

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 088**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

A61K 35/39 (2015.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2010 PCT/US2010/042393**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.01.2011 WO11011302**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2010 E 10802710 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2456858**

54 Título: **Diferenciación de células madre embrionicas humanas**

30 Prioridad:

20.07.2009 US 226936 P

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

07.12.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

XU, JEAN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 693 088 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

Diferenciación de células madre embrionarias humanas

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención proporciona métodos para promover la diferenciación de células madre pluripotentes en células productoras de Insulina. En particular, la presente invención proporciona un método para producir células capaces de producir insulina después de un trasplante en un animal.

10

ANTECEDENTES

[0002] Los avances en la terapia de reemplazo celular para la diabetes mellitus tipo I y la escasez de islotes de Langerhans trasplantables han centrado el interés en el desarrollo de fuentes de células productoras de insulina, o las células β , apropiadas para el injerto. Un enfoque es la generación de células β funcionales a partir de células madre pluripotentes, como, por ejemplo, células madre embrionarias.

15

[0003] En el desarrollo embrionario de los vertebrados, una célula pluripotente da lugar a un grupo de células que comprenden tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) en un proceso conocido como la gastrulación. Los tejidos como, por ejemplo, la tiroides, el timo, el páncreas, el intestino y el hígado se desarrollarán a partir del endodermo, a través de una etapa intermedia. La etapa intermedia en este proceso es la formación del endodermo definitivo. Las células de endodermo definitivas expresan una serie de marcadores, tales como, HNF3 beta, GATA4, MIXL1, CXCR4 y SOX17.

20

[0004] La formación del páncreas surge de la diferenciación del endodermo definitivo en el endodermo pancreático. Las células endodérmicas pancreáticas expresan el gen de homeobox pancreático-duodenal, PDX1. En ausencia de PDX1, el páncreas no se desarrolla más allá de la formación de yemas ventrales y dorsales. Por lo tanto, la expresión de PDX1 marca un paso crítico en la organogénesis pancreática. El páncreas maduro contiene, entre otros tipos de células, tejido exocrino y tejido endocrino. Los tejidos exocrinos y endocrinos surgen de la diferenciación del endodermo pancreático.

25

30

[0005] Las células que llevan las características de las células de los islotes se han derivado de células embrionarias de ratón. Por ejemplo, Lumelsky y *col.* (Science 292: 1389, 2001) informan de la diferenciación de las células madre embrionarias de ratón a estructuras secretoras de insulina similares a los islotes pancreáticos. Soria y *col.* (Diabetes 49: 157, 2000) informan que las células secretoras de insulina derivadas de las células madre embrionarias de ratón normalizan la glucemia en ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina.

35

[0006] En un ejemplo, Hori y *col.* (PNAS 99: 16105, 2002) describen que el tratamiento de células madre embrionarias de ratón con inhibidores de fosfoinositida 3-quinasa (LY294002) produjo células que se asemejaban a células β .

40

[0007] En otro ejemplo, Blyszczuk y *col.* (PNAS 100: 998, 2003) informa de la generación de células productoras de insulina a partir de células madre embrionarias de ratón que expresan constitutivamente Pax4.

45

[0008] Micallef y *col.* informa que el ácido retinoico puede regular el compromiso de las células madre embrionarias para formar el endodermo pancreático positivo PDX1. El ácido retinoico es más eficaz para inducir la expresión de PDX1 cuando se agrega a cultivos en el día 4 de la diferenciación de células madre embrionarias durante un período correspondiente al final de la gastrulación en el embrión (Diabetes 54:301, 2005).

50

[0009] Miyazaki y *col.* informa de una línea de células madre embrionarias de ratón que sobreexpresa Pdx1. Sus resultados muestran que la expresión exógena de PDX1 mejoraba claramente la expresión de los genes de insulina, somatostatina, glucoquinasa, neurogenina3, p48, Pax6 y HNF6 en las células diferenciadas resultantes (Diabetes 53: 1030, 2004).

55

[0010] Skoudy y *col.* informa que la activina A (un miembro de la superfamilia TGF- β) regula positivamente la expresión de genes pancreáticos exocrinos (p48 y amilasa) y genes endocrinos (Pdx1, insulina y glucagón) en células madre embrionarias de ratón. El efecto máximo se observó utilizando 1 nM de activina A. También observaron que el nivel de expresión de la insulina y el ARNm de PDX1 no se vieron afectados por el ácido retinoico; sin embargo, el tratamiento con 3 nM de FGF7 dio como resultado un nivel aumentado del transcrito para PDX1 (Biochem. J. 379: 749, 2004).

60

[0011] Shiraki y *col.* estudiaron los efectos de los factores de crecimiento que mejoran específicamente la diferenciación de las células madre embrionarias en células positivas para PDX1. Observaron que el TGF- β 2 producía de manera reproducible una mayor proporción de células positivas a PDX1 (Genes Cells. 2005 Jun; 10 (6): 503-16).

65

[0012] Gordon *y col.* demostraron la inducción de células de endodermo brachyury [positivas]/HNF3 beta [positivas] a partir de células madre embrionarias de ratón en ausencia de suero y en presencia de activina junto con un inhibidor de la señalización de Wnt (US 2006/0003446A1).

5 **[0013]** Gordon *y col.* (PNAS, Vol 103, página 16806, 2006) indica que "Wnt and TGF-beta/ nodal/ activin signaling simultaneously were required for the generation of the anterior primitive streak".

[0014] Sin embargo, el modelo de ratón de desarrollo de células madre embrionarias puede no exactamente imitar el programa de desarrollo en mamíferos superiores, tales como, por ejemplo, seres humanos.

10 **[0015]** Thomson *y col.* células madre embrionarias aisladas de blastocistos humanos (Science 282: 114, 1998). Actualmente, Gearhart y colaboradores derivaron líneas celulares de germen embrionario humano (hEG) del tejido gonadal fetal (Shambloott *y col.*, Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 95: 13726, 1998). A diferencia de las células madre embrionarias de ratón, que se puede evitar que se diferencien simplemente cultivando con Factor Inhibidor de Leucemia (LIF), las células madre embrionarias humanas se deben mantener en condiciones muy especiales (Patente de EE.UU. N° 6.200.806; WO 99/20741; WO 01/51616).

15 **[0016]** D'Amour *y col.* describe la producción de cultivos enriquecidos de endodermo definitivo derivado de células madre embrionarias humanas en presencia de una alta concentración de activina y suero bajo (Nature Biotechnology 2005). El trasplante de estas células debajo de la cápsula renal de los ratones dio como resultado la diferenciación en células más maduras con características de algunos órganos endodérmicos. Las células endodérmicas definitivas derivadas de células madre embrionarias humanas se pueden diferenciar adicionalmente en células positivas para PDX1 después de la adición de FGF-10 (US 2005/026654A1).

20 **[0017]** D'Amour *y col.* (Nature Biotechnology - 24, 1392 - 1401 (2006)) afirma: "Hemos desarrollado un proceso de diferenciación que convierte las células madre de embriones humanos (hES) en células endocrinas capaces de sintetizar las hormonas pancreáticas insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático y ghrelin. Este proceso imita la organogénesis pancreática *in vivo* dirigiendo las células a través de etapas que se asemejan a endodermo definitivo, endodermo de tubo digestivo, endodermo pancreático y precursor endocrino en ruta a células que expresan hormonas endocrinas".

25 **[0018]** En otro ejemplo, Fisk *y col.* informa un sistema para producir células de islotes pancreáticos a partir de células madre embrionarias humanas (US2006/0040387A1). En este caso, la vía de diferenciación se dividió en tres etapas. Las células madre embrionarias humanas se diferenciaron por primera vez a endodermo utilizando una combinación de butirato de sodio y activina A. Las células se cultivaron luego con antagonistas de TGF- β como Noggin en combinación con EGF o beta-celulina para generar células positivas de PDX1. La diferenciación terminal fue inducida por nicotinamida.

30 **[0019]** En un ejemplo, Benvenistry *y col.* afirma: "Concluimos que la sobreexpresión de la expresión mejorada de PDX1 de genes enriquecidos en páncreas, la inducción de la expresión de insulina puede requerir señales adicionales que solo están presentes *in vivo*" (Benvenistry *y col.* Stem Cells 2006; 24: 1923- 1930).

35 **[0020]** En otro ejemplo, Grapin-Botton *y col.* afirma: "La activación temprana de Ngn3 indujo casi exclusivamente a las células glucagón + mientras que agotaba el conjunto de los progenitores del páncreas. A partir de E11.5, los progenitores de PDX-1 se volvieron competentes para diferenciarse en células de insulina [positivas] y PP [positivas]" (Johansson KA *y col.*, Developmental Cell 12, 457-465, marzo de 2007).

40 **[0021]** La expresión de Ngn3 en células que expresan marcadores característicos de la edad del endodermo pancreático de línea puede reducir la capacidad de las células para diferenciarse adicionalmente en células de expresión de insulina. Estudios previos han demostrado que las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que expresan NGN3 son más propensas a producir células que expresan glucagón que las células que expresan insulina, cuando se las somete a una mayor diferenciación. Sin embargo, se requiere la expresión de NGN3 para formar células endocrinas pancreáticas, o células precursoras endocrinas pancreáticas (células que pueden formar, por ejemplo, glucagón o células que expresan insulina). Por lo tanto, la regulación temporal de NGN3 es importante para guiar el destino final de las células precursoras endocrinas pancreáticas hacia las células que expresan insulina.

45 **[0022]** Por lo tanto, sigue existiendo una importante necesidad de desarrollar condiciones para el establecimiento de líneas de células madre pluripotentes que pueden ampliarse para hacer frente a las necesidades clínicas actuales, al tiempo que conserva el potencial de diferenciarse en células que expresan insulina. La presente invención toma un enfoque alternativo para mejorar la eficacia de diferenciar células madre embrionarias humanas hacia células que expresan insulina, generando una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que coexpresan PDX1, NKX6,1, pero no expresan CDX2 y NGN3. Los métodos de la presente invención mantienen la expresión de NGN3 a un nivel mínimo hasta que se inicia la diferenciación del endodermo pancreático hacia células precursoras endocrinas pancreáticas.

65

RESUMEN

[0023] en una realización, la presente invención proporciona una población de células que expresan marcadores característicos de linaje endodérmico pancreático que coexpresan PDX1, NKX6.1, pero no expresan CDX2 y NGN3. En una realización, la población de células es capaz de producir péptido C después de la implantación en un animal.

[0024] En una realización, la presente invención proporciona un método para diferenciar una población de células madre pluripotentes en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que coexpresan PDX1, NKX6.1, pero no expresan CDX2 y NGN3, incluyendo los pasos de:

a. Cultivar las células madre pluripotentes,

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

c. Diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que coexpresan PDX1, NKX6.1, pero que no expresan CDX2 y NGN3 al tratar células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con un primer medio suplementado con FGF7, seguido de cultivo de las células en un segundo medio suplementado con FGF7, noggin (que es un factor capaz de inhibir la BMP), un agonista del receptor TGF- β seleccionado del grupo que consiste en activina B, TGF- β -I, TGF- β -II, GDF-8 y GDF-11, ácido retinoico y ciclopamina-KAAD (que es un inhibidor de la ruta de señalización de hedgehog).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**[0025]**

La Figura 1 muestra el efecto de la activina A sobre la expresión de NKX6.1, NGN3, PDX1, PTF1 alfa y ARX en la etapa 3 del día 4, en células tratadas según los métodos descritos en el Ejemplo 1. Se recogieron muestras duplicadas para análisis de PCR en tiempo real. Las representaciones representan la inducción de pliegues para cada gen en relación con el grupo de control (barras de color gris claro). Las barras de color gris oscuro representan células tratadas con FGF7, ciclopamina-KAAD, ácido retinoico, 20 ng/ml de activina A y noggin. Las barras negras representan células tratadas con FGF7, ciclopamina-KAAD, ácido retinoico, 50 ng/ml de activina A y noggin.

La Figura 2 muestra imágenes de inmunofluorescencia, que muestran la expresión de NKX6.1 (paneles a, c, y e) y NGN3 (paneles b, d y f) en células tratadas con FGF7 + Noggin + ácido retinoico + KAAD-ciclopamina (panel a y b), o células tratadas con FGF7 + Noggin + ácido retinoico + KAAD-ciclopamina + 20 ng/ml de activina A (panel c y d), y células tratadas con FGF7 + Noggin + ácido retinoico + KAAD-ciclopamina + Inhibidor de Alk5 II.

La Figura 3 muestra imágenes de inmunofluorescencia que muestran la expresión de PDX1 (paneles a y c), CDX2 (panel b y d) en células tratadas con DMEM-glucosa alta complementada con 1% de B27 + FGF7 + Noggin + ácido retinoico + KAAD-ciclopamina + 20 ng/ml de activina A (paneles a y b), y células tratadas con DMEM/F12 suplementado con 1% de B₂₇ + FGF7 + Noggin + ácido retinoico + KAAD-ciclopamina + 20 ng/ml de activina A (paneles c y d).

