

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 704**

51 Int. Cl.:

A61K 35/39 (2015.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2013 PCT/US2013/047243**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014 WO14004341**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2013 E 13733516 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2864473**

54 Título: **Células madre y células pancreáticas útiles para el tratamiento de diabetes mellitus insulino dependiente**

30 Prioridad:

26.06.2012 US 201261664259 P

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

03.03.2020

73 Titular/es:

**SERAXIS, INC. (100.0%)
20271 Goldenrod Lane
Germantown, Maryland 20876, US**

72 Inventor/es:

RUST, WILLIAM, L.

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 745 704 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

Células madre y células pancreáticas útiles para el tratamiento de diabetes mellitus insulino dependiente

5 **Antecedentes de la invención**

A. Necesidad insatisfecha de células endocrinas pancreáticas

10 La diabetes insulino dependiente es una enfermedad caracterizada por una pérdida de las células productoras de insulina del páncreas. Las células productoras de insulina, también denominadas células "beta", normalmente residen en pequeñas estructuras esféricas denominadas "islotos de Langerhans", que se dispersan a lo largo del páncreas. Se ha comprobado en humanos y animales que el trasplante de islotos de Langerhans de reemplazo, que contienen células beta funcionales, puede curar la diabetes insulino dependiente. En este procedimiento, se purifican islotos de los páncreas de uno o más donantes de órganos fallecidos y se inyectan en uno de diversos sitios en el cuerpo. Algunos islotos sobreviven al procedimiento y establecen la residencia en el cuerpo donde producen y secretan insulina. Esto puede ser suficiente para curar al paciente durante unos pocos años, hasta el fin de la vida útil de los islotos trasplantados. Véanse Shapiro (2011) y Robertson (2010).

20 Aunque este procedimiento trata de manera eficaz la diabetes, no hay suficientes páncreas de donantes para tratar más que una pequeña fracción de pacientes diabéticos. Por esta razón son necesarias fuentes alternativas de células beta o islotos pancreáticos.

B. Fuente alternativa de células pancreáticas

25 Una posible fuente de células pancreáticas de reemplazo que ha atraído mucha atención son las células madre pluripotentes. Las células madre pluripotentes se recogen de un embrión, o pueden crearse de manera artificial dirigiendo células somáticas completamente diferenciadas a un estado similar al embrionario; es decir, "reprogramando" células adultas para parecerse a células que se recogen de un embrión. Ya sea recogiendo o reprogramando, todas las células madre pluripotentes comparten tres características:

- 30 • *Expresión de genes de células madre*: expresan genes normalmente expresados en los embriones tempranos de mamífero.
- 35 • *Inmortalidad*: pueden expandirse en cultivo hasta cantidades teóricamente ilimitadas.
- 40 • *Maduración para dar todos los linajes del cuerpo del mamífero*: todos los órganos adultos derivan de uno de los linajes de tejido del embrión temprano. Estos son el endodermo, a partir del que se forman el páncreas y otros órganos intestinales, el mesodermo, a partir del que se forman el músculo y el esqueleto, y ectodermo, a partir del que se forman el cerebro y la piel. Véanse Yamanaka (2012), Plath (2011), Lai, (2011) y Stover (2011).

45 Se han elaborado protocolos para manipular células madre pluripotentes para formar células pancreáticas. Algunos de estos protocolos son capaces de dirigir la diferenciación de células madre pluripotentes a una forma que se parece a la de los progenitores fetales de los islotos de Langerhans. Véanse Kroon (2008) y Rezanian (2011). Sin embargo, ninguno produce células pancreáticas que sean capaces de una maduración adicional para dar células productoras de insulina funcionales que pueden usarse de manera terapéutica, de la manera mencionada anteriormente.

50 Los protocolos convencionales para obtener progenitores pancreáticos tienen varios inconvenientes y desventajas, pero entre ellos estos son clave:

- 55 • Las poblaciones de progenitores pancreáticos son impuras, estando contaminadas por células no pancreáticas. Las células madre pluripotentes se predisponen para formar las tres capas germinales. Por tanto, incluso el protocolo más eficiente produce poblaciones de células pancreáticas entremezcladas con células no pancreáticas.
- 60 • Las poblaciones de progenitores pancreáticos se contaminan por células inmaduras. Estas células han retenido la propiedad de inmortalidad y pueden iniciar un tumor después del trasplante a un paciente.
- Los progenitores pancreáticos no pueden madurar para dar células beta que producen insulina completamente funcionales.
- Los protocolos para cultivar las células emplean reactivos y procedimientos que las agencias regulatorias no aceptan generalmente para uso humano.

65 Véanse Matveyenko (2010), Tahamtani (2013). Véase también el título 21, Código Estadounidense de Regulaciones Federales, parte 1271.

C. Heterogeneidad celular del páncreas adulto

Los islotes se originan durante la embriogénesis de células progenitoras que brotan a partir de los conductos pancreáticos en desarrollo. Durante la vida de un individuo sano, se producen células beta de manera exclusiva a través de la replicación de células beta existentes. Véase Dor (2004). El proceso de replicación de células beta se produce más rápidamente durante periodos de aumento de peso, embarazo y recuperación tras una lesión pancreática. Las células beta aisladas no se han replicado en cultivo anteriormente sin perder sus propiedades maduras. Véase Pagluca (2013).

No se han identificado células madre o células progenitoras pancreáticas en tejido maduro a través de experimentos de trazado de linaje. No obstante, varias publicaciones han descrito células, aisladas a partir del páncreas de mamíferos, que se dice que muestran algunas características de células madre. Estas células se han identificado en el tejido ductal, en el tejido exocrino, y en los propios islotes. Por ejemplo, véanse Gong (2012), Noguchi (2010) y Ciba (2009). Se describe que tienen una capacidad replicativa limitada y que se les induce a expresar insulina.

Además, varios documentos de patente publicados describen células madre adultas que se dice que se recogen directamente del páncreas maduro. Véanse las patentes estadounidenses n.º 6436704, n.º 6815203, n.º 7544510, n.º 8110399 y n.º 8377689, y también la solicitud estadounidense n.º 2004/0115805.

Estas poblaciones celulares no se han fabricado en una escala requerida para tratar a un paciente, y ninguna ha demostrado secretar insulina de manera apropiada en respuesta a la glucosa. Por estas razones, estas poblaciones celulares no han demostrado beneficio clínico.

Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 8377689 habla de células pancreáticas que se dice que se replican en cultivo y se les induce a expresar insulina. Sin embargo, tal como se describió, estas células tenían una capacidad replicativa limitada y no maduraban en células beta completamente funcionales o, al menos, no era capaces de revertir la diabetes en modelos de roedor. Es decir, los resultados obtenidos realmente se dice que demuestran, en un modelo de "ratón diabético", "una recuperación desde ... hiperglucemia (>400 mg/dl) hasta casi normal (<300 mg/dl) en el plazo de cinco semanas, mientras que el ratón diabético no trasplantado era hiperglucémico durante todo el periodo de estudio". Columna 45, después de la línea 18 y siguientes (énfasis añadido). En el modelo de ratón diabético, sin embargo, "normal" es aproximadamente 150 mg/dl, mientras que una lectura persistente por encima de 250 mg/dl, tal como se notificó, se considera la prueba de un estado diabético estable. Véase Dang (2013), por ejemplo.

Por tanto, el potencial de la estrategias para curar la diabetes mediante el trasplante de células beta o islotes de Langerhans sustitutos se ha desaprovechado en gran medida por la falta de una fuente escalable de células pancreáticas terapéuticas de calidad farmacéutica.

Este objeto del trabajo es distinto de la invención descrita en el presente documento debido a que se refiere al aislamiento de una célula madre a partir de un páncreas de mamífero. Esta invención se refiere al aislamiento de una célula no madre completamente madura a partir de un páncreas u otra fuente que se manipula en cultivo para adoptar características de las células madre. Este método se basa en aprovechar la diversidad genética de células maduras dentro de órganos humanos para identificar la subpoblación que puede manipularse para convertirse en una célula madre terapéuticamente útil. La diversidad genética de células presente en tejidos humanos maduros solo se ha apreciado recientemente, y la comprensión convencional es incompleta con respecto a la heterogeneidad celular dentro del páncreas maduro.

Sumario de la invención

Tal como se notificó, las técnicas actuales para crear células pancreáticas no producen células pancreáticas sustitutas eficaces, es decir, las células que pueden trasplantarse a un sitio en el cuerpo del mamífero en el que establecen la residencia y realizan una función de una célula pancreática nativa. La presente invención supera esta limitación y otras desventajas proporcionando células pancreáticas sustitutas y composiciones que contienen células que son de calidad farmacéutica, es decir, que la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y/u otras agencias regulatorias considera aceptables para uso humano. Por ejemplo, véase el título 21, Código Estadounidense de Regulaciones Federales, parte 1271]. La presente invención se refiere a los siguientes puntos:

Punto 1. Una composición que comprende progenitores no pluripotentes de células pancreáticas sustitutas que son adecuados para tratar diabetes insulino dependiente, en la que los progenitores (i) tienen una morfología de célula madre y proliferan en cultivo sin cambio en dicha morfología, (ii) se reprograman administrando genes de reprogramación en al menos un plásmido episómico y no tienen genes de reprogramación integrados en sus genomas, (iii) se diferencian para dar el linaje pancreático de acuerdo con un protocolo que emplea solo reactivos definidos, y (iv) no pueden diferenciarse para dar el linaje mesodérmico y derivan de un páncreas humano.

