación humanas se describieron en la Patente U.S. N° 7.432.104 titulada METHODS FOR THE CULTURE OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS ON HUMAN FEEDER CELLS. Se describen en detalle varios métodos para producir cultivos de suspensiones de agregados de células hES y/o de cultivos de suspensiones de agregados de células derivadas de las hES en la Solicitud U.S. N° 12/264.760, titulada STEM CELL AGGREGATE SUSPENSION COMPOSITIONS AND METHODS OF DIFFERENTIATION THEREOF, presentada el 4 de Octubre, 2008.

Las condiciones del cultivo de diferenciación y de los tipos de células derivadas de hES se describen en la presente memoria de manera sustancialmente similar a la que se describe en D'Amour et al. 2006, anteriormente citada o las descritas en la Patente U.S. N° 7.534.608; la Solicitud de Patente U.S. N°s 11/681.687, presentada el 2 de Marzo, 2007; y la N° 11/773.944, presentada el 5 de Julio, 2007. D'Amour et al describe un protocolo de diferenciación de 5 etapas: etapa 1 (da como resultado la mayor parte de la producción del endodermo definitivo), etapa 2 (da como resultado la mayor parte de la producción del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-negativo), etapa 3 (da como resultado la mayor parte de la producción del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-positivo), etapa 4 (da como resultado la mayor parte de la producción del endodermo pancreático o del endocrino pancreático progenitor) y etapa 5 (da como resultado la mayor parte de la producción de las células endocrinas que expresan hormonas).

Como se emplea en la presente memoria, "endodermo definitivo (DE)" se refiere a una línea celular del endodermo multipotente que se puede diferenciar en células del tubo digestivo o en órganos derivados del tubo digestivo. De acuerdo con determinados aspectos, las células del endodermo definitivo son células de mamífero, y en un aspecto preferido, las células del endodermo definitivo son células humanas. En algunos aspectos, las células del endodermo definitivo se expresan o fallan significativamente hacia determinados marcadores. En algunos aspectos, uno o más de los marcadores seleccionados de CER, FOXA2, SOX17, CXCR4, MIXL1, GATA4, HNF3-β, GSC, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 y CRIP1 se expresan en células del endodermo definitivo. En otros aspectos, uno o más de los marcadores seleccionados de OCT4, α-fetoproteína (AFP), Trombomodulina (TM), SPARC, SOX7 y HNF4-α no se expresan de manera significativa en las células del endodermo definitivo. Dejar claro, una célula del endodermo definitivo se distingue de otras líneas celulares del endodermo, tal como las células del endodermo del tracto digestivo superior o las células del tracto digestivo superior PDX1-negativo, que expresan de forma apreciable HNF4-α en comparación con el endodermo definitivo. Las poblaciones celulares del endodermo definitivo y los métodos de producción de los mismos se describen también en la Patente U.S. N° 7.510.876 titulada DEFINITIVE ENDODERM.

Otras realizaciones se refieren a cultivos celulares denominados "células del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-negativo" o "células del endodermo del tracto digestivo" o "endodermo digestivo" o equivalentes de los mismos. En algunos aspectos, las células del endodermo del tracto digestivo superior expresan marcadores SOX17, HNF1-β, HNF4-α y FOXA1 pero no expresan sustancialmente PDX1, AFP, SOX7, SOX1. Se describen también poblaciones celulares del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-negativo y métodos de producción de los mismos en la Solicitud U.S. Número 11/588.693, titulada endodermo del tracto digestivo dorsal y ventral que expresa PDX1, presentada el 27 de Octubre, 2006. De nuevo, el endodermo del intestino expresa de manera apreciable HNF4-α en comparación con las células del endodermo definitivo, o las células de la Etapa 1; véanse los Ejemplos de a continuación.

Otros aspectos descritos en la presente memoria se refiere a cultivos celulares de "células del endodermo del tracto digestivo superior, PDX1-positivo, parcial dorsalmente", "células del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-positivo", o "endodermo PDX1-positivo", o equivalentes de los mismos. En algunos aspectos, las células del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-positivo expresan marcadores PDX1, HNF6, SOX 9 y PROX 1 pero no expresan sustancialmente NKX6.1, PTF1A, CPA, cMYC, SOX17, HNF1B o HNF4alfa. Se describen también poblaciones celulares del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-positivo y métodos de producción de los mismos en la Solicitud U.S. Número 11/588.693, titulada endodermo del tracto digestivo superior dorsal y ventral que expresa PDX1, presentado el 27 de Octubre, 2006.

Otros aspectos descritos en la presente memoria se refieren a cultivos celulares de "progenitores pancreáticos", "células del endodermo pancreático PDX1-positivo", "progenitor pancreático PDX1-positivo", "epitelio pancreático", "PE", o equivalentes de los mismos. Las células progenitoras pancreáticas PDX1-positivo son multipotentes y pueden dar lugar a varias células en el páncreas que incluyen pero no se limitan a, células acinares, del conducto y endocrinas. En algunos aspectos, las células progenitoras pancreáticas PDX1-positivo expresan altos niveles de PDX1 y NKX6.1 en comparación con las células del endodermo no pre-pancreático que no expresan de manera apreciable estos marcadores. Las células progenitoras pancreáticas PDX1-positivo expresan también bajos o ningún nivel de PTF1A, CPA, cMYC, NGN3, PAX4, ARX y NKX2.2, INS, GCG, GHRL, SST, y PP.

Alternativamente, otros aspectos se refieren a cultivos celulares de "células del extremo del endodermo pancreático PDX1-positivo", o equivalentes de los mismos. En algunos aspectos, las células del extremo del endodermo pancreático PDX1-positivo expresan niveles aumentados de PDX1 y NKX6.1 similares a los de las células

progenitoras pancreáticas PDX1-positivo, pero a diferencia de las células progenitoras pancreáticas PDX1-positivo, las células del extremo del endodermo pancreático PDX1-positivo expresan de manera adicional altos niveles de PTF1A, CPA y cMYC. Las células del extremo del endodermo pancreático PDX1-positivo expresan también bajos o ningún nivel de NGN3, PAX4, ARX y NKX2.2, INS, GCG, GHRL, SST, y PP.

Otros aspectos se refieren a cultivos celulares de “células precursoras endocrinas pancreáticas”, “células progenitoras endocrinas pancreáticas” o equivalentes de los mismos. Las células progenitoras endocrinas pancreáticas son multipotentes y dan lugar a células endocrinas maduras que incluyen células alfa, beta, delta y PP. En algunos aspectos, las células progenitoras endocrinas pancreáticas expresan altos niveles de NGN3, PAX4, ARX y NKX2.2 en comparación con otros tipos de células progenitoras no endocrinas. Las células progenitoras pancreáticas expresan también bajos o ningún nivel de INS, GCG, GHRL, SST, y PP.

Otros aspectos se refieren a cultivos celulares de “células endocrinas pancreáticas”, “células que secretan hormonas pancreáticas”, “células que expresan hormonas del islote pancreático”, o equivalentes de los mismos referidos a una célula, que se han derivado de una célula pluripotente *in vitro*, por ejemplo, células alfa, beta, delta y/o células PP o combinaciones de las mismas. Las células endocrinas pueden ser poli-hormonales o mono-hormonales, por ejemplo que expresan insulina, glucagón, grelina, somatostatina y polipéptido pancreático o combinaciones de los mismos. Las células endocrinas pueden por tanto expresar una o más hormonas pancreáticas, que tienen al menos algunas de las funciones de una célula del islote pancreático. Las células que expresan hormonas del islote pancreático pueden ser maduras o inmaduras. Las células que expresan hormonas del islote pancreático inmaduras se pueden distinguir de las células que expresan hormonas del islote pancreático maduras en base a la expresión diferencial de determinados marcadores, o en base a sus capacidades funcionales, por ejemplo, la sensibilidad a glucosa *in vitro* o *in vivo*. Las células endocrinas pancreáticas expresan también bajos o ningún nivel de NGN3, PAX 4, ARX y NKX2.2.

La mayoría de los tipos de celulares anteriores están epitelizadas en comparación con las células del endodermo definitivo mesenquimal. En algunos aspectos, las células del endodermo pancreático expresan uno o más marcadores seleccionados de la Tabla 3 y/o uno o más marcadores seleccionados de la Tabla 4 relativa a la Solicitud U.S. 11/588.693 titulada PDX1 EXPRESSING DORSAL AND VENTRAL FOREGUT ENDODERM, presentada el 27 de Octubre, 2006, y también a la Solicitud U.S. Número 11/115.868, titulada PDX1-expressing endoderm, presentada el 26 de Abril, 2005.

En determinados aspectos, los términos “enriquecido”, “aislado”, “separado”, “clasificado”, “purificado” o purificado por agotamiento o equivalentes de los mismos se refieren a un cultivo celular o a una población celular o muestra celular que contiene al menos 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la línea celular deseada o una célula deseada que tiene un determinado fenotipo celular, por ejemplo, que expresa un determinado marcador celular o que no expresa un determinado marcador celular genético característico de este fenotipo celular. Se describen también métodos para purificar, enriquecer, aislar, separar, clasificar, y/o reducir líneas celulares del endodermo derivadas de células hES en la Solicitud U.S. Número 12/107.020, titulada METHODS FOR PURIFYING ENDODERM AND PANCREATIC ENDODERM CELLS DERIVED FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS, presentada el 21 de Abril, 2008.

Como se emplea en la presente memoria, el término “poner en contacto” (es decir, poner en contacto una célula, *por ejemplo*, una célula diferenciable, con un compuesto) se destina a incluir en incubación el compuesto y la célula juntos *in vitro* (*por ejemplo*, añadir el compuesto a las células en cultivo). El término “poner en contacto” no se destina a incluir la exposición de células *in vivo* a un medio de cultivo determinado que comprende un ligando ErbB3, y opcionalmente, un miembro de la familia TGF- β , que puede aparecer de manera natural en un sujeto (es decir, exposición que puede aparecer como resultado de un proceso fisiológico natural. La etapa de poner en contacto la célula con un medio de cultivo determinado que comprende un ligando ErbB3, y opcionalmente, un miembro de la familia TGF- β , se puede realizar de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, las células se pueden tratar en un cultivo adherente, o en un cultivo en suspensión. Se entiende que las células puestas en contacto con el medio determinado se pueden tratar además con un medio de diferenciación para estabilizar las células, o para diferenciar las células.

Como se emplea en la presente memoria, el término “diferenciar” se refiere a la producción de un tipo de células que es más diferenciada que el tipo de célula de la que se deriva. En algunos aspectos, el término “diferenciar” implica producir una célula que tiene menos opciones de darse que la célula de la que se deriva. Por lo tanto el término abarca tipos celulares que son parcial y completamente diferenciados. Normalmente las células diferenciadas derivadas de células hES se refieren a células derivadas de hES o a cultivos de agregados de células derivadas de hES, o a suspensiones de células únicas derivadas de hES, o a cultivos adherentes de células derivadas de hES y similares.

Como se emplea en la presente memoria, el término “célula diferenciable” se emplea para describir una célula o población de células que se pueden diferenciar en al menos células maduras parcialmente, o que pueden participar en la diferenciación de células, *por ejemplo*, fusionarse con otras células, que se pueden diferenciar en al menos células maduras parcialmente. Como se emplea en la presente memoria, “células maduras parcialmente”, “células progenitoras”, “células inmaduras”, “células precursoras”, “células multipotentes” o equivalentes de las mismas

incluyen a aquellas células que no se diferencian completamente, por ejemplo, células del endodermo definitivo, células del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-negativo, células del endodermo pancreático PDX1-positivo que incluyen además células del endodermo pre-pancreático PDX1-positivo y células del extremo del endodermo pancreático PDX1-positivo. Todas son células que muestran al menos una característica del fenotipo, tal como la morfología o la expresión proteica, de una célula madura a partir del mismo órgano o tejido pero pueden diferenciarse además en al menos otro tipo de célula. Por ejemplo, un hepatocito normal, maduro expresa normalmente proteínas tales como albúmina, fibrinógeno, α -1-antitripsina, factores de coagulación de protrombina, transferrina, y enzimas de desintoxicación tal como el citocromo P-450s, entre otros. Por tanto, como se emplea en la presente memoria, un “hepatocito maduro parcialmente” puede expresar albúmina u otra o más proteínas, o tomar la apariencia o función de un hepatocito maduro, normal.

Como se emplea en la presente memoria, el término “sustancialmente” se refiere a una gran extensión o grado, por ejemplo, “sustancialmente similar” en el contexto se podría emplear para describir un método que es en gran extensión o grado similar a otro método. Sin embargo, como se emplea en la presente memoria, el término “libre sustancialmente”, por ejemplo “libre sustancialmente” o “libre sustancialmente de contaminantes”, o “libre sustancialmente de suero” o “libre sustancialmente de insulina o factor de crecimiento similar a insulina” o equivalentes de los mismos, significa que la disolución, medio, suplemento, excipiente y similares, es al menos 98%, o al menos 98,5%, o al menos 99%, o al menos 99,5%, o al menos 100% libre de suero, contaminantes o equivalentes de los mismos. En un aspecto, un medio de cultivo determinado no contiene suero, o es 100% libre de suero, o es libre sustancialmente de suero. En cambio, como se emplea en la presente memoria, el término “similar sustancialmente” o equivalentes de los mismos significa que la composición, proceso, método, disolución, medio, suplemento, excipiente y similares significa que el proceso, método, disolución, etc, es al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% similar al descrito anteriormente en la presente memoria.

También, como se emplea en la presente memoria, en relación con la composición de una población celular, el término “esencialmente” o “sustancialmente” significa predominante o principalmente. En algunos aspectos estos términos significan al menos 85% de las células en una población celular, al menos 86% de las células en una población celular, al menos 87% de las células en una población celular, al menos 88% de las células en una población celular, al menos 89% de las células en una población celular, al menos 90% de las células en una población celular, al menos 91% de las células en una población celular, al menos 92% de una población celular, al menos 93% de las células en una población celular, al menos 94% de las células en una población celular, al menos 95% de las células en una población celular, al menos 96% de las células en una población celular, al menos 97% de las células en una población celular, al menos 98% de las células en una población celular, o al menos 99% de las células en una población celular. En otros aspectos, los términos o frases “libre esencialmente en” y “libre sustancialmente en” se refiere a una cantidad mínima o reducida de un componente o una célula presente en algún cultivo celular, por ejemplo, progenitores pancreáticos como se describen en la presente memoria son “homogéneos esencialmente o sustancialmente”, “homo-celulares esencialmente o sustancialmente”, “células hES esencialmente”, “células del endodermo definitivo esencialmente o sustancialmente”, “células del endodermo del tracto digestivo superior esencialmente o sustancialmente”, “células del endodermo del intestino esencialmente o sustancialmente”, “células del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-negativo esencialmente o sustancialmente”, “células del endodermo pre-pancreático PDX1-positivo esencialmente o sustancialmente”, “células progenitoras pancreáticas PDX1-positivo esencialmente o sustancialmente”, “células epiteliales pancreáticas esencialmente o sustancialmente”, “células del extremo del endodermo pancreático PDX1-positivo esencialmente o sustancialmente”, “células precursoras endocrinas pancreáticas esencialmente o sustancialmente”, “células endocrinas pancreáticas esencialmente o sustancialmente”, y similares. Los términos, “esencialmente” y “sustancialmente” pueden significar también que al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, al menos 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 99% de las células (endodermo definitivo; endodermo del tracto digestivo superior PDX1-negativo; endodermo pre-pancreático PDX1-positivo; células progenitoras pancreáticas PDX1-positivo; células del extremo del endodermo pancreático PDX1-positivo; células precursoras endocrinas pancreáticas, y células que secretan hormonas endocrinas).

Como se emplea en la presente memoria, el término “cantidad eficaz” de un compuesto o equivalentes de la misma se refiere a la concentración del compuesto que es suficiente en la presencia del resto de los componentes del medio determinado, para efectuar la estabilización de la célula diferenciable en cultivo durante más de un mes en ausencia de una célula de alimentación y en ausencia de suero o reemplazo de suero. Esta concentración se determina fácilmente por un experto habitual en la técnica.

Como se emplea en la presente memoria, el término “expresa” se refiere a la transcripción de un polipéptido o a la traducción de un polipéptido en una célula, tal que los niveles de la molécula son más cuantificables en la célula que expresa la molécula que en una célula que no expresa la molécula. Los métodos para medir la expresión de una molécula son bien conocidos por los expertos habituales en la técnica, e incluyen sin limitación, transferencia Northern, RT-PCR, hibridación *in situ*, transferencia Western, e inmunotinción.

Como se emplea en la presente memoria cuando se refiere a una célula, línea celular, cultivo celular o población de células, el término “aislado” se refiere a estar separado sustancialmente de la fuente natural de las células tal que la célula, línea celular, cultivo celular, o población de células son capaces de cultivarse *in vitro*. Además, el término

“aislar” se emplea para referirse a la selección física de una o más células fuera de un grupo de dos o más células, en donde las células se seleccionan en base a la morfología y/o la expresión celular de varios marcadores.

Como se emplea en la presente memoria, el término “células conservadas” significa células mantenidas en un estado viable durante un periodo de tiempo antes del trasplante. El periodo de tiempo puede ser de 1 hora, 2 horas, 5 horas, 10 horas, 15 horas, 20 horas, 24 horas, 2 días, 4 días, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 10 meses, 1 año, 2 años, 4 años, 6 años, 8 años, 10 años, 12 años, 14 años, 16 años, 18 años, 20 años, 22 años, 24 años, 30 años, 35 años, 40 años, 45 años, o 100 años o cualquier periodo de tiempo entre cualquiera de los tiempos proporcionados en este intervalo.

Las células diferenciadas, como se emplea en la presente memoria, pueden ser pluripotentes, multipotentes, oligopotentes, o incluso unipotentes. En determinados aspectos, las células diferenciadas son células diferenciadas pluripotentes. En aspectos más específicos, las células diferenciadas pluripotentes se seleccionan del grupo que consiste en células madre embrionarias, células ICM/epiblastos, células del ectodermo primitivo, células germinales primordiales, y células de teratocarcinoma. En algunos aspectos, las células diferenciadas se derivan de un embrión preimplantatorio. En un aspecto particular, las células diferenciadas son células madre embrionarias de mamíferos. En un aspecto más particular, las células diferenciadas son células madre embrionarias humanas.

Los tipos de células que se diferencian a partir de las células diferenciadas tienen varios usos en varios campos de la investigación y el desarrollo, que incluyen pero no se limitan a, el descubrimiento de fármacos, el desarrollo y ensayo de fármacos, la toxicología, la producción de células con fines terapéuticos así como en la investigación científica básica. Estos tipos de células expresan moléculas que son de interés en un amplio rango de campos de investigación. Como se describe en los textos de referencia estándar estas moléculas incluyen a las células conocidas que se requieren para la función de varios tipos celulares. Estas moléculas incluyen, pero no se limitan a, citoquinas, factores de crecimiento, receptores de citoquinas, matriz extracelular, factores de transcripción, polipéptidos y otras moléculas secretadas, y receptores del factor de crecimiento.

Se contempla que las células diferenciadas se puedan diferenciar a través de la puesta en contacto con un entorno de diferenciación celular. Como se emplea en la presente memoria, el término “entorno de diferenciación celular” se refiere a una condición de cultivo celular en donde las células diferenciadas se inducen a diferenciarse, o se inducen a convertirse en células diferenciadas en un cultivo celular humano enriquecido. Preferiblemente, la línea celular diferenciada inducida mediante el factor de crecimiento será homogénea en la naturaleza. El término “homogéneo”, se refiere a una población que contiene más de aproximadamente el 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de la línea celular deseada.

Se puede utilizar un medio o entorno de diferenciación celular para diferenciar parcial, total, o reversiblemente a las células diferenciadas descritas en la presente memoria. De acuerdo con los aspectos descritos en la presente memoria, el medio del entorno de diferenciación celular puede contener una variedad de componentes que incluyen, por ejemplo, medio KODMEM (Medio de Eagle Modificado de Dulbecco Genosuprimido), medio DMED, medio F12 de Ham, FBS (suero bovino fetal), FGF2 (factor 2 de crecimiento de fibroblasto), KSR o hLIF (factor inhibitorio de la leucemia humana). El entorno de diferenciación celular también puede contener suplementos tales como L-Glutamina, NEAA (aminoácidos no esenciales), P/S (penicilina/estreptomicina), N2, B27 y β -mercaptoetanol (β -ME). Se contempla que se puedan añadir factores adicionales al entorno de diferenciación celular, incluyendo, pero no limitado a, fibronectina, laminina, heparina, sulfato de heparina, ácido retinoico, miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGFs), miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFs) incluyendo FGF2, FGF7, FGF8, y/o FGF10, miembros de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFs), antagonistas de la familia del factor de crecimiento de transformación (TGF)/ proteína morfogenética ósea (BMP)/ factor de crecimiento y diferenciación (GDF) que incluyen, pero no se limitan a, nogina, follistatina, cordinina, gremlina, proteínas de la familia DAN/Cerberus, ventropina, activina a dosis altas, y amnionless o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. También se podrían añadir antagonistas TGF/BMP/GDF en forma de quimeras Fc-receptor TGF/BMP/GDF. Otros factores que se pueden añadir incluyen moléculas que pueden activar o inactivar la señalización a través de la familia del receptor Notch, que incluyen pero no se limitan a, proteínas de las familias similares a Delta y Jagged, así como inhibidores del procesamiento o escisión de Notch, o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. Otros factores de crecimiento pueden incluir miembros de la familia del factor de crecimiento insulínico (IGF), insulina, la familia del factor relacionado Wingless (WNT) y la familia del factor hedgehog, o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. Pueden añadirse factores adicionales para estimular la proliferación y supervivencia de células madre/progenitoras del mesendodermo, madre/progenitoras de endodermo, madre/progenitoras del mesodermo o madre/progenitoras del endodermo definitivo, así como la supervivencia y diferenciación de derivados de estas progenitoras.