La Figura 4 muestra el efecto de activina A, activina B, TGF β 2, GDF11 y GDF8 en la expresión de NKX6.1, NGN3 y PDX1 en la etapa 3 día 4 en células tratadas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1. Se recogieron muestras duplicadas para el análisis de PCR en tiempo real. Las parcelas representan la inducción de pliegues para cada gen en relación con el grupo tratado con FGF7 + ciclopamina-KAAD + ácido retinoico + Noggin.

La Figura 5 muestra el efecto del tratamiento con Noggin y Alk5 inhibidor II sobre la expresión de NGN3, NEUROD, NKX2.2 y PAX6 (panel a), y NKX6.1, PDX1 y PTF1 alfa (panel b) en la etapa 4 día 3 en células tratadas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 2. Se recogieron muestras duplicadas para el análisis de PCR en tiempo real. Las representaciones representan la inducción de pliegues para cada gen con respecto al medio basal solamente (DMEM-glucosa alta + B27 al 1%) (barras gris claro). Las barras de color gris oscuro representan células tratadas con Noggin y Alk5 inhibidor II.

La Figura 6 muestra imágenes de inmunofluorescencia en células tratadas con FGF7 + Noggin + ácido retinoico + KAAD-ciclopamina + activina A durante cuatro días, seguido de Noggin y Alk5 inhibidor II durante tres días, como se describe en el Ejemplo 2. El panel a muestra la expresión de NKX6.1, NGN3 y una superposición de NKX6.1 y NGN3. El panel b muestra la expresión de PDX1, NGN3 y una superposición de PDX1 y NGN3.

La Figura 7 muestra la expresión de NGN3, PAX4, PDX1, NKX6.1, NEUROD, insulina y glucagón en las células

en la etapa 4, día 3 (barras de color gris claro) o en la etapa 5, día 3 (barras de color gris oscuro) o etapa 5, día 7 (barras negras), del protocolo de tratamiento descrito en el Ejemplo 3. Se recogieron muestras duplicadas para el análisis de PCR en tiempo real. Las representaciones representan la inducción de pliegues para cada gen en relación con la expresión detectada en la etapa 4 en el día uno.

La Figura 8 muestra imágenes de inmunofluorescencia, que muestran expresión de insulina, glucagón y NKX6.1, en células en la etapa 5 del día 7 del protocolo de tratamiento descrito en el Ejemplo 3. Superposición de la expresión de insulina y glucagón e insulina y NKX6.1 expresión también se muestran.

La Figura 9 muestra el péptido C humano circulante (panel a) y el nivel de glucosa en sangre no en ayunas (panel b) en ratones SCID amarillento diabéticos inducidos con STZ que recibieron las células de la presente invención debajo de la cápsula renal. Los niveles de péptido C y los niveles de glucosa en sangre se detectaron en los tiempos indicados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0026] Para mayor claridad de la divulgación, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las siguientes subsecciones que describen o ilustran ciertas características, realizaciones o aplicaciones de la presente invención.

Definiciones

[0027] Las células madre son células no diferenciadas definidas por su capacidad en el nivel de células individuales para auto-renovarse y diferenciarse para producir células de la progenie, incluyendo progenitores auto-renovadores, progenitores no renovadores, y células terminalmente diferenciadas. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de varios linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales después de la trasplatación y para contribuir sustancialmente a la mayoría, si no a todos los tejidos después de la inyección en blastocistos.

[0028] Las células madre se clasifican por su potencial de desarrollo como: (1) totipotentes, es decir, capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias; (2) pluripotentes, lo que significa que pueden dar lugar a todos los tipos de células embrionarias; (3) multipotentes, es decir, capaces de dar lugar a un subconjunto de linajes celulares pero dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir progenie que incluye HSC (autorrenovación), células progenitoras oligopotentes restringidas a células sanguíneas, y todos los tipos y elementos celulares (p. ej., plaquetas) que son componentes normales de la sangre); (4) oligopotentes, que pueden dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes celulares que las células madre multipotentes; y (5) unipotentes, lo que significa que pueden dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

[0029] La diferenciación es el proceso por el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada tal como, por ejemplo, una célula nerviosa o una célula muscular. Una célula diferenciada o inducida por diferenciación es aquella que ha adquirido una posición más especializada ("comprometida") dentro de la línea de una célula. El término "comprometido", cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que se ha avanzado en la vía de diferenciación hasta un punto en el que, en circunstancias normales, continuará diferenciándose en un tipo o subconjunto específico de células de tipos de células, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o revertir a un tipo de célula menos diferenciada. La dediferenciación se refiere al proceso por el cual una célula revierte a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Como se usa en el presente documento, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células proviene y de qué células puede originarse. El linaje de una célula coloca a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un marcador específico de linaje se refiere a una característica específicamente asociada con el fenotipo de células de un linaje de interés y se puede usar para evaluar la diferenciación de una célula no determinada con el linaje de interés.

[0030] "Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo", o "etapa de células de 1", o "Etapa 1", como se usa en el presente documento, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox similar a mezcla, FGF4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 u OTX2. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo incluyen células precursoras de rayas primitivas, células de rayas primitivas, células de mesendodermo y células endodérmicas definitivas.

[0031] "Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático", como se usa en el presente documento, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: PDX1, beta HNF1, PTF1 alfa, HNF6, NKX6.1, o HB9. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático incluyen las células endodérmicas pancreáticas, las células del tubo digestivo primitivo y

las células del intestino anterior.

[0032] "Endodermo definitivo", como se usa en el presente documento, se refiere a células que tienen las características de las células que surgen del epiblasto durante la gastrulación y que forman el tracto gastrointestinal y sus derivados. Las células de endodermo definitivas expresan los siguientes marcadores: HNF3 beta, GATA4, SOX17, Cerberus, OTX2, goosecoide, C-Kit, CD99 y MIXL1.

[0033] Los "marcadores", como se usan en el presente documento, son moléculas de ácido nucleico o polipéptido que se expresan diferencialmente en una célula de interés. En este contexto, la expresión diferencial significa un nivel aumentado para un marcador positivo y un nivel disminuido para un marcador negativo. El nivel detectable del ácido nucleico marcador o polipéptido es suficientemente más alto o más bajo en las células de interés en comparación con otras células, de modo que la célula de interés se puede identificar y distinguir de otras células usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en el arte.

[0034] "Célula pancreática endocrina", o "célula que expresa hormona pancreática", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula capaz de expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

Aislamiento, expansión y cultivo de células madre pluripotentes

Caracterización de células madre pluripotentes

[0035] Las células madre pluripotentes pueden expresar uno o más de los antígenos embrionarios específicos de la etapa (SSEA) 3 y 4, y marcadores detectables usando los anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81 (Thomson y col., Science 282: 1145, 1998). La diferenciación de células madre pluripotentes *in vitro* da como resultado la pérdida de expresión de SSEA-4, Tra 1-60 y Tra 1-81 (si está presente) y una expresión aumentada de SSEA-1. Las células madre pluripotentes indiferenciadas típicamente tienen actividad de fosfatasa alcalina, que puede detectarse fijando las células con paraformaldehído al 4% y luego desarrollándose con Vector Red como sustrato, según lo describe el fabricante (Vector Laboratories, Burlingame Calif.). Las células madre pluripotentes indiferenciadas también expresan típicamente OCT4 y TERC, como se detectó mediante RT-PCR.

[0036] Otro fenotipo deseable de células madre pluripotentes propagadas es un potencial de diferenciarse en células de las tres capas germinales: tejidos endodérmicos, mesodérmicos y ectodérmicos. La pluripotencia de las células madre pluripotentes se puede confirmar, por ejemplo, inyectando células en ratones inmunodeficientes combinados (SCID) severos, fijando los teratomas que se forman usando paraformaldehído al 4% y examinándolos histológicamente para detectar la presencia de tipos celulares de las tres capas germinales. Alternativamente, la pluripotencia puede ser determinada por la creación de cuerpos hemioides y evaluando los cuerpos embrioides para la presencia de marcadores asociados con las tres capas germinales.

[0037] las líneas de células madre pluripotentes pueden ser cariotipadas utilizando una técnica de bandedo G estándar y se compararon con cariotipos publicados de las especies de primates correspondientes. Es deseable obtener células que tengan un "cariotipo normal", lo que significa que las células son euploides, en donde todos los cromosomas humanos están presentes y no se alteran notablemente.

Fuentes de células madre pluripotentes

[0038] Los tipos de células madre pluripotentes que se pueden utilizar en métodos de la descripción incluyen líneas establecidas de células pluripotentes derivadas de tejido formado después de la gestación, incluyendo el tejido fetal tomado en cualquier momento durante la gestación, por lo general, pero no necesariamente antes de aproximadamente 10- 12 semanas de gestación. Ejemplos no limitativos son líneas establecidas de células madre embrionarias humanas o células germinales embrionarias humanas. También se contempla el uso de las composiciones de esta descripción durante el establecimiento inicial o la estabilización de tales células, en cuyo caso las células fuente serían células pluripotentes primarias tomadas directamente de los tejidos de origen. También son adecuadas las células tomadas de una población de células madre pluripotentes ya cultivadas en ausencia de células alimentadoras. También son adecuadas las líneas de células madre embrionarias humanas mutantes.

Cultivo de células madre pluripotentes

[0039] en una realización, las células madre pluripotentes se cultivan típicamente sobre una capa de células alimentadoras que soportan las células madre pluripotentes de diversos modos. Alternativamente, las células madre pluripotentes se cultivan en un sistema de cultivo que está esencialmente libre de células alimentadoras, pero no obstante apoya la proliferación de células madre pluripotentes sin experimentar una diferenciación sustancial. El crecimiento de las células madre pluripotentes en un cultivo sin alimentación sin diferenciación se apoya usando un medio condicionado por el cultivo previo con otro tipo de célula. Alternativamente, el crecimiento de las células madre pluripotentes en un cultivo sin alimentación sin diferenciación, se apoya usando un medio químicamente

definido.

[0040] Por ejemplo, Reubinoff et al (Nature Biotechnology 18: 399-404 (2000)) y Thompson y col. (Science 6 Noviembre de 1998.: Vol 282. nº 5391, pp 1145-1147) describen el cultivo de líneas de células madre pluripotentes a partir de blastocistos humanos usando una capa de células alimentadoras de fibrobármimo embrionario de ratón.

[0041] Richards y col., (Stem Cells 21: 546-556, 2003) evaluaron un panel de 11 capas de células alimentadoras fetales y neonatales adultas humanas diferentes, por su capacidad para apoyar el cultivo de células madre pluripotentes. Richards y col., afirma: "las líneas de células madre embrionarias humanas cultivadas en alimentadores de fibroblastos de piel adulta retienen la morfología de células madre embrionarias humanas y permanecen pluripotentes".

[0042] El documento US20020072117 desvela líneas celulares que producen medios que soportan el crecimiento de células madre pluripotentes de primates en un cultivo sin alimentador. Las líneas celulares empleadas son líneas celulares mesenquimales y similares a fibroblastos obtenidas de tejido embrionario o diferenciadas de células madre embrionarias. El documento US20020072117 también describe el uso de las líneas celulares como una capa primaria de células alimentadoras.

[0043] En otro ejemplo, Wang et al (Stem Cells 23: 1221-1227, 2005) da a conocer métodos para el crecimiento a largo plazo de células madre pluripotentes humanas en capas de células de alimentación derivadas de células madre embrionarias humanas.

[0044] En otro ejemplo, Stojkovic y col. (Stem Cells 2005 23: 306-314, 2005) describen un sistema de células de alimentación derivado de la diferenciación espontánea de células madre embrionarias humanas.

[0045] En un ejemplo adicional, Miyamoto y col. (Stem Cells 22: 433-440, 2004) describen una fuente de células alimentadoras obtenidas de placenta humana.

[0046] Amit y col. (Biol. Reprod 68: 2150-2156, 2003) describe una capa de células de alimentación derivadas de prepucio humano.

[0047] En otro ejemplo, Inzunza y col. (Stem Cells 23: 544-549, 2005) describen una capa de células de alimentación de fibroblastos de prepucio postnatal humano.

[0048] El documento US6642048 divulga medios que apoyan el crecimiento de células del tallo pluripotentes de primates (pPS) en cultivo libre de alimentadores y líneas celulares útiles para la producción de tales medios. El documento US6642048 establece: "Esta invención incluye líneas celulares mesenquimáticas y similares a fibroblastos obtenidas de tejido embrionario o diferenciadas de células madre embrionarias. Los métodos para derivar tales líneas celulares, medios de procesamiento y células madre en crecimiento usando los medios acondicionados descritos e ilustrados en esta descripción".

[0049] En otro ejemplo, WO2005014799 da a conocer un medio acondicionado para el mantenimiento, la proliferación y la diferenciación de células de mamíferos. El documento WO2005014799 establece: "El medio de cultivo producido de acuerdo con la presente invención está acondicionado por la actividad de secreción celular de células murinas, en particular, aquellos hepatocitos transgénicos diferenciados e inmortalizados, denominados MMH (Met Murine Hepatocyte)".

