

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 849 181**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2010 PCT/US2010/032130**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.10.2010 WO10124142**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2010 E 10767801 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2020 EP 2421957**

54 Título: **Composiciones celulares derivadas de células reprogramadas desdiferenciadas**

30 Prioridad:

22.04.2009 US 171759 P

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

16.08.2021

73 Titular/es:

**VIACYTE, INC. (100.0%)
3550 General Atomics Court Building No 2-503
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**AGULNICK, ALAN y
D'AMOUR, KEVIN, ALLEN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 849 181 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

Composiciones celulares derivadas de células reprogramadas desdiferenciadas

Esta invención se refiere en general al aislamiento, al mantenimiento y al uso de cultivos celulares. Más específicamente, se refiere a composiciones celulares derivadas de células madre pluripotentes inducidas.

5 Antecedentes

Una importante aplicación de células pluripotentes es su uso en terapia celular.. Las células madre pluripotentes incluyen, pero no se limitan a, células madre embrionarias humanas (hES), células germinativas embrionarias humanas (hEG).

10 El documento WO2010/053472, Jianjie *et al* (2007, Stem Cells, 25, 1940-1953), y Wei *et al* (2007, Cell Research, 17, 333-344) dan a conocer la diferenciación de hESC para dar progenitores pancreáticos.

15 Todavía existen otros tipos de células pluripotentes, por ejemplo, células madre de ratón y humanas desdiferenciadas, es decir, células adultas somáticas diferenciadas se desdiferencian para convertirse en células madre de tipo pluripotente. Estas células desdiferenciadas inducidas para establecer células que tienen pluripotencia y capacidad de crecimiento similares a las de las células ES también se denominan "células madre pluripotentes inducidas (iPS)", "células de tipo célula madre embrionaria", "células de tipo ES", o equivalentes de los mismos. Tales células son células pluripotentes alternativas posiblemente viables. La aplicación terapéutica de células iPS requerirá demostrar que estas células son estables y muestran un perfil de seguridad apropiado en estudios preclínicos para tratar diabetes y otras enfermedades. La reprogramación de células somáticas humanas diferenciadas en un estado pluripotente permite células madre específicas del paciente y la enfermedad. Véanse
20 Takahashi, K. *et al*. Cell, 1-12, 2007 y Ju, J. *et al*. Science 2007. Takahashi *et al*. y Ju *et al*. cada uno introdujo cuatro genes en fibroblastos adultos y fetales/de recién nacido para generar las células iPS: Oct4, Sox2, Klf4 y c-myc por Takahashi *et al*.; Oct4, Sox2, Nanog y Lin28 por Ju *et al*. En cualquier caso, las células iPS tenían algunas características de las células hES incluyendo, la morfología, expresión de marcadores, proliferación prolongada, el kariotipo normal y la pluripotencia de las células hES.

25 Aunque las células iPS pueden proporcionar una medicina regenerativa basada en terapia celular sin la controversia ética asociada, las propiedades de diferenciación de las células iPS, por ejemplo, el potencial de diferenciación y la eficiencia de la diferenciación *in vitro*, todavía no están claros y no se ha demostrado un método de diferenciación dirigida para las células iPS. Por tanto, existe la necesidad de determinar y demostrar las propiedades de diferenciación detalladas y las eficiencias de diferenciación direccional de las células iPS.

30 Sumario de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre dentro de las reivindicaciones se proporciona sólo para información.

Los aspecto aspectos descritos en el presente documento proporcionan composiciones celulares derivadas de células pluripotentes tales como células madre pluripotentes inducidas (iPS).

35 Un aspecto aspecto de la divulgación proporciona composiciones y métodos de elaboración de un cultivo celular *in vitro* que comprende células humanas en los que al menos aproximadamente el 15% de las células humanas son células del endodermo definitivo, en los que las células definitivas se derivan de células reprogramadas genéticamente desdiferenciadas. En un aspecto, las células del endodermo definitivo son células multipotentes que pueden diferenciarse en células del tubo del intestino u órganos derivados del mismo.

40 Otro aspecto del aspecto de la divulgación contempla composiciones y métodos de elaboración de un cultivo celular *in vitro* que comprende células humanas en los que al menos aproximadamente el 15% de las células humanas son células del endodermo del intestino proximal positivas para el factor de homeosecuencia 1 (PDX1) pancreáticas-duodenales, en los que las células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 se derivan de células reprogramadas genéticamente desdiferenciadas. En un aspecto, las células del endodermo del intestino proximal
45 positivas para PDX1 son positivas conjuntamente para PDX1, SOX9, PROX1 y HNF6

Un aspecto de adicional del aspecto de la divulgación contempla composiciones y métodos de elaboración de un cultivo celular *in vitro* que comprende células humanas en los que al menos aproximadamente el 15% de las células humanas son células progenitoras pancreáticas positivas para el factor de homeosecuencia 1 (PDX1) pancreáticas-duodenales, en los que las células progenitoras pancreáticas positivas para PDX1 se derivan de células reprogramadas genéticamente desdiferenciadas. En un aspecto, las células progenitoras pancreáticas positivas para
50 PDX1 son positivas conjuntamente para PDX1 y NKX6.1.

Todavía otro aspecto del aspecto de la divulgación contempla composiciones y métodos de elaboración de un cultivo celular vitro que comprende células humanas en los que al menos aproximadamente el 15% de las células humanas son células precursoras endocrinas positivas para neurogenina 3 (NGN3), en los que las células precursoras

endocrinas NGN3 se derivan de células reprogramadas genéticamente desdiferenciadas. En un aspecto, las células precursoras endocrinas positivas para NGN3 son positivas conjuntamente para NGN3, PAX4 y NKX2.2.

Breve descripción de los dibujos

5 La figura 1 es una imagen fotográfica de un cultivo en suspensión agregado de células reprogramadas desdiferenciadas o, también denominadas en el presente documento, células iPS.

10 Las figuras 2A-L son gráficos de barras que muestran los niveles de expresión génica relativa de OCT4 (figura 2A), BRACHYURY (figura 2B), CER1 (figura 2C), GSC (figura 2D), FOXA2 (figura 2E), FOXA1 (figura 2F), HNF6 (figura 2G), PDX1 (figura 2H), PTF1A (figura 2I), NKX6.1 (figura 2J), NGN3 (figura 2K) e INS (figura 2L). Los niveles de expresión se normalizan a los niveles de expresión promedio de genes de mantenimiento, expresión de ciclofilina G y proteína de unión a TATA (TBP). Los gráficos representan la regulación por incremento sobre el punto de datos más bajo del conjunto de datos.

Las figuras 3A-3D son microfotografías de inmunocitoquímica (ICC) de cultivos de células iPS humanas de la diferenciación de la fase 4 usando anticuerpos específicos para (3A) PDX-1; (3B) NKX6.1; (3C) PTF1A; y (3D) Dapi.

15 Las figuras 4A-4D son imágenes de inmunocitoquímica (ICC) de cultivos de células iPS de la diferenciación de la fase 4 usando ligandos específicos para (4A) glucagón; (4B) insulina; (4C) somatostatina; y (4D) Dapi.

Descripción detallada de la invención

La presente invención puede entenderse más fácilmente haciendo referencia a la siguiente descripción detallada de los aspecto aspectos preferidos de la divulgación y los ejemplos incluidos en el presente documento. aspecto

Definiciones

20 Se apreciará que los intervalos numéricos expresados en el presente documento incluyen los puntos finales establecidos y describen todos los números enteros entre los puntos finales del intervalo numérico establecido.

25 A menos que se indique lo contrario, los términos usados en el presente documento deben entenderse según el uso convencional por parte de los expertos en la técnica relevante. Además, para los fines de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes, porcentajes o proporciones de materiales, condiciones de reacción y otros valores numéricos usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenden obtener mediante la presente invención. Como

30 mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe al menos interpretarse a la luz del número de dígitos significativos informados y aplicando técnicas de redondeo ordinarias.

35 La práctica de los aspecto aspectos descritos en el presente documento emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, biología molecular, genética, química, microbiología, ADN recombinante e inmunología.

40 Debe entenderse que, tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un/uno”, “una” y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “una célula” incluye una o más de tales células diferentes, y la referencia al “método” incluye una referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica que podrían modificarse o sustituirse por los métodos descritos en el presente documento.

El término “célula”, tal como se usa en el presente documento, también se refiere a células individuales, líneas celulares o cultivos derivados de tales células. Un “cultivo” se refiere a una composición que comprende células aisladas del mismo tipo o de un tipo diferente.

45 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “células madre totipotentes” se refiere a células que tienen la capacidad de diferenciarse en todas las células que constituyen un organismo, tales como las células que se producen a partir de la fusión de un óvulo y un espermatozoide. Las células producidas por las primeras divisiones del óvulo fertilizado también pueden ser totipotentes. Estas células pueden diferenciarse en tipos de células embrionarias y extraembrionarias. Las células madre pluripotentes, tales como las células ES, por ejemplo, pueden dar lugar a cualquier tipo de célula fetal o adulta. Sin embargo, por sí solas no pueden convertirse en un animal fetal

50 o adulto porque carecen del potencial para desarrollar tejido extraembrionario. El tejido extraembrionario se deriva, en parte, del endodermo extraembrionario y puede clasificarse además en endodermo parietal (membrana de Reichert) y endodermo visceral (forma parte del saco vitelino). Tanto el endodermo parietal como el visceral apoyan el desarrollo del embrión, pero no forman por sí mismos estructuras embrionarias. También existen otros tejidos extraembrionarios que incluyen el mesodermo extraembrionario y el ectodermo extraembrionario.

En algunos aspectos, se usa una “célula pluripotente” como material de partida para la diferenciación en el linaje de endodermo, o más particularmente, para las células de tipo endodermo pancreático. Tal como se usa en el presente documento, “pluripotencia” o “células pluripotentes” o equivalentes de las mismas se refiere a células que pueden tanto proliferar en cultivo celular como diferenciarse hacia una variedad de poblaciones de células restringidas por linaje que presentan propiedades multipotentes, por ejemplo, ambas células ES pluripotentes y las células madre pluripotentes inducidas (iPS) pueden dar lugar a cada uno de los tres linajes de células embrionarias. Sin embargo, las células pluripotentes pueden no ser capaces de producir un organismo completo. Es decir, las células pluripotentes no son totipotentes.

En determinados aspectos, las células pluripotentes usadas como material de partida son células madre, incluyendo células hES, células hEG, células iPS, incluso células partenógenas y similares. Tal como se usa en el presente documento, “embrionario” se refiere a una gama de fases de desarrollo de un organismo que comienza con un único cigoto y termina con una estructura multicelular que ya no comprende células pluripotentes o totipotentes distintas de las células gaméticas desarrolladas. Además de los embriones derivados por fusión de gametos, el término “embrionario” se refiere a embriones derivados por transferencia nuclear de células somáticas. Todavía en otro aspecto, las células pluripotentes no se derivan o no se derivan inmediatamente de embriones, por ejemplo, las células iPS se derivan de una célula no pluripotente, por ejemplo, una célula multipotente o una célula diferenciada terminalmente.