Punto 2. Un método para generar una composición que comprende progenitores no pluripotentes de células

pancreáticas sustitutas que son adecuados para tratar diabetes insulino dependiente, que comprende:

5 a. cultivar células humanas primarias, recogidas de tejido pancreático humano viable en condiciones de cultivo definidas, mínimas, en el que el cultivo es durante un periodo de días que es menor de 9 días; luego

b. usar genes de reprogramación para reprogramar células humanas primarias de (a) de manera que se obtienen células reprogramadas que no tienen genes de reprogramación genómicamente integrados pero que tienen una morfología de célula madre;

10 c. en primer lugar, seleccionar entre las células reprogramadas obtenidas en (b) por una capacidad para proliferar, sin perder dicha morfología, en condiciones de cultivo definidas, mínimas mediante lo cual se obtienen células reprogramadas en proliferación; y luego

15 d. en segundo lugar, seleccionar entre las células reprogramadas en proliferación por una población celular caracterizada por (i) una capacidad para sobrevivir y diferenciarse para dar el linaje pancreático en el transcurso de un protocolo que emplea solo reactivos definidos, y (ii) una incapacidad sustancial de diferenciarse para dar el linaje mesodérmico,

20 mediante lo cual se obtienen dichos progenitores no pluripotentes.

Punto 3. Un método para generar células pancreáticas sustitutas que son adecuadas para tratar diabetes insulino dependiente, que comprende:

25 a. exponer progenitores no pluripotentes del punto 1 a una primera combinación de componentes que impulsa la diferenciación para dar el linaje endodérmico, mediante lo cual se obtienen células endodérmicas, excluyendo dicha primera combinación el suero y cualquier miembro de la familia wnt; y luego

30 b. exponer dichas células endodérmicas a una combinación de componentes que impulsa la diferenciación para dar el linaje endocrino pancreático,

mediante lo cual se obtienen dichas células pancreáticas sustitutas.

35 Punto 4. El método del punto 2, en el que los genes de reprogramación se seleccionan del grupo que consiste en Oct4, Sox2, Klf4 y Myc.

40 Con respecto a la terapia celular humana generalmente, los criterios de aceptabilidad de las agencias regulatorias en todo el mundo enfatizan la seguridad y eficacia de las células empleadas. Las preocupaciones de seguridad centrales en este contexto son (i) la tendencia de las células a formar un tumor y (ii) el riesgo de transferencia de partículas tóxicas, inmunógenas o infecciosas a partir de los reactivos derivados de animales, con los que las células pueden haber entrado en contacto. Los criterios de eficacia incluyen que la población celular sea potente para la función celular dada y estable a los largo del periodo de tratamiento eficaz.

45 Por consiguiente, una composición que contiene células pancreáticas sustitutas de la invención (1) no contiene células no terapéuticas que disminuyen la potencia o realizan funciones no deseadas, pero sus células terapéuticas constituyentes (2) se cultivan usando componentes definidos de origen no animal, según las normas aceptadas internacionalmente, y (3) no son modificadas genéticamente, transformadas, cariotípicamente anómalas, o caracterizadas de otra forma por un riesgo inaceptablemente alto inestabilidad o oncogénesis.

50 Según uno de los aspectos de la invención, por tanto, se proporciona una composición que comprende progenitores no pluripotentes de células pancreáticas sustitutas. Los progenitores (i) no tienen genes de reprogramación integrados en sus genomas, (ii) se diferencian para dar el linaje pancreático de acuerdo con un protocolo que emplea solo reactivos definidos, y (iii) no pueden sustancialmente diferenciarse para dar el linaje mesodérmico.

55 Además se proporciona un método, según otro aspecto de la invención, para generar una composición que comprende tales progenitores no pluripotentes de células pancreáticas sustitutas que son adecuados para tratar diabetes insulino dependiente. El método de la invención comprende:

a. recoger células humanas de tejido pancreático humano viable en condiciones de cultivo definidas, mínimas;

60 b. cultivar las células humanas primarias durante un periodo de días que es menor de aproximadamente 9 días; luego

65 c. usar genes de reprogramación para reprogramar células humanas primarias de (b) de manera que se obtienen células reprogramadas que no tienen genes de reprogramación genómicamente integrados pero que tienen una morfología de célula madre;

d. en primer lugar, seleccionar entre las células reprogramadas obtenidas en (c) por una capacidad para proliferar, sin perder la morfología de célula madre, en condiciones de cultivo definidas, mínimas mediante lo cual se obtienen células reprogramadas en proliferación; y luego

5 e. en segundo lugar, seleccionar de entre las células reprogramadas en proliferación por una población celular caracterizada por (i) una capacidad para sobrevivir y diferenciarse para dar el linaje pancreático en el transcurso de un protocolo que emplea solo reactivos definidos, y (ii) una incapacidad sustancial para diferenciarse para dar el linaje mesodérmico,

10 mediante lo cual se obtienen los progenitores no pluripotentes mencionados anteriormente.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende células pancreáticas sustitutas, adecuadas para tratar diabetes insulínica, en la que (A) las células pancreáticas sustitutas derivan de los progenitores no pluripotentes descritos anteriormente y (B) más de aproximadamente el 90% de las células que
15 comprenden la composición expresan los marcadores Pdx1, Nkx6.1 y NeuroD1. La invención proporciona además un método para generar tales células pancreáticas sustitutas, método que comprende:

a. exponer los progenitores no pluripotentes a una primera combinación de componentes que impulsa la diferenciación para dar el linaje endodérmico, mediante lo cual se obtienen células endodérmicas, excluyendo la
20 primera combinación el suero y cualquier miembro de la familia wnt; y luego

b. exponer las células endodérmicas a una combinación de componentes que impulsa la diferenciación para dar el linaje endocrino pancreático,

25 mediante lo cual se obtienen las células pancreáticas sustitutas en cuestión.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 representa la recolección de células a partir de un órgano humano. Es decir, un páncreas humano viable se pica en fragmentos (A), que luego se aclaran y se sedimentan en un tubo cónico (B). Se obtienen células adherentes (C) después de 72 horas en cultivo. En las condiciones de cultivo definidas proporcionadas, los cultivos celulares respectivamente comprendían una población mixta de células, que presentan morfologías epiteliales y fibroblásticas. No hubo evidencia de morfologías de células madre o células mesenquimatosas.

35 La figura 2 ilustra esquemáticamente la organización de genes en plásmidos episómicos de reprogramación. Abreviaturas - - CMV: promotor de citomegalovirus, 2A: secuencia peptídica de autoescisión, WPRE: elemento de respuesta postranscripcional del virus de la hepatitis Woodchuck, Poli A de VS40: señal de poliadenilación, OriP: origen de replicación, EBNA1: antígeno nuclear de Epstein Barr 1, p53shRNA: ARN de horquilla corta que selecciona como diana p53.

40 La figura 3 presenta una fotomicrografía de células reprogramadas. La imagen de contraste de la fase muestra que las células presentan morfología de célula madre 20 días después de la reprogramación.

45 La figura 4 es un gráfico de barras que ilustra la proliferación en cultivo de colonias celulares seleccionadas por su visualización de la morfología de célula madre. Las diez colonias de células que se parecen a las células madre mostradas en la figura 3 se transfirieron de manera manual a recipientes de cultivo individuales. Cuando la superficie de crecimiento quedó cubierta por una capa confluyente de células madre, se pasaron las células a nuevos recipientes de cultivo. La proliferación de las células transferidas se rastreó a lo largo del tiempo contando el número de células presente al comienzo y al final de tres pases consecutivos. El número de células se contó de manera
50 manual, usando un hematocitómetro, y se calculó el tiempo de duplicación para cada clon. Seis de los diez clones seleccionados demostraron ser capaces de proliferar en medio definido mínimo.

La figura 5 presenta fotomicrografías de la A a la D, que representan los resultados de la selección aplicada a los seis clones mencionados anteriormente que proliferaron en medio definido mínimo. Dos de los seis clones sobrevivieron al procedimiento de diferenciación, que empleó reactivos definidos, mínimos. Solo una fracción (<50%) de células del clon 9 sobrevivieron a la diferenciación, produciendo por otra parte pequeñas balsas de células en las placas de cultivo de tejidos vacías (A, C). La inmunocitofluorescencia reveló que se expresó Pdx1 en los núcleos de algunas de las células (A), pero apareció citoplásmico en otras (C). De manera similar, pareció que se expresaba Nkx6.1 en el núcleo (C). Al menos el 80% de las células del clon 10 sobrevivieron al procedimiento de diferenciación,
60 produciendo una monocapa confluyente de células (B, D) en las placas de cultivo. Se expresaron Pdx1 (B,D) y Nkx6.1 (D) en el núcleo de >90% de las células. Por tanto, solo los clones 9 y 10 sobrevivieron al procedimiento de diferenciación. El clon 9 sobrevivió de manera escasa, y las células no expresaron de manera apropiada los genes pancreáticos. Este clon se rechazó. Más del 80% de las células del clon 10 sobrevivieron al procedimiento de diferenciación, y más del 90% de las células expresaron genes pancreáticos de manera apropiada. Se seleccionó este clon.
65

La figura 6 incluye gráficos de barras que representan los resultados de análisis de RT-qPCR de expresión génica. Los cuerpos embrioides de los clones 5-9 expresaron genes que son representativos de endodermo, mesodermo y ectodermo en los días tres y diez de diferenciación. Sin embargo, el clon 10 no expresó genes representativos de mesodermo. De manera simultánea con la diferenciación, todos los cuerpos embrioides regularon por disminución la expresión de genes relacionados con la pluripotencia en los días tres y diez. Los resultados se normalizaron a beta-actina y se muestran en relación a los cultivos del día 0 (no diferenciados). Las barras de error representan la desviación estándar de tres repeticiones.