[0050] en otro ejemplo, Xu y col. (Stem Cells 22: 972-980, 2004) describe el medio acondicionado obtenido a partir de derivados de células madre embrionarias humanas que han sido modificados genéticamente para sobreexpresar transcriptasa inversa de telomerasa humana.

[0051] En otro ejemplo, US20070010011 describe un medio de cultivo químicamente definido para el mantenimiento de células madre pluripotentes.

[0052] Un sistema de cultivo alternativo emplea medio libre de suero suplementado con factores de crecimiento capaces de promover la proliferación de células madre embrionarias. Por ejemplo, Cheon y col. (BioReprod DOI: 10.1095/biol-reprod.105.046870, 19 de octubre de 2005) describen un sistema de cultivo libre de suero libre de alimentación en el que las células madre embrionarias se mantienen en sustitutos séricos no condicionados (SR). medio suplementado con diferentes factores de crecimiento capaces de desencadenar la autorrenovación de células madre embrionarias.

[0053] En otro ejemplo, Levenstein y col. (Stem Cells 24: 568-574, 2006) describen métodos para el cultivo a largo plazo de células madre embrionarias humanas ante la ausencia de los fibroblastos o medio acondicionado, utilizando medios suplementados con bFGF.

[0054] En otro ejemplo, US20050148070 describe un método de cultivo de células madre embrionarias humanas en

medio definido sin suero y células de alimentación sin fibroblastos, comprendiendo el método: el cultivo de las células madre en un medio de cultivo que contiene albúmina, aminoácidos, vitaminas, minerales, al menos una transferrina o sustituto de transferrina, al menos una insulina o sustituto de insulina, el medio de cultivo esencialmente libre de suero fetal de mamífero y que contiene al menos aproximadamente 100 ng/ml de un factor de crecimiento de fibroblastos capaz de activar un fibroblasto receptor de señalización del factor de crecimiento, en el que el factor de crecimiento se suministra desde una fuente diferente a una capa alimentadora de fibroblastos, el medio soporta la proliferación de células madre en un estado indiferenciado sin células alimentadoras o medio acondicionado.

5
10 **[0055]** En otro ejemplo, US20050233446 describe medios definidos útiles en el cultivo de células madre, incluyendo células madre primordiales de primates no diferenciadas. En conclusión, los medios son sustancialmente isotónicos en comparación con las células madre que se cultivan. En un cultivo dado, el medio particular comprende un medio base y una cantidad de cada uno de bFGF, insulina y ácido ascórbico necesarios para soportar el crecimiento sustancialmente indiferenciado de las células madre primordiales.

15
20 **[0056]** En otro ejemplo, US6800480 afirma "En una realización, se proporciona un medio de cultivo celular para el cultivo de células madre primordiales derivadas de primates en un estado sustancialmente no diferenciado que incluye una presión osmótica baja, medio básico de endotoxina baja que es eficaz para apoyar el crecimiento de las células madre primordiales derivadas de los primates. El medio básico se combina con un suero nutriente eficaz para apoyar el crecimiento de células madre primordiales derivadas de primates y un sustrato seleccionado del grupo que consiste en células alimentadoras y un componente de matraz extracelular derivado de células alimentadoras. El medio incluye además aminoácidos no esenciales, un antioxidante y un primer factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en nucleósidos y una sal de piruvato".

25
30 **[0057]** En otro ejemplo, US20050244962 establece: "En un aspecto, la invención proporciona un método de cultivar células madre embrionarias de primates. Un cultivo de las células madre en un cultivo esencialmente libre de suero fetal de mamíferos (preferiblemente también esencialmente libre de cualquier suero animal) y en presencia de factor de crecimiento de fibroblastos que se suministra desde una fuente que no sea simplemente una capa de alimentación de fibroblastos. En una forma preferida, la capa de alimentación de fibroblastos, previamente requerida para mantener un cultivo de células madre, se vuelve innecesaria por la adición de suficiente factor de crecimiento de fibroblastos".

35 **[0058]** En un ejemplo adicional, WO2005065354 da a conocer un medio de cultivo definido isotónico que es esencialmente libre de alimentador y libre de suero, que comprende: a. un medio basal; b. una cantidad de bFGF suficiente para soportar el crecimiento de células madre de mamífero sustancialmente indiferenciadas; c. una cantidad de insulina suficiente para soportar el crecimiento de células madre de mamífero sustancialmente indiferenciadas; y d. una cantidad de ácido ascórbico suficiente para soportar el crecimiento de células madre de mamífero sustancialmente indiferenciadas.

40
45 **[0059]** En otro ejemplo, WO2005086845 da a conocer un método para el mantenimiento de una célula madre no diferenciada, comprendiendo dicho método la exposición de una célula madre a un miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), un miembro de la familia de proteínas de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), o nicotinamida (NIC) en una cantidad suficiente para mantener la célula en un estado indiferenciado durante un tiempo suficiente para lograr un resultado deseado.

50 **[0060]** Las células madre pluripotentes pueden sembrarse sobre un sustrato de cultivo adecuado. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es un componente de matriz extracelular, tal como, por ejemplo, los derivados de membrana basal o que pueden formar parte de acoplamientos de ligando-receptor de molécula de adhesión. En una realización, un sustrato de cultivo adecuado es MATRIGEL® (Becton Dickenson). MATRIGEL® es una preparación soluble de las células tumorales Engel-breth-Holm Swarm que gelifica a temperatura ambiente para formar una membrana basal reconstituida.

55 **[0061]** Otros componentes de la matriz extracelular y las mezclas de componentes son adecuadas como alternativa. Dependiendo del tipo de célula que se está proliferando, esto puede incluir laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, sulfato de heparán, y similares, solos o en varias combinaciones.

60 **[0062]** Las células madre pluripotentes se pueden sembrar en el sustrato en una distribución adecuada y en presencia de un medio que promueve la supervivencia celular, propagación, y la retención de las características deseables. Todas estas características se benefician de una cuidadosa atención a la distribución de siembra y pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la materia.

65 **[0063]** Medios de cultivo adecuados pueden estar hechos de los siguientes componentes, tales como, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Gibco n° 11965-092; medio de Eagle knockout modificado por Dulbecco (KO DMEM), Gibco n° 10829-018; Medio Fans Hamish F12/50% DMEM; L-glutamina 200 mM, Gibco n° 15039-027; solución de aminoácidos no esenciales, Gibco 11140-050; β -mercaptoetanol, Sigma n° M7522; factor de crecimiento de fibroblastos básico humano recombinante (bFGF), Gibco n° 13256-029.

Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático a partir de células madre pluripotenciales

5 **[0064]** En una realización, la presente divulgación proporciona un método para producir células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático a partir de células madre pluripotentes, que comprende las etapas de:

- 10 a. Cultivar células madre pluripotentes,
- b. Diferenciar las células madre pluripotentes en células que expresan marcadores característicos del linaje definitivo del endodermo, y
- 15 c. Diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje definitivo del endodermo en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático.

[0065] En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático coexpresan PDX1, NKX6.1, pero no expresan CDX-2 y NGN3.

20 *Diferenciación de células madre pluripotentes en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo*

[0066] La formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo puede determinarse ensayando la presencia de los marcadores antes y después de seguir un protocolo particular. Las células madre pluripotentes típicamente no expresan tales marcadores. Por lo tanto, la diferenciación de las células pluripotentes se detecta cuando las células comienzan a expresarlos.

[0067] Las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante cualquier método en la técnica o mediante cualquier procedimiento propuesto en esta invención.

[0068] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos descritos en D'Amour y col., Nature Biotechnology 23, 1534-1541 (2005).

[0069] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos descritos en Shinozaki y col., Desarrollo 131, 1651-1662 (2004).

40 **[0070]** Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos descritos en McLean y col., Stem Cells 25, 29 - 38 (2007).

[0071] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos descritos en D'Amour y col., Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006).

50 **[0072]** Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en medio que contiene activina A en ausencia de suero, a continuación, el cultivo de las células con activina A y suero, y luego cultivar las células con activina A y suero de una concentración diferente. Un ejemplo de este método se describe en Nature Biotechnology 23, 1534-1541 (2005).

55 **[0073]** Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en medio que contiene activina A en ausencia de suero, a continuación, el cultivo de las células con activina A con suero de otra concentración. Un ejemplo de este método se describe en D' Amour y col., Nature Biotechnology, 2005.

60 **[0074]** Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en medio que contiene activina A y un ligando de Wnt en ausencia de suero, luego se elimina el ligando de Wnt y se cultivan las células con activina A con suero. Un ejemplo de este método se describe en Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

65 **[0075]** Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes según los

métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/736.908, asignada a LifeScan, Inc.

[0076] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo tratando las células madre pluripotenciales de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/779.311, asignada a LifeScan, Inc.

[0077] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 60/990.529.

[0078] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 61/076.889.

[0079] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 61/076.900.

[0080] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 61/076.908.

[0081] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 61/076.915.

Diferenciación de células que expresan marcadores característicos del linaje definitivo de endodermo en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático

[0082] En una realización, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se diferencian en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que coexpresan PDX1, NKX6.1, pero no expresan CDX2 y NGN3, al cultivar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en un primer medio suplementado con FGF7, seguido del cultivo de las células en un segundo medio suplementado con FGF7, noggin (que es un factor capaz de inhibir la BMP), un agonista del receptor TGFβ seleccionado del grupo que consiste en activina B, TGF-β-I, TGF-β-II, GDF-8 y GDF-11, ácido retinoico y ciclopamina-KAAD (que es un inhibidor de la ruta de señalización de hedgehog).

[0083] En una realización, FGF7 puede usarse a una concentración de aproximadamente 50 pg/ml a aproximadamente 50 µg/ml. En una realización, FGF7 se usa a una concentración de 50 ng/ml.

[0084] En una realización, el factor capaz de inhibir BMP es nuevo. Noggin puede usarse a una concentración de aproximadamente 500 ng/ml a aproximadamente 500 µg/ml. En una realización, se usa noggin a una concentración de 100 ng/ml.

[0085] En una realización, el agonista del receptor TGFβ se selecciona del grupo que consiste de activina A, activina B, TGFβ-I, TGFβ-II, GDF-8, y GDF-11.

[0086] La activina A puede usarse a una concentración de aproximadamente 2 ng/ml a 100 ng/ml. En una realización, la activina A se usa a una concentración de 20 ng/ml. En una realización alternativa, la activina A se usa a una concentración de 50 ng/ml.

[0087] La activina B puede usarse a una concentración de aproximadamente 2 ng/ml a 100 ng/ml. En una realización, la activina B se usa a una concentración de 20 ng/ml. En una realización alternativa, la activina B se usa a una concentración de 50 ng/ml.

[0088] El TGFβ-I se puede usar a una concentración de aproximadamente 2 ng/ml a 100 ng/ml. En una realización, se usa TGFβ-I a una concentración de 20 ng/ml. En una realización alternativa, se usa TGFβ-I a una concentración de 50 ng/ml.

[0089] El TGFβ-II se puede usar a una concentración de aproximadamente 2 ng/ml a 100 ng/ml. En una realización, se usa TGFβ-II a una concentración de 20 ng/ml. En una realización alternativa, se usa TGFβ-II a una concentración de 50 ng/ml.

[0090] El GDF-8 puede usarse a una concentración de aproximadamente 2 ng/ml a 100 ng/ml. En una realización, se usa GDF-8 a una concentración de 20 ng/ml. En una realización alternativa, se usa GDF-8 a una concentración de 50 ng/ml.

[0091] GDF-11 se puede usar a una concentración de aproximadamente 2 ng/ml a 100 ng/ml. En una realización, se usa GDF-11 a una concentración de 20 ng/ml. En una realización alternativa, se usa GDF-11 a una concentración de 50 ng/ml.

5 [0092] El ácido retinoico se puede usar a una concentración de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1 mM. En una realización, el ácido retinoico se utiliza a una concentración de 1 μ M.

[0093] En una realización, el inhibidor de la vía de señalización de hedgehog es ciclopamina-KAAD. Ciclopamina KAAD se puede usar a una concentración de aproximadamente 0,025 μ M a aproximadamente 2,5 μ M. En una
10 realización, ciclopamina-KAAD se utiliza a una concentración de 0,25 μ M.

[0094] La eficiencia de diferenciación puede determinarse al exponer una población de células tratadas a un agente (como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteína expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.

15 [0095] Los métodos para evaluar la expresión de marcadores de proteína y ácido nucleico en células cultivadas o aisladas son estándar en la técnica. Estos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR), transferencias Northern, hibridación *in situ* (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col., eds. 2001 supplement)) e inmunoensayos tales como análisis inmunohistoquímica de material seccionado, transferencia Western y marcadores accesibles en células intactas, análisis de citometría de flujo (FACS) (véase, por ejemplo, Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

20 [0096] Las características de las células madre pluripotentes son bien conocidas por los expertos en la técnica, y se siguen identificando características adicionales de las células madre pluripotentes. Los marcadores de células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, la expresión de uno o más de los siguientes: ABCG2, *crip-to*, FOXD3, CONNEXIN43, CONNEXIN45, OCT4, SOX2, Nanog, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, Tra 1-81.

