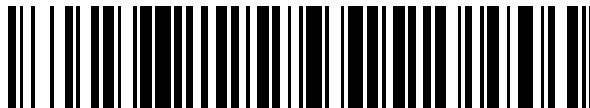


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 950**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2009 PCT/US2009/061635**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2010 WO10051213**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2009 E 09740615 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2350265**

54 Título: **Diferenciación de células madre embrionarias humanas en linaje endocrino pancreático**

30 Prioridad:

**31.10.2008 US 110278 P**

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

**21.10.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**REZANIA, ALIREZA**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 727 950 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 en linaje endocrino pancreático

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona procedimientos para estimular a diferenciación de células madre pluripotenciales, como se define en las reivindicaciones. En particular, la presente invención proporciona un procedimiento para aumentar la expresión de marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático, como se define en las reivindicaciones.

**Antecedentes**

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

En el desarrollo embrionario de vertebrados, una célula pluripotencial da lugar a un grupo de células que comprende tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) en un proceso conocido como 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 endodérmicas definitivas expresan una serie de marcadores, tales como HNF-3beta, GATA4, Mixl1, CXCR4 y Sox-17.

La formación del páncreas surge de la diferenciación del endodermo definitivo en el endodermo pancreático. Las células del endodermo pancreático expresan el gen homeobox pancreático-duodenal, Pdx1. En ausencia de Pdx1, el páncreas no se desarrolla más allá de la formación de brotes 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.

Las células que tienen las características de las células de los islotes han derivado de las células embrionarias del ratón. Por ejemplo, Lumelsky y col., (Science 292: 1389, 2001) indican 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) indican que las células secretoras de insulina derivadas de células madre embrionarias de ratón normalizan la glucemia en ratones con diabetes inducida con estreptozotocina.

En un ejemplo, Hori y col., (PNAS 99: 16105, 2002) revelan que el tratamiento de células madre embrionarias de ratón con inhibidores de la fosfoinosítido-3-quinasa (LY294002) producía células que se parecían a las células  $\beta$ .

En otro ejemplo, Blyszczuk y col., (PNAS 100: 998, 2003) informa sobre la generación de células productoras de insulina a partir de células madre embrionarias de ratón que expresan Pax4 de forma constitutiva.

Micallef y col., informan de que el ácido retinoico puede regular el compromiso de las células madre embrionarias para formar el endodermo pancreático positivo para Pdx1. El ácido retinoico es más efectivo en la inducción de la expresión de Pdx1 cuando se añade a los 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).

Miyazaki y col., informan sobre una línea de células madre embrionarias de ratón que sobreexpresa Pdx1. Sus resultados muestran que la expresión exógena de Pdx1 mejoró claramente la expresión de los genes de insulina, somatostatina, glucocinasa, neurogenina3, P48, Pax6 y HNF6 en las células diferenciadas resultantes (Diabetes 53: 1030, 2004).

Skoudy y col., informan que la activina A (un miembro de la superfamilia TGF- $\beta$ ) regula la expresión de los genes pancreáticos exocrinos (p48 y amilasa) y los genes endocrinos (Pdx1, insulina y glucagón) en células madre embrionarias de ratón. El efecto máximo se observó utilizando la activina A 1nM. También observaron que el nivel de expresión de la insulina y el ARNm de Pdx1 no se vio afectado por el ácido retinoico; sin embargo, el tratamiento con FGF7 3nM dio como resultado un aumento del nivel de la transcripción para Pdx1 (Biochem. J. 379: 749, 2004).

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- $\beta$ 2 producía reproduciblemente una mayor proporción de células positivas para Pdx1 (Genes Cells. 2005 Jun; 10 (6): 503-16.).

Gordon y col., demostraron la inducción de células endodérmicas braquiuro<sup>+</sup>/HNF3beta<sup>+</sup> de células madre embrionarias de ratón en ausencia de suero y en presencia de activina junto con un inhibidor de la señalización Wnt

(documento US 2006/0003446A1).

Gordon y col., (PNAS, Vol. 103, página 16806, 2006) indican que "se requería la señalización de Wnt y TGF-beta / nodal / activina de forma simultánea para la generación de la línea primitiva anterior".

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

10 Thomson y col., *aislaron* células madre embrionarias de blastocistos humanos (Science 282: 114, 1998). Al mismo tiempo, Gearhart y colaboradores derivaron líneas celulares de germen embrionario humano (hEG) a partir de tejido gonadal fetal (Shamblott y col., Proc. Natl Acad Sci. USA 95: 13726, 1998). A diferencia de las células madre embrionarias de ratón, que se puede evitar que se diferencien simplemente cultivando con factor de inhibición de leucemia (LIF), las células madre embrionarias humanas deben mantenerse en condiciones muy especiales (patente de Estados Unidos n.º 6.200.806; documento WO 99/20741; documento WO 01/51616).

15 D'Amour y col., describen la producción de cultivos enriquecidos de endodermo definitivo derivado de células madre embrionarias humanas en presencia de una alta concentración de activina y bajos niveles de suero (Nature Biotechnology 2005.). El trasplante de estas células debajo de la cápsula renal de 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 pueden diferenciarse aún más en células Positivas para Pdx1 después de la adición de FGF-10 (documento US 2005/0266554A1).

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

30 En otro ejemplo, Fisk y col., informan sobre un sistema para producir células de islotes pancreáticos a partir de células madre embrionarias humanas (documento US2006/0040387A1). En este caso, la vía de diferenciación se dividió en tres etapas. Las células madre embrionarias humanas se diferenciaron primero en 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 betacelulina para generar células positivas para Pdx1. La diferenciación terminal fue inducida por la nicotinamida.

35 En un ejemplo, Benvenistry y col., afirman: "Llegamos a la conclusión de que la sobreexpresión de la expresión aumentada de Pdx1 de los genes enriquecidos de 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).

40 Por lo tanto, aún existe una necesidad significativa de desarrollar condiciones para establecer líneas de células madre pluripotenciales que puedan expandirse para abordar las necesidades clínicas actuales, al tiempo que se mantiene el potencial de diferenciarse en células endocrinas pancreáticas, células que expresan hormonas pancreáticas o células secretoras de hormonas pancreáticas. Hemos tomado un enfoque alternativo para mejorar la eficiencia de la diferenciación de células madre embrionarias humanas hacia células endocrinas pancreáticas.

### Sumario

50 En una realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento para diferenciar células madre pluripotenciales, que comprende las etapas de:

- a. Cultivar las células madre pluripotenciales,
- 55 b. Diferenciar las células madre pluripotenciales en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo,
- c. Diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, y
- 60 d. Diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.

65 En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para aumentar la expresión de marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático que comprende tratar células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con medio que comprende una cantidad suficiente de un agonista del receptor de TGF-β seleccionado de activina A, activina B, variantes peptídicas de activina A y GDF-8 para causar

un aumento en la expresión de marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático, en el que las células que expresan marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático están enriquecidas, y en el que las células que expresan marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático se obtienen al diferenciar las células madre pluripotenciales humanas, y en el que los marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo que consiste en NGN-3, NeuroD, Isllet-1, Pdx-1, NKX6.1, Pax- 4, y PTF-1 alfa.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un esquema del protocolo de diferenciación empleado en la presente invención.

La figura 2 muestra la expresión de marcadores asociados con las diversas etapas del protocolo de diferenciación empleado en la presente invención. El panel a) muestra la expresión de CXCR4 determinada por FACS en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 que se había diferenciado en el estadio 1. El panel b) muestra la expresión de marcadores asociados con el estadio 1, según lo determinado por PCR en tiempo real, en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 que se habían diferenciado al estadio 1.

La figura 3 muestra la tinción con ditizona de células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 que se diferenciaron en el estadio 6 del protocolo de diferenciación empleado en la presente invención y posteriormente se trataron con activina A (estadio 7). El panel a) muestra un contraste de fase de las células teñidas con ditizona antes de pasar a través de un filtro de células de 40 µm. El panel b) muestra un contraste de fase de las células teñidas con ditizona que pudieron pasar a través de un filtro de células de 40 µm. El panel c) muestra un contraste de fase de las células teñidas con ditizona que no pudieron pasar a través de un filtro de células de 40 µm.