Las células madre pluripotentes humanas también pueden definirse o caracterizarse por la presencia de varios factores de transcripción y proteínas de la superficie celular, incluyendo los factores de transcripción Oct-4, Nanog y Sox-2, que forman el complejo regulador central que garantiza la supresión de genes que conducen a la diferenciación y el mantenimiento de la pluripotencia; y antígenos de superficie celular, tales como los glicolípidos SSEA3, SSEA4 y los antígenos de queratán sulfato, Tra-1-60 y Tra-1-81.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “células madre pluripotentes inducidas”, o “células iPS” o “iPSC”, se refiere a un tipo de célula madre pluripotente preparada artificialmente a partir de una célula no pluripotente, normalmente una célula somática adulta, o una célula diferenciada terminalmente, tal como un fibroblasto, una célula hematopoyética, un miocito, una neurona, una célula epidérmica o similares, insertando determinados genes o productos génicos, denominados factores de reprogramación. Véanse Takahashi *et al.*, Cell 131:861-872 (2007); Wernig *et al.*, Nature 448:318-324 (2007); Park *et al.*, Nature 451:141-146 (2008). Las células madre pluripotentes inducidas son sustancialmente similares a las células madre pluripotentes humanas naturales, tales como las células hES, en muchos aspectos, incluyendo la expresión de determinados genes y proteínas de células madre, patrones de metilación de cromatina, tiempo de duplicación, formación de cuerpos embrioides, formación de teratomas, formación de quimeras viables y potencia y diferenciabilidad. Las células iPS humanas proporcionan una fuente de células madre pluripotentes sin el uso asociado de embriones.

Pueden emplearse diversos métodos para producir células iPS, que se describen en el presente documento con más detalle a continuación. Sin embargo, todas las metodologías emplean determinados factores de reprogramación que comprenden casetes de expresión que codifican para Sox-2, Oct-4, Nanog y opcionalmente Lin-28, o casetes de expresión que codifican para Sox-2, Oct-4, Klf4 y opcionalmente c-myc, o casetes de expresión que codifican para Sox-2, Oct-4 y, opcionalmente, Esrrb. Los ácidos nucleicos que codifican para estos factores de reprogramación pueden estar en el mismo casete de expresión, diferentes casetes de expresión, el mismo vector de reprogramación o diferentes vectores de reprogramación. Oct-3/4 y determinados miembros de la familia de genes Sox (Sox-1, Sox-2, Sox-3 y Sox-15) son reguladores transcripcionales cruciales implicados en el proceso de inducción cuya ausencia hace que la inducción sea imposible. Oct-3/4 (Pou5f1) es uno de los factores de transcripción de la familia del octámero (“Oct”) y desempeña un papel importante en el mantenimiento de la pluripotencia. Por ejemplo, la ausencia de Oct-3/4 en células normalmente Oct-3/4+, tales como blastómeros y células madre embrionarias, conduce a una diferenciación espontánea de trofoblasto; mientras que la presencia de Oct-3/4 da lugar a la pluripotencia y el potencial de diferenciación de las células madre embrionarias. Además, otros genes de la familia “Oct”, por ejemplo, Oct1 y Oct6, no inducen pluripotencia, por lo que este proceso de inducción de pluripotencia puede atribuirse a Oct-3/4. Otra familia de genes asociados con el mantenimiento de la pluripotencia similar a Oct-3/4, es la familia Sox. Sin embargo, la familia Sox no es exclusiva de los tipos de células pluripotentes, sino que también se asocia con células madre multipotentes y unipotentes. Se ha descubierto que la familia Sox también funciona en el proceso de inducción. Los estudios iniciales de Takahashi *et al.*, 2006 citado anteriormente usaron Sox2. Desde entonces, los genes Sox1, Sox3, Sox15 y Sox18 también han generado células iPS. Klf4 de la familia de genes Klf (Klf-1, Klf2, Klf4 y Klf5) fue identificado inicialmente por Yamanaka *et al.* 2006 citado anteriormente como factor para la generación de células iPS de ratón. Se usaron en el presente documento células iPS humanas de S. Yamanaka para explorar aplicaciones terapéuticas celulares de células hIPS. Sin embargo, Yu *et al.* 2007 citado anteriormente informó que no se requería Klf4 y, de hecho, no producía células iPS humanas. Otros miembros de la familia Klf pueden generar células iPS, incluyendo Klf1, Klf2 y Klf5. Por último, la familia Myc (C-myc, L-myc y N-myc), protooncogenes implicados en el cáncer; c-myc fue un factor implicado en la generación de células iPS humanas y de ratón, pero Yu *et al.* 2007 citado anteriormente informó que no se requería c-myc para la generación de células iPS humanas.

Tal como se usa en el presente documento, “multipotencia” o “célula multipotente” o equivalentes de las mismas se refiere a un tipo de célula que puede dar lugar a un número limitado de otros tipos de células particulares. Es decir, las células multipotentes están comprometidas con uno o más destinos de células embrionarias y, por tanto, a

diferencia de las células pluripotentes, no pueden dar lugar a cada uno de los tres linajes de células embrionarias así como a células extraembrionarias. Las células somáticas multipotentes se diferencian más en relación con las células pluripotentes, pero no se diferencian terminalmente. Por tanto, las células pluripotentes tienen una potencia mayor que las células multipotentes. Los factores determinantes de la potencia que pueden reprogramar células somáticas o que se usan para generar células iPS incluyen, pero no se limitan a, factores tales como Oct-4, Sox2, FoxD3, UTF1, Stella, Rex1, ZNF206, Sox15, Myb12, Lin28, Nanog, DPPA2, ESG1, Otx2 o combinaciones de los mismos.

Un aspecto descrito en el presente documento incluye poblaciones de células precursoras o pluripotentes que pueden desarrollarse selectivamente, y en algunos aspectos de forma selectiva reversible, en diferentes linajes celulares cuando se cultivan en condiciones apropiadas. Tal como se usa en el presente documento, el término “población” se refiere al cultivo celular de más de una célula que tiene las mismas características de identificación. El término “linaje celular” se refiere a todas las fases del desarrollo de un tipo celular, desde la célula precursora más temprana hasta una célula completamente madura (es decir, una célula especializada). Una “célula precursora” o “célula progenitora” puede ser cualquier célula en una ruta de diferenciación celular que sea capaz de diferenciarse en una célula más madura. Como tal, una célula precursora puede ser una célula pluripotente, o puede ser una célula multipotente parcialmente diferenciada o una célula diferenciada reversiblemente. El término “población de células precursoras” se refiere a un grupo de células que pueden desarrollarse para dar un tipo de célula más madura o diferenciada. Una población de células precursoras puede comprender células que son pluripotentes, células que tienen un linaje de células madre restringido (es decir, células que pueden desarrollarse en menos de todos los linajes ectodérmicos, o en, por ejemplo, sólo células de linaje neuronal) y células que son reversiblemente de un linaje de células madre restringido. Por tanto, el término “célula progenitora” o “célula precursora” puede ser una “célula pluripotente” o una “célula multipotente”.

Tal como se usa en el presente documento, el término “reprogramación”, “reprogramado” o equivalentes de los mismos, se refiere a un proceso que confiere a una célula una capacidad aumentada de manera medible para formar progenie de al menos un nuevo tipo de célula, ya sea en cultivo o *in vivo*, de lo que tendría en las mismas condiciones sin reprogramar. En determinados aspectos descritos en el presente documento, las células somáticas se “reprograman” a células pluripotentes. En determinados aspectos, las células somáticas se reprograman cuando después de una proliferación suficiente, una proporción medible de células, o bien *in vivo* o bien en un cultivo celular *in vitro*, muestran características fenotípicas del nuevo tipo de célula pluripotente. Sin reprogramación, tales células somáticas no darían lugar a una progenie que muestre características fenotípicas del nuevo tipo de célula pluripotente. Si, incluso sin reprogramación, las células somáticas pudieran dar lugar a una progenie que muestre características fenotípicas del nuevo tipo de células pluripotentes, la proporción de progenie de estas células somáticas que muestran características fenotípicas del nuevo tipo de células pluripotentes es considerablemente mayor que antes de la reprogramación.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “programación de diferenciación” se refiere a un proceso que cambia una célula para formar la progenie de al menos un nuevo tipo de célula con un nuevo estado de diferenciación, o bien en cultivo o bien *in vivo*, de lo que tendría en las mismas condiciones sin reprogramación de diferenciación. Este proceso incluye diferenciación, desdiferenciación y transdiferenciación. Por tanto, tal como se usa en el presente documento, la expresión “diferenciación” se refiere al proceso mediante el cual una célula menos especializada se convierte en un tipo de célula más especializada. Por el contrario, la expresión “desdiferenciación” se refiere a un proceso celular en el que una célula diferenciada parcial o terminalmente vuelve a una fase de desarrollo anterior, tal como una célula que tiene pluripotencia o multipotencia. Por lo contrario adicionalmente, la expresión “transdiferenciación” se refiere a un proceso de transformación de un tipo celular diferenciado en otro tipo celular diferenciado.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “se desarrollan a partir de células pluripotentes”, “se diferencian de células pluripotentes”, “maduran a partir de células pluripotentes” o “se producen a partir de células pluripotentes”, “derivan de células pluripotentes”, “se diferencian de células pluripotentes” y expresiones equivalentes, se refieren a la producción de un tipo de célula diferenciada a partir de células pluripotentes *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, en el caso de células endocrinas maduradas a partir de células del endodermo pancreático PDX1 trasplantadas *in vivo* tal como se describe en la solicitud internacional PCT/US2007/015536, titulada METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES. Todos estos términos se refieren a la progresión de una célula desde la fase de tener el potencial de diferenciarse en al menos dos linajes celulares diferentes hasta convertirse en una célula especializada y diferenciada terminalmente. Tales términos pueden usarse de manera intercambiable para los propósitos de la presente solicitud. Los aspectos descritos en el presente documento contemplan condiciones de cultivo que permiten que tal diferenciación sea reversible, de manera que pueda recuperarse selectivamente la pluripotencia o al menos la capacidad de diferenciarse en más de un linaje celular.

El término “célula alimentadora” se refiere a un cultivo de células que crece *in vitro* y secreta al menos un factor en el medio de cultivo, y que puede usarse para apoyar el crecimiento de otra célula de interés en cultivo. Tal como se usa en el presente documento, una “capa de células alimentadoras” puede usarse de manera intercambiable con el término “célula alimentadora”. Una célula alimentadora puede comprender una monocapa, en la que las células alimentadoras cubren la superficie de la placa de cultivo con una capa completa antes de crecer una encima de la otra, o pueden comprender agrupaciones de células. En un aspecto preferido, la célula alimentadora comprende una

monocapa adherente.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “agrupación” y “grupo” o “agregado” pueden usarse de manera intercambiable y se refieren generalmente a un grupo de células que no se han disociado en células individuales. Las agrupaciones pueden disociarse en grupos más pequeños. Esta disociación es normalmente de naturaleza manual (tal como el uso de una pipeta Pasteur), pero se contemplan otros medios de disociación. Los cultivos de células pluripotentes o multipotentes en suspensión agregada son sustancialmente tal como se describe en las publicaciones internacionales PCT/US2007/062755, titulada COMPOSITIONS AND METHODS FOR CULTURING DIFFERENTIAL CELLS y PCT/US2008/082356, titulada STEM CELL AGGREGATE SUSPENSION COMPOSITIONS AND METHODS OF DIFFERENTIATION THEREOF.