25 [0097] Después de tratar células madre pluripotentes con los métodos de la presente invención, las células diferenciadas se pueden purificar mediante la exposición de una población celular tratada con un agente (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteína, tal como CXCR4, expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje definitivo del endodermo.

30 [0098] Adecuadas para uso en la presente descripción son las células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores característicos de células pluripotentes: ABCG2, *cripto*, CD9, Foxd3, CONNEXIN43, CONNEXIN45, Oct4, Sox2, Nanog, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60 y Tra 1-81.

35 [0099] Los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se seleccionan del grupo que consiste en SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox del tipo mezcla, FGF4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 y OTX2. Adecuada para uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una célula precursora de rayas primitiva. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje definitivo del endodermo es una célula mesendodérmica. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje definitivo del endodermo es una célula endodérmica determinante.

40 [0100] Los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se seleccionan del grupo que consiste en PDX1, HNF1 beta, PTF1 alfa, HNF6, HB9 y PROX1. Adecuada para el uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático es una célula de endodermo pancreático.

55 **Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático**

[0101] En una realización, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que coexpresan PDX1, NKX6.1, pero que no expresan CDX2 y NGN3, producidas por los métodos de la presente invención pueden diferenciarse adicionalmente en células que expresan marcadores característicos de la línea endocrina pancreática.

60 [0102] Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático mediante cualquier método en la técnica o mediante cualquier método propuesto en esta invención.

65 [0103] Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que

expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el cultivo de las células marcadoras de expresión características del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene exendina 4, luego eliminación del medio que contiene exendina 4 y posterior cultivo de las células en un medio que contiene exendina 1, IGF-1 y HGF. Un ejemplo de este método se describe en D'Amour y col., Nature Biotechnology, 2006.

[0104] Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el cultivo de las células marcadoras de expresión características del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene DAPT (Sigma-Aldrich, MO) y exendina 4. Un ejemplo de este método se describe en D'Amour y col., Nature Biotechnology, 2006.

[0105] Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el cultivo de las células marcadoras de expresión características del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene exendina 4. Un ejemplo de este método se describe en D'Amour y col., Nature Biotechnology, 2006.

[0106] Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el tratamiento de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la vía de señalización de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/736.908, asignada a LifeScan, Inc.

[0107] Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el tratamiento de las células expresión de marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la vía de señalización de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/779.311, asignada a LifeScan, Inc.

[0108] Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático del endodermo con un factor que inhibe la vía de señalización de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° de Ser. 60/953.178, asignada a LifeScan, Inc.

[0109] Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenido de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el tratamiento de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la vía de señalización de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 60/990,529, asignada a LifeScan, Inc.

[0110] Los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo que consiste en NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4 y PTF-1 alfa. En una realización, una célula endocrina pancreática es capaz de expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático. Adecuada para el uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endocrino pancreático es una célula endocrina pancreática. La célula endocrina pancreática puede ser una célula que expresa una hormona pancreática. Alternativamente, la célula endocrina pancreática puede ser una célula secretora de la hormona pancreática.

[0111] En un aspecto de la presente invención, la célula endocrina pancreática es una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células β . Una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células β expresa PDX1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN3, NKX2.2, NKX6.1, NEUROD, ISL1, HNF3 beta, MAFA, PAX4 y PAX6. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células β es una β celular.

60 Terapias

[0112] También se describe un método para tratar a un paciente que padece o está en riesgo de desarrollar diabetes tipo 1, El método puede implicar el cultivo de células madre pluripotentes, la diferenciación de las células madre pluripotentes *in vitro* en un linaje de células β , y el implante de las células de un linaje de células β en un paciente. Alternativamente, el método implica cultivar células madre pluripotentes, diferenciando las células madre pluripotentes *in vitro* en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que

coexpresan PDX1, NKX6.1, pero que no expresan CDX2 y NGN3, y que implantan las células del enlace del endodermo pancreático que coexpresa PDX1, NKX6.1, pero no expresa CDX2 y NGN3 en un paciente.

5 **[0113]** También se divulga un método para tratar a un paciente que padece o está en riesgo de desarrollar diabetes tipo 2. El método puede implicar el cultivo de células madre pluripotentes, la diferenciación de las células madre pluripotentes *in vitro* en un linaje de células β , y el implante de las células de un linaje de células β en un paciente. Alternativamente, el método implica cultivar células madre pluripotentes, diferenciando las células madre pluripotentes *in vitro* en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que coexpresan PDX1, NKX6.1, pero que no expresan CDX2 y NGN3, y que implantan las células del enlace del endodermo pancreático que coexpresa PDX1, NKX6.1, pero no expresa CDX2 y NGN3 en un paciente.

10 **[0114]** Si es apropiado, el paciente puede tratarse adicionalmente con agentes farmacéuticos o bioactivos que facilitan la supervivencia y la función de las células trasplantadas. Estos agentes pueden incluir, por ejemplo, insulina, miembros de la familia TGF- β , que incluyen TGF- β 1, 2 y 3, proteínas morfogenéticas óseas (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 y -13), factores de crecimiento de fibroblastos-1 y -2, factor de crecimiento derivado de plaquetas-AA y -BB, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-I, II) factor de diferenciación del crecimiento (GDF-5, -6, -7, -8, -10, -15), factor de crecimiento derivado de las células endoteliales vasculares (VEGF), pleiotrofina, endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, glucagón como el péptido I (GLP-1) y II, GLP-1 y 2 mimeticuerpo, Exendina-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, inhibidores de MAPK, tales como, por ejemplo, compuestos divulgados en la Solicitud publicada en los Estados Unidos 2004/0209901 y en la Solicitud publicada de EE.UU. 2004/0132729.

15 **[0115]** Las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en una célula productora de insulina antes del trasplante en un receptor. En una realización específica, las células madre pluripotentes se diferencian completamente en células β , antes del trasplante en un receptor. Alternativamente, las células madre pluripotenciales pueden trasplantarse a un receptor en un estado indiferenciado o parcialmente diferenciado. Una mayor diferenciación puede tener lugar en el receptor.

20 **[0116]** Las células endodérmicas definitivas o, alternativamente, las células endodérmicas pancreáticas, o, alternativamente, células β , pueden ser implantadas como células dispersadas o formadas en grupos que se pueden infundir en la vena portal hepática. Alternativamente, las células pueden proporcionarse en soportes poliméricos degradables biocompatibles, dispositivos porosos no degradables o encapsulados para protección de la respuesta inmune del huésped. Las células se pueden implantar en un sitio apropiado en un receptor. Los sitios de implantación incluyen, por ejemplo, hígado, páncreas natural, espacio subcapsular renal, epiplón, peroneo, espacio subseroso, intestino, estómago o bolsa subcutánea.

25 **[0117]** Para mejorar aún más la diferenciación, la supervivencia o la actividad de las células implantadas, los factores adicionales, tales como factores de crecimiento, antioxidantes o agentes anti-inflamatorios, se puede administrar antes de, simultáneamente con, o después de la administración de las células. En ciertas realizaciones, los factores de crecimiento se utilizan para diferenciar las células administradas *in vivo*. Estos factores pueden ser secretados por células endógenas y expuestas a las células administradas *in situ*. Las células implantadas se pueden inducir para diferenciar por cualquier combinación de factores de crecimiento administrados endógenamente y exógenamente conocidos en la técnica.

30 **[0118]** La cantidad de células utilizadas en la implantación depende de una serie de diversos factores que incluyen el estado del paciente y la respuesta a la terapia, y puede ser determinada por un experto en la técnica.

35 **[0119]** También se describe un método para tratar a un paciente que padece diabetes o está en riesgo de desarrollarlo. Este método implica el cultivo de células madre pluripotentes, que diferencian las células cultivadas *in vitro* en un linaje de células β , y la incorporación de las células en un soporte tridimensional. Las células se pueden mantener *in vitro* en este soporte antes de la implantación en el paciente. Alternativamente, el soporte que contiene las células se puede implantar directamente en el paciente sin cultivo adicional *in vitro*. El soporte puede incorporarse opcionalmente con al menos un agente farmacéutico que facilite la supervivencia y la función de las células trasplantadas.

40 **[0120]** Los materiales de soporte adecuados para uso para los fines de la presente invención incluyen plantillas de tejido, conductos, barreras y depósitos útiles para la reparación de tejidos. En particular, materiales sintéticos y naturales en forma de espumas, esponjas, geles, hidrogeles, textiles y estructuras no tejidas, que se han utilizado *in vitro* e *in vivo* para reconstruir o regenerar tejido biológico, así como para administrar agentes quimiotácticos para inducir el crecimiento tisular, son adecuados para su uso en la práctica de los métodos de la presente invención. Véanse, por ejemplo, los materiales descritos en la Patente de EE.UU. 5.770.417, Patente de EE.UU. 6.022.743, Patente de EE.UU. 5.567.612, Patente de EE.UU. 5.759.830, Patente de EE.UU. 6.626.950, Patente de EE.UU. 6.534.084, Patente de EE.UU. 6.306.424, Patente de EE.UU. 6.365.000, Patente de EE.UU. 6.599.323. Patente 6.656.488, solicitud publicada de los EE.UU. 2004/0062753 A1, patente de EE.UU. 4.557.264 y patente de EE.UU. 6.333.029.

[0121] Para formar un soporte incorporado con un agente farmacéutico, el agente farmacéutico se puede mezclar con la solución de polímero antes de formar el soporte. Alternativamente, un agente farmacéutico podría revestirse sobre un soporte fabricado, preferiblemente en presencia de un vehículo farmacéutico. El agente farmacéutico puede estar presente como un líquido, un sólido finamente dividido o cualquier otra forma física apropiada. Alternativamente, se pueden agregar excipientes al soporte para alterar la velocidad de liberación del agente farmacéutico. En una realización alternativa, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto antiinflamatorio, tal como, por ejemplo, compuestos descritos en la patente de EE.UU. 6.509.369.

[0122] El soporte se puede incorporar con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto anti-apoptótico, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en la patente US 6.793.945.

[0123] El soporte también se pueden incorporar con al menos un compuesto farmacéutico que es un inhibidor de fibrosis, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en la patente US 6.331.298.

[0124] El soporte también se puede incorporar con al menos un compuesto farmacéutico que es capaz de aumentar la angiogénesis, tal como, por ejemplo, compuestos descritos en la solicitud publicada de EE.UU. 2004/0220393 y la solicitud publicada 2004/0209901.

[0125] El soporte también se puede incorporar con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto de inmunosupresores, tales como, por ejemplo, compuestos descritos en la solicitud publicada de EE.UU. 2004/0171623.

[0126] El soporte también se puede incorporar con al menos un compuesto farmacéutico que es un factor de crecimiento, tal como, por ejemplo, miembros de la familia de TGF- β , incluyendo TGF- β 1, 2, y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 y -13), factores de crecimiento de fibroblastos-1 y -2, factor de crecimiento derivado de plaquetas-AA, y -BB, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento del factor de crecimiento de la insulina (IGF-I, II) factor de diferenciación (GDF-5, -6, -8, -10, -15), factor de crecimiento derivado de las células endoteliales vasculares (VEGF), pleiotrofina, endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, factor 1-alfa inducible por hipoxia, péptido-1 similar a glucagón (GLP-1), mimeticuerpo GLP-1 y GLP-2, y II, Exendina-4, nodal, noggin, NGF, ácido retinoico, hormona paratiroidea, tenascina-C, tropoelastina, péptidos derivados de la trombina, catelicidinas, defensinas, laminina, péptidos biológicos que contienen proteínas que se unen a células y heparinas de proteínas de la matriz extracelular adhesiva, como la fibronectina y la vitronectina, Inhibidores de MAPK, tales como, por ejemplo, los compuestos descritos en la solicitud publicada de EE.UU. 2004/0209901 y la solicitud publicada de EE.UU. 2004/0132729.

[0127] La incorporación de las células de la presente invención en un armazón se puede lograr mediante el simple depósito de células en el armazón. Las células pueden entrar en el andamio por difusión simple (J. Pediatr. Surg. 23 (1 Pt 2): 3-9 (1988)). Varios otros enfoques se han desarrollado para mejorar la eficacia de la siembra celular. Por ejemplo, los matraces giratorios se han usado en la siembra de condrocitos sobre andamios de ácido poliglicólico (Biotechnol. Prog. 14 (2): 193-202 (1998)). Otro enfoque para sembrar células es el uso de centrifugación, que produce un estrés mínimo para las células sembradas y mejora la eficacia de la siembra. Por ejemplo, Yang y col. desarrolló un método de siembra celular (J. Biomed. Mater. Res. 55 (3): 379-86 (2001)), denominado Inmovilización Centrifugacional de Células (CCI).