La figura 7 presenta un gráfico de barras que muestra los resultados experimentales que confirman que el clon 10 fue incapaz de diferenciarse hacia el linaje mesodérmico. Los clones 5 y 10 se dirigieron a diferenciarse hacia el linaje de cardiomiocitos mesodérmicos, siguiendo un protocolo que generó una población muy pura de cardiomiocitos a partir de células madre pluripotentes. Véase Xu (2009). En el día 15, se cuantificaron la expresión génica de factores de crecimiento cardiacos específicos (Gata4, Nkx2.5) y una proteína estructural (alfa-MHC) mediante RT-qPCR. El clon 5 reguló por incremento la expresión de genes cardiacos, mientras que el clon 10 mantuvo los niveles de expresión génica cardiaca similares a las células no diferenciadas. Los resultados se presentan como en la figura 6 (véase el comentario relacionado anterior).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

A. Enfoque de la invención para suministrar células pancreáticas sustitutas de calidad farmacéutica

Entre la diversidad de células presentes dentro del páncreas adulto, se ha descubierto una subpoblación de células que pueden explotarse para la derivación de una célula terapéutica, tal como se describió anteriormente. Estas células no son células madre o células progenitoras pancreáticas, sino que son miembros de una población celular madura de composición genética diversa que albergan un rasgo genético específico que las hace susceptibles a las manipulaciones descritas en detalle a continuación. Por consiguiente, un aspecto clave de la invención es la recolección de células a partir de un órgano adulto de manera que se mantiene una población diversa, incluyendo la subpoblación identificada por el presente inventor. Véase el ejemplo 1, a continuación.

Otro aspecto importante de la invención es la reprogramación a un estado de célula madre de la población diversa mencionada anteriormente, cada célula de las que pueden expandirse para análisis y selección (véanse los ejemplos 2 y 3). La reprogramación debe llevarse a cabo de una manera que no produzca la integración de ningún gen de reprogramación en el genoma de las células o que limite de otra manera la autorización regulatoria de las células para uso terapéutico humano.

Un aspecto importante adicional de la invención es la selección, de entre la población de células reprogramadas, de las células madre que tienen la propiedad única, revelada por primera vez por el inventor, de ser una fuente para las células pancreáticas sustitutas de calidad farmacéutica. Los criterios de selección difieren de los de la pluripotencia, que es el objetivo de la metodología convencional. Como consecuencia se obtienen células, de acuerdo con la invención, que no son pluripotentes y sin embargo han mejorado la utilidad clínica (véase el ejemplo 4).

El uso de genes de reprogramación para derivar células madre pluripotentes es un procedimiento ineficiente, que da como resultado la reprogramación de solo del 0,01 al 0,0001% de células que cumplen con los criterios de pluripotencia. En la bibliografía científica estas células se denominan "células madre pluripotentes inducidas" o células iPS. En enfoques convencionales, las células que no pueden cumplir los criterios para la pluripotencia se rechazan; estas células se denominan comúnmente "incompletamente reprogramadas" o "parcialmente reprogramadas".

El genotipo de una colonia de células iPS puede contener una variación genética específica que está presente en la población celular original solo a muy baja frecuencia. Por consiguiente, el procedimiento de reprogramación puede identificar y seleccionar genotipos representados por solo una pequeña minoría de la población celular de partida.

A partir de los hechos (i) que la reprogramación es un procedimiento ineficiente y (ii) que los genotipos de células iPS son diferentes frecuentemente de la célula tipificante de la población de partida, el presente inventor supuso que una alteración genética específica puede predisponer una célula a una reprogramación exitosa a una célula iPS. Por tanto, el inventor percibió que las células rechazadas previamente como incompletamente reprogramadas pueden albergar una rara alteración genética que las predispone a un fenotipo de célula no iPS, hasta ahora no reconocida como tal, que sin embargo tiene valor para el presente propósito terapéutico.

Las poblaciones celulares recién recogidas a partir de órganos humanos tienen una gama mucho mayor de diversidad celular que las poblaciones de células cultivadas por un periodo prolongado de tiempo. El inventor aplicó genes de reprogramación a poblaciones celulares recién recogidas, para identificar y seleccionar una célula con una utilidad clínica específica, tal como se mencionó anteriormente. Por tanto, una célula identificada no es una célula madre pancreática, tal como lo demuestran los hechos que las células identificadas (1) no son replicativas y por el contrario desaparecen en un cultivo de larga duración, (2) no presentan morfología de célula madre, y (3) pueden aislarse a partir de tejidos que no contienen células madre pancreáticas supuestas. (Se hipotetiza que las células

madre pancreáticas supuestas existen en los conductos pancreáticos.) Véase el ejemplo 1, al final.

Las células de esta invención que se recolectan a partir del páncreas adulto no requieren suero para su aislamiento, no presentan morfología de célula madre, y no se requiere que se aislen a partir de fracciones específicas de subpoblaciones celulares pancreáticas purificadas. Todo esto contrasta fuertemente con lo que describe la patente estadounidense n.º 8377689, por ejemplo.

De acuerdo con la invención, por tanto, puede usarse tejido nuevo de páncreas humano como fuente de células de la que identificar y seleccionar una población de células no madre que se predispone a ser una fuente para células pancreáticas sustitutas, capaces de tratar diabetes insulino dependiente. En particular, tal como se describe en detalle a continuación, las células pueden reprogramarse en el plazo de una semana de la recolección a partir del órgano para adoptar el estado de célula madre.

Las células madre resultantes se seleccionaron sobre la base de una capacidad (1) para diferenciar de manera eficiente a células progenitoras endocrinas pancreáticas, que pueden someterse ellas mismas a tratamiento de diabetes insulino dependiente tal como se describió anteriormente, y (2) para sobrevivir y diferenciarse para dar condiciones mínimas de cultivo que son tanto escalables como generalmente aceptables por las autoridades regulatorias. “De manera eficiente” en este sentido connota producir una población celular al final del procedimiento de diferenciación que se compone de al menos aproximadamente el 80% de células progenitoras endocrinas; más preferiblemente, al menos aproximadamente el 90% de células progenitoras endocrinas. Las “células progenitoras endocrinas” son células que madurarán para dar las células productoras de hormonas de los islotes de Langerhans. Estas células se caracterizan, por ejemplo, por la expresión simultánea de los genes Pdx1, Nkx6.1 y NeuroD1. En este sentido “sobrevivir” denota una capacidad de al menos aproximadamente el 80% de la población celular viable de partida, y preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, que es viable al final del procedimiento de diferenciación.

Más específicamente, los compuestos que dirigen la diferenciación hacia el linaje del endodermo son tóxicos para las células madre pluripotentes. Los protocolos convencionales emplean suero para potenciar la supervivencia celular, por tanto; con suero, la supervivencia celular puede superar el 50%. El suero es un reactivo indefinido, sin embargo, que generalmente no es deseable para las agencias regulatorias para el cultivo de células terapéuticas humanas.

A diferencia de los protocolos convencionales, el enfoque de la presente invención elimina el suero, mediante lo cual las células resultantes pueden considerarse adecuadas para una terapia celular humana. Además, los protocolos convencionales emplean wnt, un factor de crecimiento que es caro y extremadamente lábil. La invención ha eliminado el uso de wnt, para proporcionar de ese modo un procedimiento que es consistente y escalable.

Evitando el uso tanto de suero como de wnt, la metodología de la invención no es eficaz en la impulsión de diferenciación eficiente de una célula madre pluripotente. Por otro lado, las células de una composición según la invención se seleccionan para responder y sobrevivir a este nuevo enfoque. Por tanto, más de aproximadamente el 80% de células seleccionadas según la invención, preferiblemente más de aproximadamente el 90% de células, sobreviven al procedimiento de diferenciación. Además, de las células supervivientes más de aproximadamente el 80%, y preferiblemente más de aproximadamente el 90%, expresan simultáneamente Pdx1, Nkx6.1 y NeuroD1, marcadores del linaje endocrino pancreático (véase el ejemplo 3, último párrafo).

Durante el procedimiento de identificación y selección de esta invención, se ignoran los criterios de selección para células madre pluripotentes, y las células creadas de acuerdo con la invención ya no son pluripotentes; es decir, carecen de la capacidad para diferenciar sustancialmente a un linaje no pancreático. “Sustancialmente” en este contexto significa que al menos aproximadamente el 5%, preferiblemente al menos aproximadamente el 10%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 20% de la población de células diferenciadas demuestra características específicas para un linaje no pancreático.

Por ejemplo, las células producidas por la invención se sometieron a un protocolo comúnmente usado para derivar una mezcla de los tres linajes, mesodérmico, endodérmico y ectodérmico. Para demostrar una capacidad para diferenciar en una mezcla de los tres linajes, es una práctica convencional proporcionar un medio que no produce la diferenciación de un linaje en favor de otro, tal como el suero, a una suspensión de agrupamientos de células madres, que permite el crecimiento y la diferenciación espontáneos. En tales condiciones de cultivo los agrupamientos de células madres se diferenciarán según su programación genética, no específicamente guiada por las condiciones de cultivo proporcionadas. Por tanto, los agrupamientos formados se denominan “cuerpos embrioides” por su parecido a un embrión temprano de mamífero. Véase Rust (2006). Las células pluripotentes producirán cuerpos embrioides que contienen, al modo de un embrión de mamífero, las tres capas germinales: el ectodermo, endodermo y mesodermo. Sin embargo, a diferencia de las células madre pluripotentes, la mezcla creada a partir de células de la presente invención no incluirá células del linaje mesodérmico (véase el ejemplo 4, por ejemplo, en el quinto párrafo).

Además, las células de la invención se sometieron a un protocolo comúnmente empleado para diferenciar células

madre pluripotentes a cardiomiocitos, que son células del linaje mesodérmico. De nuevo, al contrario que las células madre pluripotentes, las células de la invención no pueden expresar genes relacionados con cardiomiocitos en respuesta al protocolo de diferenciación. El examen visual reveló que ninguna de las células descritas por esta invención presentaba la morfología latiente típica de los cardiomiocitos. Por tanto, menos de aproximadamente el 5% de células respondieron a un protocolo usado en el campo para derivar cardiomiocitos a partir de células madre pluripotentes (véase el ejemplo 4, por ejemplo, en sus párrafos sexto y séptimo).