De manera similar, los aspectos en los que los cultivos de células pluripotentes o los cultivos en suspensión de pluripotentes agregados se hacen crecer en condiciones definidas sin el uso de células alimentadoras, están “libres de alimentador”. Los métodos de cultivo libres de alimentador aumentan la escalabilidad y reproducibilidad del cultivo de células pluripotentes y reducen el riesgo de contaminación, por ejemplo, por agentes infecciosos de las células alimentadoras u otros componentes del cultivo de origen animal. Los métodos libres de alimentador también se describen en la patente estadounidense n.º 6.800.480 concedida a Bodnar *et al.* (asignada a Geron Corporation, Menlo Park, California). Sin embargo, y en contraste con la patente estadounidense n.º 6.800.480, los aspectos descritos en el presente documento, ya sean cultivos celulares pluripotentes, multipotentes o diferenciados, no están libres de alimentador y no contienen además una matriz extracelular endógena o exógena; es decir, los cultivos descritos en el presente documento están libres de matriz extracelular y están libres de alimentador. Por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6.800.480, la matriz extracelular se prepara cultivando fibroblastos, lisando los fibroblastos *in situ* y luego lavando lo que queda después de la lisis. Alternativamente, en la patente estadounidense n.º 6.800.480 también puede prepararse la matriz extracelular a partir de un componente de matriz aislado o una combinación de componentes seleccionados de colágeno, matriz placentaria, fibronectina, laminina, merosina, tenascina, sulfato de heparina, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, agregano, biglicano, trombospondina, vitronectina y decorina. Los aspectos descritos en el presente documento no producen una matriz extracelular mediante el crecimiento de una capa alimentadora o de fibroblastos y la lisis de las células para producir la matriz extracelular; ni requiere recubrir en primer lugar el recipiente de cultivo de tejidos con un componente de matriz extracelular o una combinación de componentes de matriz extracelular seleccionados de colágeno, matriz placentaria, fibronectina, laminina, merosina, tenascina, sulfato de heparina, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, agregano, biglicano, trombospondina, vitronectina y decorina. Por tanto, los cultivos en suspensión agregados descritos en el presente documento para células pluripotentes, multipotentes y diferenciadas no requieren una capa alimentadora, una célula alimentadora o fibroblástica lisada para producir un recubrimiento de matriz extracelular, una matriz extracelular añadida de manera exógena o un componente de matriz; en lugar de usar el componente de suero humano soluble tal como se describe en la solicitud internacional PCT/US2008/080516, titulada METHODS AND COMPOSITIONS FOR FEEDER-FREE PLURIPOTENT STEM CELL MEDIA CONTAINING HUMAN SERUM, supera la necesidad de una célula alimentadora o una monocapa alimentadora, así como la necesidad de una matriz extracelular endógena de una célula alimentadora o fibroblástica o de componentes de la matriz extracelular añadidos de manera exógena.

En aspectos preferidos, los métodos de cultivo están libres de productos de origen animal. En otro aspecto preferido, los métodos de cultivo están libres de xenógenos. En aspectos incluso más preferidos, se cumplen o superan una o más condiciones o requisitos para la fabricación comercial de agentes terapéuticos de células humanas mediante los métodos de cultivo descritos en el presente documento.

La población de células pluripotentes puede cultivarse adicionalmente en presencia de determinados factores de crecimiento complementarios para obtener una población de células que son o se desarrollarán en diferentes linajes celulares, o pueden invertirse selectivamente para poder desarrollarse en diferentes linajes celulares. El término “factor de crecimiento complementario” se usa en su contexto más amplio y se refiere a una sustancia que es eficaz para promover el crecimiento de una célula pluripotente, mantener la supervivencia de una célula, estimular la diferenciación de una célula y/o estimular la inversión de la diferenciación de una célula. Además, un factor de crecimiento complementario puede ser una sustancia secretada por una célula alimentadora en su medio. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, citocinas, quimiocinas, moléculas pequeñas, anticuerpos neutralizantes y proteínas. Los factores de crecimiento también pueden incluir polipéptidos de señalización intercelular, que controlan el desarrollo y mantenimiento de las células, así como la forma y función de los tejidos. En aspectos preferidos, el factor de crecimiento complementario se selecciona del grupo que consiste en factor de células de acero (SCF), oncostatina M (OSM), factor neurotrófico ciliar (CNTF), interleucina-6 (IL-6) en combinación con receptor de interleucina-6 (IL-6R) soluble, un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), una proteína morfogenética ósea (BMP), factor de necrosis tumoral (TNF) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).

En determinados procesos para producir las células tal como se describen en el presente documento, los factores de crecimiento se eliminan del cultivo celular o de la población celular después de su adición. Por ejemplo, el factor de crecimiento, tal como activina A, activina B, GDF-8 o GDF-11 puede añadirse y eliminarse en aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días o aproximadamente diez días después de su adición. En algunos aspectos, los factores de diferenciación

no se eliminan del cultivo celular.

Debido a que la eficiencia del proceso de diferenciación puede ajustarse modificando determinados parámetros, que incluyen, pero no se limitan a, las condiciones de crecimiento celular, las concentraciones de factor de crecimiento y la sincronización de las etapas de cultivo, los procedimientos de diferenciación descritos en el presente documento pueden dar como resultado aproximadamente el 5%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, o más de aproximadamente el 95% de conversión de células pluripotentes, que incluyen células pluripotentes inducidas, en células multipotentes o diferenciadas, por ejemplo, células del endodermo definitivo, del endodermo del intestino proximal, del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1, del endodermo pancreático positivas para PDX1 o del endodermo pancreático positivas conjuntamente para PDX1/NKX6.1, precursoras endocrinas o precursoras endocrinas positivas conjuntamente para NGN3/NKX2.2, y endocrinas secretoras de hormonas o INS, GCG, GHRL, SST, células endocrinas positivas individuales de PP. En los procesos en los que se emplea el aislamiento de células del mesendodermo o líneas preprimitivas, puede recuperarse una población de células del mesendodermo o líneas preprimitivas sustancialmente pura.

En el presente documento se describen diversas composiciones celulares derivadas de células madre pluripotentes. Un aspecto incluye células iPS y células derivadas de las mismas. Todavía otros procesos y composiciones relacionados pero distintos de los aspectos descritos en el presente documento pueden encontrarse en la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/532.004, titulada DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 23 de diciembre de 2003; solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/566.293, titulada PDX1 EXPRESSING ENDODERM, presentada el 27 de abril de 2004; solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/586.566, titulada CHEMOKINE CELL SURFACE RECEPTOR FOR THE ISOLATION OF DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 9 de julio de 2004; solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/587.942, titulada CHEMOKINE CELL SURFACE RECEPTOR FOR THE ISOLATION OF DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 14 de julio de 2004; solicitud de patente estadounidense n.º 11/021.618, titulada DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 23 de diciembre de 2004 y la solicitud de patente estadounidense n.º 11/115.868, titulada PDX1 EXPRESSING ENDODERM, presentada el 26 de abril de 2005; solicitud de patente estadounidense n.º 11/165.305, titulada METHODS FOR IDENTIFYING FACTORS FOR DIFFERENTIATING DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 23 de junio de 2005; solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/730.917, titulada PDX1-EXPRESSING DORSAL AND VENTRAL FOREGUT ENDODERM, presentada el 27 de octubre de 2005; solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/736.598, titulada MARKERS OF DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 14 de noviembre de 2005; solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/778.649, titulada INSULIN-PRODUCING CELLS AND METHOD OF PRODUCTION, presentada el 2 de marzo de 2006; solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/833.633, titulada INSULIN-PRODUCING CELLS AND METHOD OF PRODUCTION, presentada el 26 de julio de 2006; solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/852.878, titulada ENRICHMENT OF ENDOCRINE PRECURSOR CELLS, IMMATURE PANCREATIC ISLET CELLS AND MATURE PANCREATIC ISLET CELLS USING NCAM, presentada el 18 de octubre de 2006; solicitud de patente estadounidense n.º 11/588.693, titulada PDX1-EXPRESSING DORSAL AND VENTRAL FOREGUT ENDODERM, presentada el 27 de octubre de 2006; solicitud de patente estadounidense n.º 11/681.687, titulada ENDOCRINE PRECURSOR CELLS, PANCREATIC HORMONE-EXPRESSING CELLS AND METHODS OF PRODUCTION, presentada el 2 de marzo de 2007; solicitud de patente estadounidense n.º 11/773.944, titulada METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES, presentada el 5 de julio de 2007; solicitud de patente estadounidense n.º 60/972.174, titulada METHODS OF TREATMENT FOR DIABETES, presentada el 13 de septiembre de 2007; solicitud de patente estadounidense n.º 11/860.494, titulada METHODS FOR INCREASING DEFINITIVE ENDODERM PRODUCTION, presentada el 24 de septiembre de 2007; solicitud de patente estadounidense n.º 60/977.349, titulada CELL SURFACE MARKERS OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS AND CANCER STEM CELLS, presentada el 3 de octubre de 2007; y la solicitud de patente estadounidense n.º 12/099.759, titulada METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES, presentada el 8 de abril de 2008; y la solicitud de patente estadounidense n.º 12/107.020, titulada METHODS FOR PURIFYING ENDODERM AND PANCREATIC ENDODERM CELLS DERIVED FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS, presentada el 21 de abril de 2008.

Los métodos generales para la producción de células de linaje de endodermo derivadas de células hES se describen en las solicitudes estadounidenses relacionadas tal como se indicó anteriormente y D'Amour *et al.* 2005 Nat Biotechnol. 23:1534-41 y D'Amour *et al.* 2006 Nat Biotechnol. 24(11): 1392-401. D'Amour *et al.* describen un protocolo de diferenciación de 5 etapas: fase 1 (da como resultado una producción de endodermo mayoritariamente definitiva), fase 2 (da como resultado una producción mayoritaria de endodermo del intestino proximal negativo para PDX1), fase 3 (da como resultado una producción de endodermo del intestino proximal mayoritariamente positivo para PDX1), fase 4 (da como resultado principalmente una producción de endodermo pancreático o de progenitores endocrinos pancreáticos) y fase 5 (da como resultado una producción de células endocrinas que expresan principalmente hormonas).

El término "trofoectodermo" se refiere a una célula multipotente que tiene la expresión relativamente alta de marcadores seleccionados del grupo que consiste en los genes HAND1, Eomes, MASH2, ESXL1, HCG, KRT18,

PSG3, SFXN5, DLX3, PSX1, ETS2 y ERBB en comparación con los niveles de expresión de HAND1, Eomes, MASH2, ESXL1, HCG, KRT18, PSG3, SFXN5, DLX3, PSX1, ETS2 y ERBB en células o poblaciones de células que no son del trofoectodermo.

5 “Endodermo extraembrionario” se refiere a una célula multipotente que tiene niveles de expresión relativamente altos de marcadores seleccionados del grupo que consiste en los genes SOX7, SOX17, THBD, SPARC, DAB1 o AFP en comparación con los niveles de expresión de SOX7, SOX17, THBD, SPARC, DAB1 o AFP en células del endodermo no extraembrionario o poblaciones de células.

10 El término “células de la línea preprimitiva” se refiere a una célula multipotente que tiene niveles de expresión relativamente altos de los genes marcadores FGF8 y/o NODAL, en comparación con BRACHURY bajo, FGF4 bajo, SNAI1 bajo, SOX17 bajo, FOXA2 bajo, SOX7 bajo y SOX1 bajo.

El término “célula del mesendodermo” se refiere a una célula multipotente que tiene niveles de expresión relativamente altos de los genes marcadores brachyury, FGF4, SNAI1 MIXL1 y/o WNT3, en comparación con SOX17 bajo, CXCR4 bajo, FOXA2 bajo, SOX7 bajo y SOX1 bajo.

15 El término “endodermo definitivo (DE)” se refiere a una célula de linaje del endodermo multipotente que puede diferenciarse en células del tubo del intestino u órganos derivados del tubo del intestino. Según determinados aspectos, las células del endodermo definitivo son células de mamífero y, en un aspecto preferido, las células del endodermo definitivo son células humanas. En algunos aspectos de la presente divulgación, las células del endodermo definitivo expresan o no expresan de manera significativa determinados marcadores. En algunos aspectos, uno o más marcadores seleccionados de SOX17, CXCR4, MIXL1, GATA4, HNF3β, GSC, FGF17, VWF, 20 CALCR, FOXQ1, CMKOR1 y CRIP1 se expresan en células del endodermo definitivo. En otros aspectos, uno o más marcadores seleccionados de OCT4, alfa-fetoproteína (AFP), trombomodulina (TM), SPARC, SOX7 y HNF4alfa no se expresan o expresan significativamente en las células del endodermo definitivo. Las poblaciones de células del endodermo definitivo y los métodos de producción de las mismas también se describen en la solicitud estadounidense n.º 11/021.618, titulada DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 23 de diciembre de 2004.