La progresión de las células diferenciadas hacia la línea celular deseada, o su mantenimiento en un estado indiferenciado se puede monitorear mediante la cuantificación de la expresión de genes marcadores característicos de la línea celular deseada, así como la falta de expresión de genes marcadores de los tipos de células diferenciadas. Un método de cuantificación de la expresión genética de tales genes marcadores es a través del empleo del PCR cuantitativo (Q-PCR). Los métodos de realización de Q-PCR son bien conocidos en la técnica. Se pueden emplear también otros métodos que son bien conocidos en la técnica para cuantificar la expresión genética.

La expresión de genes marcadores se puede detectar mediante el empleo de anticuerpos específicos para el gen marcador de interés.

Aspectos descritos en la presente memoria contemplan también células diferenciables a partir de cualquier fuente dentro de un animal, proporcionan las células diferenciables como se define en la presente memoria. Por ejemplo, las células diferenciables se pueden sembrar a partir de embriones no humanos, o de cualquier estrato germinal primigenio del mismo, a partir de un tejido placentario o coriónico, o a partir de más tejidos maduros tales como células madre adultas que incluyen, pero no se limitan a, tejido adiposo, médula, tejido nervioso, tejido mamario, tejido hepático, páncreas, epitelio, tejido respiratorio, tejido gonadal y muscular. En aspectos específicos, las células diferenciables son células madre embrionarias. En aspectos específicos, las células diferenciables son células madre adultas. En otros aspectos específicos, las células madre son células madre derivadas de la placenta o del corion.

Otros aspectos contemplan el empleo de células diferenciables a partir de cualquier animal capaz de generar células diferenciables. Los animales a partir de los que se recogen las células diferenciables pueden ser vertebrados o invertebrados, mamíferos o no mamíferos, seres humanos o no humanos. Ejemplos de fuentes animales incluyen, pero no se limitan a, primates, roedores, cánidos, felinos, equinos, bovinos y porcinos.

Algunos aspectos contemplan el empleo de células madre pluripotentes inducidas (iPS), que son células madre pluripotentes derivadas de una célula no pluripotente. Véase Zhou et al. (2009), *Cell Stem Cell* 4: 381-384; Yu et al., (2009) *Science* 324(5928):797-801, Epub (publicación electrónica) 26 de Marzo, 2009; Yu et al. (2007) *Science* 318(5858):1917-20, Epub 20 de Noviembre, 2007; Takahashi et al., (2007) *Cell*, 131:861-72; y Takahashi K. y Yamanaka S. (2006), *Cell* 126:663-76s. Los animales a partir de los cuales se recogen las células no pluripotentes pueden ser vertebrados o invertebrados, mamíferos o no mamíferos, seres humanos o no humanos. Ejemplos de fuentes animales incluyen, pero no se limitan a, primates, roedores, cánidos, felinos, equinos, bovinos y porcinos.

Las células diferenciables descritas en la presente memoria pueden derivarse empleando cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las células pluripotentes humanas se pueden producir empleando métodos de transferencia nuclear y de desdiferenciación. Adicionalmente, la célula ICM humana/epiblasto o del ectodermo primitivo empleada en la presente memoria se deriva *in vivo* o *in vitro*. Las células del ectodermo primitivo se pueden generar en un cultivo adherente o como agregados en un cultivo en suspensión, como se describe en WO 99/53021. Además, las células pluripotentes humanas se pueden producir empleando cualquier método conocido por los expertos en la técnica, incluyendo, métodos de producción manual, y métodos de producción masiva, tales como la producción enzimática o no enzimática.

En un determinado aspecto, cuando se utilizan las células ES, las células madre embrionarias tienen un cariotipo normal, mientras que en otros aspectos, las células madres embrionarias tienen un cariotipo anormal. En un aspecto, una mayoría de las células madre embrionarias tienen un cariotipo normal. Se contempla que más del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o más del 95% de las metafases examinadas mostrarán un cariotipo normal.

Almacenamiento de células para encapsulación y trasplante

Algunos aspectos se refieren a métodos para la crioconservar células que se han cultivado y/o diferenciado *in vitro*. Tal almacenaje permitiría el depósito, el control de calidad, y otros procedimientos y manipulaciones deseadas, bien en relación con análisis *in vitro* o con la implantación *in vivo*. Los métodos para el almacenaje celular antes del trasplante incluyen conservar el tejido mediante congelación de células (crioconservación); o refrigerar las células a las temperaturas de congelación anteriores (hibernación). Véase Chanaud et al. 1987 *Neurosci Lett* 82: 127-133; Collier et al. (1987) 436: 363-366; y Sauer et al. 1991 *Neurology and Neuroscience* 2: 123-135; Gage et al. 1985 *Neurosci Lett* 60: 133-137. Aunque la hibernación ha permitido incrementar las tasas de supervivencia y de la función del injerto en comparación con el tejido crioconservado, las células podrían ser incapaces de mantenerse a largo plazo bajo tales condiciones sin poner en peligro la viabilidad celular durante el periodo de hibernación.

Como se emplea en la presente memoria, una "suspensión celular" o equivalentes de la misma se refiere a los agregados y/o agrupaciones y/o esferas celulares que están en contacto con un medio. Tales suspensiones celulares se describen en detalle en la Solicitud U.S. 12/264.760, titulada *Stem cell Aggregate Suspension Compositions and Methods of Differentiation Thereof*, presentada el 8 de Noviembre, 2008.

Como se emplea en la presente memoria, "suspensión celular adaptada" o cultivos o equivalentes en suspensión celular incluye una suspensión celular que se ha almacenado anteriormente en congelación, preferiblemente a 4°C, en un medio de hibernación durante aproximadamente 1 hora y hasta aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o hasta 30 días.

Como se emplea en la presente memoria, una célula adecuada para el trasplante se refiere a un célula o a una población de células lo suficientemente viable y/o funcional para un tratamiento *in vivo* de un trastorno metabólico. Por ejemplo, la diabetes, o uno o más síntomas de la misma, se puede mejorar o reducir durante un periodo de tiempo tras la implantación de una célula adecuada para el trasplante en un sujeto que padece de diabetes. En una realización preferida, una célula o población celular adecuada para el trasplante es un célula o población celular

progenitora pancreática, o una célula o población celular progenitora pancreática PDX1-positiva, o una célula o población celular precursora endocrina, o una célula endocrina mono o poli-hormonal y/o cualquier combinación de células o poblaciones de células, o incluso células o poblaciones de células de las mismas purificadas o enriquecidas. Células adecuadas para los aspectos descritos en la presente memoria se describen además en detalle en la Patente U.S. 7.534.608.

Como se emplea en la presente memoria el término “almacenamiento” o equivalentes del mismo se refiere al almacenamiento o al mantenimiento de células bien sobre o bajo congelación. El término también pretende incluir el mantenimiento de las células antes de usarse en el trasplante en un sujeto.

Como se emplea en la presente memoria el término “crioconservación” o equivalentes del mismo se refiere a la conservación de las células a temperaturas bajo cero.

Como se emplea en la presente memoria el término “hibernación” o equivalentes del mismo se refiere a la conservación de las células a temperaturas bajo cero y lo suficientemente por debajo de la temperatura fisiológica tal que uno o más de los procedimientos fisiológicos normales descienden o se detienen. En un aspecto, temperaturas de hibernación preferidas oscilan entre 0 y 4°C, preferiblemente a aproximadamente 4°C. El medio de hibernación como se emplea en la presente memoria incluye cualquier medio que carezca de un almacenamiento celular compatible fisiológicamente por encima de las temperaturas de congelación, preferiblemente aproximadamente 4°C.

Condiciones de hibernación

Las temperaturas de hibernación normalmente oscilan entre aproximadamente 0 y 5°C, preferiblemente aproximadamente 4°C. Se pueden emplear varios tipos de medios como medio de hibernación junto con los métodos del momento. Los métodos de la técnica anterior para congelar e hibernar las células emplean un medio complejo que comprende tampones y proteína añadida, a veces incluye componentes sin determinar completamente, tal como suero. Sin embargo, para minimizar la toxicidad y la inmunogenicidad tales aditivos no son deseables para el trasplante en seres humanos. En aspectos preferidos, el medio de hibernación está libre de Ca^{++} añadido. En determinados aspectos, el medio para hibernar células está libre de proteína añadida y/o libre de un tampón. Un medio de hibernación preferido incluye o consiste en cantidades mínimas de glucosa o en cantidades moderadas de glucosa en una disolución salina, por ejemplo, bien sin glucosa adicional o bien entre aproximadamente 0,1%-0,9% de glucosa en disolución salina. En aspectos preferidos, el medio de hibernación incluye o consiste en aproximadamente 0,1-0,5% de glucosa. En un aspecto más preferido, el medio incluye o consiste en aproximadamente 0,2% de glucosa. En aspectos preferidos, el medio de hibernación incluye o consiste en un pequeño porcentaje (vol/vol) de NaCl, por ejemplo, aproximadamente 0,1-1% NaCl, preferiblemente aproximadamente 0,5-0,9% NaCl. En determinados aspectos, se pueden emplear medios más complejos, por ejemplo, disolución salina equilibrada de Hank, medio mínimo esencial Dulbecco, o medio mínimo esencial modificado de Eagle. En determinados aspectos puede ser deseable suplementar con aditivos el medio de hibernación elegido, por ejemplo, proteína añadida (por ejemplo, proteína sérica o proteína entera de mamífero (preferiblemente inactivada por calor)), tampones (por ejemplo, tampones fosfato, HEPES, o similares), antioxidantes, factores de crecimiento, KCl (por ejemplo, a aproximadamente 30 mM), lactato (por ejemplo, a aproximadamente 20 mM), piruvato, MgCl_2 (por ejemplo, a aproximadamente 2-3 mM), sorbitol (por ejemplo, a aproximadamente 300 mM) u otros aditivos bien conocidos en la técnica.

En determinados aspectos, las células hibernan a aproximadamente 0-5°C, preferiblemente aproximadamente a 4°C. En determinados aspectos, las células se mantienen a aproximadamente 4°C en un medio de hibernación antes de congelarse o usarse. En otros aspectos, las células se mantienen a aproximadamente 4°C en un medio de hibernación después de congelarse. En otros aspectos, las células se mantienen a aproximadamente 4°C en un medio de hibernación sin congelación. En determinados aspectos, las células se mantienen en un medio de hibernación a aproximadamente 4°C durante al menos aproximadamente 1 hora y hasta aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o hasta 30 días antes de congelarse, después de congelarse o antes de emplearse en el trasplante. En otros aspectos, las células se mantienen en un medio de hibernación a aproximadamente 4°C durante al menos aproximadamente 12-72 horas antes de congelarse, después de congelarse o antes de emplearse en el trasplante. En determinados aspectos las células se mantienen en un medio de hibernación a aproximadamente 4°C durante al menos aproximadamente 24 horas antes de congelarse, después de congelarse o antes de emplearse en el trasplante. En una realización más preferida, las células se mantienen en un medio de hibernación a aproximadamente 4°C durante al menos aproximadamente 36-48 horas antes de congelarse, después de congelarse o antes de emplearse en el trasplante.

Condiciones de crioconservación

En algunos aspectos las células se crioconservan empleando una disolución de crioconservación. Una disolución o medio de crioconservación incluye una disolución que contiene un conservador, es decir, un compuesto que protege a las células contra el daño intracelular y/o de la membrana celular cuando las células se congelan o descongelan. Un crioconservador se identifica mediante la mejora de la viabilidad y/o funcionalidad de las células en contacto con el crioconservador cuando se compara con las células que se congelan o descongelan de manera similar en

ausencia del crioprotector. Junto a los métodos del momento se puede emplear cualquier crioprotector y el término significa que abarca tanto a los crioprotectores intracelulares como extracelulares.

En una disolución crioprotectada se puede emplear cualquier crioprotector conocido en la técnica. En determinados aspectos, las disoluciones de crioprotección incluyen crioprotectores intracelulares que incluyen, pero no se limitan a, dimetilsulfóxido (DMSO), varios dioles y trioles (por ejemplo, etilenglicol, propilenglicol, butanodiol y triol y glicerol), así como varias amidas (por ejemplo, formamida y acetamida); y se pueden emplear también crioprotectores extracelulares que incluyen pero no se limitan a, catabolitos fosfomono y fosfodiéster de fosfoglicéridos, polivinilpirrolidona, o metilcelulosa (por ejemplo, al menos 0,1%) en solitario o en combinación con cualquiera de los crioprotectores intracelulares.

En aspectos preferidos, se emplea DMSO como el crioprotector. El DMSO se puede emplear en un amplio rango de concentraciones, por ejemplo, aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 3%, aproximadamente 4%, aproximadamente 5%, aproximadamente 6%, aproximadamente 7%, aproximadamente 8%, aproximadamente 9%, aproximadamente 10%, aproximadamente 11%, aproximadamente 12%, aproximadamente 13%, aproximadamente 14%, aproximadamente 15% o más. En más aspectos preferidos la concentración de DMSO oscila de aproximadamente 6% a aproximadamente 12%. En aspectos preferidos en particular la concentración de DMSO es aproximadamente 10%.

En determinados aspectos, el crioprotector se añade a las células de una manera progresiva para incrementar gradualmente la concentración del crioprotector hasta alcanzar la concentración de crioprotector final deseada. En determinados aspectos, las células se ponen en contacto con una disolución de crioprotección que contiene el crioprotector a la concentración final deseada o el crioprotector se añade directamente al medio base sin un incremento gradual en la concentración.

La disolución de crioprotección incluye el crioprotector en un medio base apropiado. Para este propósito se puede emplear cualquier tipo de medio. En aspectos preferidos, el medio base al que se añade el crioprotector está libre de Ca^{++} añadido. En determinados aspectos el medio al que se añade el crioprotector está libre de proteína añadida y/o está libre de un tampón. En otros aspectos, el medio base (por ejemplo DMEM o DMEM/F12) al que se añade el crioprotector incluye o consiste en aproximadamente 0,1-0,5% de glucosa o contiene poco o nada de glucosa. En algunos aspectos de este aspecto, el medio base (por ejemplo DMEM o DMEM/F12) al que se añade el crioprotector incluye o consiste en aproximadamente 0,5-0,9% de NaCl. En aspectos preferidos, el medio base al que se añade el conservador incluye o consiste en muy poco o nada de glucosa y aproximadamente 0,5-0,9% de NaCl. En otro aspecto preferido, el medio base al que se añade el crioprotector incluye o consiste en aproximadamente 0,1 a 0,2% de glucosa. En algunos aspectos de este aspecto, el medio base al que se añade el crioprotector incluye o consiste en aproximadamente 0,5-0,9% de NaCl.

En determinados aspectos la disolución de crioprotección puede contener también proteína añadida, por ejemplo, suero, por ejemplo, suero fetal bovino o suero fetal humano, o una proteína sérica, por ejemplo, albúmina o suero genosuprimido sustituido. En otros aspectos, el crioprotector puede contener también otros aditivos, tal como los que se describen anteriormente para la inclusión en el medio de hibernación, por ejemplo, antioxidantes, factores de crecimiento, KCl (por ejemplo, a aproximadamente 30 mM), lactato (por ejemplo a aproximadamente 20 mM), piruvato, MgCl_2 (por ejemplo, a aproximadamente 2-3 mM), sorbitol (por ejemplo en una osmolaridad de aproximadamente 300 mM) u otros aditivos bien conocidos en la técnica.

Una vez que las células se resuspenden en la disolución de crioprotección, la temperatura de las células se reduce de una manera controlada. En el enfriamiento de las células bajo cero, la reducción de la temperatura ocurre preferiblemente de forma lenta para permitir a las células establecer un equilibrio entre la concentración intracelular y la extracelular del crioprotector tal que se inhiba la formación de cristal de hielo intracelular. En algunos aspectos, la velocidad de enfriamiento es preferiblemente lo suficientemente rápida como para proteger a las células de un exceso de pérdida de agua y de los efectos tóxicos de los crioprotectores. Las células se pueden crioprotectar a una temperatura de entre -20°C y aproximadamente -250°C . Preferiblemente, las células se almacenan por debajo de -90°C para minimizar el riesgo de recristalización de hielo. En aspectos preferidos particularmente, las células se crioprotegen en nitrógeno líquido a aproximadamente -196°C . Alternativamente, la congelación controlada se puede realizar con la ayuda de un equipo de congelación controlado eléctricamente disponible comercialmente.

Condiciones de descongelación

Después de la crioprotección, las células se pueden descongelar a través de cualquier método disponible. En un aspecto preferido, las células se descongelan rápidamente, por ejemplo, mediante inmersión rápida en líquido a 37°C . Una vez que las células se descongelan, se realiza la dilución del crioprotector mediante la adición de un medio de dilución.

Para diluir la disolución de crioprotección que está en contacto con las células descongeladas se puede emplear cualquier medio. Por ejemplo, se puede emplear para diluir la disolución de crioprotección cualquier medio enumerado anteriormente para el empleo de células en hibernación, o para el crecimiento y diferenciación de células. También son adecuados otros medios, por ejemplo, la disolución salina equilibrada de Hank

(preferiblemente sin Ca^{++}), DMEM que contiene medio sin glucosa o con cantidades mínimas a bajas de glucosa. Se pueden emplear en medios para dilución, por ejemplo, los aditivos enumerados anteriormente para la inclusión en los medios de hibernación o congelación. Ejemplos de aditivos incluyen, por ejemplo, tampones (por ejemplo, tampones fosfato, HEPES, o similares), antioxidantes, factores de crecimiento, KCl (por ejemplo, a aproximadamente 30 mM), lactato (por ejemplo, a aproximadamente 20 mM), piruvato, MgCl_2 (por ejemplo, a aproximadamente 2-3 mM), sorbitol (por ejemplo en una osmolaridad de aproximadamente 300 mM) u otros aditivos bien conocidos en la técnica. Otros aditivos adecuados incluyen ADNasa (por ejemplo, disponible comercialmente en Genentech, incorporado como PULMOZYMEOR). El medio que se emplea para diluir la disolución de crioconservación puede, opcionalmente, contener proteína añadida, por ejemplo proteína añadida (por ejemplo, suero de mamífero (preferiblemente inactivado por calor)) o una proteína sérica, tal como albúmina. En otros aspectos, el medio no contiene proteína añadida y/o tampón añadido.

Después de la dilución del crioconservador, a las células se las puede permitir a continuación disolverse o pueden formar un precipitado de células bajo la fuerza centrífuga para eliminar las células de la disolución de crioconservación en la medida de lo posible. Las células se pueden lavar luego en un medio que no contenga un crioconservador. Sería preferible para las células permanecer a temperatura ambiente después de la adición del medio de lavado y antes de dejar a las células disolverse o formar un precipitado bajo la fuerza centrífuga. En aspectos preferidos, las células permanecen a temperatura ambiente durante aproximadamente 10, 15, 20, 30 minutos antes de la segunda centrifugación. Para lavar las células se puede emplear cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, se puede utilizar cualquier medio de hibernación o dilución enunciado anteriormente.

Después de descongelar y lavar, las células se cultivan a 37°C durante distintos periodos de tiempo para permitir recuperarse antes del trasplante. Las células se pueden cultivar en cualquier medio de cultivo, preferiblemente en un medio adecuado para su etapa de diferenciación. Durante este tiempo algunas células pueden morir.

Para usarse en el trasplante, las células se deberían suspender en un medio final que sea adecuado para la administración a un sujeto. El trasplante de células es similar sustancialmente al que se describe en la Patente U.S. N° 7.534.608.

Además, las células descongeladas se pueden mantener en el medio de hibernación como se describe anteriormente entre 0 y 37°C , preferiblemente aproximadamente a 4°C durante hasta 1 hora y hasta aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o hasta 30 días antes de usarse en el trasplante sin una pérdida significativa en la viabilidad. En algunos aspectos, no ocurre una pérdida significativa estadísticamente en la viabilidad celular.

Determinar la viabilidad de las células recuperadas

Después del almacenamiento, puede ser deseable ensayar la viabilidad y/o funcionalidad de las células antes del trasplante para confirmar su idoneidad de uso, por ejemplo, en el trasplante. Esto se puede realizar empleando una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden teñir empleando tintes indispensables, tal como, por ejemplo, azul tripán o bromuro de etidio o naranja de acridina. En determinados aspectos, una población de células adecuada para el trasplante es al menos entre aproximadamente 50-100% viable. En aspectos preferidos, una población de células adecuada para el trasplante es al menos aproximadamente 50%, es al menos aproximadamente 55%, es al menos aproximadamente 60%, es al menos aproximadamente 65%, es al menos aproximadamente 70%, es al menos aproximadamente 75%, es al menos aproximadamente 80%, es al menos aproximadamente 85%, es al menos aproximadamente 90%, es al menos aproximadamente 95%, es al menos aproximadamente 96%, es al menos aproximadamente 97%, es al menos aproximadamente 98%, es al menos aproximadamente 99%, viable. En aspectos preferidos particularmente, tal población de células es al menos aproximadamente 85% viable.