Las células madre creadas según la presente invención tienen las siguientes propiedades, no descritas hasta ahora:

- constituyen una población de células madre de renovación derivadas a partir de un páncreas humano nuevo;
- se predisponen a diferenciarse de manera eficiente en poblaciones sustancialmente puras (es decir, $\geq 80\%$ o $\geq 90\%$) de células pancreáticas sustitutas capaces de tratar diabetes insulino dependiente;
- carecen de una integración genómica de genes exógenos; y
- derivadas, reprogramadas y cultivadas usando reactivos y procedimientos que se consideran aceptables generalmente para el uso humano por las agencias regulatorias.

Las células pancreáticas sustitutas obtenidas de acuerdo con la invención también tienen propiedades que no se han descrito previamente. Estas propiedades son:

- constituyen una población sustancialmente pura de células terapéuticas (es decir, $\geq 80\%$ o $\geq 90\%$), no contaminada por células madre con potencial oncógeno;
- se diferenciaron usando reactivos y procedimientos que se consideran aceptables generalmente para el uso humano por las agencias regulatorias y que son escalables; y
- carecen de integración genómica de genes exógenos.

B. Guía para la implementación del enfoque de la invención

1. Obtención de células pancreáticas nativas sin sacrificar la diversidad

Los métodos actuales para recoger células de órganos producen que las células se cultiven a lo largo del tiempo. Como resultado, se favorece una subpoblación de células proliferativas que se adaptan a las condiciones de cultivo, superando a la población para crear un cultivo celular homogéneo. Este fenómeno, a menudo denominado “deriva de cultivo” se produce como poco en diez duplicaciones de población.

Por el contrario, la presente invención especifica que las células recogidas a partir de un órgano maduro no pueden cultivarse a largo plazo, preferiblemente una semana o menos, con menos de 5 duplicaciones de población. Esto impide que la población celular se adapte a las condiciones de cultivo y minimiza la oportunidad para que células de crecimiento rápido superen a la población y reduzcan la diversidad global de la población.

2. Reprogramación de células sin integración o expresión a largo plazo de genes de reprogramación

Cuatro genes, Oct4, Sox2, Klf4 y Myc, harán que una célula madura adopte las propiedades de una célula madre. Estos “genes de reprogramación” deben expresarse en la misma célula que va a reprogramarse, y se administran comúnmente a través de virus que insertan los genes en el genoma del huésped, en el que pueden expresarse.

Las células que tienen genes insertados de manera aleatoria en sus genomas no son aceptadas generalmente por las autoridades regulatorias para trasplantar a humanos. Esto es debido a que las células así modificadas presentan un mayor riesgo de oncogénesis que las células no manipuladas.

La presente invención implica administrar genes de reprogramación en plásmidos que no integran los genes en el genoma y, por tanto, que efectúa su expresión solo de manera temporal. Mientras que en el núcleo los genes transportados por un plásmido pueden transcribirse por complejos de transcripción nuclear del huésped. Véase Takacs (2010).

En una realización preferida, los genes se administran en plásmidos episómicos. “Episómico” califica los plásmidos que pueden persistir en el núcleo de una célula pero no se incorporan en ningún cromosoma de la célula (Takacs, citado anteriormente). A lo largo del tiempo, los plásmido episómicos se diluyen a partir de la población celular debido a que no se replican y segregan durante la mitosis. Además, los plásmidos episómicos pueden eliminarse del núcleo o pueden degradarse.

Un miembro de la familia myc comúnmente usado para reprogramar, C-myc, es un oncogén conocido. En una

realización preferida, la presente invención emplea L-myc, que no es un oncogén, en lugar de C-myc. Véase Nakagawa (2010).

3. Selección de células con utilidad terapéutica

Las células que se reprograman son distinguibles de las células no reprogramadas presentando la morfología de célula madre típica. Las células madre típicas son pequeñas y redondas, tienen un núcleo prominente y un pequeño citoplasma, y crecen en agrupamientos estrechos.

Una fracción relativamente pequeña pero discernible de estas células reprogramadas son la fuente para las células pancreáticas sustitutas de calidad farmacéutica, de acuerdo con la presente invención. Esta fracción se identifica en virtud de satisfacer los criterios detallados a continuación.

- una capacidad para proliferar en condiciones de cultivo compuestas por componentes definidos de origen no animal

- una capacidad para responder a un protocolo mínimo de diferenciación diferenciándose en una población sustancialmente pura de células pancreáticas, es decir, una población compuesta por al menos aproximadamente el 80%, preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, de células que expresan genes característicos de progenitores endocrinos pancreáticos y que pueden madurar en células productoras de hormonas de los islotes de Langerhans. El protocolo de la invención se diseña para impulsar las células afectadas a lo largo de una ruta de diferenciación que recapitula la ruta que las células madre del cuerpo humano deben seguir en el desarrollo del páncreas. Por consiguiente, el protocolo imita el desarrollo humano con la fidelidad suficiente para producir una célula pancreática que es indistinguible de una célula pancreática que puede aislarse de un neonato o feto humano en desarrollo. A diferencia de las técnicas convencionales, el protocolo según la invención también usa solo componentes de origen no animal, definidos que pueden ser parte de un procedimiento de fabricación escalable de calidad farmacéutica. Es decir, el protocolo de la invención no emplea ni suero, usado anteriormente para potenciar la supervivencia celular, ni un miembro de la familia wnt, un factor de crecimiento que es extremadamente lábil y costoso.

- una capacidad de la población para sobrevivir al procedimiento de diferenciación de manera que una gran población de células pancreáticas puede producirse de manera eficiente.

Tal como se ha indicado, "sobrevivir" indica una capacidad de al menos aproximadamente el 80% de la población celular viable de partida, y preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, que es viable al final del procedimiento de diferenciación.

Seleccionando, según esta invención, las células que se predisponen a formar células pancreáticas, se seleccionan contra células que tienen la característica de pluripotencia de la maduración eficiente para dar los tres linajes del cuerpo humano. En particular, las células que constituyen la fracción mencionada anteriormente que cumple estos criterios no son pluripotentes debido a que son incapaces de diferenciarse sustancialmente en células del linaje mesodérmico, es decir, al menos aproximadamente el 5%, preferiblemente al menos aproximadamente el 10%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 20% de la población de células diferenciadas demostró características específicas del linaje mesodérmico.

C. Ejemplos

1. Recolección de células pancreáticas primarias usando solo reactivos definidos de origen no animal

Se aclaró un páncreas humano a fondo en DMEM complementado con 5X antibiótico/antimicótico (penicilina, estreptomycin, anfotericina. Life Technologies). Se picó una pequeña porción del tejido en fragmentos no mayores de 2 mm de diámetro. Se transfirió el tejido picado a un tubo cónico de 50 ml y se dejó sedimentar por gravedad (figura 1 A,B). Se reemplazó el medio con DMEM recién preparado complementado con 5X antibiótico/antimicótico y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se reemplazó el medio con medio de cultivo primario, compuesto por DMEM/F12, ácido L-ascórbico-2-fosfato (64 mg/l), Na-selenio (14 µg/l), insulina (19,4 mg/l), NaHCO₃ (543 mg/l), transferrina (10,7 mg/l), TGF beta1 (2 µg/l), bFGF (10 µg/l), heparina (50 µg/l) e hidrocortisona (100 nM). Se ajustó el medio hasta pH 7,4 y 340 mOSM.

Una variación del protocolo anterior empleó medio Essential 8 (Life Technologies) complementado con EGF (100 µg/l), trombina (1 U/ml) e hidrocortisona (100 nM). En otra variación, se usó tejido de páncreas fraccionado adquirido de Prodo Labs (Irvine, CA) en lugar de un páncreas humano completo; es decir, se fraccionó el tejido de páncreas en preparaciones de islotes y preparaciones ductales. En aún otra variación, se usó una biopsia en sacabocados de la piel. Estas variaciones no efectuaron ningún cambio sustancial en el resultado.

Se añadió colagenasa libre de origen animal, calidad AFA (Worthington Biochemical) en la cantidad de 50 mg/ml al medio y se colocó el matraz de cultivo durante la noche en una estufa de incubación humidificada a 37°C. Al día

siguiente, se desintegraron los grupos celulares restantes mediante trituración. Se transfirió la disolución a un tubo cónico y se centrifugó durante 4 minutos a 200XG. Se aspiró el medio y se resuspendió el sedimento celular en medio de cultivo primario. Luego se transfirieron las células a un matraz de cultivo celular recubierto previamente con CELLstart (Invitrogen) y se devolvieron a la estufa de incubación. Después de 24 horas, las células se habían adherido a la placa y comenzaron a proliferar (véase la figura 1, imagen C).

En una variación de este protocolo, se reemplazó la colagenasa con 1X TrypLE Select (Life Technologies). En una variación adicional, se reemplazó CELLstart con placas recubiertas con 1X VitronectinXF (Stem Cell Technologies). No se produjo ningún cambio sustancial en relación con ninguna variación.

Cuando el cultivo celular creció hasta casi la confluencia sobre la superficie de crecimiento, se disociaron mediante la adición de TrypLE Select (Life Technologies), y se recogieron para reprogramarlas. Este procedimiento, que empezó con la recepción del páncreas, no duró más de 9 días. Se crioconservaron las células en exceso en CTS Synth-a-freeze (Life Technologies), según las instrucciones del fabricante. En una variación, que no efectuó ningún cambio sustancial, se crioconservaron las células en exceso en medio de cultivo primario complementado con DMSO al 10%.

2. Reprogramación de células pancreáticas usando solo vectores génicos no integrantes y reactivos definidos de origen no animal

Se disociaron cultivos a células individuales usando TrypLE Select. Se contó la suspensión de células individuales usando un hematocitómetro. Se transfirieron 1,5E6 células a un nuevo tubo cónico y se centrifugaron durante 4 minutos a 200XG. Se resuspendió el sedimento en disolución V (Lonza), complementado con 7,5 µg de plásmido de reprogramación 1 y 12,5 µg de plásmido de reprogramación 2 (figura 2), y se añadió a una cubeta de electroporación. Los plásmidos de reprogramación 1 y 2 son plásmidos no integrantes, episómicos. Los genes usados en los plásmidos de reprogramación se han descrito, por ejemplo, por Takahashi (2006). Se usó L-myc en lugar de C-myc, un conocido oncogen. Véase Nakagawa (2010). Se insertó la cubeta rápidamente en un dispositivo Nucleofector de Lonza y se sometió a electroporación usando el programa T-024.