[0128] La presente invención se ilustra adicionalmente, pero no se limita por, los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo de referencia 1

Diferenciación de células madre pluripotentes humanas en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que coexpresan PDX1, NKX6.1, pero no expresan CDX2 y NGN3

[0129] Este ejemplo demuestra que la activina A puede usarse en combinación con Noggin y ácido retinoico para facilitar la regulación positiva de la expresión de NKX6.1. Brevemente, las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 se cultivaron en placas recubiertas MATRIGEL™ (dilución 1:30) y medio RPMI suplementado con 2% de BSA, 100 ng/ml de activina A, 20 ng/ml de WNT-3a, 8 ng/ml de bFGF durante un día, seguido de tratamiento con medio RPMI suplementado con 2% de BSA, 100 ng/ml de activina A, 8 ng/ml de bFGF durante dos días adicionales (Etapa 1), luego

a. DMEM/F12 + BSA al 2% + 50 ng/ml FGF7 durante tres días (Etapa 2), luego

b. DMEM-glucosa alta + B27 al 1% + 50 ng/ml FGF7 + 0,25 μ M Ciclopamina-KAAD + 2 μ M Ácido retinoico (AR) + 100 ng/ml de Noggin + 20 ng/ml de activina A, o 50 ng/ml de activina A por cuatro días (Etapa 3).

[0130] Como control, las poblaciones de células separadas se trataron con DMEM Alta glucosa, suplementada con

1% de B27, 50 ng/ml de FGF7, 0,25 μ M de ciclopamina-KAAD, 2 μ M de ácido retinoico (RA) y 100 ng/ml de Noggin.

[0131] Los cultivos se muestrearon por duplicado en la etapa 3 del día 4, y se analizaron para la expresión de marcadores pancreáticos usando PCR en tiempo real.

[0132] Como se muestra en la Figura 1, hubo un aumento dramático de la expresión de NKX6.1 en la etapa 3 día 4, en comparación con las muestras obtenidas de células que no recibieron activina A. El aumento en la expresión de NKX6.1, mediado por activina A, aumentada en proporción a la dosis de activina A. También se observó una regulación a la baja de la expresión de NGN3 en las células en la etapa 3 día 4. Para determinar si la ruta TGF-beta estaba involucrada en facilitar la formación de células endodérmicas pancreáticas que coexpresaban PDX1 y NKX-6,1, las células fueron tratadas del siguiente modo:

[0133] Las células de la línea H1 de células madre embrionarias humanas se cultivaron en placas recubiertas de matrigel (dilución 1:30), y se diferenciaron en células precursoras endocrinas utilizando el siguiente protocolo de páncreas:

a. Medio RPMI (Catálogo n° 22400, Invitrogen, Ca) suplementado con 2% de BSA (Catálogo n° 152401, MP Biomedical, Ohio), y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) más 20 ng/ml WNT-3a (Catálogo N° 1324-WN-002, R&D Systems, MN) más 8 ng/ml de bFGF (Catálogo n° 100-18B, PeproTech, NJ), durante un día seguido de tratamiento con medio RPMI suplementado con BSA al 2% y 100 ng/ml activina A plus 8 ng/ml de bFGF por dos días adicionales (Etapa 1), luego

b. DMEM/F12 (Catálogo n° 1 1330, Invitrogen, Ca) + 2% de BSA + 50 ng/ml de FGF7 durante tres días (Etapa 2), luego

c. Tratamiento 1: DMEM (alto contenido de glucosa) + B27 al 1% (*In vitro*, CA) + 50 ng/ml FGF7, 0,25 μ M Ciclopamina-KAAD, 2 μ M ácido retinoico (RA) y 100 ng/ml de Noggin durante cuatro días (Etapa 3), o

d. Tratamiento 2: DMEM (alto contenido de glucosa) + B27 al 1% (*In vitro*, CA) + 50 ng/ml FGF7, 0,25 μ M Ciclopamina-KAAD, 2 μ M ácido retinoico (RA), 100 ng/ml de Noggin, 20 ng/ml de activina A durante cuatro días (Etapa 3), o

e. Tratamiento 3: DMEM (alto contenido de glucosa) + B27 al 1% (*In vitro*, CA) + 50 ng/ml FGF7, 0,25 μ M Ciclopamina-KAAD, 2 μ M ácido retinoico (RA), 100 ng/ml de Noggin, 1 μ M inhibidor de μ M ALK5 II (Alexis Biochemical) durante cuatro días (Etapa 3).

[0134] Los cultivos se muestrearon por duplicado en la etapa 3 día 4, y se analizaron para la expresión de marcadores pancreáticos usando PCR en tiempo real. Los cultivos también se fijaron en paralelo para el análisis de inmunofluorescencia.

[0135] La Tabla 1 muestra los niveles de expresión relativos de NKX6.1, NGN3 y PDX1 en la etapa 3 día 4 cuando se normalizaron a la condición más mínima en este experimento (tratamiento 1).

Tabla 1

	NGN3	NKX6.1	PDX1
Tratamiento 1	1	1	1
Tratamiento 2	0,02	5,97	1,13
Tratamiento 3	5,64	0,02	0,65

[0136] El tratamiento 1 (FGF7, ácido retinoico y Noggin) indujo la expresión de NKX6.1 y NGN3. Véase Figura 2, paneles a y b. Sin embargo, la adición de activina A (Tratamiento 2) bloqueó la expresión de NGN3 y aumentó significativamente el número de células que expresan NKX6.1. Véase la Figura 2, paneles c y d. Estos datos sugieren que la activación de la vía de receptor TGF β durante la formación de una población de células que expresan marcadores característicos de los resultados de linaje endodérmico pancreático en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que no expresan NGN3.

[0137] La incubación de células con el TGF β inhibidor del receptor Alk5 inhibidor II confirmó esta hipótesis (véase Tratamiento 3). Tratamiento de células en DMEM (glucosa alta) suplementado con B27 al 1% (Invitrogen, CA), 50 ng/ml FGF7, 0,25 μ M de ciclopamina-KAAD, 2 μ M de ácido retinoico (RA), 100 ng/ml de Noggin, 1 μ M de inhibidor de ALK5 II dieron como resultado una disminución en el nivel de expresión de NKX6.1. El nivel de expresión observado fue menor que el observado en las células que recibieron el tratamiento 1. Véase Tabla 1, y Figura 2, panel e. Por otro lado, el número de células que expresan NGN3 aumentó significativamente. Véase la Tabla 1, y la

Figura 2, panel f. No se observó un impacto significativo en la expresión de PDX1. Estos resultados sugieren que la combinación de Noggin, ácido retinoico y activina A actúa de forma sinérgica para especificar una población de células precursoras de páncreas que sean positivas para la expresión de NKN6.1 y PDX1, pero negativas para la expresión de NGN3.

[0138] Como se muestra en la Figura 3, paneles a y b, la mayoría de las células que expresan PDX1 generados mediante el uso de DMEM (Tratamiento 2 -DMEM (alta glucosa) + B27 al 1% (Invitrogen, CA) + 50 ng/ml FGF7, 0,25 μ M Ciclopamina-KAAD, 2 μ M de ácido retinoico M (RA), 100 ng/ml de Noggin, 20 ng/ml de activina A) no expresaron CDX2 en la etapa 3 día 4. Esto está en contraste con las células que expresan PDX1 generadas al usar DMEM/F12 suplementado con 1% de B27 (Invitrogen, CA) + 50 ng/ml de FGF7, 0,25 μ M de ciclopamina-KAAD, 2 μ M de ácido retinoico (RA), 100 ng/ml de Noggin, 20 ng/ml de activina A, en donde la mayoría Las células que expresan PDX1 también expresaron CDX2. Véase la Figura 3, paneles c y d.

[0139] Se analizaron varios agonistas del receptor de TGF β . La sustitución de activina A en el tratamiento 2 con GDF-8, GDF-11, activina B o TGF β 2 produjo todos resultados similares: tratamiento de GDF-8, GDF-11, activina B o TGF β 2 durante cuatro días dio como resultado un aumento en la expresión de NKX6.1 y una regulación negativa de NGN3. Véase la Figura 4, paneles a y c. No se observó un impacto significativo en la expresión de PDX1. Véase la Figura 4, panel b.

Ejemplo de referencia 2

Diferenciación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que coexpresan PDX1, NKX6.1, pero no expresan CDX2 y NGN3 en células precursoras endocrinas pancreáticas

[0140] Estudios previos demostraron que las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático tienen más probabilidades de producir células que expresan glucagón que las células que expresan insulina, cuando se someten a una diferenciación adicional. Esto puede deberse, en parte, a la expresión de NGN3 en las células endodérmicas pancreáticas. Los métodos de la presente invención producen una población de células endodérmicas pancreáticas que no expresan NGN3 y, por lo tanto, sería más probable que se diferenciaran en células que expresan insulina. Sin embargo, se requiere la expresión de NGN3 para formar células endocrinas pancreáticas, o células precursoras de endocrinas pancreáticas (células que pueden formar, por ejemplo, glucagón o células que expresan insulina). Por lo tanto, la regulación temporal de NGN3 es importante para guiar el destino final de las células precursoras endocrinas pancreáticas.

[0141] La presente invención hipotetiza que la expresión de NGN3 debe mantenerse a un nivel mínimo hasta que se inicie la diferenciación del endodermo pancreático hacia las células precursoras endocrinas pancreáticas.

[0142] Brevemente, las células de la línea de células madre embrionarias humana HI fueron cultivadas en placas recubiertas de MATRIGEL™ (dilución 1:30) con RPMI medio + BSA al 2% + 100 ng/ml de activina A + 20 ng/ml de WNT-3a + 8 ng/ml de bFGF durante un día seguido de tratamiento con medio RPMI + 2% de BSA + 100 ng/ml de activina A + 8 ng/ml de bFGF durante dos días más (Etapa 1), luego

a. DMEM/F12 + BSA al 2% + 50 ng/ml FGF7 durante tres días (Etapa 2), luego

b. DMEM-glucosa alta + B27 al 1% + 50 ng/ml FGF7 + 0,25 μ M Ciclopamina-KAAD + 2 μ M Ácido retinoico (AR) + 100 ng/ml de Noggin + 20 ng/ml de Activina A durante cuatro días (Etapa 3), luego

c. DMEM-glucosa alta + 1% de B27 + 100 ng/ml de noggin + 1 μ M de inhibidor de ALK5 II durante tres días (etapa 4), o

d. DMEM-glucosa alta + B27 al 1% solo durante tres días (etapa 4).

[0143] El protocolo de diferenciación anteriormente se diseñó para ensayar la capacidad de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que coexpresan PDX1 y NKX6.1, pero no expresan CDX2 y NGN3 para diferenciar aún más en células precursoras endocrinas pancreáticas. Las células precursoras del sistema endocrino pancreático expresan NGN3.

[0144] Mediante el simple cultivo las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que coexpresan PDX1 y NKX6.1, pero que no expresan CDX2 y NGN3 en medio basal (DMEM-glucosa alta + B27 al 1%) no dio como resultado la inducción de la expresión de NGN3. Véase la Figura 5, panel a, barras gris claro. Del mismo modo, no se observó la expresión de NEUROD, NKX2.2 y PAX6.

[0145] Por el contrario, en las células incubadas en presencia de Alk5 inhibidor II, se observó un aumento significativo en la expresión de NGN3. Véase la Figura 5, panel a, barras gris oscuro. También se observó la regulación al alza en la expresión de NEUROD, NKX2.2, PAX4 y PAX6, así como un aumento en la expresión de PTF1 alfa. Véase la Figura 5, paneles a y b. La presencia de Alk5 inhibidor II no pareció afectar la expresión de

PDX1 o NKX6.1. Véase la Figura 5, panel b.

[0146] El aumento de la expresión NGN3, como se detecta por PCR, en presencia de Alk5 inhibidor II también quedó reflejado en un aumento en el número de células que eran positivas para la presencia de proteína NGN3, como se detecta por inmunocitoquímica. Véase la Figura 6. El análisis de las imágenes reveló que la mayoría de las células de expresión NGN3 también coexpresan PDX1, pero no NKX6.1. Además, la mayoría de las células NKX6.1 coexpresan PDX1. En esta etapa, el nivel de expresión de las células endocrinas, como lo demuestra la expresión del ejemplo, insulina y glucagón, fueron mínimas. Nuestros resultados sugieren que la activación de la ruta de TGF-beta facilitará la formación de una población de células que coexpresan PDX1 y NKX6.1, y la posterior inhibición de la vía de TGF-beta inducirá aún más la diferenciación del endodermo en células precursoras endocrinas.

Ejemplo de referencia 3

Diferenciación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que coexpresa PDX1, NKX6.1, pero no expresa CDX2 y NGN3 en células endocrinas pancreáticas

[0147] Este ejemplo fue diseñado para ensayar la capacidad de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que coexpresan PDX1 y NKX6.1, pero no expresan CDX2 y NGN3 para diferenciar aún más en células endocrinas pancreáticas, de las células precursoras endocrinas pancreáticas.