La figura 4 muestra la expresión de pdx-1 (panel a), nkx6-1 (panel b), Pax4 (panel c), nkx2.2 (panel d), insulina (panel e) y glucagón (panel f) según lo determinado por PCR en tiempo real, en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 que se diferenciaron a el estadio 6 del protocolo de diferenciación empleado en la presente invención y se trataron con activina A tras la diferenciación a el estadio 6, de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 2.

### Descripción detallada

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

Las células madre son células indiferenciadas definidas por su capacidad a nivel de célula única tanto para autorrenovarse como para diferenciarse para producir células progenie, que incluyen progenitores que se renuevan automáticamente, progenitores no renovadores y células diferenciadas de forma terminal. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciar *in vitro* en células funcionales de diversos linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, si no todos, los tejidos después de la inyección en blastocistos.

Las células madre se clasifican según su potencial de desarrollo como: (1) totipotenciales, lo que significa que pueden dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias; (2) pluripotencial, es decir, capaz de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias; (3) multipotente, lo que significa que puede dar lugar a un subconjunto de linajes celulares, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir progenie que incluyen HSC (autrenovación), progenitores oligopotenciales restringidos a las células sanguíneas, y todos los tipos y elementos celulares (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre); (4) oligopotencial, lo que significa que puede dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes celulares que las células madre multipotentes; y (5) unipotente, lo que significa que puede dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

La diferenciación es el proceso por el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada como, por ejemplo, una célula nerviosa o una célula muscular. Una célula diferenciada o inducida por la diferenciación es una que ha adquirido una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término "comprometido", cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha avanzado en la ruta de diferenciación hasta un punto donde, en circunstancias normales, continuará diferenciando en un tipo de célula específico o un subconjunto de tipos de células, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o revertir a un tipo de célula menos diferenciado. La diferenciación se refiere al proceso mediante el cual una célula vuelve 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 provienen y a qué células pueden dar lugar. 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 puede usarse para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida al linaje de interés.

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

10 "Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo", o "Células en Estadio 1", o "Estadio 1", como se usan en el presente documento, se refieren a las células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX-17, GATA-4, HNF -3 beta, GSC, Cer1, Nodal, FGF8, braquiuro, proteína homeobox de tipo Mix, FGF4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA-6, CXCR4, C-Kit, CD99, u OTX2. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo incluyen células precursoras de la línea primitiva, células de la línea primitiva, células del mesoendodermo y células endodérmicas definitivas.

15 "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: PDX-1, HNF-1beta, PTF-1 alfa, HNF-6 o HB9. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático incluyen células endodérmicas pancreáticas, células primitivas del tubo intestinal y células del intestino anterior.

20 "Células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático", o "Células en Estadio 5", o "Estadio 5", como se usa en el presente documento, se refiere a las células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: NGN-3, NeuroD, Islet-1, PDX-1, NKX6.1, Pax-4, Ngn-3 o PTF-1 alfa. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático incluyen células endocrinas pancreáticas, células que expresan hormona pancreática y células secretoras de hormona pancreática, y células del linaje de células  $\beta$ .

25 "Endodermo definitivo", como se usa en el presente documento, se refiere a las 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 endodérmicas definitivas expresan los siguientes marcadores: HNF-3 beta, GATA-4, SOX-17, Cerberus, OTX2, goosecoide, C-Kit, CD99 y Mixl1.

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

35 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, expresión diferencial significa un nivel incrementado para un marcador positivo y un nivel disminuido para un marcador negativo. El nivel detectable del ácido nucleico o polipéptido marcador es suficientemente alto o más bajo en las células de interés en comparación con otras células, de modo que la célula de interés puede identificarse y distinguirse de otras células utilizando cualquiera de diversos procedimientos conocidos en la técnica. .

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

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

50 "Célula endodérmica pancreática", o "células en estadio 4", o "estadio 4", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula capaz de expresar al menos uno de los siguientes marcadores: NGN-3, NeuroD, Islet-1, PDX 1, PAX-4, NKX2.2.

55 "Célula productora de hormona pancreática", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula capaz de producir al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

60 "Célula secretora de hormona pancreática" o "Células en estadio 6", o "Estadio 6", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula capaz de secretar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

"Célula " o "Células en estadio 3", o "Estadio3", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula capaz de secretar al menos uno de los siguientes marcadores: PDX-1, HNF-1, PTF-1A, HNF -6, HB-9, PROX-1.

65 "Células del disco germinativo", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: Nodal o FGF8.

"Célula del tubo digestivo primitivo" o "Células en estadio 2", o "Estadio 2", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula capaz de secretar al menos uno de los siguientes marcadores: HNF-1 o HNF-4A.

- 5 "Células primitivas", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: braquiuro, proteína homeobox similar a Mix o FGF4.

**Aislamiento, expansión y cultivo de células madre pluripotenciales**

10 *Caracterización de las células madre pluripotenciales*

Las células madre pluripotenciales pueden expresar uno o más de los antígenos embrionarios específicos para el estadio (SSEA) 3 y 4, y los marcadores detectables utilizan anticuerpos denominados Tra-1-60 y Tra-1-81 (Thomson et al., Science 282: 1145, 1998). La diferenciación de células madre pluripotenciales. *in vitro* da como resultado la pérdida de la expresión de SSEA-4, Tra-1-60 y Tra-1-81 (si está presente) y una mayor expresión de SSEA-1. Las células madre pluripotenciales 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, como lo describe el fabricante (Vector Laboratories, Burlingame, California). Las células madre pluripotenciales indiferenciadas también se suelen expresar Oct-4 y TERT, según lo detectado mediante RT-PCR.

Otro fenotipo deseable de células madre pluripotenciales propagadas es un potencial para diferenciarse en células de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y tejido ectodermo. La pluripotencia de las células madre pluripotenciales se puede confirmar, por ejemplo, inyectando células en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID), fijando los teratomas que se forman con paraformaldehído al 4 % y luego analizándoles histológicamente para detectar evidencias de tipos celulares de las tres capas germinales. Como alternativa, la pluripotencia se puede determinar mediante la creación de cuerpos embrioides y la evaluación de los cuerpos embrioides para detectar la presencia de marcadores asociados con las tres capas germinales.

Se puede realizar el cariotipo de las líneas de células madre pluripotenciales propagadas utilizando una técnica de banda G estándar y comparadas 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 las que todos los cromosomas humanos están presentes y no están notablemente alterados.

35 *Fuentes de células madre pluripotenciales*

Los tipos de células madre pluripotenciales que pueden usarse incluyen líneas establecidas de células pluripotenciales derivadas del tejido formado después de la gestación, incluido el tejido preembrionario (como, por ejemplo, un blastocisto), tejido embrionario o tejido fetal que se toma en cualquier momento durante la gestación. , típicamente pero no necesariamente antes de aproximadamente 10-12 semanas de gestación. 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 de origen serían células pluripotenciales primarias tomadas directamente de los tejidos de origen. También son adecuadas las células tomadas de una población de células madre pluripotenciales ya cultivadas en ausencia de células alimentadoras. También son adecuadas las líneas de células madre embrionarias humanas mutantes,

45 *Cultivo de células madre pluripotenciales*

En una realización, las células madre pluripotenciales se cultivan típicamente en una capa de células alimentadoras que soportan las células madre pluripotenciales de varias maneras. Como alternativa, las células madre pluripotenciales se cultivan en un sistema de cultivo que está esencialmente libre de células alimentadoras, pero, sin embargo, apoya la proliferación de células madre pluripotenciales sin experimentar una diferenciación sustancial. El crecimiento de células madre pluripotenciales en un cultivo libre de alimentación sin diferenciación se apoya utilizando un medio condicionado mediante el cultivo previo con otro tipo de célula. Como alternativa, el crecimiento de células madre pluripotenciales en un cultivo sin alimentador sin diferenciación se apoya mediante un medio químicamente definido.

Por ejemplo, Reubinoff y col., (Nature Biotechnology 18: 399 - 404 (2000)) y Thompson y col., (Science, 6 November 1998: Vol. 282. n. 5391, pp. 1145 - 1147) desvelan el cultivo de líneas de células madre pluripotenciales de blastocistos humanos utilizando una capa de células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón.