25 Todavía otros aspectos se refieren a cultivos celulares denominados “células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1” o “células del endodermo del intestino proximal” o equivalentes de los mismos. En algunos aspectos, las células del endodermo del intestino proximal expresan los marcadores SOX17, HNF1β (HNF1B), HNF4alfa (HNF4A) y FOXA1, pero no expresan sustancialmente PDX1, AFP, SOX7 o SOX1. Las poblaciones de células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1 y los métodos de producción de las mismas 30 también se describen en la solicitud estadounidense n.º 11/588.693, titulada PDX1-expressing dorsal and ventral foregut endoderm, presentada el 27 de octubre de 2006.

Otros aspectos descritos en el presente documento se refieren a cultivos celulares de “células del endodermo del intestino proximal dorsalmente polarizadas positivas para PDX1” (células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 dorsales) o simplemente “del endodermo positivas para PDX1”. En algunos aspectos, las células del endodermo positivas para PDX1 expresan uno o más marcadores seleccionados de la tabla 1 y/o uno o más marcadores seleccionados de la tabla 2, también descritos en la solicitud estadounidense relacionada 35 11/588.693 titulada PDX1 EXPRESSING DORSAL AND VENTRAL FOREGUT ENDODERM, presentada el 27 de octubre de 2006, y también la solicitud estadounidense n.º 11/115.868, titulada PDX1-expressing endoderm, presentada el 26 de abril de 2005.

Tabla 1 - Marcadores expresados tanto en endodermo del intestino proximal positivo para PDX1 tanto dorsal como ventral

Símbolo del gen	Unigene	LocusLink	OMIM	Sec. derivada de	Descriptor del gen
ANXA4	Hs.422986	307	106491	NM_001153	anexina A4
ASCL1	Hs.524672	429	100790	BC001638	complejo achaete-scute tipo 1 (<i>Drosophila</i>)
BNC1	Hs.459153	646	601930	NM_001717	basonuclina 1
C10orf30	Hs.498740	222389		A W195407	Marco de lectura abierto 30 del cromosoma 10
C2orf23	Hs.368884	65055	609139	BE535746	Marco de lectura abierto 23 del cromosoma 2
C9orf150	Hs.445356	286343		AI972386	Marco de lectura abierto 150 del cromosoma 9
CDH6	Hs.171054	1004	603007	BC000019	cadherina 6, tipo 2, K-cadherina (riñón fetal)
DACH1	Hs.129452	1602	603803	AI650353	homólogo de dachshund 1 (<i>Drosophila</i>)
DUSP9	Hs.144879	1852	300134	NM_001395	fosfatasa de especificidad dual 9
ELMOD1	Hs.495779	55531		AL359601	proteína que contiene dominio ELMO 1

40

ES 2 849 181 T3

FLJ21462 fis	Hs.24321			A W236803	clon IMAGE de ADNc:5273964, cds parcial
FLJ22761	Hs.522988	80201		W81116	proteína hipotética FLJ22761
GABRA2	Hs.116250	2555	137140	NM_000807	receptor del ácido gamma-aminobutírico (GABA), alfa 2
GRIA3	Hs.377070	2892	305915	BC032004	receptor de glutamato ionotrófico, AMPA 3
HNF4G	Hs.241529	3174	605966	AI916600	factor nuclear de hepatocitos 4, gamma
IDH2	Hs.513141	3418	147650	U52144	isocitrato deshidrogenasa 2 (NADP+), mitocondrial
IL6R	Hs.135087	3570	147880	A V700030	receptor de interleucina 6
KCNJ2	Hs.1547	3759	170390	AF153820	canal de potasio rectificador interno, subfamilia J, miembro 2
KLF3	Hs.298658	51274		AA130132	factor tipo Krüppel 3 (básico)
LGALS3	Hs.531081	3958	153619	A W085690	Lectina, proteína de unión a galactósido, soluble, 3 (galectina 3)
LGALS3 /// GALIG	Hs.531081	3958///	153619	BC001120	lectina, proteína de unión a galactósido, soluble, 3 (galectina 3) /// gen interno de galectina-3
LIPC	Hs.188630	3990	151670	NM_000236	lipasa, hepática
MEIS1	Hs.526754	4211	601739	NM_002398	Meis1, homólogo del sitio 1 de integración viral ecotrópico meloide (ratón)
NR2F1	Hs.519445	7025	132890	AI951185	Receptor nuclear subfamilia 2, grupo F, miembro 1
ONECUT2	Hs.194725	9480	604894	NM_004852	dominio one cut, familia miembro 2
PAPPA	Hs.494928	5069	176385	AA148534	proteína A plasmática asociada con el embarazo, papalisina 1
PDE3B	Hs.445711	5140	602047	NM_000753	fosfodiesterasa 3B, inhibida por cGMP
PGPEP1	Hs.131776	54858		NM_017712	piroglutamyl-peptidasa I
PMS2L1	Hs.520575	5379	605038	D38503	segregación postmeiótica aumentada 2 de tipo 1
SERPINF2	Hs.159509	5345	262850	NM_000934	Inhibidor de serina (o cisteína) proteinasa, clado F (antiplasmina alfa-2, factor derivado del epitelio pigmentario), miembro 2
SLC27A2	Hs.11729	11001	603247	NM_003645	familia 27 de portadores de solutos (transportador de ácidos grasos), miembro 2
SLN	Hs.334629	6588	602203	NM_003063	sarcolipina
SOX9	Hs.2316	6662	114290	NM_000346	SRY (región Y de determinación sexual)-caja 9 (displasia campomélica, inversión sexual autosómica)
SULT2A1	Hs.515835	6822	125263	U08024	Miembro 1 preferido de deshidroepiandrosterona (DHEA) de la familia de la sulfotransferasa, citosólica, 2A,
TFPI	Hs.516578	7035	152310	BF511231	Inhibidor de la ruta del factor de tejidos (inhibidor de coagulación asociado con lipoproteínas)
ZHX1	Hs.521264	11244	604764	AI123518	dedos de zinc y homeosecuencias 1
ZNF467	Hs.112158	168544		BE549732	proteína de dedos de zinc 467
ZNF503	Hs.195710	84858		AA603467	proteína de dedos de zinc 503
	Hs.142869			AI935586	Locus transcrito

Tabla 2 - Marcadores expresados en endodermo del intestino proximal positivo para PDX1 dorsalmente polarizado

ES 2 849 181 T3

Símbolo del gen	Unigene	LocusLink	OMIM	Sec. derivada de	Descriptor del gen
ADORA2A	Hs.197029	135	102776	NM_000675	Receptor de adenosina A2a
AMSH-LP	Hs.16229	57559		AI638611	Proteína de tipo molécula asociada con el dominio SH3 de STAM (AMSH)
BAIAP2L1	Hs.489237	55971		AA628400	proteína asociada a BAI1 2 tipo 1
CD47	Hs.446414	961	601028	BG230614	Antígeno CD47 (antígeno relacionado con Rh, transductor de señales asociado con integrina)
CHN2	Hs.203663	1124	602857	AK026415	Quimerina (quimaerina) 2
CLDN3	Hs.25640	1365	602910	BE791251	claudina 3
CPVL	Hs.233389	54504		NM_031311	carboxipeptidasa, tipo vitelogénico /// carboxipeptidasa, tipo vitelogénico
CREB3L1	Hs.405961	90993		AF055009	proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc 3 tipo 1
DACT1	Hs.48950	51339	607861	NM_016651	homólogo de dapper 1, antagonista de β -catenina (<i>Xenopus</i>)
DPP6	Hs.490684	1804	126141	AW071705	Dipeptidilpeptidasa 6
ELF3	Hs.67928	1999	602191	AF017307	Factor de tipo E74 3 (factor de transcripción del dominio ets, específico epitelial)
ENPP2	Hs.190977	5168	601060	L35594	ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 2 (autotaxina)
EPB41L1	Hs.437422	2036	602879	AA912711	banda 4.1 de proteína de la membrana de eritrocitos tipo 1
FAM46C	Hs.356216	54855		AL046017	familia con similitud de secuencia 46, miembro C familia con similitud de secuencia 49, miembro A /// familia con secuencia
FAM49A	Hs.467769	81553		NM_030797	similitud 49, miembro A
FLJ30596	Hs.81907	133686		AI453203	proteína hipotética FLJ30596
HOXA1	Hs.67397	3198	142955	S79910	homeosecuencia A1
HOXA3	Hs.533357	3200	142954	AW137982	homeosecuencia A3
HOXB2	Hs.514289	3212	142967	NM_002145	homeosecuencia B2
LAF4	Hs.444414	3899	601464	AW085505	Proteína nuclear linfocitaria relacionada con AF4
LOC283658	Hs.87194	283658		AA233912	proteína hipotética LOC283658
MAF	Hs.134859	4094	177075	AF055376	homólogo de oncogén de fibrosarcoma musculoesquelético v-maf (aviar)

ES 2 849 181 T3

MAG	Hs.515354	4099	159460	X98405	glicoproteína asociada con mielina
MYCPBP	Hs.513817	10260	600382	BE268538	proteína de unión al promotor de c-myc
NR4A2	Hs.165258	4929	168600 /	NM_006186	subfamilia 4 de receptores nucleares, grupo A, miembro 2
NRXN3	Hs.368307	9369	600567	AI129949	neurexina 3
NSE1	Hs.260855	151354		AI601101	NSE1
PCGF5	Hs.500512	84333		AL045882	dedo de RING del grupo Polycomb 5
PDE11A	Hs.130312	50940	604961	AB038041	fosfodiesterasa 11A
PDE5A	Hs.370661	8654	603310	BF221547	Fosfodiesterasa 5A, específica de cGMP
PGA3		5220	169710	AI570199	pepsinógeno 3, grupo I (pepsinógeno A)
PLN	Hs.170839	5350	115200	NM_002667	fosfolambán prostaglandina 12 (prostaciclina) sintasa /// prostaglandina 12 (prostaciclina)
PTGIS	Hs.302085	5740	145500	NM_000961	sintasa
RARB	Hs.436538	5915	180220	NM_000965	receptor de ácido retinoico, β
RGN	Hs.77854	9104	300212	D31815	regucalcina (proteína marcadora de senescencia-30)
RND1	Hs.124940	27289	609038	U69563	GTPasa de la familia Rho 1
SFRP5	Hs.279565	6425	604158	NM_003015	proteína relacionada con frizzled secretada 5
SGKL	Hs.380877	23678	607591	AV690866	tipo cinasa regulada por glucocorticoides/suero
SLC16A10	Hs.520321	117247	607550	N30257	familia 16 de portadores de solutos (transportadores de ácido monocarboxílico), miembro 10
SLC16A2	Hs.75317	6567	300095	NM_006517	familia 16 de portadores de solutos (transportadores de ácido monocarboxílico), miembro 2
SLC1A3	Hs.481918	6507	600111	NM_004172	familia 1 de portadores de solutos (transportador de glutamato de alta afinidad glial), miembro 3
SLC30A4	Hs.162989	7782	602095	NM_013309	familia 30 de portadores de solutos (transportador de zinc), miembro 4
SLICK	Hs.420016	343450		AI732637	canal de potasio sensible a ATP activado por sodio y cloruro
SLITRK4	Hs.272284	139065		AL080239	familia de tipo NTRK y SLIT, miembro 4
ST8SIA3	Hs.298923	51046		NM_015879	ST8 alfa-N-acetil-neuraminida alfa-2,8-sialiltransferasa 3

				familia del sitio de integración de MMTV tipo wingless, miembro 5A /// tipo wingless
WNT5A	Hs.152213 7474	164975	AI968085	familia del sitio de integración de MMTV, miembro 5A
XPR1	Hs.227656 9213	605237	AF089744	receptor de retrovirus xenotrópico y politrópico
	Hs.535688		AK001582	CDNA FLJ10720 fis, clone NT2RP3001116
	Hs.127009		AI935541	Locus transcrito
	Hs.4749		AL137310	CDNA FLJ31660 fis, clon NT2RI2004410

5 Las células del endodermo del intestino anterior proximal positivas para PDX1, tales como las producidas según los métodos descritos en el presente documento, son progenitores que pueden usarse para producir células secretoras de hormonas pancreáticas o endocrinas completamente diferenciadas, por ejemplo, células β productoras de insulina. En algunos aspectos de la presente divulgación, las células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 se producen diferenciando las células del endodermo definitivo que no expresan sustancialmente PDX1 (células del endodermo definitivo negativas para PDX1; también denominadas en el presente documento endodermo definitivo) para formar células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1.