[0148] Brevemente, las células de la línea HI de células madre embrionarias humanas se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución 1:30) con medio RPMI + BSA al 2% + 100 ng/ml de activina A + 20 ng/ml de WnT-3a + 8 ng/ml de bFGF durante un día seguido de tratamiento con medio RPMI + BSA al 2% + 100 ng/ml de activina A + 8 ng/ml de bFGF durante dos días más (Etapa 1), luego

- a. DMEM/F12 + BSA al 2% + 50 ng/ml de FGF7 durante tres días (Etapa 2), luego
- b. DMEM-glucosa alta + B27 al 1% + 50 ng/ml FGF7 + 0,25 µM Ciclopamina-KAAD + 2 µM Ácido retinoico (AR) + 100 ng/ml de Noggin + 20 ng/ml de Activina A durante cuatro días (Etapa 3), o
- c. DMEM-glucosa alta + B27 al 1% + 50 ng/ml FGF7 + 0,25 µM Ciclopamina-KAAD + 2 µM Ácido retinoico (AR) + 100 ng/ml de Noggin + 20 ng/ml de Activina A durante cuatro días (Etapa 3), entonces
- d. DMEM-glucosa alta + B27 al 1% + 100 ng/ml Noggin + 1 µM inhibidor ALK5 II durante tres días (Etapa 4)
- e. DMEM-glucosa alta + B27 al 1% + 100 ng/ml de noggin + 1 µM inhibidor ALK5 II + 20 ng/ml de beta-celulina durante cinco a siete días (Etapa 5).

[0149] La expresión de NGN3 y PAX4 disminuyó de sus niveles máximos en la etapa 4, día 3, alcanzando un menor nivel de expresión en la etapa 5, día 7. Durante este tiempo, aumentó la expresión de marcadores endocrinos, por ejemplo insulina y glucagón. Véase la Figura 7. Estos datos sugieren que las células de la presente invención fueron capaces de formar células endocrinas pancreáticas a partir de células precursoras de endocrinas.

[0150] Las células que expresan insulina sola o glucagón solo, o se observaron insulina y glucagón. Consulte la Figura 8 y la Tabla 2. Mediante el análisis de FACS de cultivos en la etapa 5, día 7 (Tabla 2), aproximadamente el 60% de los precursores del endodermo pancreático que expresan conjuntamente PDX1 y NKX6.1 se diferenciaron expresando el marcador pan-endocrino de sinaptofisina.

El porcentaje de células que expresan solo insulina fue del 10,4%, las células que expresan solo glucagón fue del 5,1%. Además, había un 20% de insulina y células coexpresoras de glucagón. Entre las células que expresaron insulina y ninguna otra hormona pancreática, el 60% coexpresó NKX6.1 (un marcador para células beta maduras). Estos datos sugieren que se formaron células que expresan insulina más maduras mediante los métodos de la presente invención.

Tabla 2

	Insulina
Insulina+	10,4%
Glucagón+	5,1%
Insulina+/Glucagón+	20%
Sinaptofisina +	60%
NKX6.1+	52%
NKX6.1 +/Insulina+	6%

Ejemplo de referencia 4

Implantación de las células de la presente invención en ratones beige (Bg) con inmunodeficiencia combinada severa inducida por STZ (SCID)

- 5 **[0151]** Las células de la línea HI de células madre embrionarias humanas se cultivaron en MATRIGEL® - placas recubiertas (dilución 1:30) con medio RPMI + 0,2% de FBS + 100 ng/ml de activina A + 20 ng/ml de WNT-3a durante un día seguido de tratamiento con medio RPMI + FBS al 0,5% + 100 ng/ml de activina A durante dos días adicionales (Etapa 1), luego,
- 10 a. DMEM/F12 + 2% de FBS + 50 ng/ml de FGF7 durante tres días (Etapa 2), luego
- b. DMEM-glucosa alta + B27 al 1% + 0,25 µM Ciclopamina-KAAD + 2 µM Ácido retinoico (AR) + 100 ng/ml de Noggin + 50 ng/ml FGF7 + 20 ng/ml de Activina A durante cuatro días (Etapa 3), entonces
- 15 c. DMEM-glucosa alta + 1% de B27 + 100 ng/ml de Noggin + 1 µM de inhibidor de ALK5 II durante cuatro días (Etapa 4).
- [0152]** Ratones SCID beige macho de cinco a seis semanas de edad (C.B-*Igh-Ib/GbmsTac-Prkdc^{scid}-Lyst^{bg}* N7) fueron adquiridos de Taconic Farms. Los ratones se alojaron en jaulas microaislantes con libre acceso a alimentos y agua esterilizados. En preparación para la cirugía, los ratones se identificaron mediante el etiquetado de las orejas y se midió su peso corporal y sus niveles de glucosa en sangre determinados por un glucómetro de mano (One Touch, LifeScan).
- 20 **[0153]** Dos semanas antes del trasplante, los ratones se pesaron y se dosificaron con 80 mg/kg de estreptozotocina (Sigma) disueltos en tampón de acetato con un pH de 4,5 en cada uno de cinco días consecutivos para inducir la diabetes. La glucemia se controló y solo los ratones con glucosa en sangre >300 mg/dL se utilizaron como receptores de trasplante.
- 25 **[0154]** Los ratones se anestesiaron con una mezcla de isoflurano y oxígeno y el sitio quirúrgico se rajó con cortapelos de animales pequeños. Los ratones se dosificaron con 0,1 mg.kg de Buprenex por vía subcutánea antes de la operación. El sitio quirúrgico se preparó con lavados sucesivos de 70% de alcohol isopropílico y 10% de povidona-yoduro.
- 30 **[0155]** Las células en el final de la etapa cuatro se trataron brevemente con 1 mg/ml de dispasa durante cinco minutos y se puntuaron mecánicamente usando una pipeta de vidrio de 1 mL y posteriormente se transfirieron a placas no adherentes para cultivo durante la noche. Durante la preparación preoperatoria de los ratones, las células se centrifugaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se eliminó la mayor parte del sobrenadante, dejando solo lo suficiente para recoger el sedimento de las células. Las células se recogieron en una pipeta de desplazamiento positivo Rainin Pos-D y la pipeta se invirtió para permitir que las células sedimentaran por gravedad. El exceso de medio se dispensó dejando una preparación de células empaquetadas para el trasplante.
- 35 **[0156]** Para el trasplante, se usó un catéter endovenoso 24G x 3/4" para penetrar en la cápsula renal y se retiró la aguja. El catéter se avanzó debajo de la cápsula renal hasta el polo distal del riñón. La punta de la pipeta Pos-D se colocó firmemente en el centro del catéter y los 5 millones de células dispensadas desde la pipeta a través del catéter debajo de la cápsula renal y se entregó al polo distal del riñón. La cápsula del riñón se selló con un cauterio de baja temperatura y el riñón recuperó su posición anatómica original. En paralelo, se cargaron agregados celulares que contenían 5 millones de células en el dispositivo de 50 µl usando una punta de pipeta Post-D. Los dispositivos de 50 µl se compraron de TheraCyte, Inc (Irvine, CA) El dispositivo se selló con adhesivo médico de silicona tipo A (Dow Corning, nº de catálogo 129109) después de la carga, y se implantó por vía subcutánea en ratones SCID/Bg (animales Nos.3 y 4). El músculo se cerró con suturas continuas utilizando 5-0 vicryl y la piel cerrada con clips para heridas. Los ratones se dosificaron con 1,0 mg.kg de Metacam por vía subcutánea después de la operación. El ratón se retiró de la anestesia y se dejó recuperar por completo.
- 45 **[0157]** Después del trasplante, los ratones se pesaron una vez por semana y la glucosa en sangre se midió dos veces por semana. A diversos intervalos después del trasplante, se extrajo sangre a través del seno retroorbital en tubos de microcentrífuga que contienen una pequeña cantidad de heparina. La sangre se centrifugó y el plasma se colocó en un segundo tubo de microcentrífuga y se congeló en hielo seco y luego se almacenó a -80°C hasta que se realizó el ensayo de péptido c humano. Los niveles de péptido c humano se determinaron utilizando el ELISA ultrasensible con péptido C de Mercodia/ALPCO Diagnostics (Cat. 80-CPTHU-E01, Alpc Diagnostics, NH) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 50 **[0158]** El péptido C humano se detectó en suero de animales tan pronto como 4 semanas en el grupo de cápsula renal después del trasplante y aumentó con el tiempo (Figura 9, panel a). Al final de dos meses, se detectó una cantidad significativa de péptido C humano circulante, $1,1 \pm 0,5$ ng/ml (Figura 9, panel a). Hasta dos meses después del trasplante, sus niveles de glucosa en sangre no en ayunas son consistentemente superiores a 400 ng/dl. En este estudio, no se requirió la administración de Insulina. El aumento de los niveles séricos de Insulina derivada del
- 55 **[0157]** Después del trasplante, los ratones se pesaron una vez por semana y la glucosa en sangre se midió dos veces por semana. A diversos intervalos después del trasplante, se extrajo sangre a través del seno retroorbital en tubos de microcentrífuga que contienen una pequeña cantidad de heparina. La sangre se centrifugó y el plasma se colocó en un segundo tubo de microcentrífuga y se congeló en hielo seco y luego se almacenó a -80°C hasta que se realizó el ensayo de péptido c humano. Los niveles de péptido c humano se determinaron utilizando el ELISA ultrasensible con péptido C de Mercodia/ALPCO Diagnostics (Cat. 80-CPTHU-E01, Alpc Diagnostics, NH) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 60 **[0158]** El péptido C humano se detectó en suero de animales tan pronto como 4 semanas en el grupo de cápsula renal después del trasplante y aumentó con el tiempo (Figura 9, panel a). Al final de dos meses, se detectó una cantidad significativa de péptido C humano circulante, $1,1 \pm 0,5$ ng/ml (Figura 9, panel a). Hasta dos meses después del trasplante, sus niveles de glucosa en sangre no en ayunas son consistentemente superiores a 400 ng/dl. En este estudio, no se requirió la administración de Insulina. El aumento de los niveles séricos de Insulina derivada del
- 65

injerto, mayor que 1 ng/ml da como resultado una disminución gradual de la hiperglucemia. A los tres meses, se detectó una cantidad significativa de péptido C humano circulante en 90% de los animales diotéticos inducidos por STZ. El péptido C humano circulante medio fue de $2 \pm 0,96$ ng/ml (n=8) (Figura 9, panel a). Los niveles de glucosa en sangre del 90% de ratones diabéticos injertados con hES precursores endocrinos derivados de células estaban por debajo de 200 mg/dl y los niveles se mantuvieron. Después de extirpar quirúrgicamente el injerto, los niveles de glucosa en sangre aumentaron a niveles hiperglucémicos, poco después de la remoción del injerto, lo que sugirió que las células humanas injertadas eran las únicas responsables de mantener la normoglucemia en ratones tratados con STZ (Figura 9, panel b).

5
10 **[0159]** Este ejemplo demuestra que la población de células que coexpresan PDX1 y NKX6.1 y la población de células progenitoras endocrinas derivadas de la población de células que coexpresan PDX1 y NKX6.1 tienen la competencia para diferenciarse aún más en las células secretoras de Insulina *in vivo*.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para diferenciar una población de células madre pluripotentes en una población de células que expresan marcadores característicos de la línea del endodermo pancreático que coexpresan PDX-1, NKX-6,1, pero no expresan CDX-2, y NGN-3 que comprende los pasos de:
- 10 a) Cultivar las células madre pluripotentes,
 b) Diferenciar las células madre pluripotentes en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo, y
 c) Diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que coexpresan PDX1, NKX6.1, pero no expresan CDX2 y NGN3 tratando células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con un primer medio suplementado con FGF7, seguido de cultivo de las células en un segundo medio suplementado con FGF7, noggin, un agonista del receptor de TGF-β seleccionado del grupo formado por activina B, TGF-β-I, TGF-β-II, GDF-8 y GDF-11, ácido retinoico y ciclopamina-KAAD.
- 15 **2.** El método de la reivindicación 1, en donde se usa FGF7:
- 20 a) a una concentración de 50 pg/ml a 50 µg/ml; o
 b) a una concentración de 50 ng/ml.
- 3.** El método de la reivindicación 1, en el que se usa noggin:
- 25 a) a una concentración de 500 ng/ml a 500 µg/ml; o
 b) a una concentración de 100 ng/ml.
- 4.** El método de la reivindicación 1 o 3, en donde se usa el agonista receptor de TGF-β:
- 30 a) a una concentración de 2 ng/ml a 100 ng/ml;
 b) a una concentración de 20 ng/ml; o
 c) a una concentración de 50 ng/ml.
- 5.** El método de la reivindicación 1, en el que se usa ácido retinoico:
- 35 a) a una concentración de 1 nM a 1 mM; o
 b) a una concentración de 1 µM.
- 6.** El método de la reivindicación 1, en el que se usa ciclopamina-KAAD:
- 40 a) a una concentración de 0,025 µM a 2,5 µM; o
 b) a una concentración de 0,25 µM.
- 7.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.
- 45 **8.** El método de la reivindicación 7, en el que la célula endocrina pancreática es una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células β, tal como una célula β.
- 50 **9.** El método de la reivindicación 8, en el que una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células β expresa PDX1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN3, NKX2.2, NKX6.1, NEUROD, ISL1, HNF3 beta, MAFA, PAX4, y PAX6.
- 10.** Una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que coexpresan PDX-1, NKX-6,1, pero no expresan CDX-2 y NGN-3 obtenibles mediante los métodos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9. para uso en el tratamiento de la diabetes, como la diabetes tipo I o tipo II.
- 55 **11.** Una composición farmacéutica que comprende la población de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que coexpresan PDX-1, NKX-6,1, pero que no expresan CDX-2 y NGN-3 obtenibles mediante los métodos de cualquiera de las reivindicaciones 1 -9.
- 60 **12.** La composición farmacéutica según la reivindicación 11, en la que las células se proporcionan en soportes poliméricos degradables biocompatibles, dispositivos porosos no degradables o encapsulados para proteger de la respuesta inmune del huésped.
- 65