60 Richards y col., (Stem Cells 21: 546-556, 2003) evaluó un panel de 11 capas diferentes de células alimentadoras humanas adultas, fetales y neonatales por su capacidad para apoyar el cultivo de células madre pluripotenciales humanas. Richards y col., afirma: "las líneas de células madre embrionarias humanas cultivadas en alimentadores de fibroblastos de piel adulta conservan la morfología de las células madre embrionarias humanas y siguen siendo pluripotenciales".

5 El documento US20020072117 desvela líneas celulares que producen medios que apoyan el crecimiento de células madre pluripotenciales de primates en cultivos libres de alimentadores. Las líneas celulares empleadas son líneas celulares mesenquimales y de tipo fibroblasto obtenidas a partir de tejido embrionario o diferenciadas de células madre embrionarias. El documento US20020072117 también desvela el uso de las líneas celulares como una capa de celda de alimentación primaria.

10 En otro ejemplo, Wang y col., (Stem Cells 23: 1221-1227, 2005) describen procedimientos para el crecimiento a largo plazo de células madre pluripotenciales humanas en capas de células alimentadoras derivadas de células madre embrionarias humanas.

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

15 En otro ejemplo, Miyamoto y col., (Stem Cells 22: 433-440, 2004) desvelan una fuente de células alimentadoras obtenidas de la placenta humana.

Amit y col., (Biol. Reprod 68: 2150-2156, 2003) desvelan una capa de células alimentadoras derivada de prepucio humano.

20 En otro ejemplo, Inzunza y col., (Stem Cells 23: 544-549, 2005) desvelan una capa de células alimentadoras a partir de fibroblastos de prepucio humanos.

25 El documento US6642048 desvela medios que apoyan el crecimiento de células madre pluripotenciales (pPS) de primates en cultivos libres de alimentadores y líneas celulares útiles para la producción de dichos medios. El documento US6642048 indica "la presente invención incluye líneas celulares mesenquimales y de tipo fibroblasto obtenidas a partir de tejido embrionario o diferenciadas de células madre embrionarias. Los procedimientos para obtener dichas líneas celulares, medios de procesamiento y células madre en crecimiento utilizando los medios condicionados se describen e ilustran en esta descripción. "

30 En otro ejemplo, el documento WO2005014799 describe un medio acondicionado para el mantenimiento, la proliferación y la diferenciación de células de mamíferos. El documento WO2005014799 afirma: "El medio de cultivo producido de acuerdo con la presente invención está condicionado por la actividad de secreción celular de las células murinas, en particular, aquellos hepatocitos transgénicos diferenciados e inmortalizados, llamados MMH (Met Hepatocito Murino)".

35 En otro ejemplo, Xu y col., (Stem Cells 22: 972-980, 2004) desvelan un medio acondicionado obtenido a partir de derivados de células madre embrionarias humanas que se han modificado genéticamente para sobreexpresar la transcriptasa inversa de la telomerasa humana.

40 En otro ejemplo, el documento US20070010011 desvela un medio de cultivo químicamente definido para el mantenimiento de células madre pluripotenciales.

45 Un sistema de cultivo alternativo emplea un medio sin suero complementado con factores de crecimiento capaces de promover la proliferación de células madre embrionarias. Por ejemplo, Cheon y col., (BioReprod DOI: 10.1095 / biolreprod.105.046870, 19 de octubre de 2005) revelan un sistema de cultivo libre de suero y libre de alimentador en el que las células madre embrionarias se mantienen en un medio de reemplazo de suero (SR) no condicionado complementado con diferentes factores de crecimiento capaces de desencadenar la auto renovación de las células madre embrionarias.

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

55 En otro ejemplo, el documento US20050148070 desvela un procedimiento para cultivar células madre embrionarias humanas en medios definidos sin suero y sin células alimentadoras de fibroblastos, comprendiendo el procedimiento: cultivar células madre en un medio de cultivo que contiene albúmina, aminoácidos, vitaminas, minerales, al menos una transferrina o un sustituto de la transferrina, al menos una insulina o un sustituto de insulina, el medio de cultivo esencialmente libre de suero fetal de mamífero y que contiene al menos aproximadamente 100 ng / ml de un factor de crecimiento de fibroblastos capaz de activar un receptor de señalización del factor de crecimiento de fibroblastos, en donde el factor de crecimiento se suministra desde una fuente aparte de solo una capa de alimentación de fibroblastos, el medio apoyó la proliferación de células madre en un estado indiferenciado sin células de alimentación o medio acondicionado.

65 En otro ejemplo, el documento US20050233446 desvela un medio definido útil en el cultivo de células madre, incluyendo células madre primordiales primates no diferenciadas. En solución, el medio es sustancialmente isotónico en comparación con las células madre que se cultivan. En un cultivo dado, el medio particular comprende un medio

base y una cantidad de cada uno de bFGF, insulina y ácido ascórbico necesarios para soportar un crecimiento sustancialmente indiferenciado de las células madre primordiales.

5 En otro ejemplo, US6800480 afirma "En una realización, se proporciona un medio de cultivo celular para el crecimiento de células madre primordiales derivadas de primates en un estado sustancialmente indiferenciado que incluye una presión osmótica baja, medio básico de endotoxinas bajas que es eficaz para apoyar el crecimiento de células madre primitivas derivadas de primates El medio básico se combina con un suero nutritivo 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 la matriz extracelular derivado de células alimentadoras. El medio incluye además productos no esenciales aminoácidos, un antioxidante y un primer factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en nucleósidos y una sal de piruvato".

15 En otro ejemplo, el documento US20050244962 afirma: "En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para cultivar células madre embrionarias de primate. Uno cultiva las células madre en un cultivo esencialmente libre de suero fetal de mamífero (preferiblemente también esencialmente libre de cualquier suero animal) y en presencia de factor de crecimiento de fibroblastos que se suministra desde una fuente que no sea solo una capa de alimentación de fibroblastos. En una forma preferida, la capa de alimentación de fibroblastos, previamente requerida para sostener un cultivo de células madre, se vuelve innecesaria mediante la adición de suficiente factor de crecimiento de fibroblastos".

20 En otro ejemplo, el documento WO2005065354 desvela un medio de cultivo isotónico definido que está 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 mamíferos sustancialmente indiferenciadas; do. una cantidad de insulina suficiente para soportar el crecimiento de células madre de mamíferos sustancialmente indiferenciadas; y d. una cantidad de ácido ascórbico suficiente para soportar el crecimiento de células madre de mamíferos sustancialmente indiferenciadas.

25 En otro ejemplo, el documento WO2005086845 desvela un procedimiento para el mantenimiento de una célula madre indiferenciada, dicho procedimiento comprende exponer una célula madre a un miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), un miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o nicotinamida (NIC) en una cantidad suficiente para mantener la célula en un estado indiferenciado durante un tiempo suficiente para lograr un resultado deseado.

30 Las células madre pluripotenciales pueden colocarse 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 la membrana basal o que pueden formar parte de acoplamientos de receptor-ligando de molécula de adhesión. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es MATRIGEL® (Becton Dickenson). MATRIGEL® es una preparación soluble de células tumorales de Engelbreth-Holm Swarm que gelifican a temperatura ambiente para formar una membrana basal reconstituida.

35 Otros componentes de la matriz extracelular y mezclas de componentes son adecuados como alternativa. Dependiendo del tipo de célula que prolifere, esto puede incluir laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, sulfato de heparán y similares, solos o en varias combinaciones.

40 Las células madre pluripotenciales pueden colocarse sobre el sustrato en una distribución adecuada y en presencia de un medio que promueva la supervivencia, propagación y retención celular de las características deseables. Todas estas características se benefician de una cuidadosa atención a la distribución de la siembra y pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica.

45 Se pueden hacer medios de cultivo adecuados a partir de los siguientes componentes, tales como, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Gibco # 11965-092; defectivo del medio Eagle modificado por Dulbecco (KO DMEM), Gibco # 10829-018; medio basal F12 / 50 % DMEM de jamón; L-glutamina 200 mM, Gibco # 15039-027; solución de aminoácidos no esenciales, Gibco 11140-050;  $\beta$ -mercaptoetanol, Sigma # M7522; factor de crecimiento de fibroblastos básicos recombinantes humanos (bFGF), Gibco # 13256-029.