10 Tal como se usa en el presente documento, "endodermo pancreático", "epitelio pancreático", "epitelio pancreático (PE)", "progenitor pancreático", "endodermo pancreático positivo para PDX-1 o equivalentes de los mismos son células que presentan al menos una característica del fenotipo, tal como como morfología o expresión de proteínas, de una célula madura del mismo órgano o tejido, por ejemplo, una célula progenitora pancreática que expresa al menos un fenotipo marcador de ese tipo de célula, por ejemplo, células positivas conjuntamente para PDX1, NKX6.1 y PFT1A. El endodermo pancreático derivado de células madre pluripotentes, y al menos las células hES, de esta
15 manera se distingue de otros tipos de células de linaje endodérmico basándose en niveles de expresión diferenciales o altos de marcadores seleccionados de PDX1, NKX6.1, PTFA1A, CPA1, cMYC, NGN3, PAX4, ARX y NKX2.2, pero no expresan sustancialmente genes que son distintivos de las células endocrinas pancreáticas, por ejemplo, CHGA, INS, GCG, GHRL, SST, MAFA, PCSK1 y GLUT1. Además, algunas "células progenitoras endocrinas" que expresan NGN3 pueden diferenciarse en otras estructuras no pancreáticas (por ejemplo, duodeno).
20 En un aspecto, el progenitor endocrino que expresa NGN3 descrito en el presente documento se diferencia en células de linaje pancreático maduro, por ejemplo, células endocrinas pancreáticas. El endodermo pancreático o las poblaciones de células progenitoras endocrinas y métodos de los mismos también se describen en la solicitud estadounidense n.º 11/773.944, titulada Methods of producing pancreatic hormones, presentada el 5 de julio de 2007, y la solicitud estadounidense n.º 12/107.020, titulada METHODS FOR PURIFYING ENDODERM AND
25 PANCREATIC ENDODERM CELLS DERIVED FORM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS, presentada el 21 de abril de 2008.

30 Tal como se usa en el presente documento, "célula precursora endocrina" se refiere a una célula multipotente del linaje del endodermo definitivo que expresa neurogenina 3 (NEUROG3) y que puede diferenciarse adicionalmente en células del sistema endocrino, incluyendo, pero sin limitarse a, células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos. Las células precursoras endocrinas no pueden diferenciarse en tantos tipos diferentes de células, tejidos y/u órganos en comparación con las células del linaje del endodermo definitivo diferenciadas menos específicamente, tales como la célula del endodermo pancreática positiva para PDX1.

35 Tal como se usa en el presente documento, "célula que expresa hormonas de los islotes pancreáticos", "célula endocrina pancreática" o equivalentes de las mismas se refieren a una célula, que se ha derivado de una célula pluripotente *in vitro*, que puede ser polihormonal o monohormonal. Por tanto, las células endocrinas pueden expresar una o más hormonas pancreáticas, que tienen al menos algunas de las funciones de una célula de islote pancreático humana. Las células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos pueden ser maduras o inmaduras. Las células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras pueden distinguirse de las
40 células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos maduras basándose en la expresión diferencial de determinados marcadores, o basándose en sus capacidades funcionales, por ejemplo, la capacidad de respuesta a la glucosa.

45 Se prevén muchos entornos de cultivo o crecimiento de medios de células madre en los aspectos descritos en el presente documento, incluyendo los medios definidos, los medios acondicionados, los medios libres de alimentador, los medios sin suero y similares. Tal como se usa en el presente documento, el término "entorno de crecimiento" o "medio" o equivalentes del mismo es un entorno en el que proliferarán *in vitro* células madre indiferenciadas o diferenciadas (por ejemplo, células madre embrionarias de primates). Las características del entorno incluyen el

medio en el que se cultivan las células y una estructura de soporte (como un sustrato sobre una superficie sólida) si está presente. Los métodos para cultivar o mantener células pluripotentes y/o diferenciar células pluripotentes también se describen en el documento PCT/US2007/062755 titulado COMPOSITIONS AND METHODS USEFUL FOR CULTURING DIFFERENTIABLE CELLS, presentado el 23 de febrero de 2007; la solicitud estadounidense n.º 11/993.399, titulada EMBRYONIC STEM CELL CULTURE COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF, presentada el 20 de diciembre de 2007; y la solicitud estadounidense n.º 11/875.057, titulada Methods and compositions for feeder-free pluripotent stem cell media containing human serum, presentada el 19 de octubre de 2007.

El término “esencialmente” o “sustancialmente” significa o bien un *de minimus* o bien una cantidad reducida de un componente o célula presente en cualquier tipo de suspensión de agregados celulares, por ejemplo, los agregados celulares en suspensión descritos en el presente documento son “esencial o sustancialmente homogéneos”, “esencial o sustancialmente homocelulares” o se componen de “esencialmente de células hES”, “esencial o sustancialmente de células del endodermo definitivo”, “esencial o sustancialmente de células del endodermo del intestino proximal”, “esencial o sustancialmente de células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1”, “esencial o sustancialmente de células del endodermo prepancreático positivas para PDX1”, “esencial o sustancialmente de células progenitoras o del endodermo pancreático positivas para PDX1”, “esencial o sustancialmente de células de la punta del endodermo pancreático positivas para PDX1”, “esencial o sustancialmente de células precursoras endocrinas pancreáticas”, “esencial o sustancialmente de células endocrinas pancreáticas” y similares.

Con respecto a las células en cultivos celulares o en poblaciones de células, el término “sustancialmente libre de” significa que el tipo de célula especificado del que el cultivo celular o la población celular está libre, está presente en una cantidad de menos de aproximadamente el 10%, menos de aproximadamente el 9%, menos de aproximadamente el 8%, menos de aproximadamente el 7%, menos de aproximadamente el 6%, menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2% o menos de aproximadamente el 1% del número total de células presentes en el cultivo celular o la población celular.

Los cultivos celulares pueden hacerse crecer en un medio que contenga suero reducido o sustancialmente libre de suero o sin suero. En determinadas condiciones de cultivo condiciones, las concentraciones de suero pueden oscilar entre aproximadamente el 0% (v/v) y aproximadamente el 10% (v/v). Por ejemplo, en algunos procesos de diferenciación, la concentración de suero del medio puede ser menos de aproximadamente el 0,05% (v/v), menos de aproximadamente el 0,1% (v/v), menos de aproximadamente el 0,2% (v/v), menos de aproximadamente el 0,3% (v/v), menos de aproximadamente el 0,4% (v/v), menos de aproximadamente el 0,5% (v/v), menos de aproximadamente el 0,6% (v/v), menos de aproximadamente el 0,7% (v/v), menos de aproximadamente el 0,8% (v/v), menos de aproximadamente el 0,9% (v/v), menos de aproximadamente el 1% (v/v), menos de aproximadamente el 2% (v/v), menos de aproximadamente el 3% (v/v), menos de aproximadamente el 4% (v/v), menos de aproximadamente el 5% (v/v), menos de aproximadamente el 6% (v/v), menos de aproximadamente el 7% (v/v), menos de aproximadamente el 8% (v/v), menos de aproximadamente el 9% (v/v) o menos de aproximadamente el 10% (v/v). En algunos procesos, las células de las líneas preprimitivas se hacen crecer sin suero o sin reemplazo de suero. En todavía otros procedimientos, las células de las líneas preprimitivas se hacen crecer en presencia de B27. En tales procedimientos, la concentración del complemento de B27 puede oscilar entre aproximadamente el 0,1% (v/v) y aproximadamente el 20% (v/v).

En todavía otros procesos, las células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras se hacen crecer en presencia de B27. En tales procesos, la concentración de complemento de B27 puede oscilar entre aproximadamente el 0,1% (v/v) y aproximadamente el 20% (v/v) o en concentraciones mayores de aproximadamente el 20% (v/v). En determinados procesos, la concentración de B27 en el medio es de aproximadamente el 0,1% (v/v), aproximadamente el 0,2% (v/v), aproximadamente el 0,3% (v/v), aproximadamente el 0,4% (v/v), aproximadamente el 0,5% (v/v), aproximadamente el 0,6% (v/v), aproximadamente el 0,7% (v/v), aproximadamente el 0,8% (v/v), aproximadamente el 0,9% (v/v), aproximadamente el 1% (v/v), aproximadamente el 2% (v/v), aproximadamente el 3% (v/v), aproximadamente el 4% (v/v), aproximadamente el 5% (v/v), aproximadamente el 6% (v/v), aproximadamente el 7% (v/v), aproximadamente el 8% (v/v), aproximadamente el 9% (v/v), aproximadamente el 10% (v/v), aproximadamente el 15% (v/v) o aproximadamente el 20% (v/v). Alternativamente, la concentración del complemento de B27 añadido puede medirse en términos de múltiplos de la concentración de disolución madre de B27 disponible comercialmente. Por ejemplo, B27 está disponible de Invitrogen (Carlsbad, CA) como una disolución madre 50X. La adición de una cantidad suficiente de esta disolución madre a un volumen suficiente de medio de crecimiento produce un medio complementado con la cantidad deseada de B27. Por ejemplo, la adición de 10 ml de disolución madre de B27 50X a 90 ml de medio de crecimiento produciría un medio de crecimiento complementado con B27 5X. La concentración de complemento de B27 en el medio puede ser de aproximadamente 0,1X, aproximadamente 0,2X, aproximadamente 0,3X, aproximadamente 0,4X, aproximadamente 0,5X, aproximadamente 0,6X, aproximadamente 0,7X, aproximadamente 0,8X, aproximadamente 0,9X, aproximadamente 1X, aproximadamente 1,1X, aproximadamente 1,2X, aproximadamente 1,3X, aproximadamente 1,4X, aproximadamente 1,5X, aproximadamente 1,6X, aproximadamente 1,7X, aproximadamente 1,8X, aproximadamente 1,9X, aproximadamente 2X, aproximadamente 2,5X, aproximadamente 3X, aproximadamente 3,5X, aproximadamente 4X, aproximadamente 4,5X, aproximadamente 5X, aproximadamente

6X, aproximadamente 7X, aproximadamente 8X, aproximadamente 9X, aproximadamente 10X, aproximadamente 11X, aproximadamente 12X, aproximadamente 13X, aproximadamente 14X, aproximadamente 15X, aproximadamente 16X, aproximadamente 17X, aproximadamente 18X, aproximadamente 19X, aproximadamente 20X y mayor de aproximadamente 20X.

5 Tal como se usa en el presente documento, compuestos “añadidos de manera exógena” tales como factores de crecimiento, factores de diferenciación y similares, en el contexto de cultivos o medios acondicionados, se refiere a factores de crecimiento que se añaden a los cultivos o medios para complementar cualquier compuesto o factor de crecimiento que puede estar ya presente en el cultivo o los medios. Por ejemplo, en algunos aspectos, los cultivos celulares o las poblaciones de células no incluyen un retinoide añadido de manera exógena.

10 Tal como se usa en el presente documento, “retinoide” se refiere a retinol, retinal o ácido retinoico, así como a derivados de cualquiera de estos compuestos. En un aspecto preferido, el retinoide es ácido retinoico.