Se diluyeron las células electroporadas en medio de cultivo de reprogramación y se transfirieron a placas cubiertas previamente con CELLstart. El medio de cultivo de reprogramación estaba compuesto por: DMEM/F12, ácido L-ascórbico-2-fosfato (64 mg/l), Na-selenio (14 µg/l), insulina (19,4 mg/l), NaHCO₃ (543 mg/l), transferrina (10,7 mg/l), TGF beta1 (2 µg/l), bFGF (10 µg/l) y heparina (50 µg/l). Se ajustó el medio hasta pH 7,4 y 340 mOSM. Alternativamente, se diluyeron las células electroporadas en medio Essential 6 (Life Technologies) complementado con bFGF 100 ng/ml (Sigma), butirato de sodio 100 µM (Sigma) e hidrocortisona 100 nM (Sigma).

Se renovó el medio cada 2 días. Opcionalmente, se complementó el medio con ácido valproico 2 mM (Sigma) durante 4-10 días. Se sometieron a pase las células cuando habían alcanzado la confluencia, usando TrypLE. En el día 20, habían aparecido las colonias de células con morfología de célula madre (figura 3).

3. Identificación y selección de células útiles para tratar diabetes insulino dependiente

Se disociaron de manera manual diez colonias de células con morfología de célula madre a partir del sustrato en pequeños grupos de células y se transfirieron a placas de cultivo de tejido nuevas, cubiertas previamente con CELLstart, y se cultivaron con medio de cultivo de reprogramación. En una variación de este protocolo, se transfirieron las colonias con morfología de células madre a placas de cultivo de tejido cubiertas previamente con Vitronectin XF (Stem Cell Technologies).

De las diez colonias así obtenidas, seis continuaron proliferando sin un cambio en su morfología. Se calculó el tiempo de duplicación de las poblaciones celulares sobre los pases 1-3 (figura 4).

Luego se transfirieron las colonias de células en proliferación a pocillos de placas de cultivo de tejido de 6 pocillos, cubiertas previamente con CELLstart, y se dejaron crecer hasta casi la confluencia. En casi la confluencia, se sometieron las células a un protocolo para impulsar la diferenciación para dar el linaje pancreático. Alternativamente, se transfirieron las células a pocillos de placas de cultivo de tejido de 6 pocillos cubiertas previamente con Vitronectin XF (Stem Cell Technologies).

Nuevo protocolo para impulsar la diferenciación de células madre para dar el linaje pancreático: se reemplazó el medio con DMEM/F-12 complementado con albúmina sérica humana (HSA) al 0,2%, 0,5XN2 (Life Technologies), 0,5XB27 (Life Technologies), activina A 100 ng/ml y wortmanina 1µM (Sigma). Se renovó el medio después de 2 días. En el día 4, las células expresaron genes característicos del linaje del endodermo Sox17, HNF3β y HNF4α. En el día 5, se reemplazó el medio con IMDM/F-12 complementado con HSA al 0,5%, ácido retinoico 2 µM (Sigma), Noggin 50 ng/ml, FGF7/KGF 10 ng/ml e insulina-transferrina-selenio al 0,5% (BD Biosciences). Se renovó el medio en el día 7. En el día nueve, se reemplazó el medio con DMEM complementado con ITS al 1%, 1XN2 y EGF 50 ng/ml. Se renovó el medio en los días 11 y 13. En el día 15, las células expresaron simultáneamente genes

característicos de células pancreáticas a partir de los cuales deriva el páncreas endocrino Pdx1, Nkx6.1 y NeuroD.

De las seis colonias solo dos fueron capaces de sobrevivir al procedimiento de diferenciación. La supervivencia se define como al menos el 80% de las células sometidas al procedimiento de diferenciación que permanecen después de la diferenciación. En el día quince, se fijaron los dos cultivos supervivientes usando paraformaldehído al 4% y se prepararon para la inmunocitofluorescencia. Se visualizó la expresión de las proteínas Pdx1 y Nkx6.1 mediante incubación primaria con anticuerpos anti-Pdx1 y anti-Nkx6.1, e incubación secundaria con anticuerpos secundarios acoplados a fluorescencia. De los dos cultivos solo uno mantuvo un cultivo casi confluyente compuesto por células bpositivas Pdx1 y Nkx6.1 casi exclusivamente (figura 5). El recuento de núcleos en varias imágenes fluorescentes del clon 10 revelaron que >95% de células expresaron Pdx1 y Nkx6.1.

4. Pruebas para determinar la pluripotencia

Se diferenciaron los clones 5-10 para dar las tres capas germinales primarias para determinar si estas células madre eran pluripotentes. El protocolo de diferenciación, comúnmente usado por los expertos en la técnica, permite la diferenciación de células madre en “cuerpos embrioides”. Véase [Rust 2006]. La diferenciación se evaluó mediante análisis de RT-qPCR de expresión génica.

Se cultivaron dos pocillos de las placas de seis pocillos que contenían cada uno los clones 5-10 durante cinco minutos en dispa (Stem Cell Technologies) y se disociaron de manera manual rascando con una punta de pipeta. Se transfirió el medio que contenía los grupos celulares a un tubo cónico y se centrifugó a 90XG durante 5 minutos. Se aclaró el sedimento celular en DMEM (Gibco) y se resuspendió en RPMI complementado con reemplazo de suero al 20% (Invitrogen) y penicilina/estreptomina al 0,5% vol./vol. (Gibco).

Se transfirieron los sedimentos celulares a pocillos de una placa de baja adhesión de seis pocillos y se cultivaron durante 15 días. Se cambió el medio cada 2-3 días. En el plazo de dos días, los cuerpos embrioides habían comenzado a formarse. Se recogieron alícuotas de los cuerpos embrioides en los días 0, 3 y 10 y se analizaron mediante RT-PCR. Se aisló el ARN total usando el kit RNeasy (Qiagen), se trató con ADNasa en filtro y se cuantificó mediante absorción de UV. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, un total de 1 µg de ARN se convirtió a ADNc, usando transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV) (New England Biolabs) y cebadores hexámeros aleatorios.

Se realizó PCR cuantitativa con 50 ng de cada reacción de transcriptasa inversa, 250 nM de cada cebador y mezcla madre de PCR verde 1XSYBR (Bio-RAD) y se analizó mediante un termociclador iCycler (Bio-RAD). Los pares de cebadores se enumeran en la tabla 1. La expresión se calculó basándose en la curva de calibración, normalizada a beta-actina y hecha en relación al día 0 (células no diferenciadas).

Tabla 1. Cebadores usados para RT-qPCR

Gen	Cebador directo	Cebador inverso
Oct4	GGCAACCTGGAGAATTTGTT	GCCGGTTACAGAACCACACT
Nanog	TACCTCAGCCTCCAGCAGAT	TGCGTCACACCATTGCTATT
Sox17	CCAGAATCCAGACCTGCACAA	CTCTGCCTCCTCCACGAA
AFP	GTAGCGCTGCAAACAATGAA	TCCAACAGCCTGAGAAATC
HNF3beta	GGAGCGGTGAAGATGGAA	TACGTGTTTCATGCCGTTTCAT
SHH	CCAATTACAACCCTACATC	CAGTTTCACTCCTGGCCACT
Tbx6	AGTGCTGAGGCCTACCTCCT	CCAGAAATGCAGCCGAGTAG
Nestina	GCCCTGACCACTCCAGTTTA	GGAGTCCTGGATTTCTTCC
NeuroD	GCCCCAGGGTTATGAGACTA	GTCCAGCTTGGAGGACCTT
Nkx2.5	AGGACCCTAGAGCCGAAAAG	GTTGTCCGCCTCGTCTTCT
GATA4	GGAAGCCCAAGAACCTGAAT	GGGAGGAAGGCTCTCACTG
Alfa-MHC	ATTGCTGAAACCGAGAATGG	CGCTCCTTGAGGTTGAAAAG
beta-actina	CAATGTGGCCGAGGACTTTG	CATTCTCCTTAGAGAGAAGTGG

Fue evidente una correlación entre la alta eficiencia de diferenciación para dar el linaje pancreático, y baja eficiencia de diferenciación a células del linaje mesodérmico (figura 6). A medida que progresó la diferenciación, todos los clones manifestaron expresión reducida de genes relacionados con la pluripotencia y expresión aumentada en genes relacionados con el endodermo y el ectodermo. Los clones 5-9 presentaron un aumento con los genes relacionados con el mesodermo. El clon 10 no pudo demostrar una expresión significativa de los genes relacionados con el mesodermo.

Para confirmar este último resultado, se sometieron los clones 5 y 10 a un protocolo diseñado para impulsar la diferenciación de células pluripotentes a cardiomiocitos mesodérmicos [Xu 2009]. En resumen, se sometieron a pase los clones sobre placas de baja adhesión para formar agrupamientos celulares tal como se describió anteriormente, excepto que se usó el medio de cultivo de reprogramación. Después de la incubación durante la noche, se

reemplazó el medio con medio compuesto por: DMEM, 1X aminoácidos no esenciales (Gibco), L-glutamina 2 mM (Gibco), transferrina 5,5 µg/ml (Sigma), selenito de sodio 5 ng/ml (Sigma), beta-mercaptoetanol 0,1 mM (Gibco) y 1X penicilina/ estreptomycin (Gibco). Se cambió el medio cada de 3 a 4 días.