Figura 1

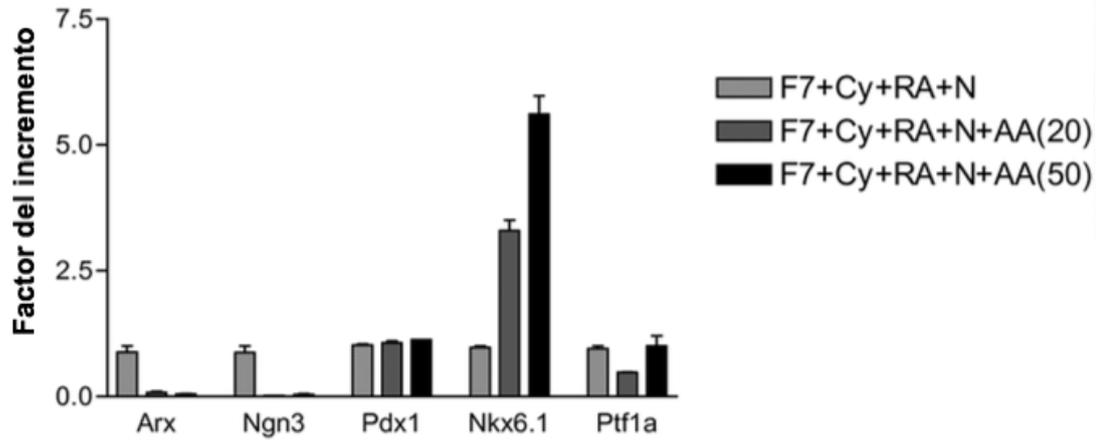


Figura 2

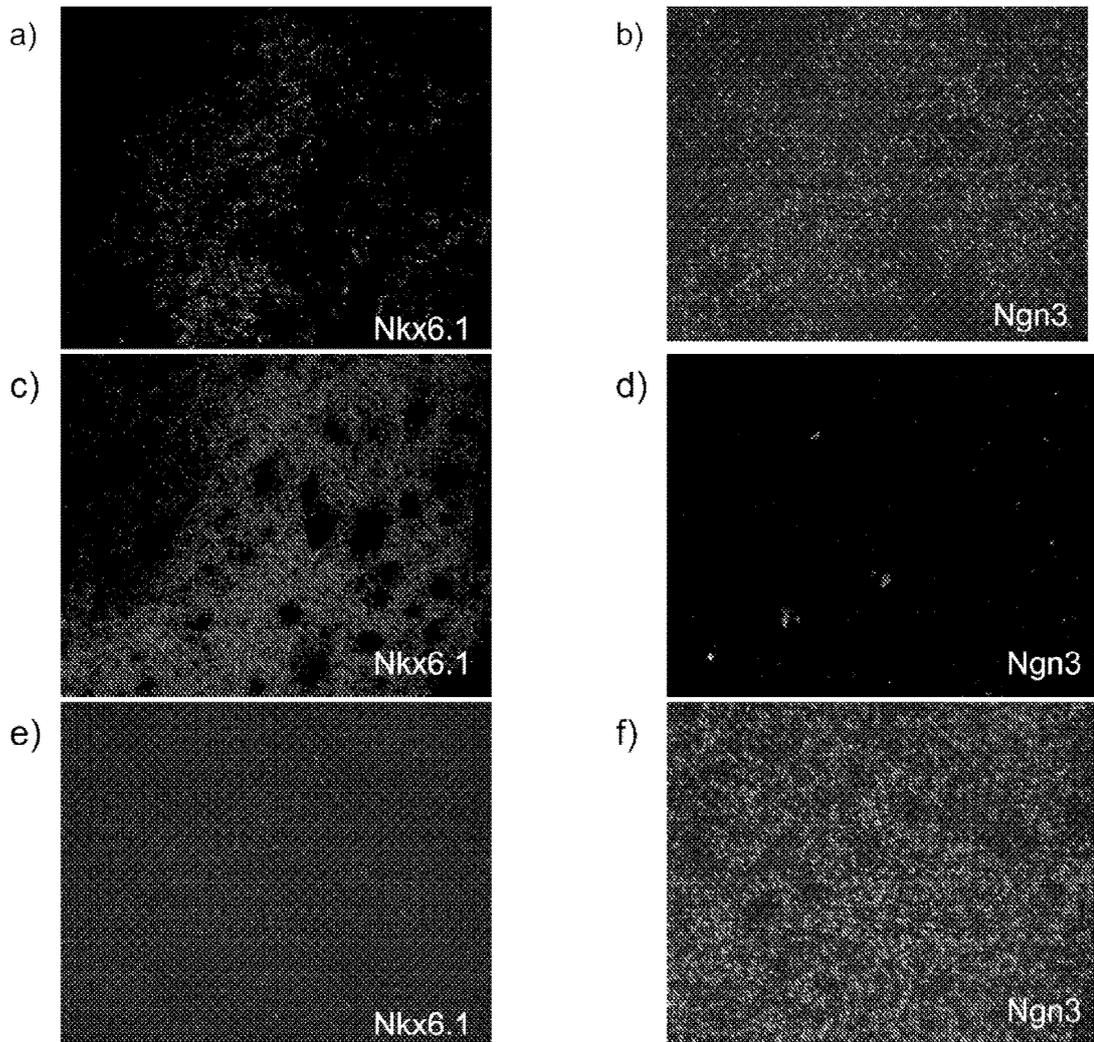


Figura 3

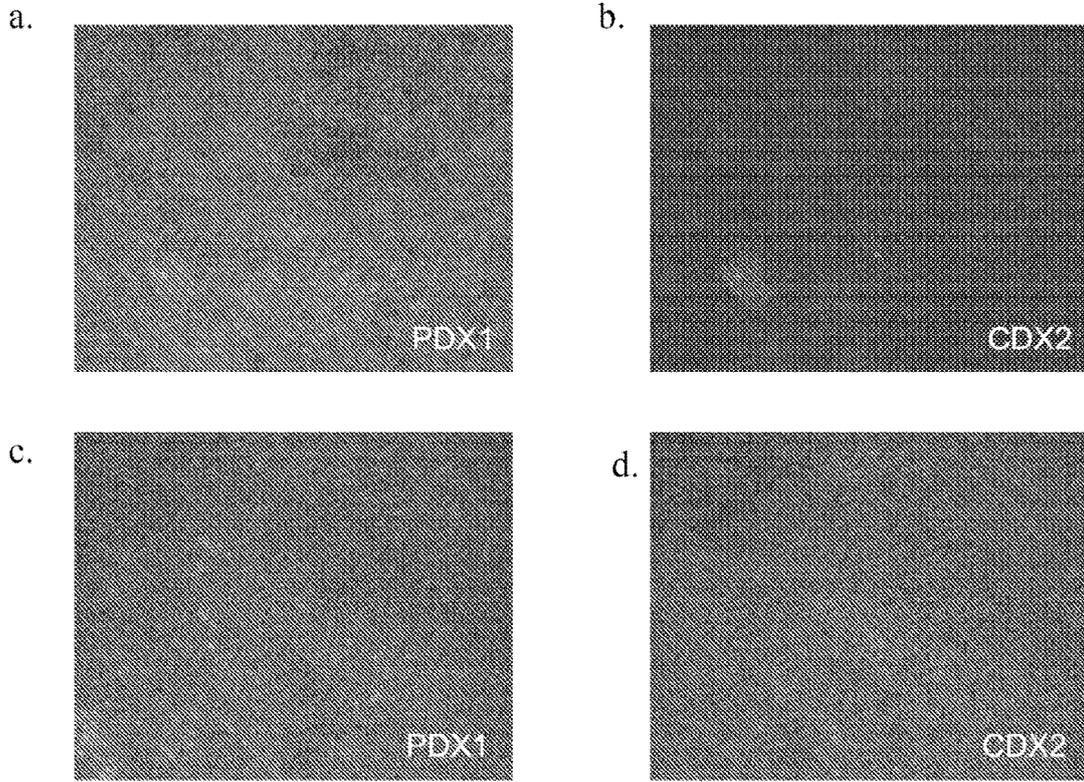


Figura 4

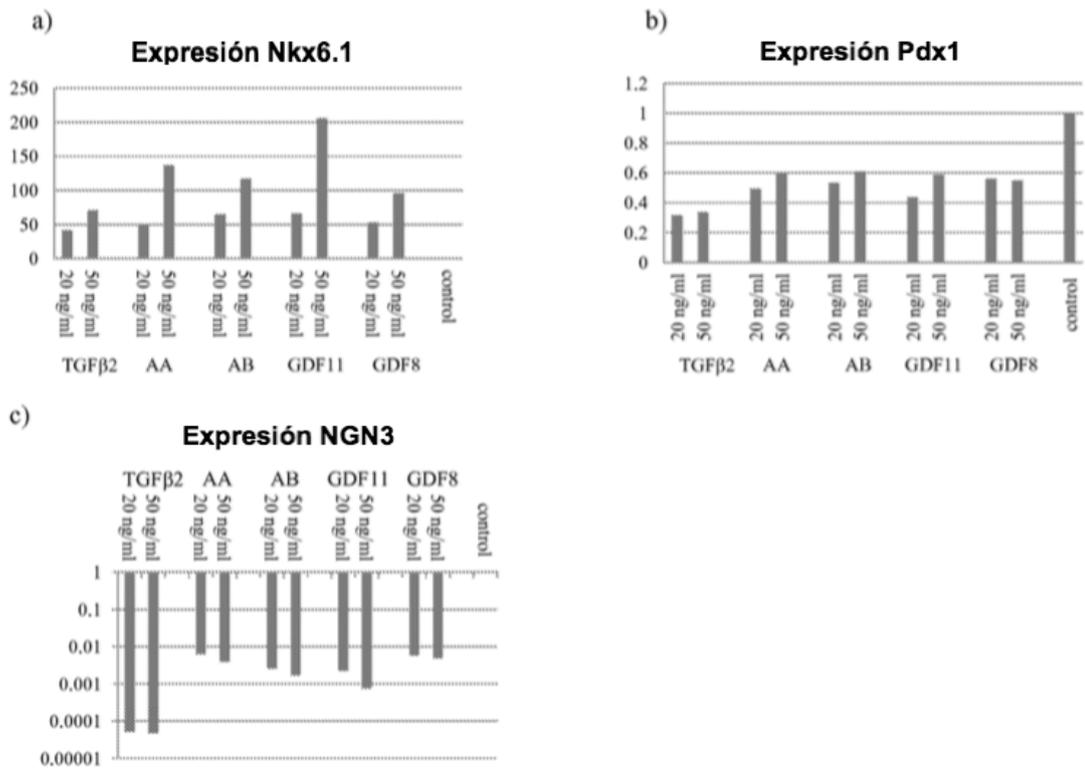


Figura 5

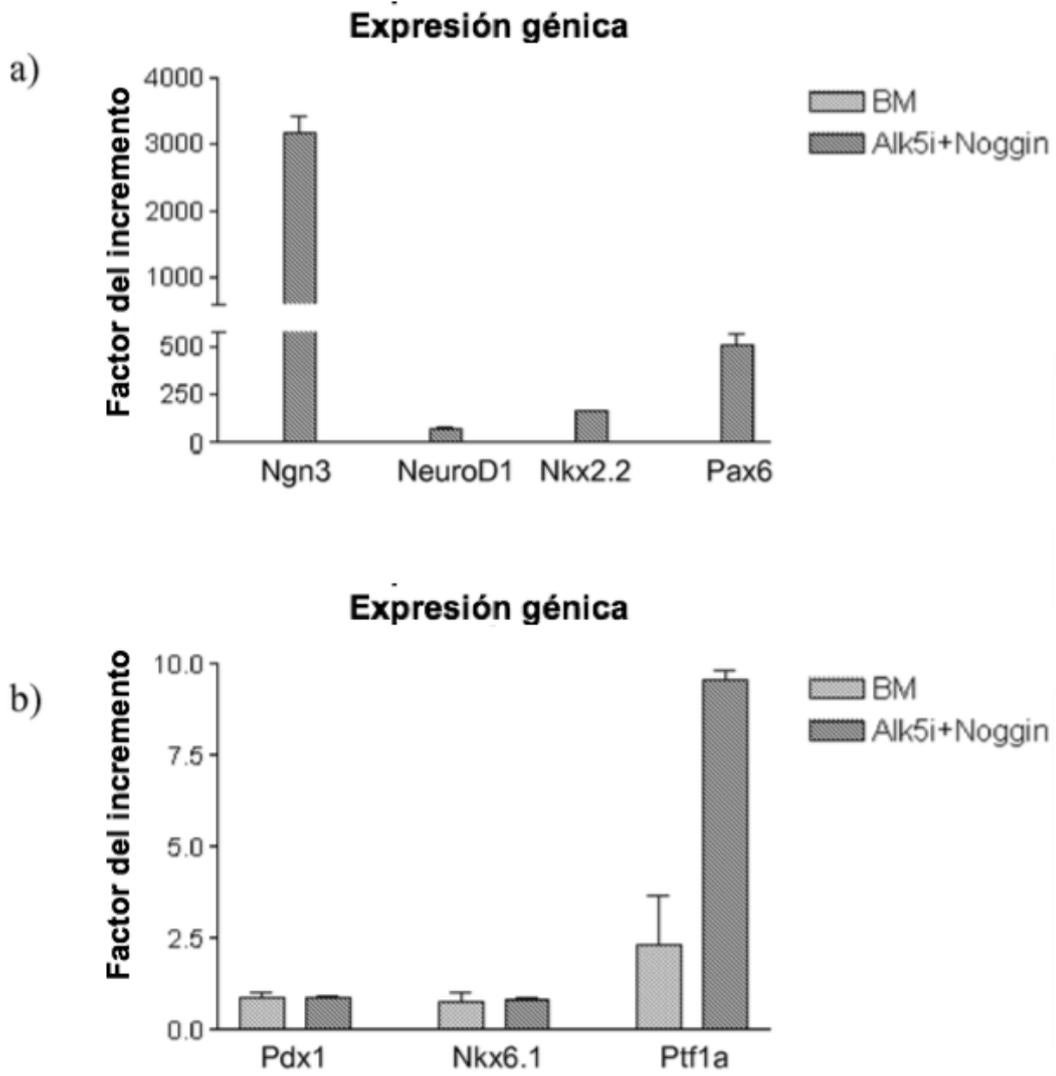