15 Por “factor de crecimiento de la familia de FGF”, “un factor de crecimiento de fibroblastos” o “miembro de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos” se entiende un FGF seleccionado del grupo que consiste en FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22 y FGF23. En algunos aspectos, “factor de crecimiento de la familia de FGF”, “un factor de crecimiento de fibroblastos” o “miembro de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos” significa cualquier factor de crecimiento que tenga homología y/o función similar a un miembro conocido de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos.

20 Tal como se usa en el presente documento, “expresión” se refiere a la producción de un material o una sustancia, así como al nivel o la cantidad de producción de un material o una sustancia. Por tanto, determinar la expresión de un marcador específico se refiere a detectar la cantidad o bien relativa o bien absoluta del marcador que se expresa o detectar simplemente la presencia o ausencia del marcador.

25 Tal como se usa en el presente documento, “marcador” se refiere a cualquier molécula que puede observarse o detectarse. Por ejemplo, un marcador puede incluir, pero no se limita a, un ácido nucleico, tal como un transcrito de un gen específico, un producto polipeptídico de un gen, un polipéptido de producto no genético, una glicoproteína, un hidrato de carbono, un glicolípido, un lípido, una lipoproteína o una molécula pequeña (por ejemplo, moléculas que tienen un peso molecular de menos de 10.000 uma).

30 Para la mayoría de los marcadores descritos en el presente documento, se proporciona el símbolo de gen oficial de la Organización del Genoma Humano (HUGO). Estos símbolos, que son desarrollados por el Comité de Nomenclatura Genética de HUGO, proporcionan abreviaturas únicas para cada uno de los genes y productos génicos humanos mencionados. Estos símbolos de genes se reconocen fácilmente y pueden asociarse fácilmente con un único gen humano correspondiente y/o una secuencia de proteína por los expertos habituales en la técnica.

35 Según las designaciones de HUGO, los siguientes símbolos de genes se definen de la siguiente manera: GHRL - grelina; IAPP - polipéptido amiloide de los islotes; INS - insulina; GCG - glucagón; ISL1 - factor de transcripción ISL1; PAX6 - gen de caja apareada 6; PAX4 - gen de caja apareada 4; NEUROG3 - neurogenina 3 (NGN3); NKX2-2 - factor de transcripción relacionado con NKX2, locus 2 (NKX2.2); NKX6-1 - factor de transcripción relacionado con NKX6, locus 1 (NKX6.1); IPF1 - factor promotor de insulina 1 (PDX1); ONECUT1 – dominio one cut, miembro de la familia 1 (HNF6); HLXB9 - homeosecuencia B9 (HB9); TCF2 - factor de transcripción 2, hepático (HNF1b); FOXA1 - forkhead box A1; HGF - factor de crecimiento de hepatocitos; IGF1 - factor de crecimiento 1 similar a la insulina; 40 POU5F1 - dominio POU, clase 5, factor de transcripción 1 (OCT4); NANOG - Homeosecuencia de Nanog; SOX2 - SRY (región Y de determinación sexual)-caja 2; CDH1 - cadherina 1, tipo 1, E-cadherina (ECAD); T - homólogo de brachyury (BRACH); FGF4 - factor 4 de crecimiento de fibroblastos; WNT3 - familia de sitios de integración de MMTV de tipo wingless, miembro 3; SOX17 - SRY (región Y de determinación sexual)-caja 17; GSC - gooseoid; CER1 - (cerberus 1, superfamilia de nudos de cisteína, homólogo (CER)); CXCR4 - receptor 4 de quimiocinas (motivo 45 CXC); FGF17 - factor de crecimiento de fibroblastos 17; FOXA2 - forkhead box A2; SOX7 - SRY (región Y de determinación sexual)-caja 7 ; SOX1 - SRY (región Y de determinación sexual)-caja 1; AFP - alfa-fetoproteína; SPARC - proteína secretada, ácida, rica en cisteína (osteonectina); y THBD - trombomodulina (TM), NCAM - molécula de adhesión de células neurales; SYP - sinaptofisina; ZIC1 - miembro 1 de la familia Zic; NEF3 - neurofilamento 3 (NFM); SST - somatostatina; MAFA - homólogo A del oncogén del fibrosarcoma musculoaponeurótico v-maf; 50 MAFB - homólogo B del oncogén del fibrosarcoma musculoaponeurótico v-maf; SYP – sinaptofisina; CHGA - cromogranina A (proteína secretora paratiroidea 1).

A continuación se proporcionan los nombres de genes completos correspondientes a símbolos de genes distintos de HUGO, así como otras abreviaturas que pueden usarse en el presente documento: SS - somatostatina (SOM); PP - polipéptido pancreático; Péptido C - péptido de conexión; Ex4 - exendina 4; NIC - nicotinamida y DAPT – éster t-butílico de N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina; RA - ácido retinoico; RPMI: medio del Roswell Park Memorial Institute; CMRL: medio del Connaught Medical Research Labs; FBS - suero bovino fetal; NBP10 - proteína de unión a NCAM 10; PTF1a: factor de transcripción específico del páncreas 1a.

La progresión de las células pluripotentes a diversas células multipotentes y/o diferenciadas puede monitorizarse

determinando la expresión relativa de genes, o marcadores génicos, característicos de una célula específica, en comparación con la expresión de un segundo o un gen de control, por ejemplo, genes de mantenimiento. En algunos procesos, la expresión de determinados marcadores se determina detectando la presencia o ausencia del marcador. Alternativamente, la expresión de determinados marcadores puede determinarse midiendo el nivel al que el marcador está presente en las células del cultivo celular o la población celular. En tales procesos, la medición de la expresión del marcador puede ser cualitativa o cuantitativa. Un método para cuantificar la expresión de marcadores que son producidos por genes marcadores es a través del uso de PCR cuantitativa (Q-PCR). Los métodos de realización de Q-PCR son bien conocidos en la técnica. También pueden usarse otros métodos que se conocen en la técnica para cuantificar la expresión del gen marcador. Por ejemplo, la expresión de un producto génico marcador puede detectarse usando anticuerpos específicos para el producto génico marcador de interés.

En algunos procesos, la mayor expresión de los siguientes genes es indicativa de determinadas poblaciones de células, por ejemplo: SOX17, SOX7, AFP o THBD son indicativas de endodermo extraembrionario; NODAL y/o FGF8 son indicativos de una línea preprimitiva; brachyury, FGF4, SNAI1 y/o WNT3 son indicativos de mesendodermo; CER, GSC, CXCR4, SOX17 y FOXA2 son indicativos de células del endodermo definitivo; SOX17, FOXA2, FOXA1, HNF1B y HNF4A son indicativos de endodermo del intestino proximal (o endodermo negativo para PDX1); PDX1, HNF6, SOX9 y PROX1 son indicativos de endodermo positivo para PDX1; PDX1, NKX6.1, PTFA1, CPA y cMYC son indicativos de epitelio pancreático (PE o progenitor pancreático); NGN3, PAX4, ARX y NKX2.2 son indicadores de células precursoras endocrinas; e INS, GCG, GHRL, SST y PP son indicativos de las diversas células endocrinas; la expresión génica relativamente alta de MAFA con respecto a MAFB es indicativa de células endocrinas secretoras de insulina; y la expresión relativamente alta de MAFB con respecto a la expresión del gen MAFA es indicativa de células endocrinas secretoras de glucagón.

Los términos factor de crecimiento de fibroblastos 7 (FGF7) y factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) son sinónimos.

Métodos para la producción de células madre pluripotentes inducidas (iPS)

Los aspectos descritos en el presente documento no se limitan a ningún tipo de célula iPS ni a ningún método para producción de la célula iPS. Los aspectos no están limitados ni dependen de los niveles de eficiencia de producción de las células iPS, porque existen diversos métodos. Los aspectos descritos en el presente documento se aplican a la diferenciación de células iPS en células de linaje del endodermo y a usos de las mismas.

Se han descrito métodos virales, no virales y virales no integrantes para generar células madre pluripotentes inducidas (iPSC) usando adenovirus, plásmidos o la escisión de factores de reprogramación usando Cre-loxP3 o transposición piggyBAC. Véanse Stadtfeld, M., *et al.*, Science 322, 945-949 (2008); Okita, K. *et al.*, Science 322, 949-953 (2008); Kaji, K. *et al.* Nature 458, 771-775 (2009); Soldner, F. *et al.* Cell 136, 964-977 (2009); y Woltjen, K. *et al.* Nature 458, 766-770 (2009). Véanse también la solicitud de patente estadounidense n.º 20100003757 concedida a Mack, A. *et al.* (publicada el 7 de enero de 2010) y el documento n.º PCT/US2009/037429 concedido a Shi *et al.* Sin embargo, estos métodos tienen bajas eficiencias de reprogramación (<0,003%) y pueden dejar secuencias de vector residuales a pesar de la escisión, lo que limita sus aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, la integración viral en el genoma del huésped y la sobreexpresión de los factores de transcripción anteriores se han asociado con la tumorigénesis; y una expresión transgénica residual es posiblemente la característica que distingue a las células ES y las células iPS. Véanse Solder, F. *et al.*, Cell 136:964-977 (2009); Foster *et al.*, Oncogene 24:1491-1500 (2005); y Hochedlinger, K. *et al.*, Cell 121:465-477 (2005).

En otros aspectos de la divulgación, los métodos para generar iPSC incluyen vectores episómicos derivados del virus de Epstein-Barr. Véanse Yu, J. *et al.* Science 324, 797-801 (2009) y la solicitud estadounidense 20100003757 concedida a Mack, A. *et al.* Publicada el 7 de enero de 2010. Estos métodos requieren tres plásmidos distintos que lleven una combinación de siete factores, incluyendo el oncogén SV40.

En otro aspecto de la divulgación, los métodos para generar iPSC incluyen iPSC basadas en proteínas de células fetales y neonatales de ratón y humanas. Véanse Zhou, H. *et al.* Cell Stem Cell 4, 381-384 (2009); y Kim, D. *et al.* Cell Stem Cell 4, 472-476 (2009). Estas metodologías se logran usando un tratamiento químico (por ejemplo, ácido valproico en el caso de Zhou *et al.* 2009 citado anteriormente) o muchas tandas de tratamiento (Kim *et al.* 2009, citado anteriormente).

En otro aspecto de la divulgación, pueden usarse plásmidos o vectores en minicírculo, que son moléculas de ADN superenrolladas que carecen de un origen bacteriano de replicación y genes de resistencia a antibióticos. Véanse Chen, Z.-Y. *et al.*, Mol. Ther. 8, 495-500 (2003); Chen, Z.-Y. *et al.*, Hum. Gene Ther. 16, 126-131 (2005); y Jia, F. *et al.*, Nature Methods Advance Publication Online 7 de febrero de 2010. Estas metodologías generan iPSC con mayores eficiencias de transfección y una expresión ectópica más prolongada porque tienen una menor activación de los mecanismos de silenciamiento exógeno.

Todavía en otro aspecto de la divulgación, las células iPS pueden generarse a partir de pacientes humanos con diversas enfermedades incluyendo pacientes diabéticos, pacientes con ELA, distrofia muscular espinal y Parkinson. Véanse Maehr *et al.* PNAS USA 106(37):15768-73 (2009); Dimos *et al.*, Science, 321:1218-21 (2008); Ebert *et al.*

5 Nature 457:277-80 (2009); Park *et al.* Cell 134:877-886 (2008); y Soldner *et al.*, Cell 136:964-977. Al menos una ventaja de producir células hIPS a partir de pacientes con enfermedades específicas es que la célula derivada contendría el genotipo y las respuestas celulares de la enfermedad humana. Además, véase la tabla 3 que enumera al menos algunas líneas de células iPS humanas existentes. Esta información se obtuvo de la bibliografía y de las bases de datos disponibles públicamente que incluyen, por ejemplo, el National Institutes of Health (NIH) Stem Cell Registry, el Human Embryonic Stem Cell Registry y el International Stem Cell Registry ubicado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Massachusetts, Worcester, Massachusetts, EE.UU.. Estas bases de datos se actualizan periódicamente a medida que las líneas celulares están disponibles y se obtiene el registro.