En otros aspectos, se pueden determinar las características morfométricas de las células como una medida de la idoneidad de las células para usarse en el trasplante. En aspectos preferidos, la morfología de las células que se han almacenado empleando los métodos actuales y que son idóneas para el trasplante no difieren (por ejemplo, significativa estadísticamente) de las células en fresco. En aspectos preferidos, la morfología de las células in vivo que se han almacenado empleando los métodos del momento y que son adecuados para el trasplante no difieren (por ejemplo, significativa estadísticamente) de las células en fresco.

En el caso de agrupaciones celulares, la masa celular se puede cuantificar antes y después de la congelación/descongelación y recuperación celular. En un aspecto, las agrupaciones celulares cultivadas en suspensión se pueden manipular para envasarse. El área ocupada por las agrupaciones se puede fotografiar y medir a continuación. Mediante la comparación de las áreas ocupadas por las células antes y después de congelar/descongelar y de la recuperación, se puede determinar un valor para el porcentaje de recuperación.

Las células que se han almacenado se pueden ensayar también para la presencia de determinadas hES y/o progenitores pancreáticos o marcadores de células que secretan hormonas para determinar si son adecuados para el uso en el trasplante. Este método se ha descrito en detalle más arriba en Kroon et al. 2008, anteriormente citado, o en la Patente U.S. N° 7.534.608.

Adicionalmente, o alternativamente, las células se pueden ensayar por su funcionalidad, por ejemplo, como se discute en Kroon et al. 2008, anteriormente citado, o en la Patente U.S. N° 7.534.608.

Dispositivos de encapsulación

Un aspecto descrito en la presente memoria se refiere a dispositivos de encapsulación. Tales dispositivos se pueden implantar en un mamífero para tratar una variedad de enfermedades y trastornos. En aspectos preferidos, el dispositivo comprende un dispositivo de inmuno-aislamiento, biocompatible, que es capaz de encapsular completamente un agente activo biológicamente y/o células en él. Por ejemplo, tales dispositivos pueden albergar cantidades de células eficaces terapéuticamente con una membrana semi-permeable que tiene un tamaño de poro tal que el oxígeno y otras moléculas importantes para la supervivencia y la función celular se puedan mover a través de la membrana semi-permeable pero que las células del sistema inmunológico no puedan penetrar o pasar a través de los poros. De manera similar, tales dispositivos pueden contener cantidades eficaces terapéuticamente de un agente activo biológicamente, por ejemplo, un factor angiogénico, un factor de crecimiento, una hormona, y similares.

Los dispositivos descritos en la presente memoria se pueden emplear para tratar patologías que requieren el suministro continuo de sustancias activas biológicamente para el organismo. Tales dispositivos pueden referirse también, por ejemplo, como órganos bioartificiales, que contienen mezclas homogéneas o heterogéneas de agentes activos biológicamente y/o células, o células que producen una o más sustancias activas biológicamente de interés. Lo ideal sería que los agentes biológicamente activos y/o células se encapsularan o encerraran totalmente en al menos un espacio interno o en cámaras de encapsulación, que se unieran mediante al menos una o más membranas semi-permeables. Tal membrana semi-permeable debería permitir pasar a la sustancia encapsulada activa biológicamente de interés (por ejemplo, insulina, glucagón, polipéptido pancreático, y similares), haciendo disponible a la sustancia activa para las células diana fuera del dispositivo y en el cuerpo del paciente. En un aspecto preferido, la membrana semi-permeable permite que los nutrientes presentes de manera natural en el sujeto pasen a través de la membrana para proporcionar nutrientes esenciales a las células encapsuladas. Al mismo tiempo, tal membrana semi-permeable impide o previene que las células del paciente, más en particular a las células del sistema inmunológico, pasen a través del dispositivo y dañen las células encapsuladas en el dispositivo. Por ejemplo, en el caso de la diabetes, este planteamiento puede permitir a la glucosa y al oxígeno estimular a las células que producen insulina para liberar insulina según es requerido por el organismo en tiempo real, mientras que previene a las células del sistema inmunológico reconocer y destruir a las células implantadas. En un aspecto preferido, la membrana semi-permeable impide que las células implantadas escapen de la encapsulación.

Dispositivos preferidos pueden tener determinadas características que son deseables pero que no se limitan a una o a una combinación de las siguientes: i) estar comprendido de un material biocompatible que funcione bajo condiciones fisiológicas, incluyendo pH y temperatura; ejemplos incluyen, pero no se limitan a, materiales anisotrópicos, polisulfona (PSF), láminas de nano-fibra, poliimida, tetrafluoroetileno/politetrafluoroetileno (PTFE; también conocido como Teflon®, ePTFE (politetrafluoroetileno expandido), poliacrilonitrilo, polietersulfona, resina acrílica, acetato de celulosa, nitrato de celulosa, poliamida, así como membranas de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC); ii) no liberar compuestos tóxicos que dañen al agente activo biológicamente y/o a las células encapsuladas dentro del dispositivo; iii) promover la secreción o liberación de un agente o macromolécula activa biológicamente a través del dispositivo; iv) promover cinéticas rápidas de difusión de la macromolécula; v) promover la estabilidad a largo plazo de las células encapsuladas; vi) promover la vascularización; vii) comprender membranas o una estructura/cubierta que sea inerte químicamente; viii) proporcionar propiedades mecánicas estables; ix) mantener la integridad de la estructura/cubierta (por ejemplo, prevenir la fuga accidental de agentes y/o células tóxicas o dañinas); x) ser recargable y/o desechable; xi) ser expandible mecánicamente; xii) no contener puertos o al menos uno, dos, tres o más puertos; xiii) proporcionar el medio a las células trasplantadas del inmuno-aislamiento hasta el tejido hospedador; xiv) ser fácil de fabricar y de producir; y xv) poderse esterilizar.

Los aspectos de los dispositivos de encapsulación descritos en la presente memoria no pretenden limitarse a determinados tamaños, formas, diseños, capacidad de volumen, y/o materiales empleados para fabricar los dispositivos de encapsulación, siempre y cuando se alcancen uno o más de los elementos anteriores.

Diseños del dispositivo

En un aspecto, el dispositivo de encapsulado se mejora mediante la creación de uno o más compartimentos en el dispositivo, distinto al creado por sellado o soldadura alrededor de la periferia o de los bordes para prevenir la pérdida de las células y/o los agentes activos biológicamente. La Figura 1 es un ejemplo de un esquema de un aspecto del dispositivo, pero el dispositivo no pretende vincularse a este diseño. En cambio, el diseño puede incluir variaciones tales como las habituales en la técnica. En algunos aspectos, el diseño del dispositivo se puede modificar dependiendo del tipo de agentes activos biológicamente y/o células encapsuladas y satisfacer las necesidades y la función del estudio. Además, un dispositivo de cualquier tamaño o forma razonable se puede compartimentar para tener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24 o más cámaras o compartimentos. Un propósito para crear una pluralidad de compartimentos es incrementar el área

superficial para el intercambio de nutrientes y de oxígeno entre las células encapsuladas y, por ejemplo, el espacio intersticial alrededor del dispositivo; véanse por ejemplo, las FIGs. 1-11. Además, tales diseños prohíben o no promueven grandes agrupaciones o agregados celulares tal que las células envasadas en el centro de las grandes agrupaciones/aglomeraciones rechazan, o reciben menos, nutrientes y oxígeno y, por tanto, posiblemente no sobrevivan. Por lo tanto, los dispositivos que contienen una pluralidad de cámaras o compartimentos son más capaces de dispersar las células a través de la cámara/compartimento o de las cámaras/compartimentos. En este sentido, existe más posibilidad para cada célula para recibir nutrientes y oxígeno, promoviendo así la supervivencia celular e impidiendo la muerte celular.

Un aspecto se refiere a un dispositivo de forma sustancialmente elíptica a rectangular; véanse las FIG. 1 y 6. Además, estos dispositivos se compartimentan o reconfiguran además para que en lugar de un dispositivo aplanado ligeramente haya una costura o soldadura a través del centro del dispositivo, en cualquiera de las mitades de sellado del dispositivo, formando por tanto dos reservorios, lúmenes, cámaras, espacios vacíos, receptáculos o compartimentos separados; o la soldadura o costura crea una cámara con forma de U que se separa o divide en la mitad debido a la soldadura, pero en este caso tal soldadura no cierra completamente las cámaras; véase la FIG. 1. En la FIG. 1 dos puertos proporcionan una mayor facilidad de llenado y descarga células en y a través de las cámaras.

Otro aspecto se refiere a un dispositivo con forma rectangular o elíptica similar que tiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más soldaduras a través del plano del dispositivo. En algunos aspectos las soldaduras están a través del lado o plano horizontal del dispositivo. En otros aspectos las soldaduras están a través del lado o plano vertical del dispositivo. En otros aspectos, se presentan soldaduras entrecruzadas a través de ambos lados o planos horizontal y vertical. En algunos aspectos las soldaduras están en paralelo y equidistantes las unas de las otras. En otros aspectos las soldaduras están perpendiculares. En otros aspectos las soldaduras están en paralelo pero no equidistantes. Como en el ejemplo anterior, tal diseño puede formar de manera eficaz hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más cámaras, separadas completamente si la soldadura atraviesa y conecta ambos límites del dispositivo, o puede crear una cámara continua pero interdigitada. Además, aunque se describen determinados ejemplos de dispositivos en las FIGs. 1-11 con soldaduras en paralelo o en paralelo y equidistantes, se pueden personalizar o fabricar otros dispositivos con soldaduras en cualquier dirección u orientación, incluyendo largas soldaduras que tienen regiones discontinuas sin soldaduras. El tipo y número de soldaduras que se usen puede depender de la población celular o del agente empleado y del tratamiento o propósito. En algunos aspectos, las soldaduras se pueden disponer para modificar el aspecto del dispositivo.

La Figura 1 muestra un dispositivo de encapsulación que representa las características descritas en la presente memoria, pero como se describe anteriormente, esto es sólo una ilustración y un experto habitual en la técnica puede contemplar que mediante la formación de diferentes configuraciones empleando soldaduras o costuras en cualquiera de tales dispositivos, puede personalizar el número de compartimentos adecuados para el propósito. Las Figuras 2-5 muestran las secciones superior, lateral y final del mismo dispositivo. El dispositivo se puede soldar ultrasónicamente alrededor del perímetro entero 1 para crear un lumen interno completamente cerrado. Se pueden emplear otros medios para sellar o cerrar las membranas para formar la bolsa similar al dispositivo. El lumen se compartimenta además mediante una soldadura interna 2 que se localiza en el centro y se extiende a lo largo del eje del dispositivo. Esta soldadura se extiende hasta un punto 3 que limita eficazmente el grosor o profundidad de cada compartimento, sin embargo no segrega completamente el lumen interno. Para este propósito se controla la anchura y la profundidad de los compartimentos y se pueden variar según se requiera para facilitar la supervivencia y el rendimiento del producto celular. Por otra parte, todas las dimensiones del dispositivo, que incluyen pero no se limitan a, la longitud total, anchura total, grosor de la soldadura perimetral, anchura de la soldadura perimetral, longitud del compartimento, anchura del compartimento, profundidad del compartimento, longitud de la soldadura interna, anchura de la soldadura interna y posición del puerto, son especificaciones de diseño que se pueden modificar para optimizar el dispositivo para productos y/o agentes activos biológicamente en particular.

En referencia a la Figura 1, el compartimento se carga con un producto celular o agente activo biológicamente a través de las dos puertas 5, 5' que se incorporan en el dispositivo durante la soldadura ultrasónica del perímetro. Estos puertos se extienden dentro del lumen o de los compartimentos y permiten el acceso al compartimento con el propósito de distribuir las células y/o agentes uniformemente durante la carga. Además, como los puertos 5, 5' se conectan a través del lumen interno en forma de U como en la FIG. 1, se permite descargar el gas a través de cada puerto 5 mientras que el puerto 5' adyacente se está cargando, previniendo por tanto la acumulación de presión en el dispositivo.

Alternativamente, en otro aspecto, los dispositivos proporcionados en la presente memoria no contienen puertos de entrada o salida, es decir, se dice que los dispositivos carecen de puertos. Tal aspecto se muestra en la FIG. 6. Las Figuras 7-9 muestran una sección superior, lateral y terminal de un dispositivo sustancialmente similar. Puede ser necesario un proceso de dos, tres o más etapas de soldadura para crear un dispositivo sin puertos como los que se muestran en las FIGs. 6-11. Por ejemplo, en un aspecto, el perímetro exterior 6 elíptico/rectangular y los puntos de soldadura 7 de compartimentación se crean primero mediante soldadura ultrasónica. Los puntos de soldadura 7 funcionan de manera similar a los de la soldadura interna 2 de la FIG. 1. Los puntos de soldadura 7 se localizan de manera cruzada al dispositivo para limitar periódicamente la expansión del lumen o del compartimento 8 en cualquier punto dado. De nuevo, el lumen o compartimentos 8 creado mediante puntos de soldadura interconectan

por lo tanto los compartimentos 8, y no aíslan o separan completamente ningún lumen o compartimento. Por otra parte, el número total, diámetro y distribución de los puntos de soldadura 7 son parámetros de diseño que se pueden optimizar para acomodar las cargas dinámicas y las tasas de crecimiento de cualquier producto o agente.

Una vez que las células se cargan en el dispositivo, el perímetro externo se sella completa y asépticamente mediante una segunda soldadura ultrasónica a través del borde 9 del dispositivo. El resultado del proceso de sellado en multi-etapas es que los dispositivos finales están totalmente cerrados y carecen de puertos a lo largo del perímetro. Este planteamiento simplifica el proceso de carga y mejora la integridad y seguridad total del dispositivo, como los puertos pueden ser un área del perímetro pueden aparecer fisuras como resultado de una soldadura ultrasónica deficiente.

Además, aunque el proceso anterior se describió en 2 etapas secuenciales, los medios para encapsular las células y/o agentes no se limita a las 2 etapas descritas sino que cualquier número de etapas, en cualquier orden, necesario para encapsular las células previene y reduce al mismo tiempo el nivel de rotura del dispositivo.

En otro aspecto, las FIGs. 10 y 11 muestran un dispositivo de encapsulación sustancialmente similar al dispositivo mostrado en la FIG. 6, pero los puntos de soldadura 10 se han modificado durante el proceso de soldadura para no tener centros. Un experto habitual en la técnica puede realizar esto de varias maneras, por ejemplo, mediante el empleo de un sonotrodo ultrasónico que tiene un borde afilado interno que puede cortar el material inmediatamente después de la soldadura. Estas soldaduras de rotura 10 tienen la ventaja de que se integran más fácilmente con el tejido del hospedador ya que las soldaduras de rotura 10 promueven la vascularización del dispositivo, mejorando por tanto la supervivencia y el rendimiento de los productos y/o agentes celulares dependientes de oxígeno. Como consecuencia de facilitar y promover una nueva vascularización a través del dispositivo, existe un transporte de oxígeno difusivo mejorado en la dirección X-Y, que se limita normalmente hacia el centro de los dispositivos de capa plana.

En otros aspectos, el diseño del dispositivo puede tener diferentes formas, por ejemplo, el dispositivo de encapsulación celular puede tener forma de tubo o tubo aplanado o cualquier otra forma que satisfaga uno de los requerimientos anteriores para un dispositivo de la presente divulgación.

Materiales del dispositivo

Las membranas permeables e impermeables celulares se han descrito en la técnica incluyendo las patentes anteriormente descritas por Baxter o referidas anteriormente de otra manera como dispositivos de encapsulación celular TheraCyte que incluyen, las Patentes U.S. N^{os} 6.773.458; 6.520.997; 6.156.305; 6.060.640; 5.964.804; 5.964.261; 5.882.354; 5.807.406; 5.800.529; 5.782.912; 5.741.330; 5.733.336; 5.713.888; 5.653.756; 5.593.440; 5.569.462; 5.549.675; 5.545.223; 5.453.278; 5.421.923; 5.344.454; 5.314.471; 5.324.518; 5.219.361; 5.100.392; y 5.011.494.

En un aspecto, los dispositivos de encapsulación se comprenden de un material biocompatible que incluye, pero no se limita a, materiales anisotrópicos, polisulfona (PSF), láminas de nano-fibra, poliimida, tetrafluoroetileno/politetrafluoroetileno (PTFE; también conocido como Teflon®, ePTFE (politetrafluoroetileno expandido), poliacrilonitrilo, polietersulfona, resina acrílica, acetato de celulosa, nitrato de celulosa, poliamida, así como membranas de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Estos tipos de membrana y otros sustancialmente similares y componentes se fabrican por Gore®, Phillips Scientific®, Zeus®, Pall® y Dewal® por mencionar algunos.

Dispositivos inmovilizados

Se proporciona también un dispositivo implantable, que se inmoviliza en un lugar de trasplante para mantener la célula encapsulada y/o agente activo biológicamente en el lugar de implantación y permitir la difusión de, por ejemplo, un polipéptido terapéutico expresado y secretado a partir del lugar de implantación. En un aspecto, el lugar de implantación está en, o se encierra próximo a, el tejido u órgano que es centro del tratamiento. En otros aspectos, cuando el reparto del agente secretado a partir del dispositivo no depende de la localización y la distribución del agente es dependiente de la vasculatura, el dispositivo se puede implantar en una localización distante. Por ejemplo, en un aspecto preferido, el dispositivo biocompatible se implanta subcutáneamente bajo la piel en el antebrazo, o en el costado, o en la espalda, o en el glúteo, o en la pierna y similares, donde permanece sustancialmente hasta el momento en el que se requiera ser eliminado.

Dispositivos expandibles

Los dispositivos descritos en la presente memoria tienen superficies interiores y exteriores en donde el dispositivo contienen al menos un vacío (o reservorio, o lumen, o depósito o compartimento) y en donde se abre al menos un vacío hasta la superficie interna del dispositivo. Los dispositivos implantables convencionales se fabrican normalmente de materiales biocompatibles rígidos, no expandibles. Un aspecto del dispositivo descrito en la presente memoria se fabrica de un material expandible. Otros aspectos se dirigen a materiales no expandibles. Si el dispositivo es capaz de expandirse puede ser una parte inherente de los materiales empleados para producir el dispositivo, por ejemplo, un recubrimiento polímero que es expandible, o se puede diseñar para que sea expandible

o tenga capacidades expandibles. Por ejemplo, se proporciona un dispositivo que se expande en tamaño para albergar células o para recargar un dispositivo existente.

En otro aspecto, el dispositivo implantable está contenido en una carcasa o soporte, que es ligeramente más rígido, y no expandible, pero que permite medios suficientes para incrementar la capacidad de la célula o agente de incrementar en número o aumentar los dispositivos de implante. Por ejemplo, medios para insertar un reservorio, lumen, depósito, compartimento o casete adicional que tiene células o agente pre-cargados. Alternativamente, la carcasa contiene una pluralidad de dispositivos donde sólo algunos de los cuales están cargados con células encapsuladas o tienen células encapsuladas, mientras que otros están vacíos, los cuales se pueden cargar y llenar con las células o los agentes en un periodo de tiempo posterior o en cualquier periodo de tiempo posterior a la implantación inicial. Tal carcasa expandible se comprende de materiales inertes adecuados para implantación en el cuerpo, por ejemplo, metal, titanio, aleación de titanio o una aleación de acero inoxidable, plástico, y cerámica apropiados para la implantación en un mamífero, más específicamente, en el cuerpo humano.

En otro aspecto, tal carcasa o soporte del dispositivo de implante incluye un manguito exterior que tiene un eje longitudinal, al menos un fragmento a lo largo del eje longitudinal, y un extremo distal y un área de conexión adaptada al dispositivo para cooperar conjuntamente con el dispositivo. Por analogía, el soporte del dispositivo funciona de manera similar al soporte de un disco o un casete capaz de albergar más de un disco o casete en cualquier periodo de tiempo o durante un periodo de tiempo prolongado. En otro aspecto, el soporte del dispositivo contiene un expansor adaptado para incrementar la altura del soporte.

Dispositivos de encapsulación celular recargables

Otro aspecto se refiere a un dispositivo de encapsulación con un reservorio, lumen, depósito o compartimento recargable, que se puede llenar o descargar periódicamente con agentes activos y/o células terapéutica o biológicamente adecuados. Tal llenado se puede realizar mediante inyección de una cantidad eficaz terapéuticamente de los agentes activos y/o células terapéutica o biológicamente adecuadas en un reservorio, lumen, depósito o compartimento implantado, por ejemplo, subdérmica o subcutáneamente empleando una jeringa u otro medio estándar en la técnica para llenar reservorios, lúmenes, depósitos o compartimentos *in vivo*.