#### 55 **Formación de células productoras de hormonas pancreáticas a partir de células madre pluripotenciales**

60 En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para producir células productoras de hormona pancreática a partir de células madre pluripotenciales, que comprende las etapas de:

- a. Cultivar células madre pluripotenciales,
- b. Diferenciar las células madre pluripotenciales en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo,
- 65 c. Diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, y



d. Diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático

5 y en el que la expresión de marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se incrementa al tratar las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con medio que comprende una cantidad suficiente de un agonista del receptor de TGF- $\beta$  seleccionado de activina A, activina B, variantes peptídicas de activina A, y GDF-8 para causar un aumento en la expresión de marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático, en donde las células que expresan marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático están enriquecidas, y en donde los marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo que consiste en NGN-3, NeuroD, Islet-1, Pdx-1, NKX6.1, Pax-4 y PTF-1 alfa.

15 En un aspecto de la presente invención, la célula endocrina pancreática es una célula productora de hormona pancreática. En un aspecto alternativo, la célula endocrina pancreática es una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células  $\beta$ . Una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células  $\beta$  expresa Pdx1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN-3, Nkx2.2, Nkx6.1, NeuroD, Isl-1, HNF-3 beta, MAFA, Pax4, y Pax6. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células  $\beta$  es una célula  $\beta$ .

20 Las células madre pluripotenciales adecuadas para su uso en la presente invención son células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores característicos de las células pluripotenciales: ABCG2, cripto, CD9, FoxD3, Conexina43, Conexina45, Oct4, Sox2, Nanog, hTERT, UTF-1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra1-60, Tra1-81.

25 Los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se seleccionan del grupo que consiste en SOX-17, GATA4, Hnf-3beta, GSC, Cer1, Nodal, FGF8, braquiuro, proteína homeobox tipo Mix, FGF4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 y OTX2. Adecuada para su uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una célula precursora de vetas primitivas. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una célula mesoendodérmica. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una célula endodérmica definitiva.

35 Los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se seleccionan del grupo que consiste en Pdx1, HNF-1beta, PTF1a, HNF-6, HB9 y PROX1. Adecuada para su uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático es una célula endodérmica pancreática.

40 Los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo que consiste en NGN-3, NeuroD, Islet-1, Pdx-1, NKX6.1, Pax-4, Ngn-3 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 su 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 la hormona pancreática. Como alternativa, la célula endocrina pancreática puede ser una célula secretora de hormona pancreática.

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

#### 55 **Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo**

Las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo por cualquier procedimiento en la técnica o por cualquier procedimiento propuesto en esta invención.

60 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo de acuerdo con los procedimientos descritos en D'Amour y col., Nature Biotechnology 23, 1534 - 1541 (2005).

65 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo de acuerdo con los procedimientos descritos en Shinozaki y col.,

Development 131, 1651-1662 (2004).

5 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo de acuerdo con los procedimientos descritos en McLean y col., Stem Cells 25, 29 - 38 (2007).

10 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo de acuerdo con los procedimientos descritos en D'Amour y col., Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

15 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo cultivando las células madre pluripotenciales en un medio que contiene activina A en ausencia de suero, luego cultivando las células con activina A y suero, y luego cultivando Células con activina A y suero de diferente concentración. Un ejemplo de este procedimiento se describe en Nature Biotechnology 23, 1534 - 1541 (2005).

20 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo cultivando las células madre pluripotenciales en un medio que contiene activina A en ausencia de suero, y luego cultivando las células con activina A con suero de otra concentración. Un ejemplo de este procedimiento se describe en D 'Amour y col., Nature Biotechnology, 2005.

25 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo cultivando las células madre pluripotenciales en un medio que contiene activina A y un ligando Wnt en ausencia de suero, luego retirando el ligando Wnt y cultivando las células con Activina A con suero. Un ejemplo de este procedimiento se describe en Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

30 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo al tratar las células madre pluripotenciales de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 11/736,908, asignado a LifeScan, Inc.

35 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo al tratar las células madre pluripotenciales de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 11/779,311, asignada a LifeScan, Inc.

40 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo al tratar las células madre pluripotenciales de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 60/990,529.

45 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo al tratar las células madre pluripotenciales de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 61/076,889.

50 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo al tratar las células madre pluripotenciales de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 61/076,900.

55 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo al tratar las células madre pluripotenciales de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 61/076,908.

60 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo al tratar las células madre pluripotenciales de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 61/076,915.

***Diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo***

60 La formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se puede determinar probando la presencia de los marcadores antes y después de seguir un protocolo particular. Las células madre pluripotenciales típicamente no expresan tales marcadores. Así, la diferenciación de las células pluripotenciales se detecta cuando las células comienzan a expresarlas.

65 La eficiencia de la diferenciación se puede determinar 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.

Los procedimientos para evaluar la expresión de marcadores de proteínas y ácidos nucleicos en células cultivadas o aisladas son estándares en la técnica. Estos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR), transferencias Northern, *en el lugar* hibridación (ver, por ejemplo, Protocolos actuales en biología molecular (Ausubel et al., Eds. 2001 suplemento)), e inmunoensayos como el análisis inmunohistoquímico del material seccionado, la transferencia de Western y los marcadores que son accesibles en las células intactas, el análisis de citometría de flujo (FACS) (ver, por ejemplo, Harlow y Lane, Usando Anticuerpos: Un Manual De Laboratorio, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

Las características de las células madre pluripotenciales son bien conocidas por los expertos en la técnica, y las características adicionales de las células madre pluripotenciales siguen siendo identificadas. Los marcadores pluripotenciales de células madre incluyen, por ejemplo, la expresión de uno o más de los siguientes: ABCG2, cripto, FoxD3, Connexin43, Connexin45, Oct4, Sox2, Nanog, hTERT, UTF-1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra1-60, Tra1-81.

Después de tratar las células madre pluripotenciales con los procedimientos de la presente invención, las células diferenciadas pueden purificarse exponiendo una población de células tratadas a un agente (como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteína, como el CXCR4, expresado por células que expresan marcadores. Característica del linaje endodérmico definitivo.

**Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático**

Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático por cualquier procedimiento en la técnica o por cualquier procedimiento propuesto en esta invención.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático de acuerdo con los procedimientos descritos en D'Amour y col., Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se diferencian aún más en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, al tratar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con un factor de crecimiento de fibroblastos y el inhibidor de la ruta de señalización de hedgehog -ciclopamina, luego eliminando el medio que contiene el factor de crecimiento de fibroblastos y KAAD-ciclopamina y posteriormente cultivando las células en medio que contiene ácido retinoico, un factor de crecimiento de fibroblastos y KAAD-ciclopamina. Un ejemplo de este procedimiento se describe en Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con ácido retinoico y al menos uno. factor de crecimiento de fibroblastos por un período de tiempo, de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 11/736,908, asignado a LifeScan, Inc.

En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con ácido retinoico y al menos uno. factor de crecimiento de fibroblastos por un período de tiempo, de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 11/779,311, asignado a LifeScan, Inc.

En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 60/990,529.

*Detección de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático*

Los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático son bien conocidos por los expertos en la técnica, y los marcadores adicionales característicos del linaje endodérmico pancreático continúan identificándose. Estos marcadores pueden usarse para confirmar que las células tratadas de acuerdo con la presente invención se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje endodérmico pancreático. Los marcadores específicos del linaje del endodermo pancreático incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción como, por ejemplo, Hlx9, PTF-1a, PDX-1, HNF-6, HNF-1beta.

La eficiencia de la diferenciación puede determinarse exponiendo 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 pancreático.

- 5 Los procedimientos para evaluar la expresión de marcadores de proteínas y ácidos nucleicos en células cultivadas o aisladas son estándares en la técnica. Estos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR), transferencias Northern, *en el lugar* hibridación (ver, por ejemplo, Protocolos actuales en biología molecular (Ausubel et al., Eds. 2001 suplemento)), e inmunoensayos como el análisis inmunohistoquímico del material seccionado, la transferencia de Western y los marcadores que son accesibles en las células intactas, el análisis de citometría de flujo (FACS) (ver, por ejemplo, Harlow y Lane, Usando Anticuerpos: Un Manual De Laboratorio, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

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

- 15 Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático por cualquier procedimiento en la técnica o por cualquier procedimiento descrito en esta invención.