Tabla 3: lista de líneas de células madre pluripotentes inducidas humanas (hIPS)

<p>Universidad de Wisconsin - Madison (EE.UU.)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. IPS(FORES-KIN)-1 (Normal; 46XY; Yu, J., <i>et al.</i> [Thomson] Science. 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells 318(5858):1917-20.) 2. IPS(FORES-KIN)-2 (Normal; 46XY; Yu, J., <i>et al.</i> [Thomson] Science. 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells 318(5858):1917-20.) 3. IPS(FORES-KIN)-3 (Normal; 46XY; Yu, J., <i>et al.</i> [Thomson] Science. 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells 318(5858):1917-20.) 4. IPS(FORES-KIN)-4 (Normal; 46XY; Yu, J., <i>et al.</i> [Thomson] Science. 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells 318(5858):1917-20.) 5. IPS(IMR90)-1 (Normal; 46XX; Yu, J., <i>et al.</i> [Thomson] Science. 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells 318(5858):1917-20.) 6. IPS(IMR90)-2 (Normal; 46XX; Yu, J., <i>et al.</i> [Thomson] Science. 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells 318(5858):1917-20.) 7. IPS(IMR90)-3 (Normal; 46XX; Yu, J., <i>et al.</i> [Thomson] Science. 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells 318(5858):1917-20.) 8. IPS(IMR90)-4 (Normal; 46XX; Yu, J., <i>et al.</i> [Thomson] Science. 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells 318(5858):1917-20.) 9. IPS-SMA-3,5 (Normal; 46XY; Atrofia muscular espinal de tipo 1; Ebert, A. D., <i>et al.</i> 2009. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient Nature. 457:277-80) 10. IPS-SMA-3,6 (Normal; 46XY; Atrofia muscular espinal de tipo 1; Ebert, A. D., <i>et al.</i> 2009. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient Nature. 457:277-80) 11. IPS-WT (Normal; 46XX; Atrofia muscular espinal de tipo 1; Ebert, A. D., <i>et al.</i> 2009. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient Nature. 457:277-80)
<p>Universidad de California, Los Angeles (EE.UU.)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. IPS-1 (Karumbayaram, S. <i>et al.</i> 2009. Directed Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells Generates Active Motor Neurons Stem Cells. 27:806-811; Lowry, W. E., <i>et al.</i> 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts Proc Natl Acad Sci U S A. 105:2883-8) 2. IPS-2 (Karumbayaram, S. <i>et al.</i> 2009. Directed Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells Generates Active Motor Neurons Stem Cells. 27:806-811; Lowry, W. E., <i>et al.</i> 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts Proc Natl Acad Sci U S A. 105:2883-8) 3. IPS-5 (Lowry, W. E., <i>et al.</i> 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts Proc Natl Acad Sci U S A.

	<p>105:2883-8)</p> <p>4. IPS-7 (Lowry, W. E., <i>et al.</i> 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts Proc Natl Acad Sci U S A. 105:2883-8)</p> <p>5. IPS-18 (Karumbayaram, S. <i>et al.</i> 2009. Directed Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells Generates Active Motor Neurons Stem Cells. 27:806-811; Lowry, W. E., <i>et al.</i> 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts Proc Natl Acad Sci U S A. 105:2883-8)</p> <p>6. IPS-24 (Lowry, W. E., <i>et al.</i> 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts Proc Natl Acad Sci U S A. 105:2883-8)</p> <p>7. IPS-29 (Lowry, W. E., <i>et al.</i> 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts Proc Natl Acad Sci U S A. 105:2883-8)</p>
<p>Hospital Monte Sinai (Samuel Lunenfeld Research Institute; EE.UU.)</p>	<p>1. 60 (Woltjen, K. <i>et al.</i> 2009. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells Nature. 458(7239):766-70)</p> <p>2. 61 (Woltjen, K. <i>et al.</i> 2009. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells Nature. 458(7239):766-70)</p> <p>3. 66 (Woltjen, K. <i>et al.</i> 2009. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells Nature. 458(7239):766-70)</p> <p>4. 67 (Woltjen, K. <i>et al.</i> 2009. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells Nature. 458(7239):766-70)</p> <p>5. HIPSC117 (Kaji K, <i>et al.</i> 2009 Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors Nature 458(7239):771-5)</p> <p>6. HIPSC121 (Kaji K, <i>et al.</i> 2009 Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors Nature 458(7239):771-5)</p> <p>7. HIPSC122 (Kaji K, <i>et al.</i> 2009 Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors Nature 458(7239):771-5)</p>
<p>Hospital Infantil - Boston (EE.UU.)</p>	<p>1. 551-IPS8 (Park IH, <i>et al.</i> 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature 451:141-6).</p> <p>2. ADA-IPS2 (inmunodeficiencia combinada grave relacionada con deficiencia de adenosina desaminasa (ADA-SCID) (GGG>AGG, exón 7, gen ADA); Park, I. H. <i>et al.</i> 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)</p> <p>3. ADA-IPS3 (inmunodeficiencia combinada grave relacionada con deficiencia de adenosina desaminasa (ADA-SCID) (GGG>AGG, exón 7, gen ADA); Park, I. H. <i>et al.</i> 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)</p> <p>4. BJ1-IPS1 (Park, I. H. <i>et al.</i> 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)</p> <p>5. BMD-IPS1 (Hombre; Distrofia muscular de Becker (BMD) (mutación no identificada en distrofina); Park, I. H. <i>et al.</i> 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell 134(5):877-86)</p> <p>6. BMD-IPS4 (Normal; 46XY; Distrofia muscular de Becker (BMD) (mutación no identificada en distrofina); Park, I. H. <i>et al.</i> 2008. Disease-</p>

- Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)
7. DH1CF16-IPS1 (Normal; 46XY; Park, I. H. *et al.* 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)
 8. DH1CF32-IPS2 (Hombre; Park, I. H. *et al.* 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)
 9. DHIF-IPS3-3(Normal; 46XY; Park, I. H. *et al.* 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)
 - 10.DMD-IPS1 ((Normal; 46XY; DMD) Distrofia muscular de Duchenne (delección del exón 45-52, gen distrofina; Park, I. H. *et al.* 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)
 11. DMD-IPS2 (Hombre; Distrofia muscular de Duchenne (DMD) (delección del exón 45-52, gen distrofina; Park, I. H. *et al.* 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)
 - 12.DS1-IPS4 (Hombre; síndrome de Down (trisomía 21); Park, I. H. *et al.* 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)
 - 13.DS2-IPS1 (Hombre; síndrome de Down (trisomía 21); Park, I. H. *et al.* 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)
 - 14.DS2-IPS10 (Hombre; síndrome de Down (trisomía 21); Park, I. H. *et al.* 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)
 - 15.GD-IPS1(Hombre; enfermedad de Gaucher tipo III (AAC > AGC, exón 9, inserción en G, nucleótido 84 de ADNc, gen GBA; Park, I. H. *et al.* 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)
 - 16.GD-IPS3 (Hombre; enfermedad de Gaucher tipo III (AAC > AGC, exón 9, inserción en G, nucleótido 84 de ADNc, gen GBA; Park, I. H. *et al.* 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)
 - 17.HFIB2-IPS2 (Park, I. H., *et al.* 2008. Generation of human-induced pluripotent stem cells Nat Protoc. 3:1180-6 ; Park, I. H. *et al.* 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors Nature. 451:141-6)
 - 18.HFIB2-IPS4 (Park, I. H., *et al.* 2008. Generation of human-induced pluripotent stem cells Nat Protoc. 3:1180-6 ; Park, I. H. *et al.* 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors Nature. 451:141-6)
 - 19.HFIB2-IPS5 (Park, I. H., *et al.* 2008. Generation of human-induced pluripotent stem cells Nat Protoc. 3:1180-6 ; Park, I. H. *et al.* 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors Nature. 451:141-6)
 20. JDM-IPS1 1 (Normal, 46XX; Diabetes mellitus juvenil (multifactorial); Park, I. H. *et al.* 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)
 21. JDM-IPS 1 (Normal, 46XX; Diabetes mellitus juvenil (multifactorial); Park, I. H. *et al.* 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)
 22. JDM-IPS2 (Mujer; Diabetes mellitus juvenil (multifactorial); Park, I. H. *et al.* 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)

ES 2 849 181 T3

	<p>23. JDM-IPS3 (Mujer; Diabetes mellitus juvenil (multifactorial); Park, I. H. <i>et al.</i> 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)</p> <p>24.LNSC-IPS2 (Mujer; síndrome de Lesch-Nyhan (portador, heterozigosis de HPRT1; Park, I. H. <i>et al.</i> 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)</p> <p>25.MRC5-IPS7 (Hombre; Park, I. H. <i>et al.</i> 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)</p> <p>26.MRC5-IPS12 (Normal; 46XY; Park, I. H. <i>et al.</i> 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)</p> <p>27.MRC5-IPS1 (Hombre; Park, I. H. <i>et al.</i> 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)</p> <p>28.PD-IPS1 (hombre; Enfermedad de Parkinson (multifactorial); Park, I. H. <i>et al.</i> 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)</p> <p>29.SBDS-IPS1 (Hombre; síndrome de Swachman-Bodian-Diamond (IV2 + 2T>C y IV3 - 1G>A, gen SBDS; Park, I. H. <i>et al.</i> 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)</p> <p>30.SBDS-IPS2</p> <p>31.SBDS-IPS3 (Normal; 46XY; síndrome de Swachman-Bodian-Diamond (IV2 + 2T>C y IV3 - 1G>A, gen SBDS; Park, I. H. <i>et al.</i> 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Cell134(5):877-86)</p>
<p>Universidad de Harvard (EE.UU.)</p>	<p>1. A29a (46XX; esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (L144F [Leu144 > Phe] gen de alelo dominante de la superóxido dismutasa (SOD1); raza blanca; Dimos, J. T., <i>et al.</i> 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons Science. 321:1218-21)</p> <p>2. A29b (46XX; esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (L144F [Leu144 > Phe] gen de alelo dominante de la superóxido dismutasa (SOD1); raza blanca; Dimos, J. T., <i>et al.</i> 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons Science. 321:1218-21)</p> <p>3. A29c (46XX; esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (L144F [Leu144 > Phe] gen de alelo dominante de la superóxido dismutasa (SOD1); raza blanca; Dimos, J. T., <i>et al.</i> 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons Science. 321:1218-21)</p>
<p>Salk Institute (EE.UU.)</p>	<p>1. HAIR-IPS 1 (Aasen, T., <i>et al</i> [Belmonte, J. C.] 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes Nat Biotechnol. 26:1276-84)</p> <p>2. HAIR-IPS2 (Aasen, T., <i>et al</i> [Belmonte, J. C.] 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes Nat Biotechnol. 26:1276-84)</p>
<p>Royan Institute (Irán)</p>	<p>1. R.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos)</p> <p>2. BOM.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos)</p> <p>3. FHC.1.H.iPSC.3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos)</p> <p>4. GSD.1.H.iPSC.7 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos)</p> <p>5. TYR.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos)</p>