Células encapsuladas

En algunos aspectos, el sistema comprende una densidad celular entre aproximadamente 1×10^5 , 1×10^6 células/ml a aproximadamente 1×10^{10} células/ml o más. En algunos aspectos, la célula sobrevive bajo condiciones de cultivo o *in vivo* en el sistema durante al menos un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses o un año o más, con una funcionalidad que represente al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de la función expresada en el momento en el que las células se introducen/introdujeron en el sistema o en el momento en el que las células plenamente desarrolladas y/o maduras en el sistema, por ejemplo, la implantación de células progenitoras que necesitan otro desarrollo o maduración a células funcionales *in vivo*. En algunos aspectos, la célula en el sistema crece en dicho sistema para incrementar la densidad celular y/o la función celular tras la implantación del sistema *in vivo*.

Métodos para incrementar la viabilidad celular

Un obstáculo en el campo de la encapsulación/inmuno-aislamiento celular y tisular ha sido la falta de transporte de nutrientes y oxígeno suficientes a través de las membranas de polímero empleados para encapsular células y tejidos. El resultado de este intercambio insuficiente de nutrientes y de gas es la disminución de la actividad metabólica y la muerte celular. Aspectos descritos en la presente memoria se refieren a un dispositivo de encapsulación celular implantable resolviendo esta deficiencia de la técnica anterior.

Se han medido las presiones parciales de oxígeno dentro de los islotes, en su entorno de origen, después del aislamiento, y después del trasplante en varios dispositivos poliméricos, así como en los puros o libres, por ejemplo, bajo la cápsula del riñón. Las presiones parciales de oxígeno en los islotes pancreáticos son las más altas de cualquier órgano del cuerpo (37-46 mmHg). Sin embargo, tras el aislamiento, estos valores caen drásticamente (14-19 mmHg). Tras el trasplante de los islotes pancreáticos en animales normo-glucémicos los valores descienden ligeramente (9-15 mmHg) en comparación con sus valores aislados. Véase Dionne et al., Trans. Am. Soc. Artf. Intern. Organs. 1989; 35: 739-741; y Carlsson et al., Diabetes Julio 1998 47(7):1027-32. Estos estudios demuestran que cuando los tejidos se inmuno-aislan y trasplantan, incluso en una región vascularizada, tal como la cápsula del riñón, las presiones parciales de oxígeno disminuyen en comparación con sus estados originales (37-46 mmHg). Por lo tanto, estas condiciones casi anóxicas pueden dar como resultado la muerte celular, particularmente la de la célula más cercana al núcleo de una agrupación celular o al núcleo de un dispositivo de encapsulación.

Para alcanzar una mejor disponibilidad y reparto del oxígeno a las células o tejidos encapsulados y/o a los agentes activos biológicamente, aspectos descritos en la presente memoria se refieren al uso de, por ejemplo, sustancias perfluoradas en el diseño y/o formulación del dispositivo, por ejemplo, en las membranas o materiales empleados para ensamblar el dispositivo. En particular, los compuestos orgánicos perfluorados, por ejemplo, perfluorocarbonos (PFCs), son buenos disolventes ya que tienen una solubilidad varias veces mayor por el oxígeno que el agua. Por

ejemplo, bajo condiciones normales, los PFCs líquidos disuelven entre el 40% y 55% en volumen del oxígeno y entre el 100 y 150% en volumen del CO₂. Los PFCs se utilizan principalmente como sustitutos sanguíneos y conservantes tisulares. Adicionalmente, los derivados PFC son compuestos densos, inertes químicamente, e insolubles en agua que no se pueden metabolizar.

En otro aspecto de los aspectos, la mejora del reparto de O₂ se realiza mediante una emulsión de PFC o mezcla de PFC con alguna matriz. Los componentes o células del dispositivo se podrían, por ejemplo, suspender o impregnar o incubar en la emulsión/matriz para formar un recubrimiento. Determinadas emulsiones de PFC con mayores concentraciones en peso/volumen han sido conocidas por tener un mejor reparto de oxígeno y retención de las propiedades. Y debido a la mayor presión parcial de oxígeno creada por las capacidades de transporte de O₂ de los PFCs, se crea un gradiente de presión de O₂ que conduce a la difusión del oxígeno disuelto en el tejido, mejorando así el reparto de O₂ a las células.

La sustancia PFC incluye pero no se limita a, perfluorotributilamina (FC-43), perfluorodecalina, bromuro de perfluorooctilo, bis-perfluorobutiletano, u otros PFCs adecuados. Los PFCs preferidos contienen normalmente aproximadamente de 60 a aproximadamente 76 por ciento en peso de flúor unido a carbono. Los fluidos perfluorados pueden ser compuestos únicos, pero usualmente serán una mezcla de tales compuestos. Patentes U.S. N^{os} 2.500.388 (Simons); 2.519.983 (Simons); 2.594.272 (Kauck et al.); 2.616.927 (Kauck et al.); y 4.788.339 (Moore et al.). PFCs útiles en los aspectos descritos en la presente memoria incluyen también a los descritos en la Encyclopedia of Chemical Technology, Kirk-Othmer, Tercera Ed., Vol. 10, páginas 874-81, John Wiley E Hijos (1980). Por ejemplo, PFCs útiles incluyen perfluoro-4-metilmorfolina, perfluorotrietilamina, perfluoro-2-etiltetrahidrofurano, perfluoro-2-butiltetrahidrofurano, perfluoropentano, perfluoro-2-metilpentano, perfluorohexano, perfluoro-4-isopropilmorfolina, perfluodibutileter, perfluoroheptano, perfluorooctano, y mezclas de los mismos. Líquidos fluoroquímicos inertes preferidos incluyen el perfluorohexano, perfluoro-2-butiltetrahidrofurano, perfluoroheptano, perfluorooctano, y mezclas de los mismos. PFCs disponibles comercialmente útiles en los aspectos descritos en la presente memoria incluyen los fluidos FLUORINERT.TM, por ejemplo, FC-72, FC-75, FC-77 y FC-84, descritos en el boletín del producto 1990 n° 98-0211-5347-7(101.5) NPI, fluidos FLUORINERT.TM, (disponible en Minnesota Mining and Manufacturing Company, St. Paul, Minn.), y mezclas de los mismos.

Capacidad de imagen in vivo

En un aspecto, se proporcionan medios para la obtención de imágenes o detección de las células dentro de los dispositivos de encapsulación in vivo. Las imágenes desempeñan importantes funciones en las terapias de células madre. Por ejemplo, la obtención de imágenes de forma no invasiva se puede emplear para: (1) determinar la presencia, gravedad o fenotipo de la célula y/o enfermedad a tratar; (2) controlar las terapias celulares de implante para la aparición de tipos celulares y estructuras perjudiciales o que no sean dianas, tal como quistes o microquistes; (3) guiar el reparto de la terapia; (4) seguir el trascurso de la enfermedad y evaluar los efectos o la eficacia de la terapia; (5) proporcionar marcadores y definir mecanismos terapéuticos; (6) analizar y evaluar la supervivencia y la función de las células injertadas; y (7) generalmente facilitar el proceso de cualquier terapia celular, por ejemplo, mediante la determinación del injerto, supervivencia, y función local de la terapia celular, incluyendo las terapias celulares descritas en la presente memoria para el tratamiento de la diabetes mediante la sustitución y/o implantación de células progenitoras pancreáticas. Además, aunque las terapias celulares ayudan a disminuir la morbilidad/mortalidad, las técnicas no invasivas de obtención de imágenes como se describen en la presente memoria y con más detalle más abajo, pueden servir como un criterio de valoración indirecto útil, por ejemplo, en ensayos preliminares o en estudios preclínicos.

Cualquier tecnología de obtención de imágenes in vivo resulta ideal: i) no invasiva; ii) repetitiva de forma fiable; iii) capaz de la penetración en el tejido hasta una profundidad de al menos 3 mm; iv) capacidades de resolución de no más de 100 µm e idealmente no mayor de 50 µm; v) la obtención de imágenes no se atenúa por los materiales del dispositivo, por ejemplo, se puede obtener una imagen a través de PTFE; vi) compatible clínicamente y no ser incómoda o complicada técnicamente; vii) disponible comercialmente; viii) uso humano aprobado por la FDA; ix) coste-eficacia razonable; y x) poder obtener imágenes de células en un periodo de tiempo razonable (por ejemplo, segundos o minutos), o cualquier combinación de lo anterior.

Hasta la fecha, los métodos actuales incluyen pero no se limitan a, microscopía confocal, microscopía de 2 fotones, ultrasonido de alta frecuencia, tomografía de coherencia óptica (OCT), tomografía fotoacústica (PAT), tomografía computarizada (CT), imagen de resonancia magnética (MRI), tomografía computarizada de emisión de un solo fotón (SPECT) y tomografía por emisión de positrones (PET). Estas tecnologías en solitario o combinadas pueden proporcionar medios útiles para controlar las células implantadas. También, se espera que tales tecnologías mejorarán a lo largo del tiempo pero que los principios esenciales de cómo funciona cada tecnología o su utilidad es sustancialmente similar. Dicho esto, las imágenes *in vivo* descritas en la presente memoria no se destinan a limitarse a las tecnologías descritas a continuación sino que las tecnologías descubiertas y descritas posteriormente podrían tener la misma utilidad que las que se describen en la presente memoria.

En un aspecto, la técnica de obtención de imágenes empleada será no invasiva y proporcionará datos tomográficos 3-dimensionales, tendrá una alta resolución temporal y espacial, permitirá imágenes moleculares, y será económica y portátil. Aunque en la actualidad ninguna modalidad en solitario es ideal (discutido con más detalle a continuación), cada una tiene diferentes atributos y estas modalidades juntas pueden proporcionar información complementaria.

- 5 La microscopía confocal es una técnica óptica de obtención de imágenes que incrementa el contraste de la micrografía y es capaz de reconstruir imágenes tridimensionales mediante el empleo de un agujero estenopeico espacial para eliminar la luz desenfocada de los especímenes que son más gruesos que el plano focal. Ya que sólo se ilumina un punto en la muestra al mismo tiempo, las imágenes en 2D o 3D requieren el escaneo sobre una trama regular (es decir, un patrón rectangular de líneas de escaneo paralelo) en el espécimen. Se emplean normalmente tres variaciones de escaneo principal para producir imágenes de microscopía confocal. Se puede conseguir una operación confocal equivalente prácticamente mediante la etapa de transformación lateral del espécimen acoplada a un haz de luz de iluminación estacionaria (etapa de escaneado), un haz de luz escaneado con una etapa estacionaria (haz de escaneado), o mediante el mantenimiento de tanto la etapa como la fuente de luz estacionaria mientras se escanea el espécimen con un conjunto de puntos de luz que se transmiten a través de la aperturas en un disco giratorio Nipkow o Nipkov. Cada técnica tiene características de rendimiento que las hace ventajosas para aplicaciones confocales específicas, pero que limitan el uso de la característica para otras aplicaciones.

20 Todas las microscopías confocales cuentan con la capacidad de la técnica para producir imágenes de alta resolución, secciones ópticas terminadas, en secuencia a través de las secciones relativamente gruesas o del montaje completo de los especímenes. Basado en la sección óptica como la unidad de imagen básica, los datos se pueden recoger a partir de especímenes fijados y teñidos en modos de iluminación en solitario, doble, triple, o múltiple longitud de ondas, y las imágenes recogidas con las diferentes estrategias de iluminación y marcaje se registrarán unos con los otros. Son posibles las imágenes de células vivas y de secuencias en un período de tiempo, y los métodos de procesamiento de imagen digital aplicado a las secuencias de imágenes permiten la representación de series-z y tridimensionales de los especímenes, así como la presentación de datos 3D de secuencias a lo largo del tiempo como imágenes en cuatro dimensiones. Se abarca también en los aspectos descritos en la presente memoria que el uso de los microscopios confocales anteriores no limitan a otros microscopios confocales actuales o que se descubran posteriormente.

30 Está disponible un gran número de sondas fluorescentes que, cuando se incorporan en protocolos relativamente simples, pueden teñir determinados marcadores de superficie celular y/o proteínas y orgánulos y estructuras intracelulares, por ejemplo, Celltracker, Dil, tintes nucleares, y similares. Los marcadores fluorescentes que se unen de forma específica directa o indirectamente a determinados marcadores de superficie celular, pueden ser útiles especialmente para la identificación de, por ejemplo, tipos celulares indeseados. En un aspecto preferido, las imágenes in vivo a tiempo real para la presencia de células pluripotentes encapsuladas proporcionan un medio para detectar, y por lo tanto, el potencial para prevenir, la formación de teratoma causado por las células madre pluripotentes, tal como hES o células gonadales embrionarias humanas o por células madre pluripotentes inducidas (IPs) o células parthenote, y similares. Los mismos medios de detección pueden también identificar células madre pluripotentes que se han escapado o fugado del dispositivo (o no están encapsuladas). La identificación de tales células se puede realizar también empleando genes promotores marcados fluorescentemente OCT4 y NANOG que están regulados al alza en la expresión de células madre pluripotentes. De manera similar, determinados marcadores fluorescentes intracelulares que marcan el núcleo, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, y la mitocondria, e incluso tintes tales como faloidinas marcadas fluorescentemente que marcan la actina polimerizada en las células, están también disponibles comercialmente y pueden proporcionar información crucial a cerca del destino de una célula.

45 En otro aspecto, la microscopía de fluorescencia de excitación de dos fotones (TPEF) es un medio no invasivo para controlar la diferenciación o, de forma inversa, para identificar células madre pluripotentes (por ejemplo, células hESCs o IPS o células parthenote) que no se diferenciaron y se implantaron inadvertidamente como un porcentaje muy pequeño de células de producto que se encapsularon en el dispositivo descrito en la presente memoria. La microscopía de fluorescencia de excitación de dos fotones se basa sustancialmente en fuentes endógenas de contraste, pero puede detectar también, por ejemplo, moléculas de matriz fibrilar a través de una generación armónica secundaria. En resumen, la microscopía de dos fotones se basa en una emisión de fluorescencia similar a la que se emplea en la microscopía confocal. Rice et al. (2007) describieron que la TPEF se puede emplear para revelar diferencias cuantitativas en el estado bioquímico y en la forma de diferenciación y no diferenciación de las células madre en dos dimensiones (2-D). Véase Rice et al. (2007) J Biomed Opt. 2007 Nov-Dic; 12(6). En un aspecto, las células madre pluripotentes se pueden modificar genéticamente para expresar una proteína fluorescente, por ejemplo, una proteína fluorescente verde mejorada, y conducir a células madre pluripotentes promotoras (por ejemplo, OCT4 o NANOG o cualquier otra célula madre pluripotente promotora identificada posteriormente). Para los dispositivos implantables que son más profundos que los implantes subcutáneos, es decir, profundidad por debajo de la superficie de la piel, la microscopía de fluorescencia de dos fotones proporciona imágenes no invasivas más profundas que para la microscopía confocal. Además, como la energía del fotón requerida para la excitación de fluorescencia sólo ocurre en el plano de enfoque y no se experimenta en las células o tejidos en los planos desenfocados, la luz infrarroja que se usa es menos dañina para las células vivas que la exposición a la luz visible o ultravioleta.

En otro aspecto, el ultrasonido es portátil, esencialmente inocuo, versátil, y se puede realizar a tiempo real en el momento de la implantación del producto celular encapsulado y/o agente activo biológicamente encapsulado. En particular, el ultrasonido en alta frecuencia tal como el que se describe por VisualSonics. Las imágenes de alta resolución permiten el ensayo *in vivo* de las estructuras anatómicas y de la función hemodinámica en estudios longitudinales de mamíferos. Por ejemplo, Vevo de VisualSonics ofrece: (1) la capacidad de realizar estudios longitudinales de la progresión y regresión de la enfermedad en sujetos individuales; (2) resolución de imagen de estructuras anatómicas y fisiológicas de pocas a 30 micras; (3) capacidad para visualizar guías de imágenes de una inyección y extracción con aguja; (4) valoración del flujo sanguíneo microcirculatorio y cardiovascular; (5) alto rendimiento a través de equipos de uso sencillo e interconexión dirigida a la investigación; y (6) arquitectura abierta que permite la medición completa y anotaciones y análisis de datos sin conexión. La capacidad para ensayar el flujo sanguíneo microcirculatorio y cardiovascular ayudará a determinar la capacidad de las células, por ejemplo el flujo y el reparto de O₂.

En otro aspecto, la imagen de resonancia magnética (MRI) se puede utilizar para distinguir entre un tejido sano y uno enfermo usando un agente de contraste. Pero, en otro aspecto, la tomografía computarizada (CT) o escaneos CT se pueden utilizar para crear un dibujo detallado de los tejidos y estructuras corporales. De nuevo aquí, se utiliza un agente de contraste y hace fácil visualizar el tejido anormal debido a tasas de absorción específicas. Un uso de un agente de contraste, tal como el Indio-111(I-111) oxina, es el seguimiento de las células madre a pesar de tener una vida media corta. En otro aspecto, se puede emplear la tomografía por emisión de positrones (PET) para medir las emisiones a partir de moléculas que emiten positrones, por ejemplo, carbono, nitrógeno, y oxígeno por nombrar algunas, y proporcionar información funcional útil. En otro aspecto, se pueden emplear también la tomografía de coherencia óptica (OCT) o la tomografía fotoacústica (PAT) para examinar las células y los tejidos dentro y fuera del dispositivo. La OCT detecta diferencias en la reflectividad de varios tejidos mientras que la PAT detecta ondas ultrasónicas creadas cuando los tejidos se calientan mediante la exposición a luz láser de baja energía.

Se pueden emplear varios métodos y técnicas o herramientas, solos o combinados, para visualizar, analizar y ensayar las células implantadas dentro del dispositivo *in vivo*. Estas y otras tecnologías ahora conocidas o que se desarrollen más tarde se pueden utilizar para permitir obtener imágenes *in vivo* y controlar las células y/o agentes como se describe en la presente memoria.

Ejemplos

Ejemplo1

Función *in vivo* de los progenitores pancreáticos encapsulados

El siguiente ejemplo se realizó, al menos en parte, para determinar, primero, la integridad de los métodos de encapsulación de células progenitoras pancreáticas, que incluyen un dispositivo bio-compatible y un dispositivo médico/mecánico; y segundo, para determinar si las células progenitoras pancreáticas encapsuladas completamente sobreviven y maduran para hacer funcionar a las células que secretan hormonas *in vivo* en comparación con células progenitoras pancreáticas sin encapsular (controles).

Los métodos para producir líneas celulares pancreáticas a partir de células madre embrionarias humanas (hES) son sustancialmente como se describen en la Patente U.S. Nº 7.534.608, titulada METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES, Solicitud de Patente U.S. Nº 12/264.760, titulada STEM CELL AGGREGATE SUSPENSION COMPOSITIONS AND METHODS OF DIFFERENTIATION THEREOF, presentada el 4 de Octubre, 2008; la Solicitud U.S. Nº 11/773.944, titulada METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES, presentada el 5 de Julio, 2007; la Solicitud U.S. Nº 12/132.437, GROWTH FACTORS FOR PRODUCTION OF DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 3 de Junio, 2008, Solicitud U.S. Nº 12/107.020, titulada METHODS FOR PURIFYING ENDODERM AND PANCREATIC ENDODERM CELLS DERIVED FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS, presentada el 8 de Abril, 2008; Solicitud U.S. Nº 11/875.057, titulada METHODS AND COMPOSITIONS FOR FEEDER-FREE PLURIPOTENT STEM CELL MEDIA CONTAINING HUMAN SERUM, presentada el 19 de Octubre, 2007; Solicitud U.S. Nº 11/678.487, titulada COMPOSITIONS AND METHODS FOR CULTURING DIFFERENTIAL CELLS, presentada el 23 de Febrero, 2007; Patente U.S. Nº 7.432.104, titulada ALTERNATIVE COMPOSITIONS & METHODS FOR THE CULTURE OF STEM CELLS; Kroon et al. (2008) Nature Biotechnology 26(4): 443-452; D'Amour et al. 2005 Nat Biotechnol. 23:1534-41; D'Amour et al. 2006 Nat Biotechnol. 24(11):1392-401; McLean et al., 2007 Stem cells 25:29-38.

En resumen, las células madre embrionarias humanas (hES) se mantuvieron sobre capas de alimentación de fibroblastos de embriones de ratón (medio especializado) en DMEM/F12 (Mediatech) enriquecido con suero Genosuprimido al 20% de reemplazamiento (KOSR, GIBCO BRL), aminoácidos no esenciales 1 mM (GIBCO BRL), Glutamax (GIBCO BRL), penicilina/estreptomina (GIBCO BRL), 2-mercaptoetanol 0,55 mM (GIBCO BRL) y 4 ng/mL de FGF2 humano recombinante (R&D Systems) y enriquecido alternativamente en 10-20 ng/mL de Activina A (R&D Systems). Los cultivos de las células ES humanas se pasaron manualmente de aproximadamente 1:4 a 1:8, 1:9, o 1:10 de relación de separación cada 5 a 7 días. Antes de la diferenciación tanto los cultivos adherentes como las suspensiones de agregados celulares, se lavaron brevemente en PBS^{+/+} (que contiene Mg⁺⁺ y Ca⁺⁺, Invitrogen). Las líneas celulares ES humanas pueden incluir, pero no se limitan a, CyT49, CyT203, Cyt25, BG01 y BG02.