5 Alrededor del día 12, aparecieron cardiomiocitos mesodérmicos que contenían agrupamientos celulares espontáneamente latentes en cultivos del clon 5. En el día 15, al menos el 50% de los agrupamientos celulares se contrajeron espontáneamente en un sitio, al menos. Se recogieron los cuerpos embrioides en el día 15, y el análisis de RT-PCR se llevó a cabo sobre genes representativos de cardiomiocitos. Se expresaron genes de cardiomiocitos de manera robusta por el clon 5, es decir, al menos 5 veces en comparación con las células no diferenciadas (figura 7). Por el contrario, los agrupamientos celulares espontáneamente latentes no estaban presentes en el cultivo del clon 10 ni en el día 12 ni en el día 15 de diferenciación. El análisis de RT-PCR de expresión génica de agrupamientos celulares reveló que los genes de cardiomiocitos no se expresaron por encima de los niveles de las células madre no diferenciadas.

15 Por tanto, el clon 10 fue incapaz de diferenciarse sustancialmente para dar células del linaje cardiaco mesodérmico. Debido a que no se identificaron agrupamientos celulares espontáneamente latentes, y debido a que no se expresaron genes de cardiomiocitos a niveles por encima de las poblaciones celulares no diferenciadas, se concluyó que menos de aproximadamente el 5% de células respondieron a un protocolo comúnmente empleado para diferenciar células madre pluripotentes para dar cardiomiocitos.

20 Si bien se han comentado anteriormente realizaciones particulares de la invención en cuestión, son solo ilustrativas y no restrictivas de la invención. Una revisión de esta memoria descriptiva hará muchas variaciones de la invención evidentes para los expertos en el campo de la invención. El alcance completo de la invención debe determinarse en referencia tanto a las reivindicaciones a continuación, junto con su gama completa de equivalentes, como a la memoria descriptiva, con tales variaciones.

Publicaciones citadas

DOCUMENTOS DE PATENTES ESTADOUNIDENSES

30	Documento 6.436.704 B1	8/2002	Roberts y Mather
	Documento 6.815.203 B1	11/2004	Bonner-Weir y Taneja
35	Documento 7.544.510 B2	6/2009	Habener <i>et al.</i>
	Documento 7.604.991 B2	10/2009	Bouwens y Baeyens
	Documento 8.110.399 B2	2/2012	Habener <i>et al.</i>
40	Documento 2004/0115805 A1	6/2004	Tsang <i>et al.</i>
	Documento 8.377.689 B2	2/2013	Tsang <i>et al.</i>

OTRAS PUBLICACIONES

	Shapiro, A.M. 2011 Curr Opin Organ Transplant 16(6), 627-31
	Robertson, R.P. 2010 Endocrinol Metab Clin N Am 39, 655-67
50	Yamanaka, S. 2012 Cell Stem Cell 10, 678-84
	Plath, K. 2011 Nat Rev Genet. 12(4), 253-65
55	Lai, M.I. 2011 J Assist Reprod Genet 28, 291-301
	Stover, A.E., <i>et al.</i> 2011 Methods Mol Biol 767, 391-8
	Kroon, E., <i>et al.</i> 2008 Nat Biotechnol 26(4), 443-52
60	Rezania, A., <i>et al.</i> 2012 Diabetes 61(8), 2016-29
	Matveyenko, A.V., <i>et al.</i> 2010 Am J Physiol Endocrinol Metab 299, E713-20
65	Tahamtani, Y., <i>et al.</i> 2013 Stem Cells and Dev 22(9), 1419-32

Título 21, Código Estadounidense de Regulaciones Federales, parte 1271

Dor Y., *et al.* 2004 Nature 429(6987), 41-6

5 Pagluca, F.W. y Melton, D.A. 2013 Dev 140, 2472-83

Gong J., *et al.* 2012 J Mol Histol 43(6), 745-50

Noguchi H, *et al.* 2010 Cell Transplant 19(6), 879-86

10

Ciba P, *et al.* 2009 Ann Anat 191(1), 94-103

Dang T.T., *et al.* 2013 Biomaterials 34, 5792-801

15 Xu X.Q., *et al.* 2009 Stem Cells. 27(9), 2163-74

Rust W.L., *et al.* 2006 Stem Cells Dev 15(6), 889-904

Takacs M, *et al.* 2010 Biochim Biophys Acta 1799(3-4), 228-35

20

Nakagawa M, *et al.* 2010 Proc Natl Acad Sci USA 107(32), 14152-7

Takahashi K y Yamanaka S. 2006 Cell 126(4), 663-76

25

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende progenitores no pluripotentes de células pancreáticas sustitutas que son adecuados para tratar diabetes insulino dependiente, en la que los progenitores (i) tienen una morfología de célula madre y proliferan en cultivo sin cambio en dicha morfología, (ii) se reprograman administrando genes de reprogramación en al menos un plásmido episómico y no tienen genes de reprogramación integrados en sus genomas, (iii) se diferencian para dar el linaje pancreático de acuerdo con un protocolo que emplea solo reactivos definidos, y (iv) derivan de un páncreas humano y no pueden diferenciarse para dar el linaje mesodérmico.
2. Método para generar una composición que comprende progenitores no pluripotentes de células pancreáticas sustitutas que son adecuados para tratar diabetes insulino dependiente, que comprende:
- a. cultivar células humanas primarias, recogidas de tejido pancreático humano viable en condiciones de cultivo definidas, mínimas, en el que el cultivo es durante un periodo de días que es menor de 9 días; luego
- b. usar genes de reprogramación para reprogramar células humanas primarias de (a) de manera que se obtienen células reprogramadas que no tienen genes de reprogramación genómicamente integrados pero que tienen una morfología de célula madre;
- c. en primer lugar, seleccionar de entre las células reprogramadas obtenidas en (b) por una capacidad para proliferar, sin perder dicha morfología, en condiciones de cultivo definidas, mínimas mediante lo cual se obtienen células reprogramadas en proliferación; y luego
- d. en segundo lugar, seleccionar de entre las células reprogramadas en proliferación por una población celular caracterizada por (i) una capacidad para sobrevivir y diferenciarse para dar el linaje pancreático en el transcurso de un protocolo que emplea solo reactivos definidos, y (ii) una incapacidad sustancial de diferenciarse para dar el linaje mesodérmico,
- mediante lo cual se obtienen dichos progenitores no pluripotentes.
3. Método para generar células pancreáticas sustitutas que son adecuadas para tratar diabetes insulino dependiente, que comprende:
- a. exponer los progenitores no pluripotentes según la reivindicación 1 a una primera combinación de componentes que impulsa la diferenciación para dar el linaje endodérmico, mediante lo cual se obtienen células endodérmicas, excluyendo dicha primera combinación el suero y cualquier miembro de la familia wnt; y luego
- b. exponer dichas células endodérmicas a una combinación de componentes que impulsa la diferenciación para dar el linaje endocrino pancreático,
- mediante lo cual se obtienen dichas células pancreáticas sustitutas.
4. Método según la reivindicación 2, en el que los genes de reprogramación se seleccionan del grupo que consiste en Oct4, Sox2, Klf4 y Myc.

Figura 1.