20 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático de acuerdo con los procedimientos descritos en D'Amour y col., Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

25 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian aún más en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, cultivando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en un medio que contiene DAPT y exendina 4, y luego eliminando el medio que contiene DAPT y exendina 4 y posteriormente se cultivan las células en un medio que contiene exendina 1, IGF-1 y HGF. Un ejemplo de este procedimiento se describe en Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

30 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian aún más en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el cultivo de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en un medio que contiene exendina 4, luego se elimina el medio que contiene exendina 4 y posteriormente cultivar las células en un medio que contiene exendina 1, IGF-1 y HGF. Un ejemplo de este procedimiento se describe en D 'Amour y col., Nature Biotechnology, 2006.

40 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, cultivando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en un medio que contiene DAPT y exendina 4. Un ejemplo de esto procedimiento se revela en D 'Amour y col., Nature Biotechnology, 2006.

45 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian aún más en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, cultivando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en un medio que contiene exendina 4. Un ejemplo de este procedimiento es revelado en D 'Amour y col., Nature Biotechnology, 2006.

50 En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, al tratar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la Notch. vía de señalización, de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 11/736,908, asignado a LifeScan, Inc.

55 En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, al tratar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la Notch. vía de señalización, de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 11/779,311, asignado a LifeScan, Inc.

60 En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, al tratar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la Notch. vía de señalización, de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 60/953,178, asignado a LifeScan, Inc.

65 En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino

pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático según los procedimientos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 60/990,529.

5 En un aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona un procedimiento para aumentar la expresión de marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático que comprende tratar células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con medio que comprende una cantidad suficiente de un agonista del receptor de TGF- $\beta$  para causar un aumento en la expresión de marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático.

10 El agonista del receptor de TGF- $\beta$  puede ser cualquier agente capaz de unirse y activar el receptor de TGF- $\beta$ . En una realización, el agonista del receptor de TGF- $\beta$  se selecciona del grupo que consiste en activina A, activina B y activina C.

15 En una realización alternativa, el agonista del receptor de TGF- $\beta$  puede ser una variante peptídica de la activina A. Los ejemplos de tales variantes peptídicas se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 61/076,889, asignado a Centocor R&D, Inc.

20 En una realización, las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se tratan con una cantidad de activina A suficiente para causar un aumento en la expresión de marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático durante aproximadamente uno a aproximadamente cinco días. Como alternativa, las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se tratan con una cantidad de activina A suficiente para causar un aumento en la expresión de marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático durante aproximadamente tres a aproximadamente cinco días. Como alternativa, las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se tratan con una cantidad de activina A suficiente para causar un aumento en la expresión de marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático durante aproximadamente cinco días.

30 En una realización alternativa, el agonista del receptor de TGF- $\beta$  se selecciona del grupo que consiste en GDF-8, GDF 11 y GDF-15. En una realización, las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se tratan con el agonista del receptor de TGF- $\beta$  seleccionado del grupo que consiste en GDF-8, GDF 11 y GDF-15 y al menos otro factor. En una realización, el al menos otro factor es un compuesto de anilina piridinotriazina cíclica. Ejemplos de tales compuestos anilina piridinotriazina cíclicos se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 61/076,900, asignado a Centocor R&D, Inc. En una realización alternativa, el al menos otro factor es un compuesto de anilina-piridinotriazina. Ejemplos de tales compuestos de anilina-piridinotriazina se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 61/076,908, asignado a Centocor R&D, Inc. En una realización alternativa, el al menos otro factor es un compuesto descrito en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 61/076,915, asignado a Centocor R&D, Inc.

40 En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se enriquecen posteriormente. La etapa de enriquecimiento se puede realizar antes del tratamiento de las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con el agonista del receptor de TGF- $\beta$ . Como alternativa, la etapa de enriquecimiento puede realizarse después de que las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se hayan tratado con el agonista del receptor de TGF- $\beta$ .

45 En una realización, el enriquecimiento se logra obteniendo una suspensión de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático y pasando la suspensión de células a través de un filtro de células de 40  $\mu\text{m}$ .

#### 50 *Detección de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático*

Los marcadores característicos de las células del linaje endocrino pancreático son bien conocidos por los expertos en la técnica, y los marcadores adicionales característicos del linaje endocrino pancreático continúan siendo identificados. Estos marcadores pueden usarse para confirmar que las células tratadas de acuerdo con la presente invención se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje endocrino pancreático. Los marcadores específicos del linaje endocrino pancreático incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción como, por ejemplo, NGN-3, NeuroD, Islet-1.

60 Los marcadores característicos de las células del linaje de las células  $\beta$  son bien conocidos por los expertos en la técnica, y los marcadores adicionales característicos del linaje de las células  $\beta$  continúan siendo identificados. Estos marcadores pueden usarse para confirmar que las células tratadas de acuerdo con la presente invención se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje de células  $\beta$ . Las características específicas del linaje de las células  $\beta$  incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción como, por ejemplo, Pdx1 (gen 1 de homeobox pancreático y duodenal), Nkx2.2, Nkx6.1, Isl1, Pax6, Pax4, NeuroD, Hnflb, Hnf -6, Hnf-3beta, y MafA, entre otros. Estos factores de transcripción están bien establecidos en la técnica para la identificación de células endocrinas. Ver, por ejemplo, Edlund (Nature Reviews Genetics 3: 524-632 (2002)).

La eficiencia de la diferenciación se puede determinar 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 endocrino pancreático. Como alternativa, la eficiencia de la diferenciación puede determinarse exponiendo 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 de células  $\beta$ .

Los procedimientos para evaluar la expresión de marcadores de proteínas y ácidos nucleicos en células cultivadas o aisladas son estándares en la técnica. Estos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR), transferencias Northern, *en el lugar* hibridación (ver, por ejemplo, Protocolos actuales en biología molecular (Ausubel et al., Eds. 2001 suplemento)), e inmunoensayos como el análisis inmunohistoquímico del material seccionado, la transferencia Western y los marcadores que son accesibles en las células intactas, el análisis de citometría de flujo (FACS) (ver, por ejemplo, Harlow y Lane, Usando Anticuerpos: Un Manual De Laboratorio, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

En un aspecto de la presente invención, la eficacia de la diferenciación se determina midiendo el porcentaje de células positivas para insulina en un cultivo celular dado después del tratamiento. En una realización, los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente el 100% de células positivas para insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente un 90% de células positivas para insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente el 80% de células positivas para insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente el 70% de células positivas para insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente el 60% de células positivas para insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente el 50% de células positivas para insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 40% de células positivas para insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 30% de células positivas para insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 20% de células positivas para insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente un 10% de células positivas para insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente un 5% de células positivas para insulina en un cultivo dado.

En un aspecto de la presente invención, la eficacia de la diferenciación se determina midiendo la secreción de insulina estimulada por glucosa, según se detecta midiendo la cantidad de péptido C liberado por las células. En una realización, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 1000 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 900 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 800 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 700 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 600 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 500 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 400 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 500 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 400 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 300 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 200 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 100 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 90 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 80 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 70 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 60 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 50 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 40 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 30 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 20 ng de péptido C / pg de ADN. En una realización alternativa, las células producidas por los

procedimientos de la presente invención producen aproximadamente un péptido C / pg de ADN.

### Terapias

5 En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar a un paciente que padece o tiene riesgo de desarrollar diabetes tipo 1. Este procedimiento implica cultivar células madre pluripotenciales, diferenciar las células madre pluripotenciales *in vitro* en un linaje de células  $\beta$ , e implantar las células de un linaje de células  $\beta$  en un paciente.

10 En otro aspecto más, esta invención proporciona un procedimiento para tratar a un paciente que padece o tiene riesgo de desarrollar diabetes tipo 2. Este procedimiento implica cultivar células madre pluripotenciales, diferenciar las células cultivadas *in vitro* en un linaje de células  $\beta$ , e implantar las células de un linaje de células  $\beta$  en el paciente.