Métodos para el cultivo y la diferenciación de células o poblaciones celulares en suspensión se describen en detalle en la solicitud Internacional PCT/US2007/062755, COMPOSITIONS AND METHODS FOR CULTURING DIFFERENTIAL CELLS, presentada el 23 de Febrero 2007 y la Solicitud U.S. Número 12/264.760, STEM CELL AGGREGATE SUSPENSION COMPOSITIONS AND METHODS OF DIFFERENTIATION THEREOF, presentada el 4 de Noviembre 2008.

Las condiciones del cultivo de diferenciación fueron sustancialmente similares a las que se describen en D'Amour et al. 2006, anteriormente citado, y el Ejemplo 4 de a continuación, describen ambos un protocolo de diferenciación de 5 etapas: etapa 1 (endodermo definitivo; d 1-d 4), etapa 2 (tubo digestivo primitivo o endodermo del tracto digestivo superior; d 5 a d 8), etapa 3 (tracto digestivo superior posterior o endodermo Pdx1-positivo; d 9 a d 12), etapa 4 (progenitor pancreático, epitelio pancreático y/o precursor endocrino; d 13 a d 15) y etapa 5 (célula endocrina que expresa hormonas, d 16 o más).

En la etapa 4, el ácido retinoico (RA) se retiró de los cultivos de la etapa 3, los cultivos se lavaron una vez con DMEM más B27 (1:100 Gibco), y después del lavado se reemplazó bien con suplemento DMEM+1XB27 solo o con cualquier combinación de cualquiera de los siguientes factores: Nogina (50 ng/ml), FGF10 (50 ng/ml), KGF (25-50 ng/ml), EGF (25-50 ng/ml), FBS 1-5% durante 4-8 días. En los casos donde no se añadió RA, se añadió nogina a 30-100 ng/mL (R&D systems) al medio durante 1-9 días. Alternativamente, en la etapa 4 no se añadieron factores de crecimiento adicionales. También, se pueden añadir a los cultivos agentes de supervivencia celular tal como Y-27632, fasudil, H-1152P, y una mezcla que comprende insulina/transferrina/selenio (ITS).

Independientemente de si los progenitores pancreáticos se produjeron a partir de cultivos adherentes o de suspensiones de agregados, todas las poblaciones celulares progenitoras pancreáticas se desarrollaron y maduraron en tejidos endocrinos funcionales cuando se trasplantaron en mamíferos *in vivo*. La producción de insulina *in vivo* mediante las células trasplantadas derivadas de hES se describen en las Solicitudes U.S. y referencias anteriores, por ejemplo, la Solicitud U.S. N° 11/773.944, titulada METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES y Kroon et al. 2008, anteriormente citado.

A diferencia de las composiciones celulares descritas en la Solicitud U.S. N° 11/773.944 y Kroon et al. 2008, anteriormente citado, los progenitores pancreáticos se aislaron o encapsularon *in vivo* completamente en este estudio. Las células progenitoras pancreáticas se encapsularon empleando polietilenglicol (PEG) bio-compatibles, que se describe en más detalle en la Patente U.S. N° 7.427.415, titulada IMPLANTATION OF ENCAPSULATED BIOLOGICAL MATERIALS FOR TREATING DISEASES. Los progenitores pancreáticos encapsulados con PEG se trasplantaron debajo de la bolsa de grasa epididimal (EFP, de sus siglas en inglés); se determinaron los niveles de suero de péptido-C en varios puntos de tiempo después de la estimulación de glucosa; y se realizó el análisis inmunohistoquímico en los explantes encapsulados con PEG. De nuevo, estos métodos han sido descritos previamente en la Solicitud U.S. N° 11/773.944, titulada METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES y Kroon et al. 2008, anteriormente citado (datos no mostrados). Los análisis inmunohistoquímicos demostraron que las células progenitoras pancreáticas eran capaces de madurar *in vivo* y contenían células que expresan hormonas, tales como insulina, glucagón y somatostatina.

La encapsulación de las células progenitoras pancreáticas también se realizó empleando un dispositivo médico o mecánico, por ejemplo, un dispositivo de encapsulación celular TheraCyte. Todas las referencias de los dispositivos de encapsulación celular TheraCyte son dispositivos que se adquirieron directamente desde el fabricante /Theracyle, Inc., Irvine, California) y además se describen en las Patentes U.S. N°s 6.773.458; 6.156.305; 6.060.640; 5.964.804; 5.964.261; 5.882.354; 5.807.406; 5.800.529; 5.782.912; 5.741.330; 5.733.336; 5.713.888; 5.653.756; 5.593.440; 5.569.462; 5.549.675; 5.545.223; 5.453.278; 5.421.923; 5.344.454; 5.314.471; 5.324.518; 5.219.361; 5.100.392; y 5.011.494. Las células progenitoras pancreáticas se cargaron bien en los dispositivos *ex vivo*, o bien una vez que los dispositivos se implantaron durante un periodo de tiempo que permita la revascularización del dispositivo, después las células se cargaron *in vivo* a través de un puerto de carga en uno de los lados del dispositivo.

Por lo tanto, el dispositivo contiene una primera membrana que es impermeable a las células (0,4 micras) pero al mismo tiempo no restringe el movimiento del oxígeno y de los distintos nutrientes dentro y fuera de la membrana interna, por ejemplo, la glucosa de fuera de la membrana interna puede penetrar en la cápsula que contiene las células que secretan la hormona pancreática madura, que en respuesta a la glucosa, pueden secretar insulina que pasa después fuera de la membrana interna. El dispositivo contiene también una membrana de vascularización externa.

Para usar un dispositivo en cualquier terapia celular, el dispositivo tiene que contener completamente las células *in vivo* (por ejemplo, células derivadas de hES inmuno aisladas a partir del hospedador). Para determinar la integridad del dispositivo TheraCyte, se compararon los dispositivos intactos que contienen las células progenitoras pancreáticas con dispositivos que tenían agujeros perforados en las membranas *in vivo*. Los agujeros perforados en los dispositivos permiten la invasión celular del hospedador y establecen, por lo tanto, el contacto célula a célula del injerto del hospedador.

Se pre-vascularizaron primero dos dispositivos TheraCyte de 4,5 μ L mediante implantación quirúrgica bajo la bolsa de grasa epididimal (EFP) o subcutáneamente (SQ) en cada ratón macho beige (BG) con inmunodeficiencia combinada grave (SCID, de sus siglas en inglés). Esto es, un animal recibió 2 dispositivos bajo el EFP, y otro animal recibió 2 dispositivos SQ. Estos dispositivos intactos pero vacíos (sin células progenitoras pancreáticas) permanecen en el animal durante un periodo de tiempo suficiente como para permitir a las estructuras de la vasculatura del hospedador formarse y asociarse con el dispositivo, por ejemplo, al menos de 2 a 8 semanas. Después de 8 semanas, se cargaron aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células progenitoras pancreáticas derivadas de células hES dentro de cada uno de los 4 dispositivos. Al mismo tiempo en el que se cargaron los animales con los dispositivos prevascularizados, a 3 de los otros animales se les implantó dos dispositivos TheraCyte modificados en donde un dispositivo TheraCyte original del mismo tamaño (4,5 μ L) se modificó con perforaciones en las membranas del dispositivo. Estos dispositivos perforados (2 dispositivos perforados por animal) se cargaron con células *ex vivo* con aproximadamente la misma dosificación de células con las que se cargó los dispositivos perforados. También al mismo tiempo, se realizaron dos controles positivos paralelamente a estos experimentos y a ambos animales se les injertó con progenitores pancreáticos en Gelfoam como se describe en la Solicitud U.S. N° 11/773.944, titulada METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES y Kroon et al. 2008, anteriormente citado, aunque en un animal dos injertos se colocaron bajo el EFP y en el otro animal sólo se colocó un injerto en el EFP. La Tabla 1 resume los resultados de los experimentos anteriores.

Tabla 1: Niveles séricos de péptido-C humano a partir de las células que secretan hormonas pancreáticas maduras encapsuladas

Implante	Animal n°	9 semanas		12 semanas		15 semanas	
		Tiempo GSIS (min)	Pep-C Humano pM	Tiempo GSIS	Pep-C Humano pM	Tiempo GSIS	Pep-C Humano pM
PV EFP 2 x 1,5M	675	0	91	0	186		
		60	224	30	304		
				60	419		
PV SQ 2 x 1,5M	676	0	157	0	322	0	908
		60	610	30	532	5	874
				60	2637	30	3037
nPV + perforaciones EFP 2 x1,5M	679	0	239	0	374		
		60	727	30	482		
				60	2259		
	680	0	218	0	329		
		60	899	30	506		
				60	2177		
	681	0	408	0	422	0	1554
		60	2136	30	1059	5	1615
				60	2751	30	10330
EFP GF 2 x 1,5M	682	0	912	0	488	0	1504
		60	3716	30	3025	5	1878
				60	3673	30	4288
EFP GF 1 x 1,5M	684	0	279	0	444	0	1498
		60	580	30	751	5	1411
				60	3000	30	4698

Con respecto a la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS), 0 se refiere al tiempo 0; 5 se refiere a 5 minutos después de la estimulación por glucosa; 30 se refiere a 30 minutos después de la estimulación por glucosa; 60 se refiere a 60 minutos después de la estimulación por glucosa; PV TC EFP, TheraCyte prevascularizado bajo la bolsa de grasa epididimal; PV TC SQ, TheraCyte prevascularizado subcutáneo; nPV TC +perforaciones EFP, TheraCyte no prevascularizado perforado bajo la bolsa de grasa epididimal; y EFP GF, dos construcciones con aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células sobre Gelfoam, $2 \times 1,5$ M en la bolsa de grasa epididimal.

A las células progenitoras pancreáticas se las dejó desarrollarse y madurar *in vivo* y se determinó la secreción de insulina, y la respuesta a glucosa de las células que secretan hormonas maduras de manera sustancial a la que se describe en la Solicitud U.S. Nº 11/773.944, titulada METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES y Kroon et al. 2008, anteriormente citado. Véase la Tabla 1. Adicionalmente, para determinar la integridad de los dispositivos, se sacrificaron algunos animales y se les realizó un examen inmunohistoquímico de los dispositivos. Los solicitantes demostraron previamente que los niveles de suero de péptido-C humano por debajo de 50 pM, o los niveles de insulina por debajo de 25 pM, son insignificantes para demostrar que las células que secretan insulina son en respuesta a la glucosa *in vivo*. Este mismo estándar se empleó en estos estudios. Los resultados de los estudios se muestran en la Tabla 1. Tanto el dispositivo TheraCyte original como el dispositivo TheraCyte modificados tenían niveles de péptido C de suero humano comparables después de 8, 12 y 15 semanas (animales nos. 675-676 y 679-681), con la excepción del animal número 681 a los 30 minutos después de la estimulación de glucosa en el cual los niveles de péptido C sérico era mucho más alto que en cualquier otro animal en este periodo de tiempo.

En primer lugar, en lo que respecta a la integridad del dispositivo de encapsulación TheraCyte, se realizaron las tinciones de hematoxilina y eosina estándar del dispositivo TheraCyte original y el dispositivo TheraCyte modificados (animales nos. 675-676 y 679-681, respectivamente). El examen microscópico de estos dispositivos mostró que los dispositivos TheraCyte originales tenían varias estructuras vasculares del hospedador que incluían células de tipo vascular alrededor del dispositivo, pero no se observaron estructuras similares invadiendo la membrana celular interna impermeable y en el espacio que contienen las células derivadas de hES. Esto es, no se observaron estructuras vasculares del hospedador dentro de la membrana celular interna impermeable que alberga las células derivadas de hES, o del injerto. Por el contrario, el examen microscópico de los dispositivos TheraCyte modificados mostraron que no sólo había estructuras vasculares asociadas en el exterior del dispositivo, sino que también había estructuras vasculares y células vasculares dentro de la membrana celular interna impermeable perforada. Por lo tanto, los dispositivos TheraCyte originales pueden contener completamente las células derivadas de hES pero no se observaron células hospedadoras y tejidos en el espacio que alberga a las células derivadas de hES.

En resumen, el dispositivo TheraCyte es capaz de encapsular (aislar) completamente células derivadas de hES *in vivo*, y las células progenitoras pancreáticas pueden sobrevivir y madurar para hacer funcionar a las células que secretan hormonas *in vivo* en estos dispositivos.

Además de demostrar la integridad del dispositivo TheraCyte, los presentes estudios demuestran también que los dispositivos intactos completamente permiten el suficiente intercambio de oxígeno y de los distintos nutrientes entre las células derivadas de hES y el medio del hospedador, y los progenitores pancreáticos son capaces de sobrevivir y madurar *in vivo*. Por ejemplo, los niveles de péptido C del suero humano en los dispositivos prevascularizados a las 9 y 12 semanas no fueron tan sólidos como el momento equivalente en comparación con los controles (animales 682 y 684). Sin embargo, en la 15ª semana (post-implante con células), los niveles de péptido C del suero humano en los dispositivos prevascularizados eran comparables a los de los controles sin encapsular (Gelfoam).

Además, los animales con los dispositivos TheraCyte (prevascularizados) se sacrificaron y se les extrajeron los dispositivos (o explantes) (animales nos. 675 y 676). Se realizó el análisis inmunohistoquímico de nuevo como se describe sustancialmente en Kroon et al. 2008 anteriormente citado, mediante la fijación de los dispositivos y/o explantes extraídos y cortando las 10 secciones en secciones delgadas de micras. Las secciones se lavaron con PBS dos veces, seguido de PBST (PBS/0,2% (p/v) Tween 20; Thermo Fisher Scientific). El bloqueo se realizó durante 1 hora a 24°C con 5% de suero normal de burro (Jacksons Immuno Research Labs)/PBSTr (PBS/0,1% (p/v) Triton X-100 (Sigma)). Los anticuerpos primario y secundario se diluyeron en BSA 1% (Sigma)/PBSTr para injertos. Los anticuerpos primarios se incubaron a 4°C durante la noche y los anticuerpos secundarios durante aproximadamente 1 hora 15 minutos en una cámara de hidratación. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios y diluciones; anti-insulina de cerdo de guinea (INS), 1:500 (Dako, A0564); anti-somatostatina de conejo (SST), 1:500 (Dako, A0566); anti-somatostatina de cabra (SST), 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, SC-7819); anti-glucagón de cabra (GCG), 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, SC-7780). La imagen se tomó mediante microscopía confocal (Nikon, Eclipse 80i, Ci).

El examen inmunohistológico de los dispositivos/explantes TheraCyte demostraron de forma clara células hormonales positivas únicamente, por ejemplo, células que expresan GCG, INS y SST. Estos datos respaldan los datos del péptido C de suero humano demostrando la capacidad de respuesta a la glucosa de las células derivadas de hES trasplantadas. La presencia de células que secretan hormonas demuestra que los progenitores pancreáticos son capaces de sobrevivir y madurar *in vivo*, incluso cuando se encapsulan completamente.

Los estudios anteriores demuestran claramente la eficacia tanto del dispositivo TheraCyte original como el modificado para contener completamente las células progenitoras pancreáticas derivadas de hES sin la invasión celular del hospedador a través de la membrana celular impermeable interna. Estos estudios demuestran también que la membrana celular impermeable interna de los dispositivos, si bien es impermeable para las células, es permeable al oxígeno y a distintos nutrientes requeridos para la supervivencia de los progenitores pancreáticos derivados de hES en el dispositivo, tal que las células progenitoras son capaces de madurar a células que secretan hormonas *in vivo*, que son células que funcionan y responden a la glucosa.

Además, está previsto que las poblaciones de líneas celulares pancreáticas, en particular, al menos los progenitores pancreáticos descritos en la presente memoria, madurarán y funcionarán también *in vivo* cuando se encapsulen en dispositivos mejorados, por ejemplo, al menos los que se describen en las FIGS.1-11.

Ejemplo 2

Progenitores pancreáticos encapsulados *in vivo* en ausencia de contacto con células del injerto del hospedador

Para determinar si se requería el contacto célula a célula con el injerto del hospedador para el funcionamiento *in vivo* de las poblaciones celulares progenitoras pancreáticas trasplantadas, las células se cargaron en dispositivos de encapsulación de células no prevascularizados.

Las poblaciones celulares de progenitores pancreáticos se generaron sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1 anterior. Los dispositivos de este estudio no se prevascularizaron, y todos los dispositivos TheraCyte (4,5 μ L) se cargaron *ex vivo* con al menos $1,5 \times 10^6$ células (1,5M) o $4,5 \times 10^6$ células (4,5M) en cada dispositivo. Los tres dispositivos que contienen células 1,5M se implantaron subcutáneamente (TC SQ 1,5), y 3 dispositivos que contienen $4,5 \times 10^6$ células (4,5M), o aproximadamente 15 μ L, se implantaron subcutáneamente (TC SQ 4,5) *ex vivo*. Al contrario, y como controles, a los animales implantados con progenitores pancreáticos sin encapsular, se realizaron experimentos frente a los encapsulados pero sin prevascularizar. A tres ratones se les implantó a cada uno subcutáneamente dos construcciones de Gelfoam cargadas con aproximadamente $1,9-2,4 \times 10^6$ células (total para las dos construcciones), o aproximadamente 4 μ L/construcción, y a 2 ratones se les implantó bajo el EFP con dos construcciones de Gelfoam cargadas con aproximadamente $1,9-2,4 \times 10^6$ células (total para las dos construcciones), o aproximadamente 4 μ L/construcción. La Tabla 2 resume los resultados de los experimentos anteriores.

Tabla 2: Niveles de péptido C de suero humano a partir de células que secretan hormona pancreática madura encapsuladas no prevascularizadas

Implante	Animal nº	Tiempo GSIS (min)	Pep-C 6 semanas (pM)	Pep-C 8,5 semanas (pM)	Pep-C 10 semanas (pM)
SQ 1,5M	833	0	nd	3,5	20,9
		60	5,8	60,9	167,7
	834	0	nd	0,3	32,5
		60	0,6	32,6	97,5
	835	0	102,8	168,3	153,1
		60	77,2	197,8	440,0
SQ 4,5M	836	0	nd	11,4	39,3
		60	nd	nd	29,9

Implante	Animal nº	Tiempo GSIS (min)	Pep-C 6 semanas (pM)	Pep-C 8,5 semanas (pM)	Pep-C 10 semanas (pM)
	837	0	6,8	60,9	85,8
		60	8,3	137,3	188,4
	838	0	4,2	21,6	64,4
		60	39,5	36,4	98,0
SQ GF 1,9-2,4M	819	0	nd	26,9	0,4
		60	4,2	26,9	79,4
	820	0	nd	4,7	11,8
		60	4,2	20,7	12,9
	821	0	nd	10,9	12,3
		60	2,7	69,1	54,3
EFP GF 1,9-2,4M	822	0	nd	22,5	57,3
		60	4,7	95,0	132,8
	823	0	nd	11,8	33,5
		60	46,0	243,3	170,3

Con respecto a la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS), 0 se refiere al tiempo 0; 60 se refiere a 60 minutos después de la estimulación por glucosa; SQ, dispositivo subcutáneo; SQ GF, Gelfoam subcutáneo, EFP GF, EFP, Gelfoam bajo la bolsa de grasa epididimal; 1,5M, $1,5 \times 10^6$ células; 4,5M, $4,5 \times 10^6$ células; 1,9-2,4M, $1,9-2,4 \times 10^6$ células; nd, no detectado.

Aunque el Ejemplo 1 demostró que las células derivadas de hES pueden sobrevivir, madurar y funcionar *in vivo* en dispositivos prevascularizados, en base a la Tabla 2 la prevascularización no es esencial para la supervivencia, crecimiento y/o maduración celular. La Tabla 2 compara células progenitoras pancreáticas encapsuladas con células progenitoras pancreáticas sin encapsular sobre Gelfoam, las últimas se han documentado por producir el funcionamiento de células que secretan hormonas *in vivo*, véase Kroon et al. 2008, anteriormente citado. De hecho, a los 60 minutos después de la estimulación con glucosa, los niveles de péptido-C del suero a partir de las células encapsuladas fueron comparables a los niveles de péptido-C de suero observados a partir de las células que no se encapsularon. Comparar los animales números 833-838 con los animales números 819-823. De hecho, las células encapsuladas consiguen mejores resultados que las que no lo están cuando se implantan subcutáneamente, comparar por ejemplo los animales números 833-835 (TC SQ 1,5M) con los números 819-821 (SQ 1,9-2,4M). Por lo tanto, el contacto célula a célula del injerto del hospedador no es esencial ya que como se demuestra claramente en este ejemplo, las células completamente encapsuladas sobreviven, crecen y maduran en ausencia de cualquier contacto célula a célula del injerto del hospedador en conjunto.

Los métodos, composiciones, y dispositivos descritos en la presente memoria son representativos de aspectos preferidos en la actualidad y son ejemplarizantes y no pretenden ser limitaciones del alcance de la patente. Por ejemplo, los dispositivos TheraCyte vienen en tamaños de 4,5 μ L, 20 μ L, y 40 μ L, por lo tanto, un experto en la técnica puede ampliar los estudios anteriores si emplea un dispositivo que sea capaz de contener más células.