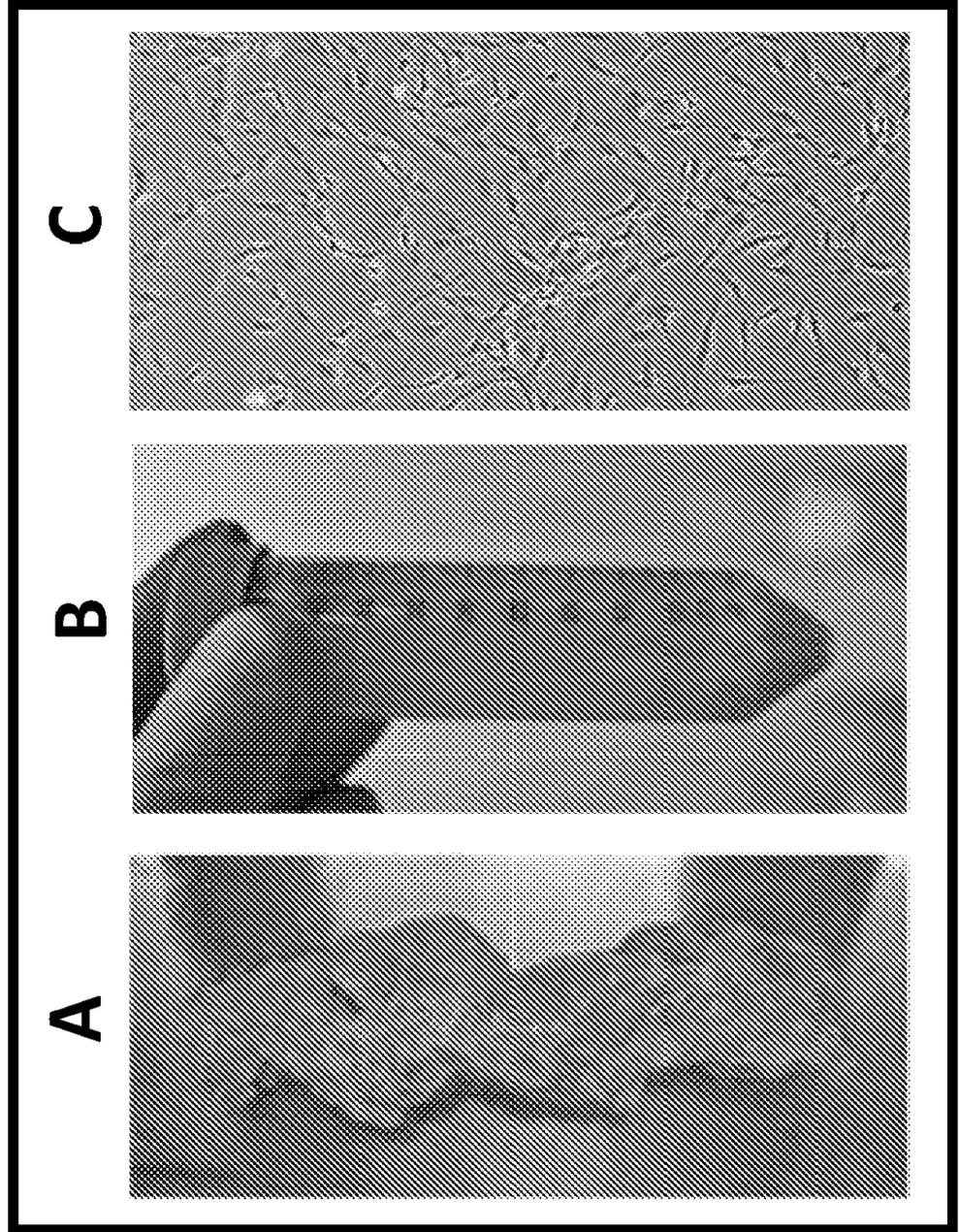
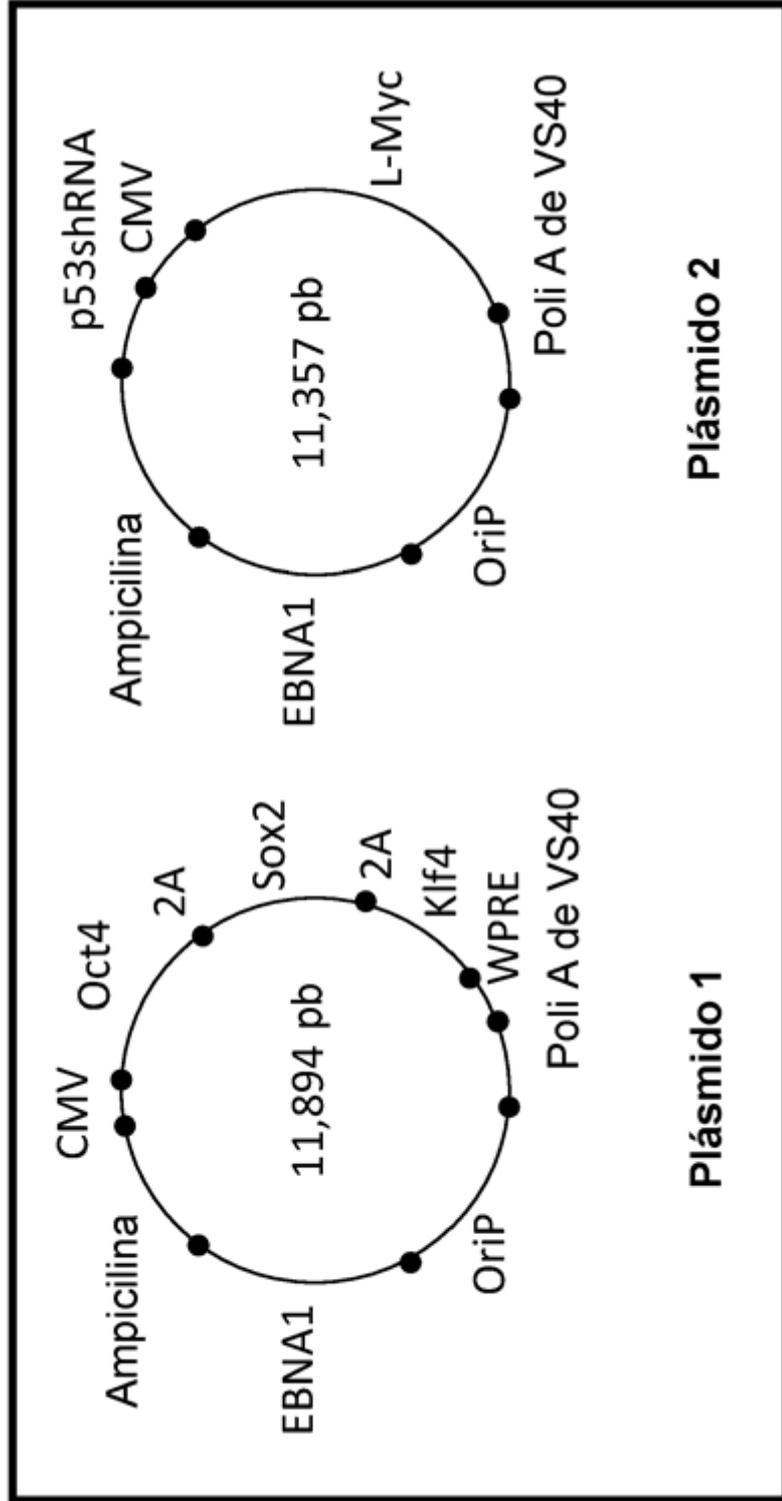


Figura 2.



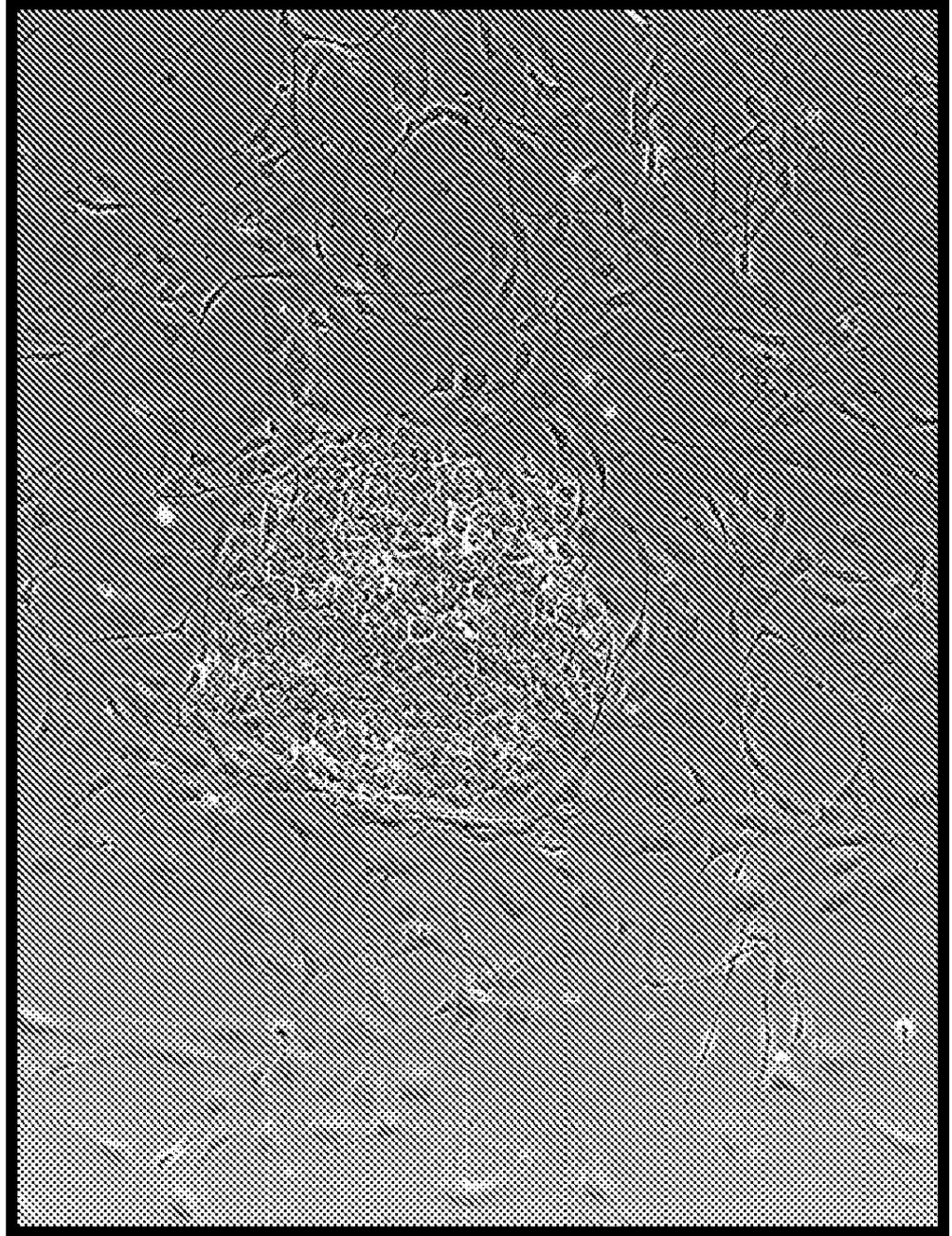


Figura 3.

Figura 4.