15 Si es apropiado, el paciente puede ser tratado con agentes farmacéuticos o bioactivos que faciliten la supervivencia y la función de las células trasplantadas. Estos agentes pueden incluir, por ejemplo, insulina, miembros de la familia TGF- $\beta$ , incluyendo TGF- $\beta$ 1, 2 y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 y -13), factores de crecimiento de fibroblastos-1 y -2, factor de crecimiento derivado de las plaquetas -A, y -BB, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de la insulina (IGF-I, II) factor de diferenciación del crecimiento (GDF-5, -6, -7, -8, -10, -15), factor de crecimiento derivado de células endoteliales vasculares (VEGF), pleiotrofina, endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, glucagón como péptido-I (GLP-1) y II, mimeticuerpo GLP-1 y 2, Exendin-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, inhibidores de MAPK, como, por ejemplo, compuestos descritos en la solicitud publicada de Estados Unidos 2004/0209901 y la solicitud publicada de Estados Unidos 2004/0132729.

25 Las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en una célula productora de insulina antes del trasplante en un receptor. En una realización específica, las células madre pluripotenciales se diferencian completamente en células  $\beta$ , antes del trasplante en un receptor. Como alternativa, las células madre pluripotenciales pueden trasplantarse a un receptor en un estado no diferenciado o parcialmente diferenciado. Una mayor diferenciación puede tener lugar en el receptor.

30 Las células endodérmicas definitivas o, como alternativa, las células endodérmicas pancreáticas o, como alternativa, las células  $\beta$ , pueden implantarse como células dispersas o formarse en grupos que pueden infundirse en la vena porta hepática. Como alternativa, las células pueden proporcionarse en soportes poliméricos degradables biocompatibles, dispositivos porosos no degradables o encapsulados para protegerlos de la respuesta inmune del huésped. Las células pueden implantarse en un sitio apropiado en un receptor. Los sitios de implantación incluyen, por ejemplo, el hígado, el páncreas natural, el espacio subcapsular renal, el omento, el peritoneo, el espacio subserosal, el intestino, el estómago o una bolsa subcutánea.

40 Para mejorar la diferenciación, la supervivencia o la actividad de las células implantadas pueden administrarse factores adicionales, como factores de crecimiento, antioxidantes o agentes antiinflamatorios antes, simultáneamente o después de la administración de las células. En ciertas realizaciones, los factores de crecimiento se utilizan para diferenciar las células administradas. *in vivo*. Estos factores pueden ser secretados por células endógenas y expuestos a las células administradas. *en el lugar*. Las células implantadas pueden inducirse para diferenciarse por cualquier combinación de factores de crecimiento administrados de forma exógena y endógena conocidos en la técnica.

La cantidad de células utilizadas en la implantación depende de varios factores, entre ellos, el estado del paciente y la respuesta a la terapia, y un experto en la técnica puede determinarlo.

50 En un aspecto, esta invención proporciona un procedimiento para tratar a un paciente que padece o tiene riesgo de desarrollar diabetes. Este procedimiento implica cultivar células madre pluripotenciales, diferenciar las células cultivadas *in vitro* en un linaje de células  $\beta$ , e incorporando las células en un soporte tridimensional. Las células se pueden mantener. *in vitro* en este soporte antes de la implantación en el paciente. Como alternativa, el soporte que contiene las células se puede implantar directamente en el paciente sin necesidad de *in vitro* cultivando El soporte puede incorporarse opcionalmente con al menos un agente farmacéutico que facilita la supervivencia y la función de las células trasplantadas.

60 Los materiales de soporte adecuados para uso para los fines de la presente invención incluyen plantillas de tejidos, conductos, barreras y depósitos útiles para la reparación de tejidos. En particular, los 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 de tejido, son adecuados para usar en la práctica de los procedimientos de la presente invención. Véase, por ejemplo, los materiales descritos en la patente de Estados Unidos 5.770.417, la patente de Estados Unidos 6.022.743, la patente de Estados Unidos 5.567.612, la patente de Estados Unidos 5.759.830, la patente de Estados Unidos 6.626.950, la patente de Estados Unidos 6.534.084, la patente de Estados Unidos 6.306.424, la patente de Estados Unidos 6.365.149, la patente de Estados Unidos 6.599.323, la patente de Estados

Unidos 6.656,488, la solicitud publicada de Estados Unidos 2004/0062753 A1, la patente de Estados Unidos 4.557.264 y la patente de Estados Unidos 6.333.029.

5 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. Como alternativa, un agente farmacéutico podría recubrirse 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. Como alternativa, se pueden añadir 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, los compuestos descritos en la patente de Estados Unidos 6,509,369.

El soporte puede incorporarse con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto antiapoptótico, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en la patente de Estados Unidos 6.793.945.

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

El soporte también puede incorporarse con al menos un compuesto farmacéutico que sea capaz de mejorar la angiogénesis, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en la solicitud publicada de Estados Unidos 2004/0220393 y la solicitud publicada de Estados Unidos 2004/0209901.

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

25 El soporte también puede incorporarse con al menos un compuesto farmacéutico que es un factor de crecimiento, como, por ejemplo, miembros de la familia TGF- $\beta$ , incluyendo TGF- $\beta$ 1, 2 y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 y -13), factores de crecimiento de fibroblastos -1 y -2, factor de crecimiento derivado de plaquetas -AA, y -BB, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-I, II) factor de diferenciación de crecimiento (GDF-5, -6, -8, -10, -15), factor de crecimiento derivado de células endoteliales vasculares (VEGF), pleiotrofina, endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, factor inducible por hipoxia 1-alfa, glucagón como péptido-I (GLP-1), GLP-1 y mimeticuerpo de GLP-2, y II, Exendin-4, nodal, noggin, NGF, ácido retinoico, hormona paratiroidea, tenascina-C, tropoelastina, péptidos derivados de trombina, catelicidinas, defensinas, laminina, péptidos biológicos que contienen dominios de unión a heparina y células de proteínas de matriz extracelular adhesivas como fibronectina y vitronectina, inhibidores de MAPK, como, por ejemplo, los compuestos descritos en la solicitud publicada de Estados Unidos 2004/0209901 y la solicitud publicada de Estados Unidos 2004/0132729.

40 La incorporación de las células de la presente invención en un andamio se puede lograr mediante el simple depósito de las células en el armazón. Las células pueden entrar en el andamio por difusión simple (J. Pediatr. Surg. 23 (1 Pt 2): 3-9 (1988)). Se han desarrollado varios otros enfoques para mejorar la eficiencia de la siembra de células. Por ejemplo, los matraces giratorios se han utilizado para sembrar condrocitos en andamios de ácido poliglicólico (Biotechnol. Prog. 14 (2): 193-202 (1998)). Otro enfoque para sembrar células es el uso de la centrifugación, que produce un estrés mínimo para las células sembradas y mejora la eficiencia de la siembra. Por ejemplo, Yang y col., desarrolló un procedimiento de siembra de células (J. Biomed. Mater. Res. 55 (3): 379-86 (2001)), referido como inmovilización celular por centrifugación (ICC).

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

## 50 EJEMPLOS

### Ejemplo 1 (ejemplo de referencia)

#### 55 **Diferenciación de células madre embrionarias humanas de la línea celular H1e n células endocrinas pancreáticas en ausencia de suero bovino fetal**

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en el paso 52 se cultivaron en platos recubiertos con MATRIGEL™ (dilución 1:30) y se expusieron a medio RPMI suplementado con BSA al 2% (número de catálogo 152401, MP Biomedical, Ohio), y 100 ng / ml de activina A (R&D Systems, MN) más 20 ng / ml WNT-3a (Catálogo # 1324-WN-002, R&D Systems, MN) más 8 ng / ml de bFGF (Catálogo # 100-18B, PeproTech, NJ), durante un día, seguido de un tratamiento con medios RPMI suplementados con BSA al 2% y 100 ng / ml de activina A más 8 ng / ml de bFGF durante dos días adicionales. A continuación, los cultivos se trataron con DMEM / F12 + BSA al 2% + 50 ng / ml FGF7 + 0.25  $\mu$ M de ciclopamina-KAAD (# 239804, Calbiochem, CA) durante dos días, seguido de cuatro días de incubación en DMEM / F12 + 1% B27 (Invitrogen, CA) + 50 ng / ml FGF7 + 0.25  $\mu$ M ciclopamina-KAAD + 2  $\mu$ M ácido retinoico (RA) (Sigma, MO) + 100 ng / ml de Noggin (R & D Systems, MN).