Además, ya que Kroon et al. 2008 anteriormente citado ha demostrado la eficacia de los progenitores pancreáticos para liberar estreptozotocina (STZ) inducida en ratones diabéticos antes y después de la implantación del injerto, un experto en la técnica puede realizar estudios análogos empleando las células encapsuladas descritas en la presente memoria. También, se describen en detalle métodos para purificar o enriquecer determinadas poblaciones derivadas de hES en la Solicitud U.S. 12/107.020, titulada METHODS FOR PURIFYING ENDODERM AND PANCREATIC

ENDODERM CELLS DERIVED FROM hES CELLS, presentada el 8 de Abril, 2008. Por tanto, un experto en la técnica puede enriquecer células derivadas de hES específicas que incluyen, pero no se limitan, a células progenitoras pancreáticas, células precursoras endocrinas pancreáticas y/o células precursoras endocrinas.

Ejemplo 3

Progenitores pancreáticos crioconservados cuando se implantan se desarrollan y funcionan in vivo

Debido a que el trasplante celular se dificulta por la falta de fuentes celulares disponibles y por problemas operacionales y logísticos, existe una necesidad de proporcionar una fuente celular ilimitada para el trasplante en horas convenientes para el paciente.

Las células ES humanas se diferenciaron como se describe sustancialmente en los Ejemplos 1 y 2 y Kroon et al., 2008, anteriormente citado, así como en las Tablas 3a-h de a continuación. En el día 14 de la diferenciación, los progenitores pancreáticos se centrifugaron y luego se resuspendieron en un medio de congelación que contiene DMEM con 30% de suero de reemplazamiento genosuprimido xeno-libre, HEPES 25mM y 10% de una disolución de dimetilsulfóxido. Las células se tomaron en alícuotas en viales de congelación. Las células se reequilibraron en un medio de congelación durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente, después 45 minutos a 4°C, luego se colocaron sobre hielo en un congelador programado que se equilibró a 0°C.

Las células y la cámara de congelación se llevaron a -9°C a una velocidad de 2°C/min. La cámara y la muestra se mantuvieron a esta temperatura durante aproximadamente 10 minutos, y los viales se sembraron manualmente. La muestra se mantuvo a -9°C durante aproximadamente 10 minutos y a continuación se enfrió a una velocidad de 0,2°C/minuto hasta que la muestra alcanzó -40°C. La cámara de congelación se enfrió posteriormente a una velocidad de 25°C/minuto hasta que la muestra alcanzó aproximadamente -150°C. Las células en los viales se movieron a la fase de vapor de un congelador de almacenamiento de nitrógeno líquido.

En los tiempos deseados, los viales se descongelaron rápidamente mediante la transferencia de las células a un baño de agua de 37°C. Las células se transfirieron a un tubo estéril de 15 ml, que contiene DMEM con B-27 (1:100) y KGF + EGF (50 ng/mL cada uno), se mezcló suavemente y se centrifugó brevemente a 50 x g. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en el mismo tampón más ADNasa en 25 μ g/mL y se colocó en un cultivo de rotación.

Se cuantificaron las células supervivientes mediante fotografía de los agregados progenitores pancreáticos cuando se removieron hacia el centro del pocillo de cultivo tisular, se descongelaron de inmediato antes de que apareciera cualquier pérdida celular significativa, y a los 4 días después de la descongelación cuando se completó la disminución en la masa celular. Se cuantificó el área ocupada por las células en las fotografías, y se expresó como un porcentaje de supervivencia a los 4 días después de descongelar. En este ejemplo, se obtuvo al menos el 52% de supervivencia. La morfología de las células progenitoras pancreáticas cultivadas después de la crioconservación y la descongelación fue idéntica a las de las células en fresco.

Después de 4 días de descongelar el cultivo, las células se cargaron en los dispositivos como se describe sustancialmente anteriormente y se implantaron quirúrgicamente en el mamífero como se describe anteriormente. Las células crioconservadas fueron capaces de desarrollar y madurar in vivo a células acinares y células que secretan hormonas funcionales del páncreas de forma similar a la que se describe para los agregados celulares de progenitores pancreáticos en fresco. Véase el Ejemplo 4.

Por lo tanto, la crioconservación de progenitores pancreáticos humanos in vitro derivados de células hES no tienen o tienen un efecto pequeño en el desarrollo después de la implantación. Por tanto, la crioconservación demuestra ser un método de almacenamiento fiable de células pancreáticas derivadas de hESC adecuado para el trasplante.

Ejemplo 4

Métodos para proporcionar progenitores pancreáticos humanos para el tratamiento de la diabetes

Condiciones de cultivo de células madre pluripotentes

El cultivo, proliferación y mantenimiento de células madre pluripotentes, células ES y IPS en particular, se realizan sustancialmente como se describe en D'Amour et al. 2005 y 2006 y Kroon et al. 2008, citado anteriormente. Se usó

el medio base ES de DMEM/F12/1% Glutamax/1% de aminoácidos no esenciales/1%Pen-Estrep/0,2% de b-mercaptoetanol. Durante la etapa 0 o de proliferación de células hES, los niveles de varios factores de crecimiento y o insulina y factores de crecimiento similares a insulina, se mantuvieron muy bajos. Las células madre pluripotentes libres de alimentación se cultivaron empleando bajos niveles de suero humano. Las células madre pluripotentes se mantuvieron empleando un inhibidor Y27632 Rho-quinasa. Se apreciará que se pueden emplear otros inhibidores Rho-quinasa con resultados similares. Las condiciones de cultivo de células madre pluripotentes o ES son similares sustancialmente a las de los Ejemplos 1 y 2 descritos anteriormente.

Se apreciará que el medio base ES puede contener habitualmente aproximadamente 20% de Suero de Reemplazamiento Genosuprimido (KSR) o Suero de Reemplazamiento Genosuprimido libre de Xeno (XF).

Se apreciará que los cultivos de células hES pueden contener habitualmente aproximadamente 0 ng/mL, aproximadamente 4 ng/ml o aproximadamente 10 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF). Como se demostró anteriormente, bajo determinadas condiciones bajos niveles de Activina A ayudan a promover la proliferación de células madre pluripotentes sin promover la diferenciación de células hES. Por lo tanto, cultivos de células madre pluripotentes normalmente contienen aproximadamente 5 ng/mL, aproximadamente 10 ng/mL, o aproximadamente 20 ng/mL de Activina A o B, u otras familias del factor de crecimiento TGF- β activo biológicamente de manera similar, por ejemplo, al menos GDF-8 y GDF-11. En otros cultivos de células madre pluripotentes, un ligando de unión a Errb2 a niveles bajos, tal como heregulina, ayuda también a promover la proliferación de células hES, por ejemplo, de aproximadamente 5 a 10 ng/mL. También, se puede emplear para promover las cultivos de células hES cualquier combinación de diferentes o bajos niveles de bFGF, Activina A, B u otros miembros de la familia del factor de crecimiento TGF- β , específicamente GDF-8 y -11, y ligandos de unión a Errb2, tales como heregulina, siempre y cuando los niveles de los factores de crecimiento se mantengan para promover la proliferación y pluripotencia de las células hES y la no diferenciación de las células de los mismos. Aspectos descritos en la presente memoria describen varios factores de crecimiento (en algunos casos grandes proteínas) para mantener y proliferar cultivos de células madre pluripotentes, sin embargo, el alto coste de estas proteínas sobre una base de fabricación a gran escala la vuelve prohibitiva económicamente. Como tal, puede ser beneficioso identificar y caracterizar moléculas pequeñas determinadas para reemplazar las grandes proteínas de factor de crecimiento. Una de tales moléculas es nor-epinefrina (NE), que se describe en más detalle la Solicitud U.S. 61/172.998, titulada SMALL MOLECULES SUPPORTING PLURIPOTENT CELL GROWTH AND METHODS THEREOF, y presentada el 27 de Abril de 2009. En un aspecto, aproximadamente 5 ng/mL, aproximadamente 10 ng/mL, aproximadamente 20 ng/mL, aproximadamente 30 ng/mL, aproximadamente 40 ng/mL, aproximadamente 50 ng/mL, aproximadamente 60 ng/mL, aproximadamente 70 ng/mL, aproximadamente 80 ng/mL, aproximadamente 90 ng/mL, aproximadamente 100 ng/mL o más, se emplea para mantener los cultivos de células madre pluripotentes, por ejemplo, cultivos de hES o iPS. En un aspecto preferido, se puede emplear aproximadamente 50 ng/mL en los cultivos de células hES.

Se apreciará que la proliferación de células madre pluripotentes se sostienen habitualmente sobre células de alimentación de fibroblastos. Alternativamente, las células ES se pueden cultivar sobre placas recubiertas de una matriz extracelular (Corning). Además, Bodnar et al. (Geron Corporation, Menlo Park, California, EE.UU) describen el crecimiento de cultivos de células hES sobre una matriz extracelular monocapa, cuya matriz se derivó mediante lisis de la capa alimentadora de fibroblastos en la Patente U.S. Nº 6.800.480. Sin embargo, en un aspecto preferido, las células madre pluripotentes libres de alimentador se cultivaron usando bajos niveles de suero humano, por ejemplo, aproximadamente 0,1%, aproximadamente 0,2%, aproximadamente 0,3%, aproximadamente 0,4%, aproximadamente 0,5%, aproximadamente 0,6%, aproximadamente 0,7%, aproximadamente 0,8%, aproximadamente 0,9%, aproximadamente 1%, aproximadamente 1,2%, aproximadamente 1,4%, aproximadamente 1,6%, aproximadamente 1,8%, aproximadamente 2%, a aproximadamente 10% o más en una base de un medio de células ES. El suero humano se añadió al medio base simultáneamente evitando así cualquier necesidad de placas de cultivo tisular pre-recubiertas como se contempla en la Patente U.S. Nº 6.800.480 o que se proporcionan por Corning. El uso de suero humano para el cultivo, mantenimiento y proliferación de cultivos de células madre pluripotentes se describe en más detalle en la solicitud U.S. 11/875.057, titulada METHODS AND COMPOSITIONS FOR FEEDER-FREE PLURIPOTENT STEM CELL MEDIA CONTAINING HUMAN SERUM, presentada el 19 de Octubre de 2007.

Las células madre pluripotentes se pueden mantener también mediante la adición de inhibidores de la familia Rho-quinasa, por ejemplo al menos Y27632. Se ha encontrado recientemente que la Y27632 previene la apoptosis, así como mejora la supervivencia y eficacia de clonación de células madre pluripotentes humanas disociadas sin afectar las propiedades de auto-renovación o de pluripotencia.

Aunque los aspectos descritos en la presente memoria emplean Y27632 debido a su disponibilidad comercial, se pueden utilizar otros inhibidores quinasa.

Condiciones para la Etapa 1 de diferenciación de células madre pluripotentes

La diferenciación dirigida de células madre pluripotentes, en particular de células ES y IPS, se realizó sustancialmente como se describe en D'Amour et al. 2005 y 2006 y Kroon et al. 2008, citado anteriormente y en Solicitudes U.S. relacionadas anteriormente, que incluyen la Solicitud U.S. 61/171.759, titulada CELL

COMPOSITIONS DERIVED FROM DEDIFFERENTIATED REPROGRAMMED CELLS, presentada el 22 de abril de 2009.

Antes de la Etapa 1 de diferenciación, o en el día 0 del proceso de diferenciación, las células madre pluripotentes se cultivaron en un medio que comprende de RPMI1640/1% de Glutamax/1% de Pen-Estrep y sustancialmente sin suero y/o aproximadamente 0,1% de Albúmina Sérica Bovina (BSA). También, se añadió 1:5000 o 1:1000 o aproximadamente 0,02% o 0,1%, respectivamente, de suplemento de Insulina/Transferrina/Selenio (ITS). Además, se añadieron al medio de diferenciación varios factores de crecimiento que incluyen factor de crecimiento de la súper familia TGF- β y un miembro de la familia Wnt.

Se apreciará que los factores de crecimiento de la súper familia TGF- β añadidos incluyen pero no se limitan a, Activina A, Activina B, GDF-8 o GDF-11. En algunos aspectos se puede emplear un activador de la ruta Wnt. En otro aspecto, se emplea Wnt-3a junto con uno de los factores de crecimiento de la súper familia TGF- β . En otro aspecto preferido, se emplea aproximadamente 50 ng/mL de Wnt-3a con aproximadamente 100 ng/mL de un miembro de la súper familia TGF- β , tal como Activina A, Activina B, GDF-8 y GDF-11. En otros aspectos, moléculas pequeñas que activan rutas de traducción de señales similares se pueden sustituir por factores de crecimiento. Véase, por ejemplo, Borowiak, M. et al. (2009) que describe dos moléculas pequeñas que dirigen la diferenciación de células madre embrionarias humanas y de ratón hacia el endodermo. Borowiak, M. et al. (2009) Cell Stem Cell, 4(4):348-358.

Las células pluripotentes se incubaron en las condiciones de medio anteriores durante al menos 24 horas, transcurrido el cual el medio se cambió a un medio que comprende RPMI1640/1% de Glutamax/1% de Pen-Estrep y un ligero incremento en FBS, aproximadamente 0,2% de FBS y que contiene además aproximadamente 100 ng/mL de un miembro de la súper familia TGF- β . No se añadió un miembro de la familia Wnt. Se apreciará que se puede añadir un miembro de la familia Wnt al cultivo después de aproximadamente 24 horas.

Las células se cultivaron en este medio durante otras 24 horas. Después de aproximadamente un total de 48 horas desde que las células se habían diferenciado (día 0 a día 2), las células en el cultivo comprenden de células del endodermo definitivo diferenciado.

Se apreciará que el número total de días de diferenciación en la etapa 1, comenzando con el día 0 (células madre pluripotentes), pueden ser de aproximadamente 1-3 días, preferiblemente aproximadamente 1-2 días, y incluso más preferible, aproximadamente 2 días. Se apreciará que después de la etapa 1 de diferenciación, las células en el cultivo comprenderán aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, o aproximadamente 99% de células del endodermo definitivo diferenciado.

Se han descrito previamente métodos para determinar la composición de los cultivos en las solicitudes relacionadas anteriormente, pero son bien conocidos en la técnica principalmente los ensayos mediante ARN y proteína. Las células del endodermo definitivo expresan niveles aumentados de determinados marcadores de superficie celular característica, tal como SOX17 y FOXA2, pero pueden expresar también niveles aumentados de CER y CXCR4, pero no expresan HNF4- α de manera apreciable el cual se expresa apreciablemente en las células del endodermo del tracto digestivo superior (o tracto digestivo PDX1-negativo). Las células del endodermo definitivo tampoco expresan de manera apreciable marcadores observados posteriormente en células de la Etapa 3, 4 ó 5, tales como PDX1, NNF6, SOX9 y PROX1 expresados en células del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-positivo, o PDX1, NKX6., PTF1A, CPA y cMYC expresados en células pancreáticas PDX1-positivo o en células progenitoras pancreáticas PDX1/NKX6.1 co-positivo., o NGN3, PAX4, ARX y NKX2.2 expresados en células precursoras endocrinas, o INS, GCG, GHRL, SST o PP expresados en células endocrinas pancreáticas monohormonales o polihormonales.

Condiciones de diferenciación para la Etapa 2

Después de aproximadamente 48 horas (aproximadamente 2 días) de diferenciación de las células madre pluripotentes a DE, el medio de diferenciación DE se reemplazó por otro medio que promueve la Etapa 2 o formación de las células del endodermo del tracto digestivo superior humano (endodermo del tracto digestivo superior PDX1-negativo). Este medio de cultivo celular comprende RPMI1640/1% de Glutamax/1% de Pen-Estrep y 0,2% de FBS o un incremento adicional de FBS, por ejemplo, aproximadamente 2% de FBS. De manera similar al medio de cultivo de la Etapa 1 anterior, se añadió aproximadamente 1:5000 ó 1:1000 o aproximadamente 0,02% o 0,1%, respectivamente, de suplemento ITS.

Se apreciará que el medio de diferenciación DE no siempre se suplementa con ITS.

Sin embargo, en el medio no se incluyeron intencionadamente factores de crecimiento de diferenciación DE, tal como factores de crecimiento de la súper familia TGF- β o miembros de la familia Wnt. Al medio se añadió un inhibidor TGF- β quinasa.

Puesto que la eliminación de los miembros de la súper familia TGF- β es beneficiosa para la formación adecuada del endodermo del tracto digestivo superior, el uso de inhibidores de miembros de la súper familia TGF- β , tal como

inhibidores de TGF- β quinasa, asegura que los efectos de la acción de los miembros de la súper familia TGF- β se inhiban sustancialmente. Esto permite dirigir eficazmente la diferenciación de los DE hacia el endodermo del tracto digestivo superior (endodermo del tracto digestivo superior PDX1-negativo) sin que permanezcan los efectos de la diferenciación DE en el cultivo.

5 En lugar de añadir miembros de la súper familia TGF- β , se añadió el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) para promover la formación del endodermo del tracto digestivo superior. Las células se incubaron en este medio durante aproximadamente 24 horas, después de las cuales el medio se reemplazó sustancialmente con el mismo medio, excepto que ahora se eliminó del cultivo el inhibidor de TGF- β quinasa. Las células se incubaron entonces en este medio (sin el inhibidor de TGF- β quinasa) durante 5 días con cambios en el medio.

10 Se apreciará que las células se pueden incubar en este medio (sin inhibidor de TGF- β quinasa) hasta aproximadamente 3 días durante la Etapa 2 con cambios permisibles en el medio. El número total de días de diferenciación, comenzando con el día 0 y células madre pluripotentes, es aproximadamente 3-5 días, preferiblemente aproximadamente 4-5 días, y más preferible, aproximadamente 5 días.

De nuevo, los métodos para determinar la composición de los cultivos, se han descrito previamente en las solicitudes relacionadas anteriores, pero son bien conocidos en la técnica principalmente los ensayos mediante ARN y proteína. Las células del endodermo del tracto digestivo superior, o células del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-negativo, expresan niveles aumentados de determinados marcadores de superficie celular característica, tal como SOX17, HNF3- β y HNF4- α . Esto se distingue de las DE de la Etapa 1, que no expresan de manera apreciable HNF4- α , pero que expresan apreciablemente otros dos marcadores, SOX17 y HNF3- β . Las células del tracto digestivo superior PDX1-negativo no expresan apreciablemente marcadores observados posteriormente en las células de la Etapa 3, 4, ó 5, tal como PDX1, NNF6, SOX9 y PROX 1 expresados en células del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-positivo, o PDX1, NKX6.1, PTF1A, CPA y cMYC expresados en células progenitoras pancreáticas PDX1-positivo o células progenitoras pancreáticas PDX1/NKX6.1 co-positivo, o NGN3, PAX4, ARX y NKX2.2 expresados en células precursoras endocrinas, o INS, GCG, GHRL, SST o PP expresados en células endocrinas pancreáticas monohormonales o polihormonales.

Condiciones de diferenciación de la Etapa 3

Para promover la diferenciación de células del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-positivo de las células del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-negativo de la Etapa 2, se cambió el medio de cultivo de las células del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-negativo y se incubó en un medio que comprende DMEM con glucosa elevada/1% Glutamax /1%Pen-Estrep/1% de suplemento de B27 con bien aproximadamente 1 ó 2 μ M de Ácido Retinoico (RA), aproximadamente 0,25 μ M de KAAD-Cyclopamina, y con o sin aproximadamente 50 ng/mL de Nogina. Alternativamente, algunos cultivos en lugar de recibir RA, recibieron 1nM a aproximadamente 3 nM del retinoide aromático ácido (E)-4-[-2-(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftilenil)-1-propenil] benzoico (TTNPB). Otros cultivos recibieron aproximadamente 1 mM de dorsomorfina. Las células se incubaron en este medio de cultivo durante aproximadamente 3 días. Se apreciará que las células se pueden incubar aproximadamente 1-5 días, preferiblemente 2-4 días, y más preferiblemente 3 días.

De manera similar a lo anterior, los métodos para determinar la composición de los cultivos, se han descrito previamente en las solicitudes relacionadas anteriores, pero son bien conocidos en la técnica principalmente los ensayos mediante ARN y proteína. Las células del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-positivo, expresan niveles aumentados de determinados marcadores de superficie celular característica, aparte de PDX1, tal como SOX9, HNF6 y PROX1, pero no expresan apreciablemente otros marcadores de células de las Etapas posteriores 4 ó 5, tal como PDX1, NKX6.1, PTF1A, PCA y cMYC encontrados en células progenitoras pancreáticas, o NGN3, PAX4, ARX y NKX2.2 expresados en células precursoras endocrinas, o INS, GCG, GHRL, SST o PP expresados en células endocrinas pancreáticas monohormonales o polihormonales.