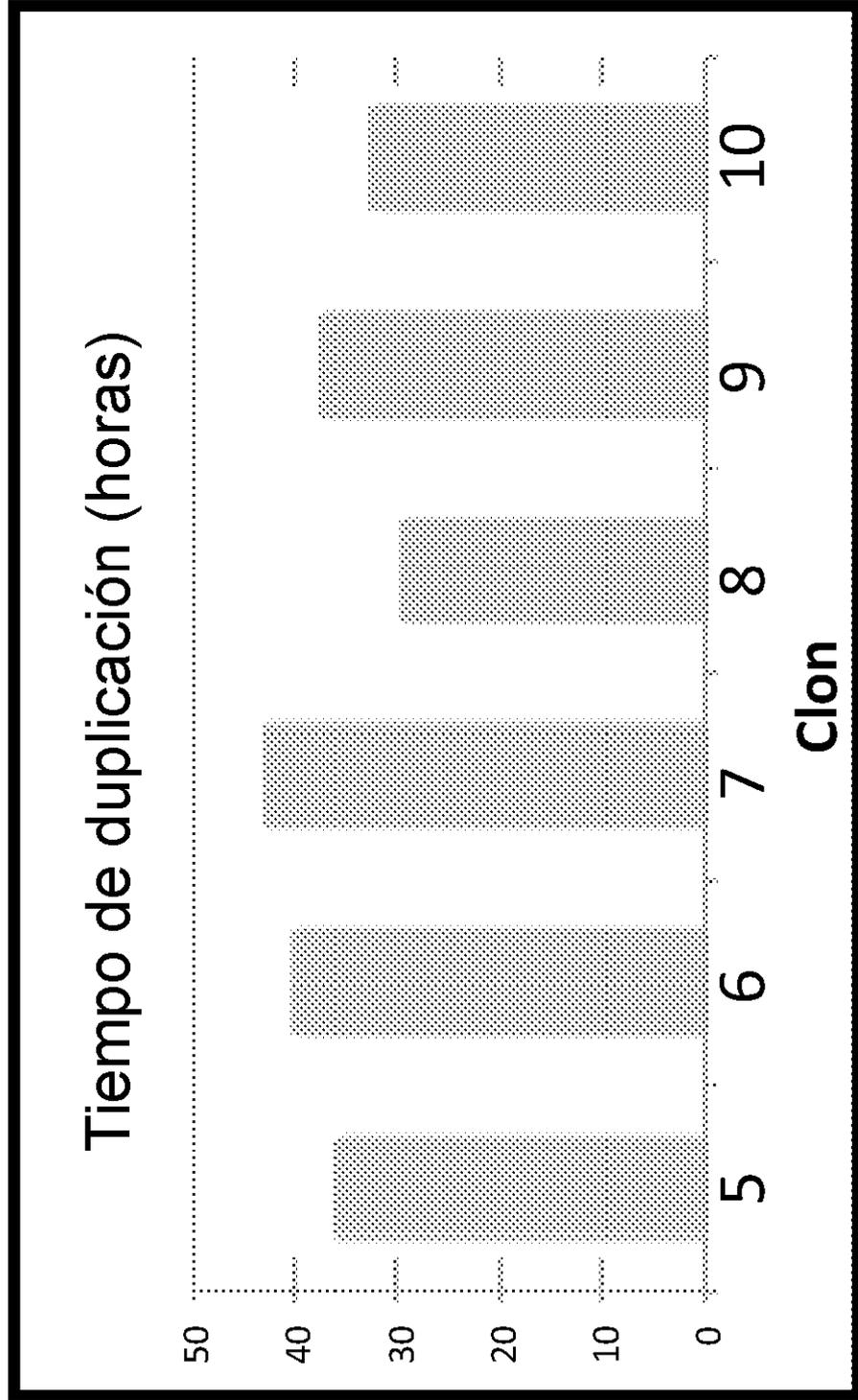


Figura 5.

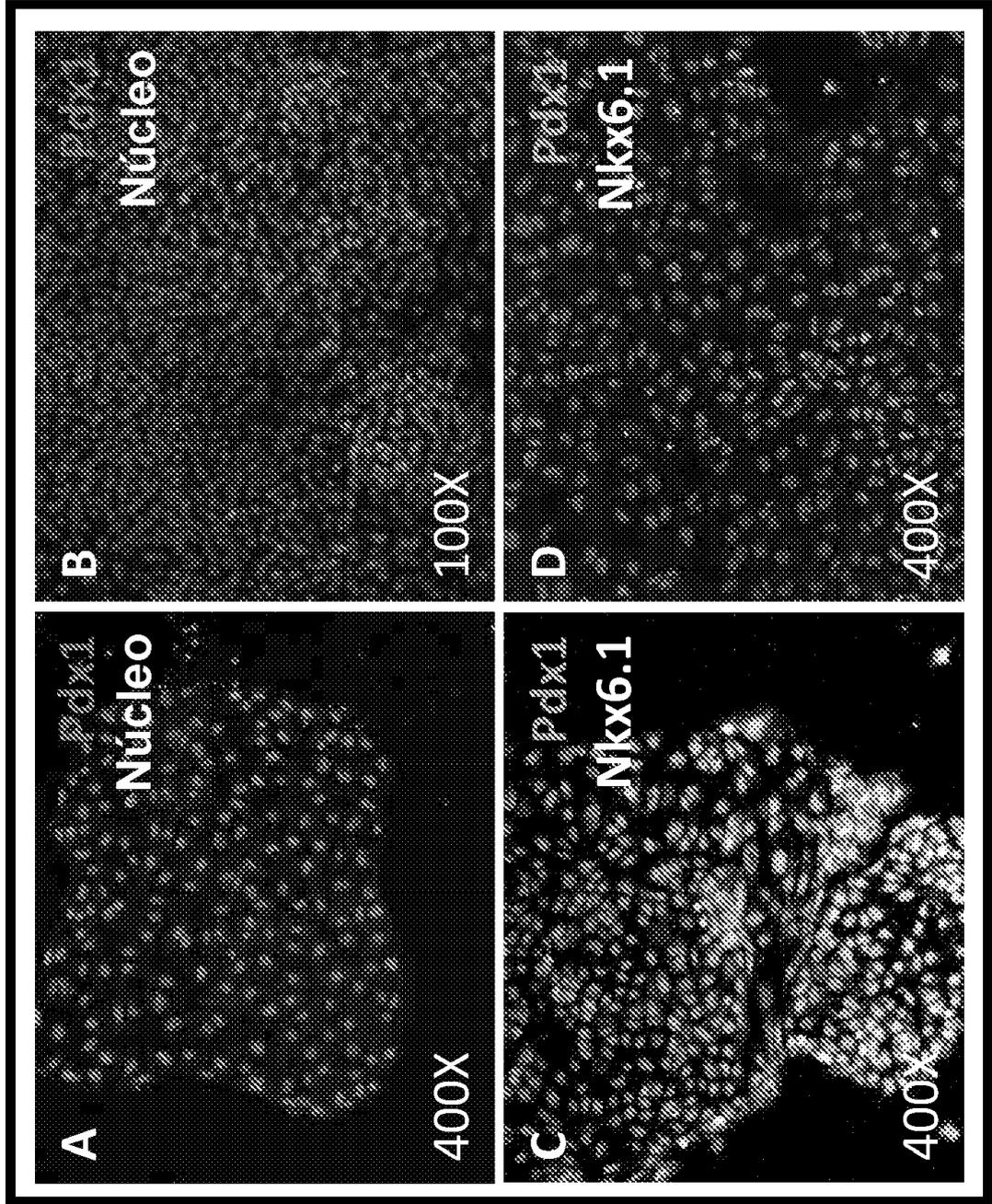


Figura 6.

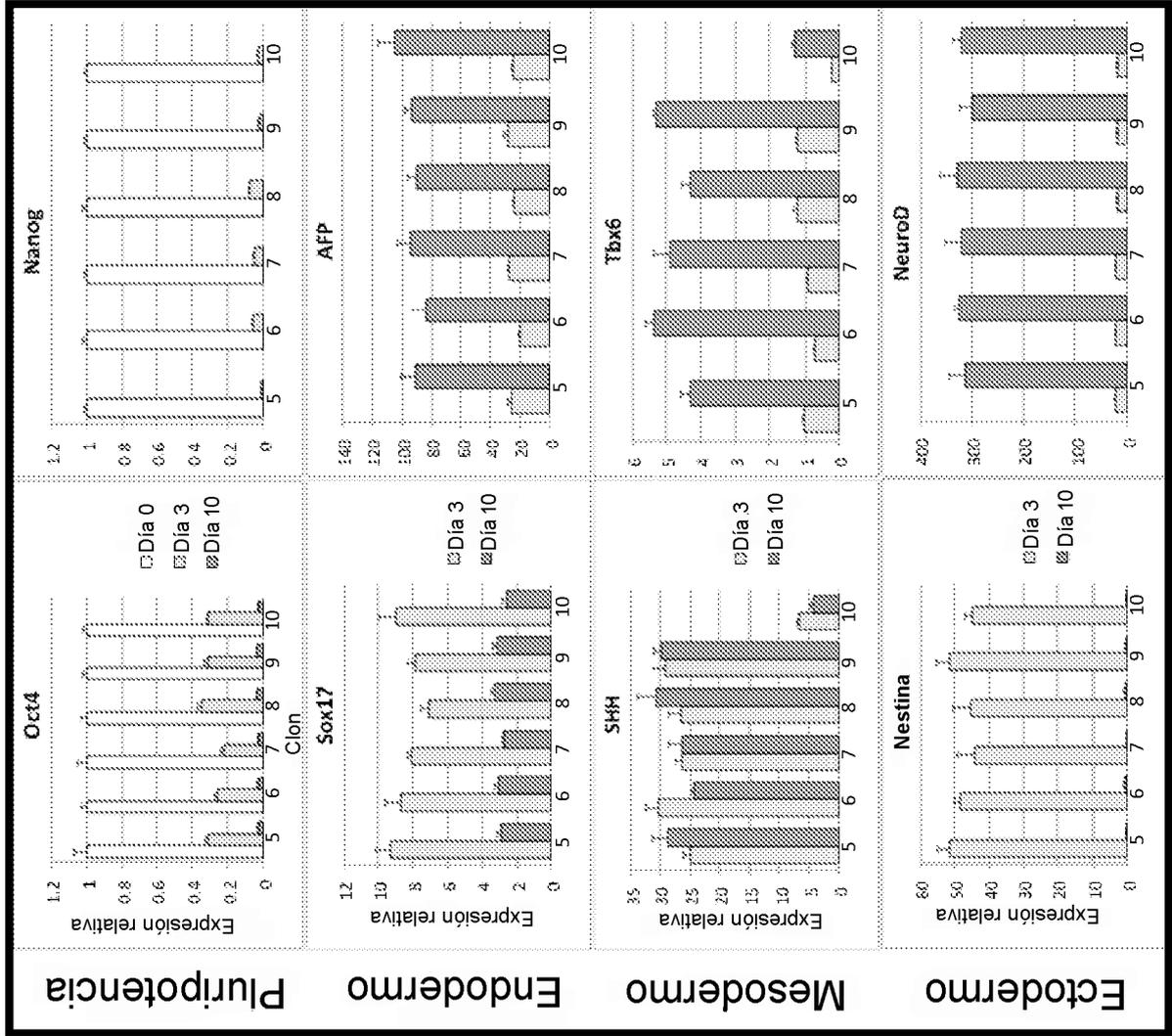


Figura 7.