Las células se diferenciaron en células endocrinas pancreáticas incubando las células en DMEM / F12 + B27 al 1 % (Invitrogen, CA) + 100 ng / ml Noggin + DAPT 1  $\mu$ M (un inhibidor de la gamma-secretasa) (Número de catálogo 565784, Calbiochem, CA) + 1  $\mu$ M de inhibidor de ALK5 II (número de catálogo 616452, Calbiochem, Ca) + 100 ng / ml de Netrin-4 (R&D Systems, MN) durante tres días seguidos de siete días adicionales de incubación en DMEM / F12 + 1% B27 (Invitrogen, CA) + 1  $\mu$ M de inhibidor de ALK5 II (Calbiochem, Ca). Se agregó una última etapa para madurar aún más los cultivos endocrinos, que consistió en un tratamiento de siete días con DMEM / F12 + 1% B27 (Invitrogen, CA). Excepto en la última etapa, todas las demás etapas incluyeron cambios diarios en los medios. En la Figura 1 se muestra un esquema del procedimiento. En cada etapa, se calculó el número de células utilizando un hemocitómetro y se recolectó el ARN para el análisis de PCR. Todas las muestras fueron recolectadas por triplicado.

La figura 2, paneles a y b, muestra la expresión de CXCR4 en las células según lo medido por FACS y los datos de la PCR en tiempo real para el punto de tiempo de tres días, correspondiente al estadio 1. El cambio de doblez en la expresión se muestra en relación con las células H1 ES no diferenciadas.

**Ejemplo 2 (ejemplo de referencia)**

**La adición de activina A a cultivos en estadio 6 mejoró significativamente la expresión de marcadores endocrinos pancreáticos**

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en el paso 43 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución 1:30) y se diferenciaron en células endocrinas pancreáticas según los procedimientos descritos en el Ejemplo 1. En el estadio 6, se trataron algunos de los cultivos con 10 ng / ml de activina A (R&D Systems, MN) durante siete días. En el día 7, las células se trataron durante 5 minutos a temperatura ambiente con 1X Accutase (Sigma, MO) seguido de la eliminación de Accutase y la adición de DMEM / 12 + 1% de B27. Las células unidas se eliminaron utilizando un escarificador de células y se resuspendieron suavemente y se pasaron a través de un filtro de células de 40  $\mu$ m. Se eliminaron el flujo y las células retenidas en el filtro y se recogieron muestras para la PCR y la tinción para ditizona. La ditizona (DTZ) es un pigmento que se une selectivamente al zinc, que se ha demostrado que está presente dentro de los islotes. En la Figura 3, los paneles a-c representan cultivos teñidos con DTZ antes y después de la separación utilizando un filtro de células de 40  $\mu$ m. Una porción significativa (aproximadamente el 80%) de los grupos mayores de 40  $\mu$ m se tiñeron de forma positiva para DTZ. Esto proporciona un procedimiento rápido y simple de enriquecimiento de grupos ricos en endocrinos. En la Figura 4, los paneles a-f muestran el perfil de expresión génica de las células tratadas en el estadio 6 +/- 10 ng / ml de activina A y posteriormente se enriquecen con un filtro de 40  $\mu$ m. La adición de activina A al estadio 6, aumentó significativamente la expresión de todos los marcadores endocrinos pancreáticos clave.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para aumentar la expresión de marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático que comprende tratar células que expresan marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático con medio que comprende una cantidad suficiente de un agonista del receptor de TGF- $\beta$  seleccionado de activina A, activina B, variantes peptídicas de activina A, y GDF-8 para causar un aumento en la expresión de marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático, en el que las células que expresan marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático se enriquecen, y en el que donde las células que expresan marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático se obtienen por diferenciación células madre pluripotenciales humanas, y en el que los marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo que consiste en NGN-3, NeuroD, Islet-1, Pdx-1, NKX6.1, Pax-4 y PTF-1 alfa.
2. Un procedimiento para diferenciar células madre pluripotenciales, que comprende las etapas de:
- a. cultivar las células madre pluripotenciales,
- b. diferenciar las células madre pluripotenciales en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo,
- c. diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, y
- d. diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático
- y en el que la expresión de marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se incrementa al tratar las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con medio que comprende una cantidad suficiente de un agonista del receptor de TGF- $\beta$  seleccionado de activina A, activina B, variantes peptídicas de activina A, y GDF-8 para causar un aumento en la expresión de marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático, en el que las células que expresan marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático están enriquecidas, y en el que los marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo que consiste en NGN-3, NeuroD, Islet-1, Pdx-1, NKX6.1, Pax-4 y PTF-1 alfa.
3. El procedimiento de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el agonista del receptor de TGF- $\beta$  se selecciona del grupo que consiste en activina A, o variantes peptídicas de activina A.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se tratan con una cantidad de activina A suficiente para causar un aumento en la expresión de marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático para:
- a. uno a cinco días;
- b. tres a cinco días; o
- c. cinco días.
5. El procedimiento de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el agonista del receptor de TGF- $\beta$  es GDF-8.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el medio comprende además un compuesto de anilina piridinotriazina cíclico.

55

60

65

Figura 1

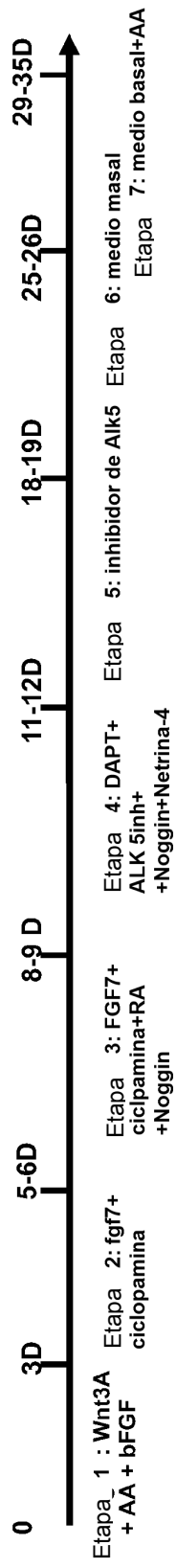
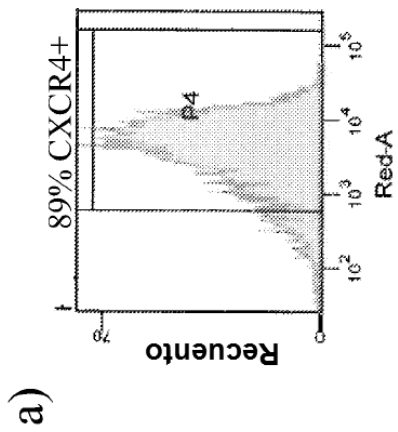
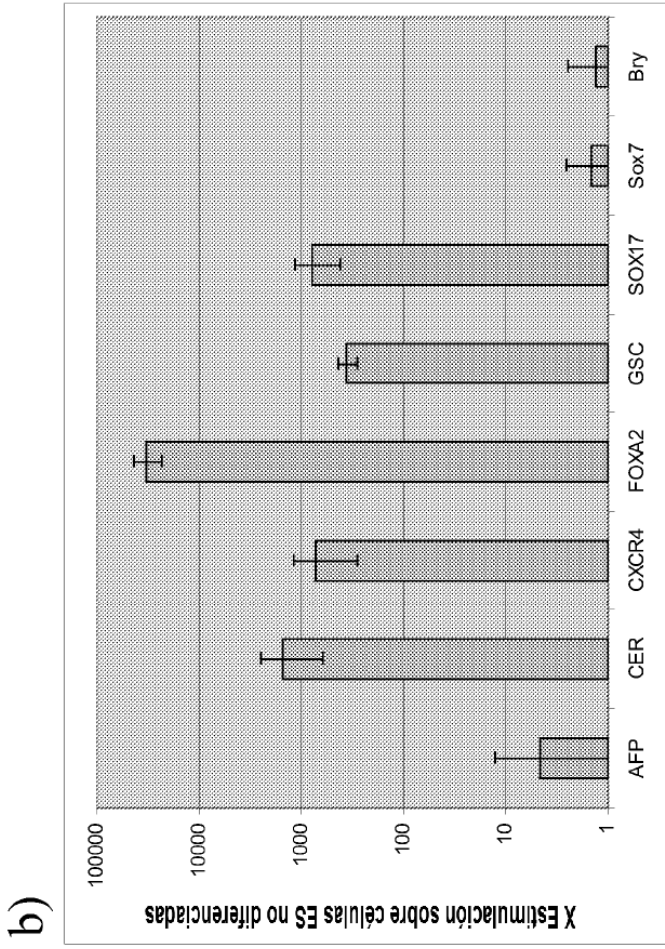
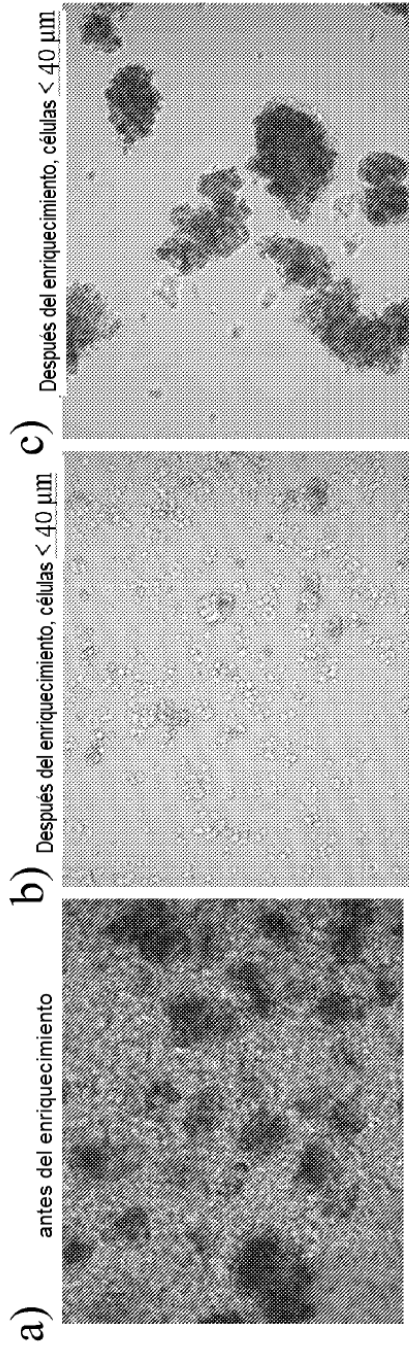