Condiciones de diferenciación para la Etapa 4

Para promover la diferenciación de células progenitoras pancreáticas PDX1/NKX6.1 co-positivo diferenciadas adecuadamente a partir de células del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-positivo, el medio de cultivo de las células del endodermo del tracto digestivo superior PDX1-positivo se cambió e incubó en un medio que comprende un medio base similar al de la Etapa 3 anterior, DMEM con glucosa elevada/1% Glutamax /1%Pen-Estrep/1% de suplemento de B27, excepto que no hay RA o derivado del ácido retinoico, tal como TTNPB o Nogina o dorsomorfina. En su lugar, se añadió al medio aproximadamente 50 ng/mL de Nogina, KGF y FGF. Se apreciará que se puede añadir al cultivo de aproximadamente 10 a 100 ng/mL de factores de crecimiento de fibroblastos y epidermo (EGF y FGF). Hay preferiblemente aproximadamente 10 a 50 ng/mL, o preferiblemente aproximadamente 10 ng/mL de EFG y aproximadamente 50 ng/mL de FGF añadido al cultivo. Alternativamente se puede no añadir FGF a los cultivos, o se añadió aproximadamente 25 a 100 ng/mL de Nogina, KGF, FGF, o se usó preferiblemente aproximadamente 50 ng/mL de Nogina, KGF y FGF. Las células se mantuvieron en este medio con cambios del medio durante aproximadamente 4 a 5 días. Se apreciará que las células se pueden mantener en el medio durante aproximadamente 2 a 6 días, preferiblemente de 3 a 5 días, e incluso más preferiblemente de 4 a 5 días con intercambio permisible del medio.

De manera similar a lo anterior, los métodos para determinar la composición de los cultivos, se han descrito previamente en las solicitudes relacionadas anteriores, pero son bien conocidos en la técnica principalmente los ensayos mediante ARN y proteína. Las células del endodermo o progenitoras pancreáticas PDX1/NKX6.1 co-positivo, expresan niveles aumentados de determinados marcadores de superficie celular característicos, tales como

- 5 PDX1, NKX6.1, PTF1A, CPA y cMYC, pero no expresan apreciablemente otros marcadores de células que se encuentran en etapas posteriores, tal como NGN3, PAX4, ARX y NKX2.2 expresados en células precursoras endocrinas, o INS, GCG, GHRL, SST o PP expresados en células endocrinas pancreáticas monohormonales o polihormonales.

Trasplante y purificación de progenitores pancreáticos PDX1-positivo

- 10 Después de aproximadamente 3-5 días en el medio de cultivo de la Etapa 4, los cultivos celulares se prepararon bien mediante: i) separación por citometría de flujo y/o purificación y análisis; ii) encapsulación en dispositivos de encapsulación como se discutió en más detalle anteriormente; y/o iii) trasplante en el mamífero. Alternativamente, el cultivo celular de la Etapa 4 se transfirió o adaptó en un medio DMEM con glucosa elevada/1% Glutamax /1%Pen-Estrep/1% de suplemento de B27 sin factores de crecimiento durante aproximadamente 1 a 2 días, antes de la
- 15 citometría de flujo y/o el trasplante.

Descripciones detalladas para enriquecer, separar, aislar y/o purificar progenitores pancreáticos y/o células endocrinas pancreáticas o células precursoras endocrinas se describen en detalle en la solicitud U.S. Número 12/107.020, titulada METHODS FOR PURIFYING ENDODERM AND PANCREATIC ENDODERM CELLS DERIVED FROM hES CELLS, presentada el 8 de Abril de 2008.

- 20 En resumen, se usó CD142 para enriquecer el progenitor pancreático PDX1-positivo (o células del epitelio pancreático o PE) mediante lavado rápido con PBS y disoció enzimáticamente en una suspensión celular sustancialmente única empleando 3% de TrypLE y FBS/PBS/EDTA 1 mM (tampón de elección). La suspensión celular única se pasó a través de un filtro de 40-100 μ M, y a continuación se granuló y se lavó de nuevo en un tampón de elección, re-granuló, y después se resuspendió de nuevo como una suspensión celular única
- 25 sustancialmente en un tampón de elección en aproximadamente 1×10^8 células/mL. Las células resuspendidas se incubaron con anticuerpo CD142 anti-ratón conjugado con ficoeritrina (BD PHARMIGENTM) en 10 μ l por 1×10^7 células. Las células se lavaron al menos una vez con tampón de elección, se granularon y resuspendieron de nuevo como una suspensión celular única sustancialmente en tampón de elección que contiene una disolución de microesferas de anti-ficoeritrina (Miltenyi Biotec) y se incubaron. Las células se lavaron al menos una vez y se
- 30 realizó la selección inmuno-magnética de células CD142 positivas. La pre-clasificación, unión y flujo a través de las fracciones se recogieron y contabilizaron mediante tinción con anti-PDX1 y/o anti-CHGA.

- La fracción de unión estaba altamente enriquecida por células CD142 positivas y por células progenitoras pancreáticas PDX1-positivas en comparación con las fracciones de pre-clasificación y de flujo. Véase la Tabla 9 de la Solicitud U.S. Número 12/107.020. Por ejemplo, la fracción anti-CD142-positiva o fracción de unión se comprendía
- 35 de aproximadamente 71% de células progenitoras pancreáticas PDX1-positivo en comparación a aproximadamente 22% de células progenitoras pancreáticas PDX1-positivo en la fracción de pre-clasificación, y aproximadamente 8% de células progenitoras pancreáticas PDX1-positivo en la fracción de flujo. Por lo tanto, había aproximadamente tres veces más enriquecimiento de células progenitoras pancreáticas PDX1-positivo en la fracción anti-CD142-positiva o fracción de unión en relación a la población de pre-clasificación. También, la fracción CD142-positiva o fracción de
- 40 unión era reducida en células cromogranina A (CHGA)-positivas indicando que las células endocrinas monohormonales o multihormonales no se seleccionaron o enriquecieron en esta población. Por lo tanto, las células CD142 se pueden emplear para la inmuno-selección positiva para enriquecer y/o purificar células epiteliales o células progenitoras pancreáticas PDX1-positivo, mientras que la fracción de flujo (la fracción o células que no se unen a la columna de anticuerpo; o CD142-) se enriquece con células de tipo endocrino pancreático. También, se
- 45 refiere a la Tabla 10 de la Solicitud U.S. Número 12/107.020.

Ejemplo 5

Maduración in vivo de progenitores pancreáticos que mejora la hipoglucemia en animales con diabetes inducida

- Para determinar si las poblaciones enriquecidas o los cultivos de células progenitoras pancreáticas PDX1-positivo, incluyendo las poblaciones crioconservadas, eran completamente capaces de desarrollar y madurar *in vivo* mediante
- 50 células que segregan insulina sensibles a glucosa, se cargaron las poblaciones progenitoras en los dispositivos de encapsulación de manera similar a la descrita anteriormente en los Ejemplos 1 y 2 empleando bien una jeringa Hamilton con una aguja sin punta de calibre de tamaño adecuado o bien mediante el método de carga según el procedimiento del fabricante.

- Antes de cargar las células en el dispositivo, el dispositivo se consideró adecuado para trasplante y uso en mamíferos, incluyendo a los seres humanos, por ejemplo, el dispositivo ha pasado los estándares de control de
- 55 calidad habituales, incluyendo la esterilización. Debido a que los componentes de la membrana del dispositivo es probable que comprendan membranas hidrófobas, por ejemplo, PTFE y, por lo tanto, repelen el agua, la esterilización de los dispositivos normalmente se realiza mediante la impregnación en un disolvente alcohólico de los

dispositivos (por ejemplo, 95% ETOH) y después se lavan en disolución salina repetidas veces. Los dispositivos deberán, por lo tanto, mantenerse húmedos antes de la carga. Lo ideal sería que cualquier método de carga del dispositivo se realizara bajo condiciones estériles, asegurando que cualquier componente del dispositivo que se implante no se contaminará con células no deseadas.

- 5 La carga del dispositivo se puede realizar bien empleando una jeringa Hamilton o similar más una aguja sin punta de calibre de tamaño adecuado (el tamaño dependerá del diámetro del puerto del dispositivo) o similares, por ejemplo, una aguja de calibre 22. La aguja se conecta a una jeringa Hamilton adecuada y contiene aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más μL de volumen celular que recogen una cantidad o dosis de células eficaz terapéuticamente. La aguja se inserta entonces a través de al menos un puerto del dispositivo y a través del lumen (o cámara o reservorio) pero sin tocar las paredes del dispositivo. Los contenidos
10 totales de la jeringa se expulsan lentamente en el dispositivo al mismo tiempo que la aguja se está retirando.

- Alternativamente, otro método para cargar el dispositivo empleando una aguja es mediante el empleo de un tubo de puerto de plástico o silicona estéril que conecta el puerto del dispositivo a la aguja que se inserta en el puerto pero no en el lumen. En este método, se inyecta un adhesivo de silicona en el tubo de puerto de silicona, sellando el
15 puerto del dispositivo. El tubo de puerto se corta después y se inspeccionan las fugas o roturas.

- Para cargar el dispositivo empleando el método de centrifugación, se prepara un determinado volumen celular que contiene una cantidad o dosis de células eficaz terapéuticamente, en una punta de micropipeta y la punta se conecta con el puerto del dispositivo. El dispositivo y la punta de la pipeta pueden ponerse también en un depósito o tubo cónico de centrifugar más grandes, inmovilizado o no. A menudo determinados volúmenes se estratifican por encima
20 de la suspensión celular en la punta de la pipeta y también en el tubo cónico más grande. El tubo cónico se centrifuga entonces a aproximadamente 1000 rpm durante unos pocos minutos, preferiblemente de 20 segundos hasta a aproximadamente 2 minutos o hasta que las células se cargan en el dispositivo. Después se eliminan con mucho cuidado los componentes de carga y se garantiza el dispositivo cargado.

- Las células encapsuladas en el dispositivo se prepararon entonces para la implantación en un mamífero, por ejemplo, un ratón inmuno-suprimido, tal como SCID/Bg, rata, un mamífero más grande o un paciente humano. Los métodos para implantar las células encapsuladas y el dispositivo son sustancialmente como los que se describen anteriormente en los Ejemplos 1 y 2 y en Kroon et al., 2008, excepto que en Kroon et al. las células se implantaron sobre GELFOAM y no contenían dentro un dispositivo. Sin embargo, ya que la población celular encapsulada contiene sustancialmente una población progenitora similar a la que se describe por Kroon et al. 2008, y la Patente U.S. Nº 7.534.608, titulada METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES, presentada el 5 de julio,
30 2007, los ensayos para determinar la función celular fueron esencialmente los mismos. En resumen, los animales se ensayaron aproximadamente cada dos, tres o cuatro semanas inyectándoles un bolo de arginina o glucosa, preferiblemente glucosa, en los que si las células encapsuladas han madurado adecuadamente en nuevas células beta in vivo, secretarán insulina en respuesta a glucosa. Para resumir, las células beta maduras son sensibles a glucosa de forma no diferente a la de las células beta que aparecen de manera natural. Se recogió la sangre de los mamíferos para determinar los niveles de péptido C humano que se secreta a partir de las células progenitoras trasplantadas que tienen células beta humanas maduras. Se detectó péptido-C humano en el suero animal como muy pronto a las 4 a 6 semanas después del trasplante y los niveles de péptido-C humano incrementan con del tiempo en células progenitoras o células precursoras endocrinas maduras en células beta que funcionan
40 adecuadamente. Cantidades habituales de péptido C humano por encima de 50 pM se consideraron una indicación de la función de las células trasplantadas. Se demostró previamente que las células injertadas a partir de progenitores pancreáticos PDX1-positivo dan lugar fielmente a células que expresan marcadores y características fisiológicas de células que secretan hormonas pancreáticas funcionales. Véase Kroon et al. 2009, citado anteriormente y la Solicitud U.S. 11/773.944, titulada METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES, presentada el 5 de Julio, 2007.
45

Se contempla la inmuno-supresión para determinados mamíferos durante un periodo de tiempo inicial hasta que los progenitores dentro del dispositivo maduren completamente y sean sensibles a la glucosa. En algunos mamíferos los regímenes de inmuno-supresión pueden ser durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más semanas, y dependen probablemente del mamífero.

- 50 Por último, similar a Kroon et al 2008, las células encapsuladas no sólo maduran en las agrupaciones del islote pancreático con células endocrinas, sino que también se desarrollan dentro de células asociadas al islote, tal como células acinares. Por tanto, los progenitores pancreáticos PDX1-positivo trasplantados no estaban comprometidas a convertirse en células endocrinas que secretan una única hormona sino que fueron capaces de madurar y desarrollarse en lo que es sustancialmente similar a un islote humano, que comprende tanto células endocrinas como células acinares. Y esta maduración in vivo y respuesta a glucosa de las células trasplantadas se observó si
55 las células progenitoras (PDX1/NKX6.1 co-positivas; precursores endocrinos, o determinadas células monohormonales o polihormonales) se cultivaron y diferenciaron in vitro y posteriormente se trasplantaron, o si determinados progenitores se purificaron o enriquecieron antes del trasplante, o si se produjeron previamente a partir de uno o más lotes y se crioconservaron, descongelaron y adaptaron en un cultivo antes del trasplante.

En resumen, después del trasplante, a las células trasplantadas se les permitió diferenciarse y madurar in vivo. Para determinar si las células trasplantadas tenían una función fisiológica normal, por ejemplo, como la de la célula beta que aparece de forma natural, se determinaron los niveles de insulina mediante el ensayo de los niveles de péptido-C humano. El péptido-C humano se separa o procesa a partir de la pro-insulina humana, por tanto, la detección de péptido-C humano, y la no detección de péptido-C endógeno de ratón, indica que la secreción de insulina se deriva de las células injertadas (exógenas).

Se midió la secreción de péptido-C humano estimulado por glucosa de las células trasplantadas en el suero a varios puntos de tiempo después del trasplante. Se apreciará que la secreción de péptido-C humano estimulado por glucosa se puede medir en varios puntos de tiempo, por ejemplo, al menos 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 y más días. Los niveles de péptido-C humano estimulado por glucosa se podrían medir de manera profunda en el suero a partir de aproximadamente 15 minutos después de la administración o inyección de glucosa. A los animales se les extrajo sangre aproximadamente a los intervalos de tiempo de 15, 30 y 60 minutos después de la administración de glucosa. El suero se separó de las células sanguíneas mediante centrifugación en micro-recipientes como se describe por el fabricante (Becton Dickinson). Se realizó el análisis ELISA del suero empleando placas ELISA específicas para el péptido-C humano ultrasensibles (Alpco). En general, la mayoría de los animales que reciben células trasplantadas encapsuladas responden a glucosa, como se demuestra mediante los niveles de péptido-C que son tres veces superiores a 50 pM.

En resumen, las células encapsuladas completamente mediante el dispositivo anteriores no afectan a la maduración de las células ni a la función fisiológica de las células una vez han madurado. Además, se observó la mejora de la hipoglucemia en estos animales con diabetes inducida, y era sustancialmente similar a la que se describe previamente en Kroon et al. (2008), así como en la Patente U.S. N° 7.534.608, aunque ninguno describe células o injertos encapsulados completamente.

Como se empela en las reivindicaciones de a continuación y a través de esta divulgación, mediante la frase “que consiste esencialmente en” significa que incluye cualquiera de los elementos enumerados después de la frase, y limita a otros elementos que no interfieren con, o contribuyen en, la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos enumerados. Por tanto, la frase “que consiste esencialmente en” indica que los elementos enumerados se requieren o son obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no presentarse dependiendo de si afectan o no a la actividad o acción de los elementos enumerados.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ensamblaje de encapsulación celular para implantar en un hospedador mamífero, comprendiendo dicho ensamblaje una membrana semi-permeable y al menos una cámara para encapsular células vivas, en donde el ensamblaje comprende un primer cierre en el borde periférico del ensamblaje, formando así el ensamblaje de encapsulación, y un segundo cierre que reduce el volumen de la cámara, y en donde el ensamblaje comprende además células vivas que son células progenitoras pancreáticas PDX1-positivo y que maduran en células endocrinas capaces de secretar insulina en respuesta a la estimulación por glucosa.
- 10 2. El ensamblaje de la reivindicación 1, en donde el ensamblaje tiene un tercer o cuarto cierre y reduce además el volumen de la cámara.
3. El ensamblaje de la reivindicación 1 que comprende además al menos un puerto de carga.
4. El ensamblaje de la reivindicación 1 que comprende dos puertos de carga.
5. El ensamblaje según la reivindicación 1, en donde las células vivas maduran en un islote que comprende células endocrinas y acinares en el hospedador mamífero.
- 15 6. El ensamblaje según la reivindicación 1, en donde la membrana semi-permeable es permeable a los nutrientes y el oxígeno.
7. El ensamblaje según la reivindicación 1, en donde el ensamblaje comprende una pluralidad de cámaras que limitan las aglomeraciones de células dentro del ensamblaje.
- 20 8. El ensamblaje según la reivindicación 1, en donde el ensamblaje promueve la secreción o liberación de un agente o macromolécula activa biológicamente a través del ensamblaje.
9. El ensamblaje según la reivindicación 1, en donde el ensamblaje promueve la estabilidad a largo plazo de las células vivas encapsuladas.
10. El ensamblaje según la reivindicación 1, en donde el ensamblaje aísla inmunológicamente las células trasplantadas del tejido del hospedador.
- 25 11. El ensamblaje según la reivindicación 1, en donde el ensamblaje está vascularizado.