Figura 6

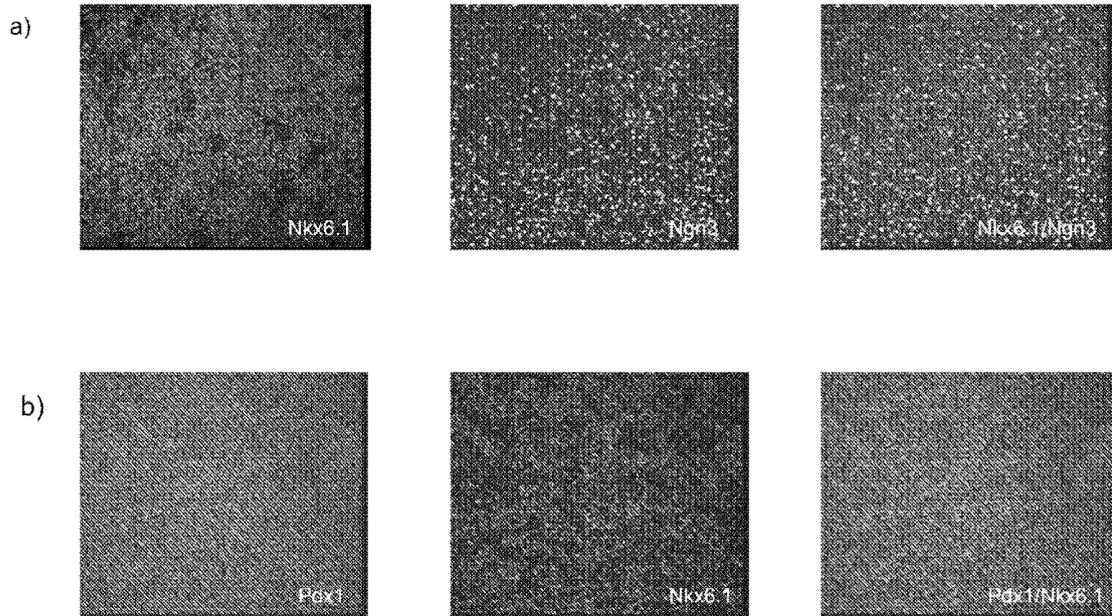


Figura 7

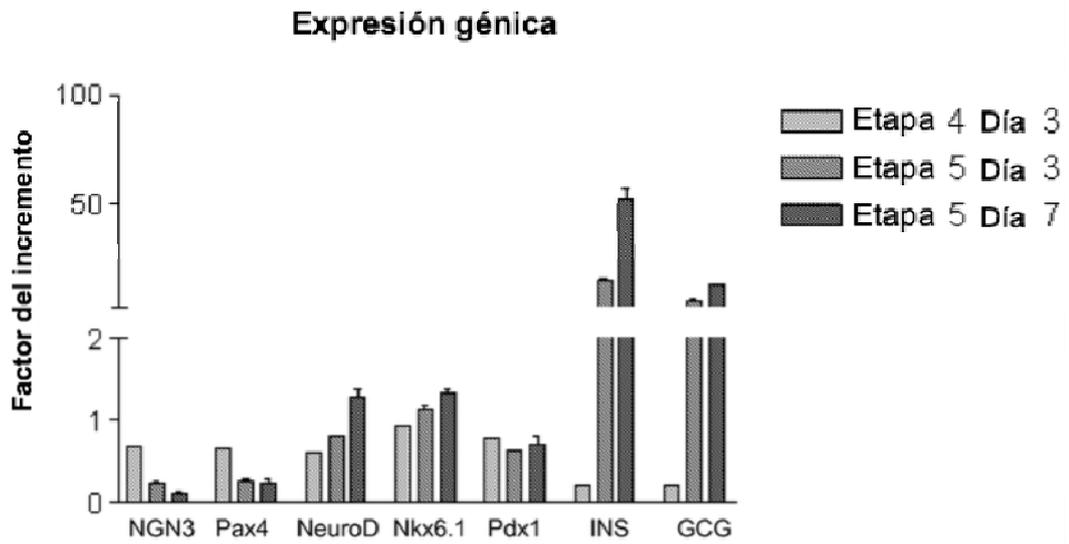


Figura 8

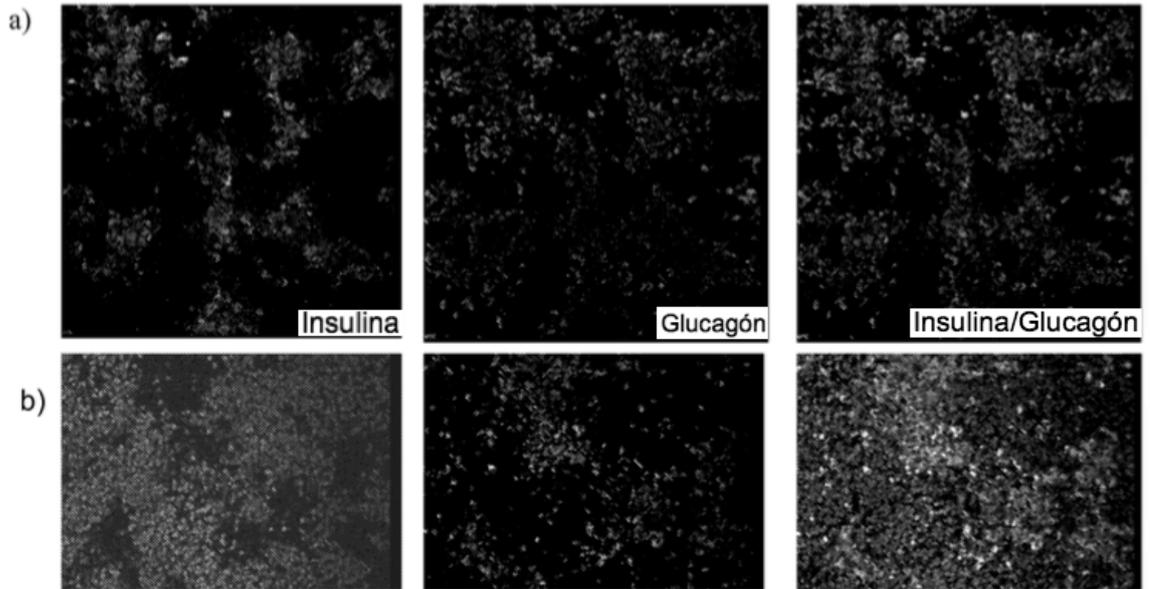


Figura 9a

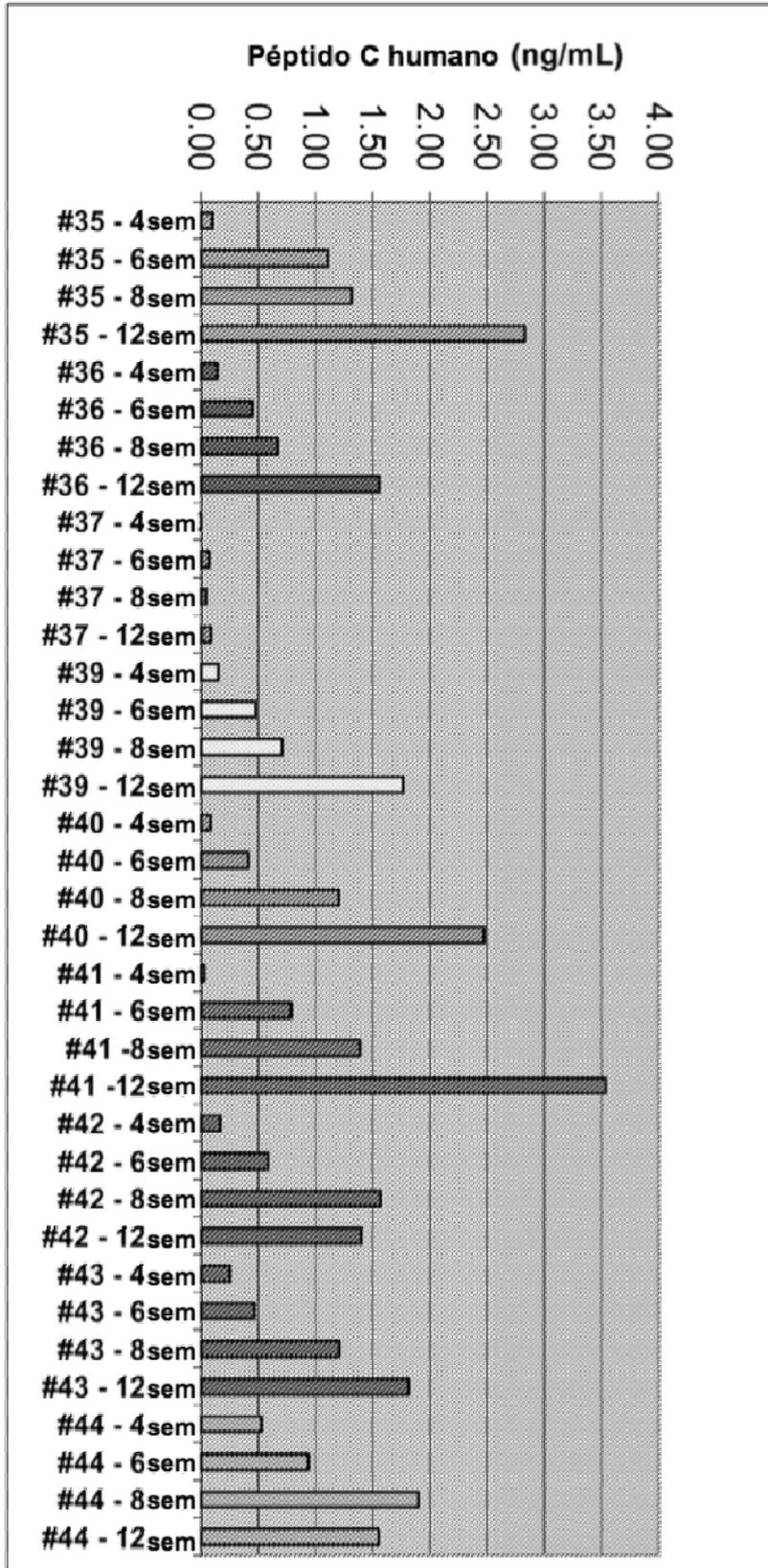


Figura 9b