Figura 2



**Figura 3**



• > El 80% de las agrupaciones enriquecidas fueron DTZ +

Figura 4

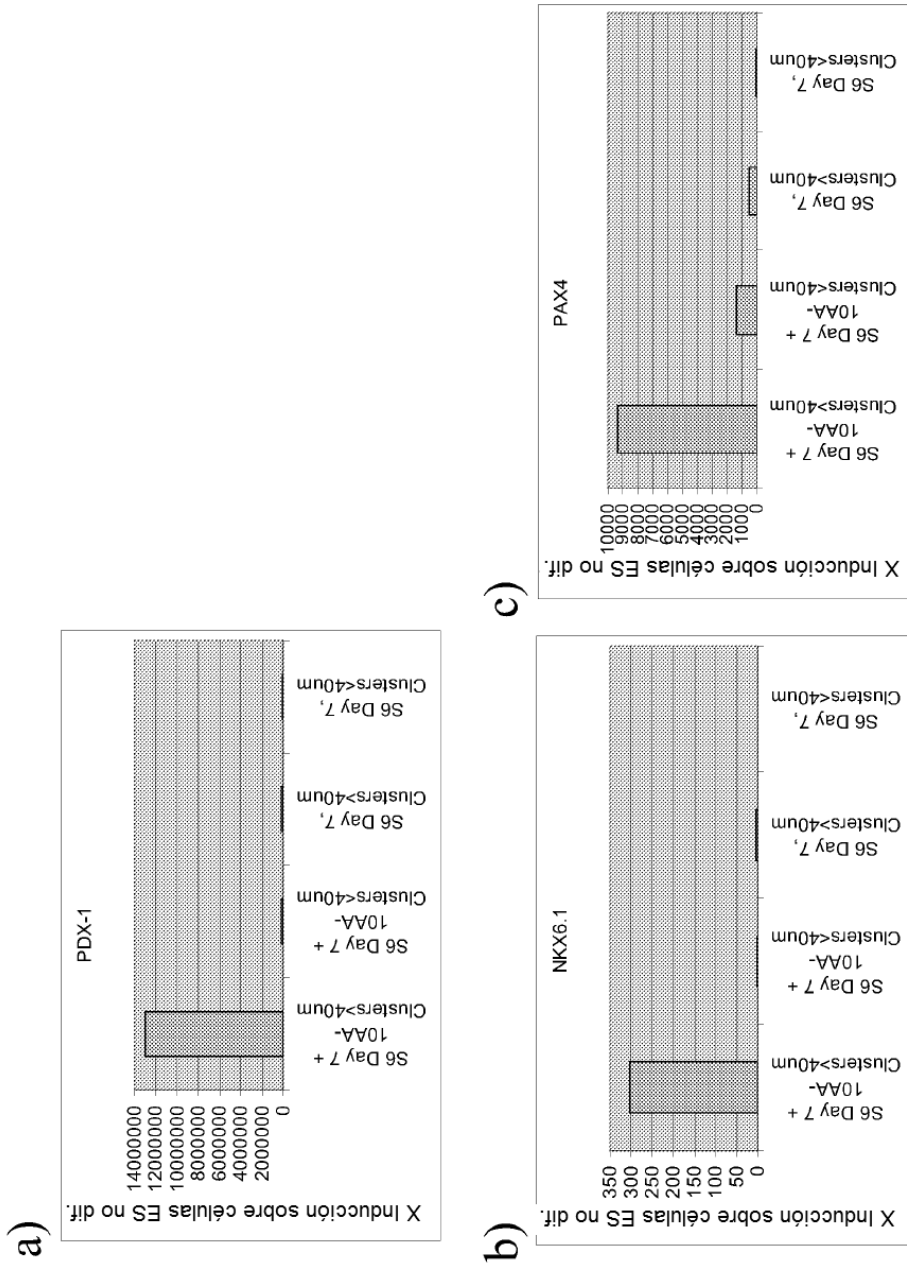
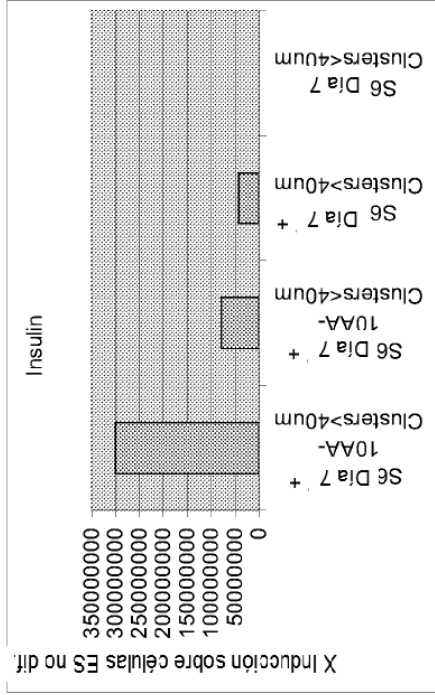
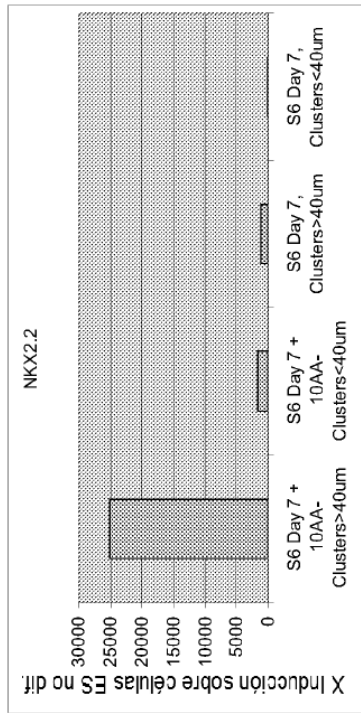


Figura 4

e)



d)



f)