Figura 1

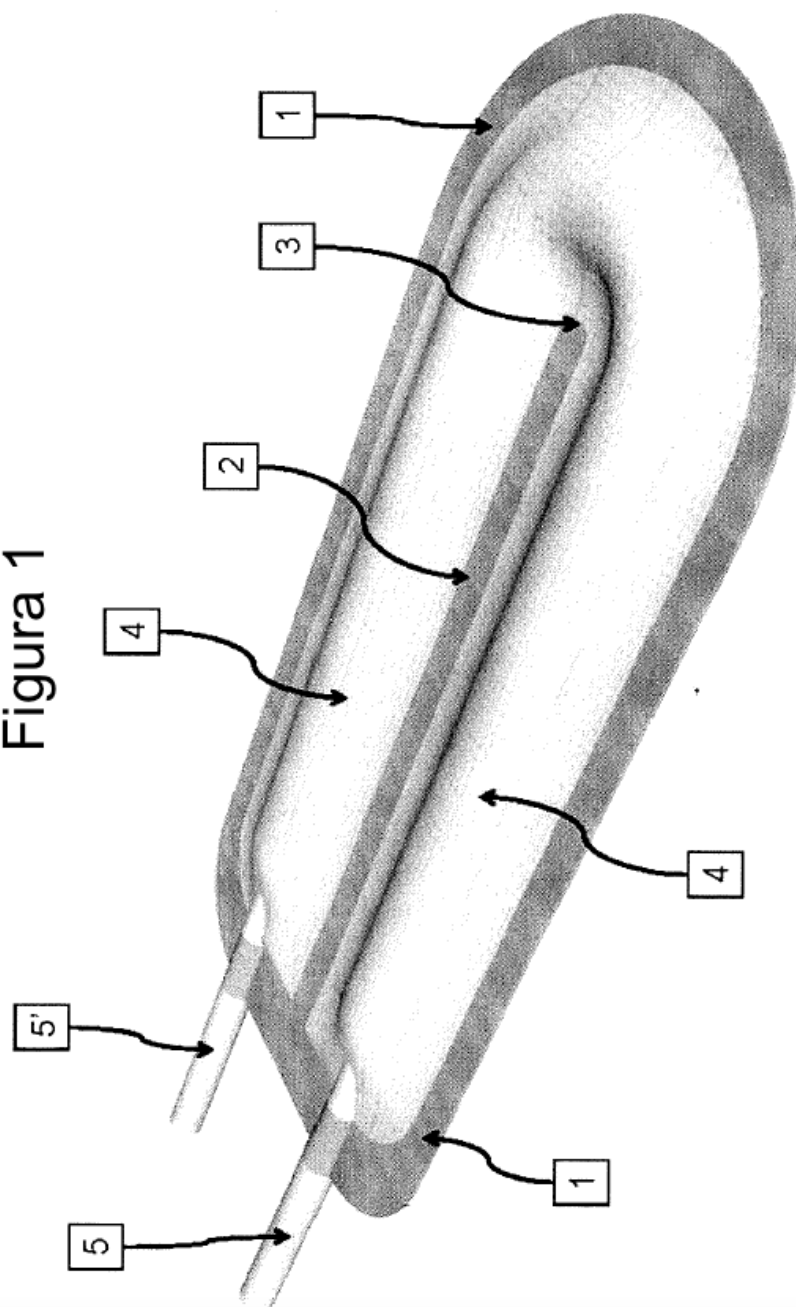


Figura 2

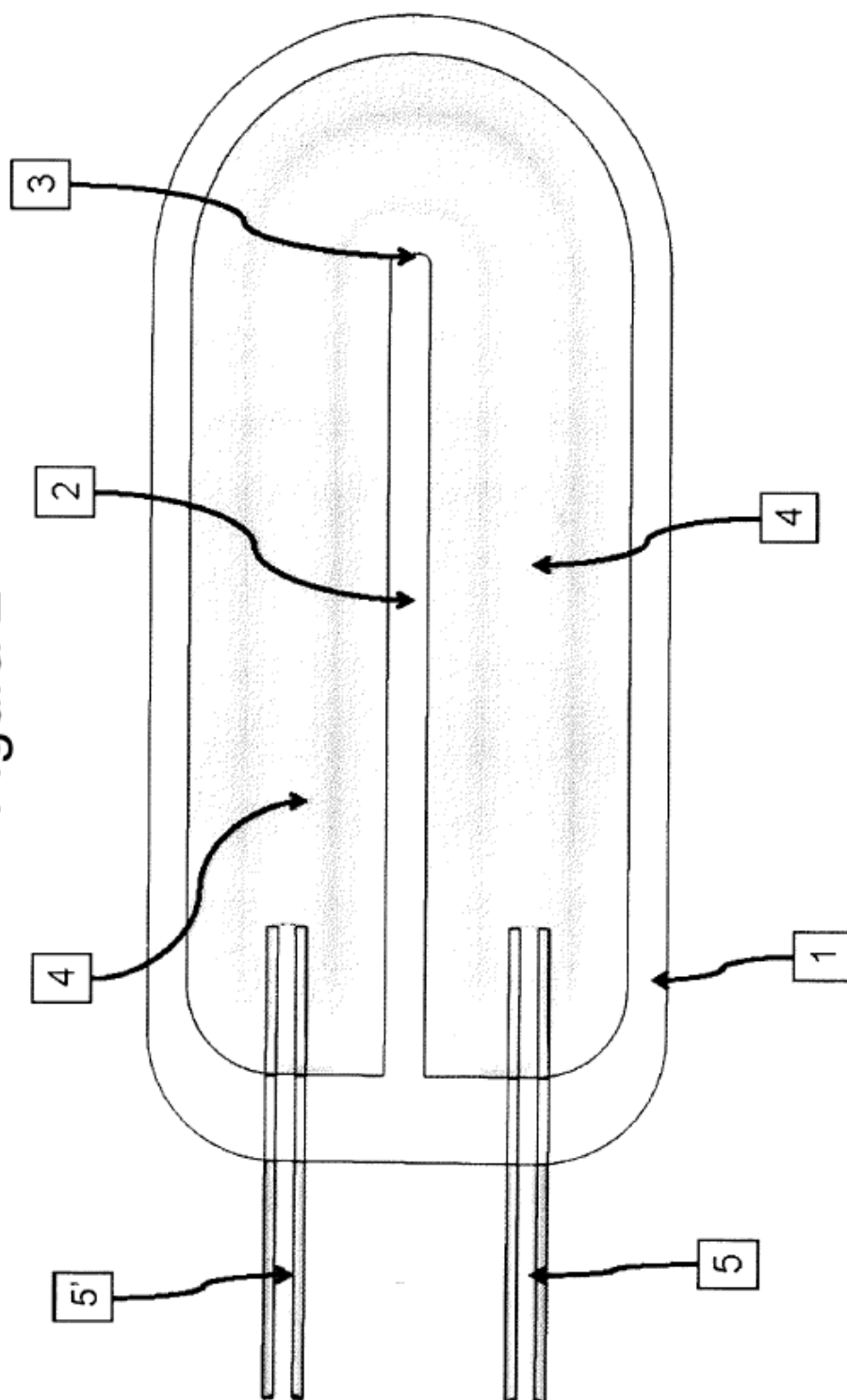


Figura 3

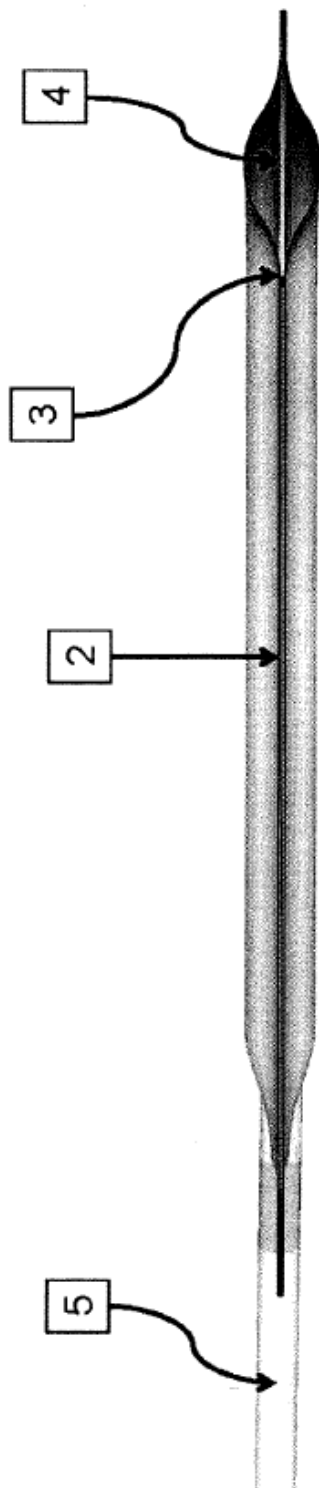


Figura 4

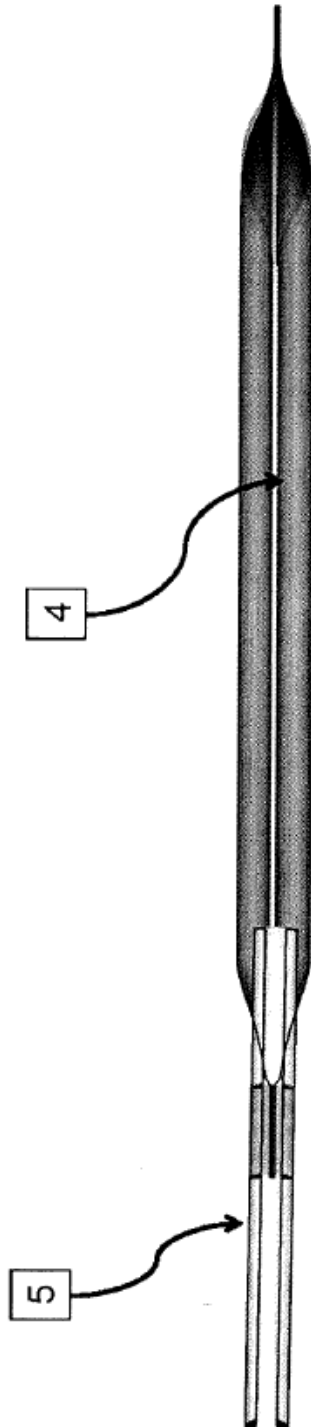


Figura 5

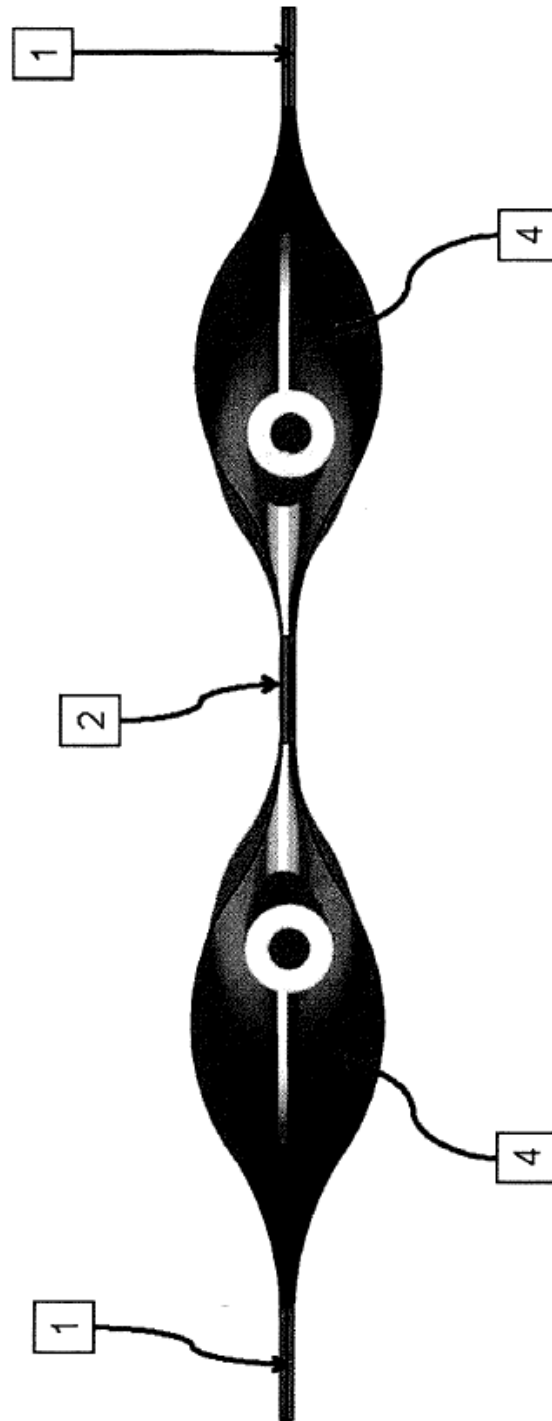


Figura 6

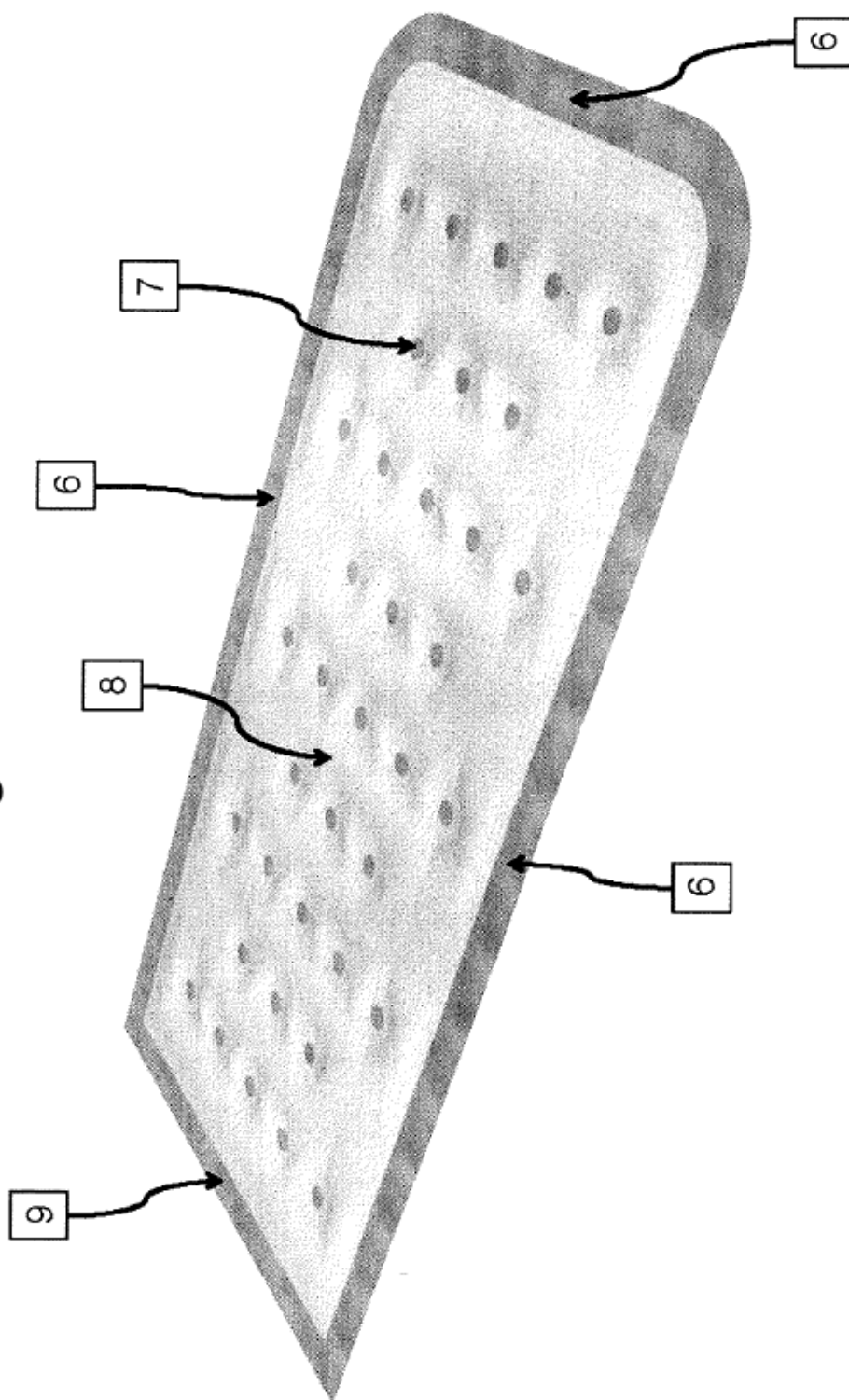


Figura 7

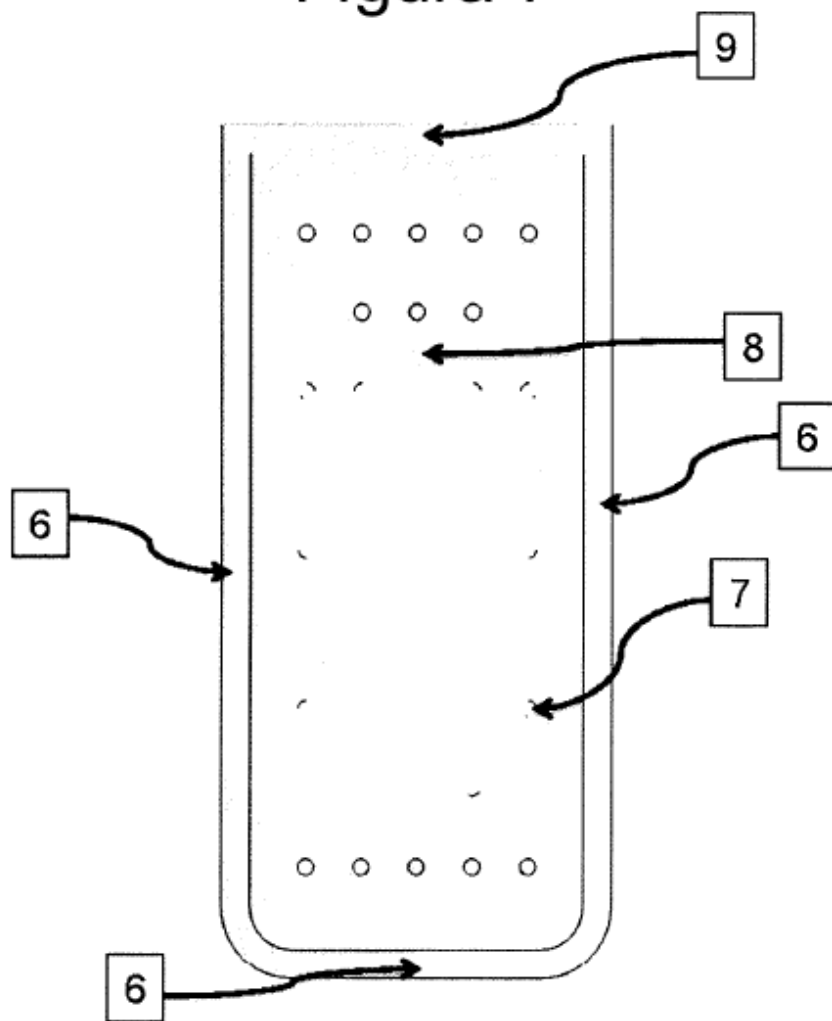


Figura 8

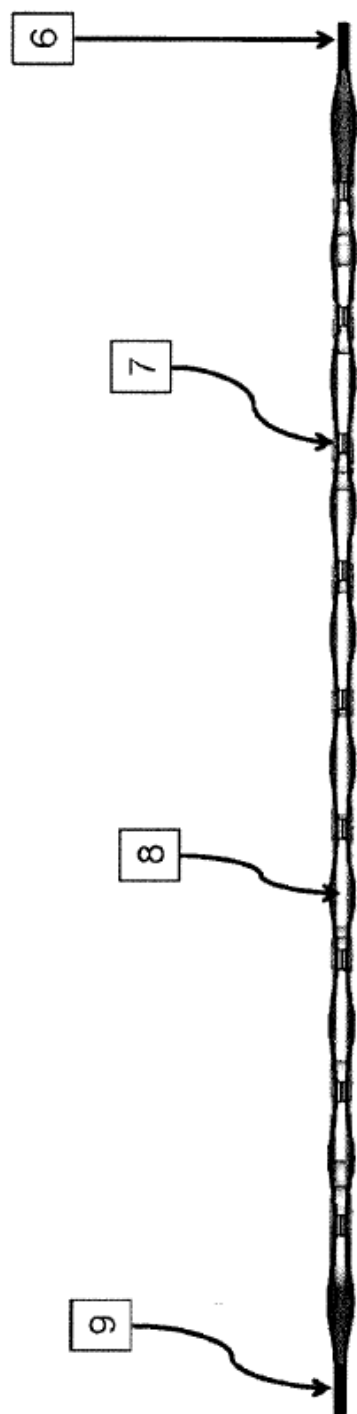


Figura 9

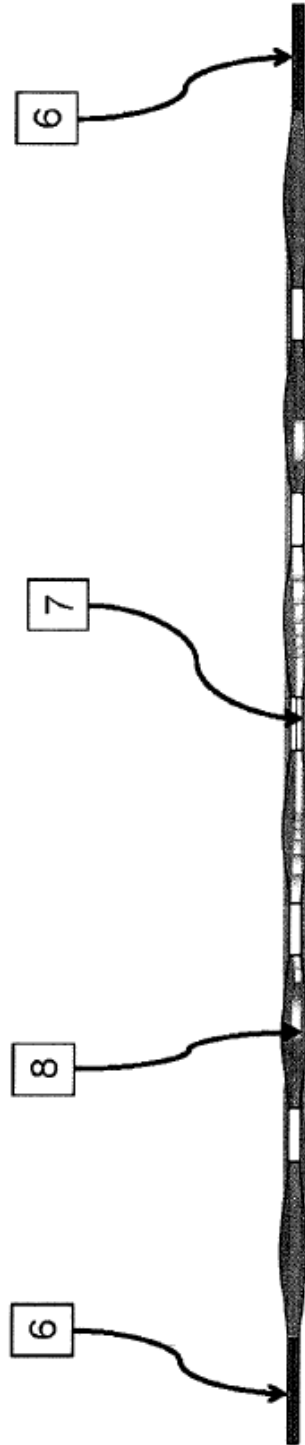


Figura 10

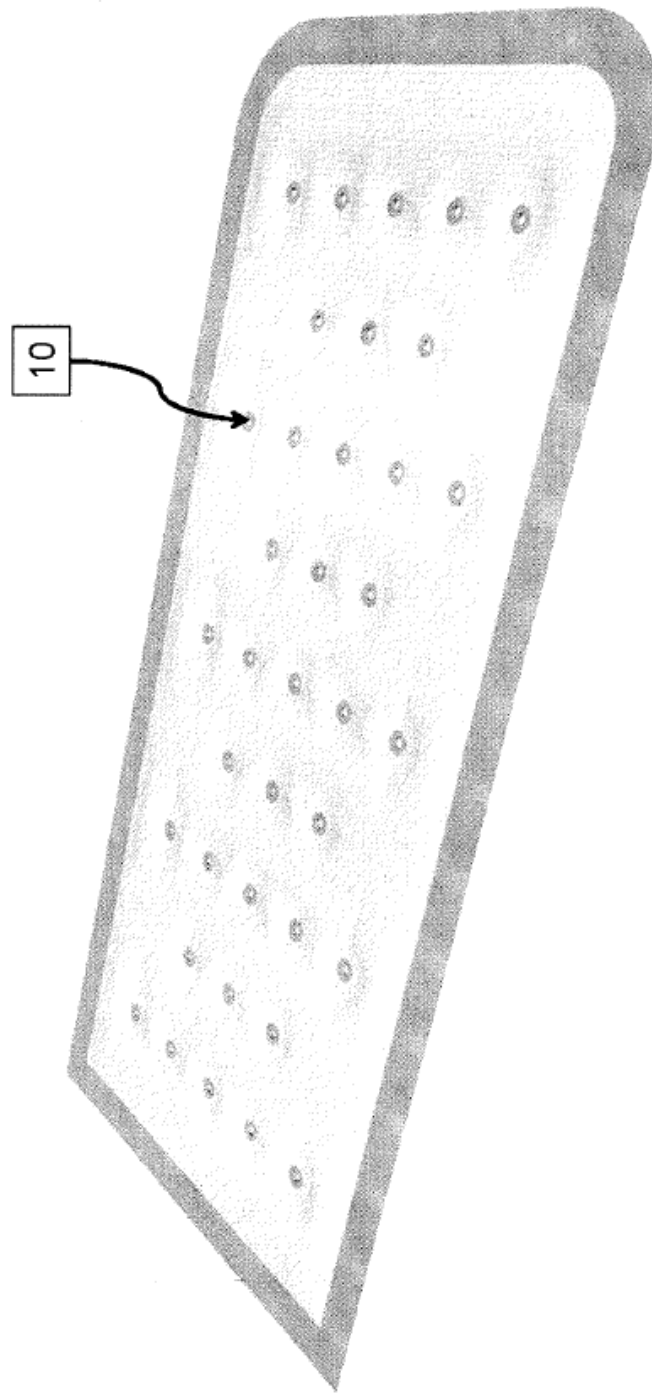


Figura 11