ES 2 849 181 T3

	<p>6. HER.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos)</p> <p>7. R.1.H.iPSC.4 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos)</p> <p>8. R.1.H.iPSC.9 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos)</p> <p>9. RP2.H.iPSC.3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; células iPS)</p> <p>10.LCA.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; células iPS)</p> <p>11.USH.1.H.iPSC.6 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos)</p> <p>12.RP.1.H.iPSC.2 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos)</p> <p>13.ARM.1.H.iPSC.2 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; fibroblastos humanos)</p> <p>14.LHON.1.H.iPSC.5 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; células iPS)</p> <p>15.CNS.1.H.iPSC. 10 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; células iPS)</p> <p>16.CNS.2.H.iPSC.7 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; células iPS)</p>
Centro de Medicina Regenerativa en Barcelona (España)	<p>1. KiPS4F-1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; queratinocitos de prepucio humanos; 46XY)</p> <p>2. KiPS3F-7 (OCT4, Sox2, KLF4); queratinocitos de prepucio humanos)</p> <p>3. KiPS4F-8 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc queratinocitos de prepucio humanos; 46XY)</p> <p>4. cFA404-KiPS4F-1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; queratinocitos epidérmicos; 46XY)</p> <p>5. cFA404-KiPS4F-3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; queratinocitos epidérmicos; 46XY)</p>
Universidad Paris-Sud 11 (Francia)	<p>1. PB03 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; amniocitos primarios; 46XX; Lentivirus)</p> <p>2. PB04 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; amniocitos primarios; B-Thalassemia affected; 46XY; Lentivirus)</p> <p>3. PB05-1 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; amniocitos primarios; afectado por B-talasemia; 46XY; Lentivirus)</p> <p>4. PB05 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; amniocitos primarios; afectado por B-talasemia; 46XY; Lentivirus)</p> <p>5. PB06 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; amniocitos primarios; síndrome de Down; 47XY, +21; Lentivirus)</p> <p>6. PB06-1 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; amniocitos primarios; síndrome de Down; 47XY, +21; Lentivirus)</p> <p>7. PB07 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; amniocitos primarios; 46XY; Retrovirus)</p> <p>8. PB08 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; amniocitos primarios; 46XY; Retrovirus)</p> <p>9. PB09 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; amniocitos primarios; 46XY; Lentivirus)</p> <p>10.PB10 (Oct4, Sox2; amniocitos primarios 46XY, Lentivirus)</p>
Universidad de	<p>1. 201B1 (fibroblasto humano; 46XX)</p>

ES 2 849 181 T3

<p>Kyoto (Japón)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 2. 201B2 (fibroblasto humano; 46XX) 3. 201B3 (fibroblasto humano; 46XX) 4. 201B6 (fibroblasto humano; 46XX) 5. 201B7 (fibroblasto humano; 46XX) 6. 243H1 (fibroblasto humano) 7. 243H7 (fibroblasto humano) 8. 246B1 (Normal, 46XX) 9. 246B2 (Normal, 46XX) 10. 246B3 (Normal, 46XX) 11. 246B4 (Normal, 46XX) 12. 246B5 (Normal, 46XX) 13. 246B6 (Normal, 46XX) 14. 246G1 (fibroblasto humano; Takahashi, K., <i>et al.</i> 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72) 15. 246G3 (fibroblasto humano; Takahashi, K., <i>et al.</i> 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72) 16. 246G4 (fibroblasto humano; Takahashi, K., <i>et al.</i> 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72) 17. 246G5 (fibroblasto humano; Takahashi, K., <i>et al.</i> 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72) 18. 246G6 (fibroblasto humano; Takahashi, K., <i>et al.</i> 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72) 19. 253F1 (Normal, 46XX; Takahashi, K., <i>et al.</i> 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72) 20. 253F2 (Normal, 46XX; Takahashi, K., <i>et al.</i> 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72) 21. 253F3 (Normal, 46XX; Takahashi, K., <i>et al.</i> 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72) 22. 253F4 (Normal, 46XX; Takahashi, K., <i>et al.</i> 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72) 23. 253F5 (Normal, 46XX; Takahashi, K., <i>et al.</i> 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell. 131:861-72)
<p>Shanghai Institutes for Biological Sciences (China)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 24. HAFDC-IPS-6 (Li C., <i>et al.</i> 2009 Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells Hum Mol Genet. 15 de noviembre de 2009;18(22):4340-9)

	25. IPS-S (Liao, J., <i>et al.</i> 2008. Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors <i>Cell Res.</i> 18:600-3)
--	---

Otra ventaja es que tales células hIPS serían una población de células autólogas inmunológicamente emparejadas; y las células específicas del paciente permitirían estudiar el origen y la progresión de la enfermedad. Por tanto, es posible comprender las causas fundamentales de una enfermedad, lo que puede proporcionar conocimientos que conduzcan al desarrollo de tratamientos profilácticos y terapéuticos para la enfermedad.

Células somáticas desdiferenciadas pluripotentes

Recientemente, los estudios que usan determinados factores de reprogramación nuclear han permitido que las células madre pluripotentes o células madre de tipo pluripotente se deriven de las propias células somáticas del paciente. Estas células también se denominan células madre pluripotentes inducidas (iPS). La presente divulgación describe diversas líneas de células iPS proporcionadas por Shinya Yamanaka, Universidad de Kyoto. Sin embargo, otras líneas de células iPS, por ejemplo, las descritas por James Thomson *et al.* A1. son por la divulgación en el presente documento. Véanse la publicación estadounidense 20090047263, publicación internacional WO2005/80598, publicación estadounidense 20080233610 y publicación internacional WO2008/11882. Por tanto, tal como se usa en el presente documento, "células madre pluripotentes inducidas (iPS)" significa células que tienen propiedades similares a otras células madre pluripotentes, por ejemplo, células hES, células hEG, células pPS (madre pluripotente de primates), células partenogénicas y similares.

Los factores de programación nuclear se describen en la publicación estadounidense 20090047263, publicación internacional WO2005/80598, publicación estadounidense 20080233610 y publicación internacional WO2008/11882 y se usaron para inducir la reprogramación de una célula diferenciada sin usar óvulos, embriones o células ES. Los métodos para preparar células iPS inducidas a partir de células somáticas usando el factor de reprogramación nuclear similar al usado y descrito en la presente divulgación no están particularmente limitados. En aspectos preferidos, el factor de reprogramación nuclear se pone en contacto con las células somáticas en un entorno en el que pueden proliferar las células somáticas y las células madre pluripotentes inducidas. Una ventaja de determinados aspectos descritos en el presente documento es que una célula madre pluripotente inducida puede prepararse poniendo en contacto un factor de reprogramación nuclear con una célula somática en ausencia de óvulos, embriones o células madre embrionarias (ES). Mediante el uso de un factor de reprogramación nuclear, el núcleo de una célula somática puede reprogramarse para obtener una célula iPS o una "célula de tipo ES".

Las células madre pluripotentes descritas en el presente documento, ya sean células hES o células iPS, pueden expresar cualquier número de marcadores de células pluripotentes, incluyendo pero sin limitarse a: fosfatasa alcalina (AP); ABCG2; antígeno-1 embrionario específico de fase (SSEA-1); SSEA-3; SSEA-4; TRA-1-60; TRA-1-81; Tra-2-49/6E; ERas/ECAT5, E-cadherina; β .III-tubulina; α .-actina del músculo liso (α .-SMA); factor de crecimiento de fibroblastos 4 (Fgf4), Cripto, Dax1; proteína de dedos de zinc 296 (Zfp296); N-acetiltransferasa-1 (Nat1); (transcripto 1 asociado a células ES (ECAT1); ESG1/DPPA5/ECAT2; ECAT3; ECAT6; ECAT7; ECAT8; ECAT9; ECAT10; ECAT15-1; ECAT15-2; Fth117; Sal14; factor de transcripción de células embrionarias indiferenciadas (Utf1); Rex1; p53; G3PDH; telomerasa, incluyendo TERT; genes del cromosoma X silenciado; Dnmt3a; Dnmt3b; TRIM28; proteína que contiene F-box 15 (Fbx15); Nanog/ECAT4; Oct3/4; Sox2; Klf4; c-Myc; Esrrb; TDGF1; GABRB3; Zfp42, FoxD3; GDF3; CYP25A1; desarrollo asociado a la pluripotencia 2 (DPPA2); punto de corte 1 del linfoma de células T (Tcl1); DPPA3/Stella; DPPA4 y similares. Se entiende que la presente divulgación no se limita a los marcadores enumerados en el presente documento, y abarca marcadores tales como marcadores de superficie celular, antígenos y otros productos génicos incluyendo EST, ARN (incluyendo microARN y ARN antisentido), ADN (incluyendo genes y ADNc), y porciones de los mismos.

En un aspecto, las líneas de células iPS usadas en el presente documento contienen los siguientes genes de factores de reprogramación nuclear: un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf y un gen de la familia Sox. En una línea de células iPS, se proporcionan cada una de las siguientes tres clases de genes: Oct3/4, Klf4 y Sox2. Se emplearon otros productos génicos de líneas de células iPS de cada una de las siguientes tres clases de genes: un gen de la familia Oct, un gen de la familia Klf y un gen de la familia Myc, por ejemplo, Oct3/4, Klf4 y c-Myc. Por consiguiente, se entiende que el factor de reprogramación nuclear puede estar con o sin el gen de la familia Myc.

Los factores de reprogramación nuclear descritos en el presente documento y también conocidos en la técnica, pueden usarse para generar células iPS a partir de células somáticas adultas diferenciadas, y no están limitados por el tipo de células somáticas que van a reprogramarse, es decir, puede reprogramarse o desdiferenciarse cualquier clase de célula somática. Debido a que la reprogramación de un somático no requiere un óvulo y/o un embrión, una célula iPS puede ser una célula de mamífero, por tanto, brinda la oportunidad de generar células madre pluripotentes específicas del paciente o de la enfermedad.

Suspensión de agregados de células madre pluripotentes

En contraste con los métodos previamente conocidos de ingeniería de tejidos que se basan en la siembra de células individuales en armazones, matrices y/o geles de polímero, los aspectos descritos en el presente documento pueden usar suspensiones de agregados celulares formadas a partir de células madre pluripotentes, suspensiones de células individuales o suspensiones de células individuales diferenciadas derivadas de las mismas. Los métodos de procesamiento y/o fabricación de la suspensión de agregados de células madre y la diferenciación de las células de los mismos se describen en las solicitudes internacionales PCT/US2007/062755 y PCT/US2008/082356.

En un aspecto, se proporcionan métodos para producir suspensiones de agregados de células madre pluripotentes a partir de una suspensión de células individuales de cultivos de células madre pluripotentes, por ejemplo, cultivos de células hES o iPS. La célula madre pluripotente puede cultivarse inicialmente en alimentadores de fibroblastos o puede estar libre de alimentador. Los métodos de aislamiento de células hES y el cultivo en células alimentadoras humanas se describen en la patente estadounidense n.º 7.432.104.

Tal como se usa en el presente documento, "suspensión de una célula individual" o equivalentes de la misma se refiere a una suspensión de una célula individual pluripotente, multipotente o diferenciada terminalmente, o una suspensión de una célula individual derivada de una célula pluripotente o multipotente, por cualquier medio mecánico o químico. Existen varios métodos para disociar agrupaciones de células para formar suspensiones de células individuales a partir de tejidos primarios, células adheridas en cultivo y agregados, por ejemplo, fuerzas físicas (disociación mecánica como rascador de células, trituración a través de una pipeta de calibre estrecho, aspiración con aguja fina, disgregación con vórtex y filtración forzada a través de una malla fina de nailon o acero inoxidable), enzimas (disociación enzimática como tripsina, colagenasa, Accutase™ y similares), o una combinación de ambas. Además, los métodos y las condiciones de los medios de cultivo que pueden soportar la disociación unicelular de células pluripotentes, multipotentes o diferenciadas son útiles para la expansión, clasificación celular y siembra definida para ensayos en placas de pocillos múltiples y permiten la automatización de los procedimientos de cultivo y la expansión clonal.

Otros aspectos proporcionan métodos de producción de suspensiones de agregados de células madre pluripotentes directamente en un medio de diferenciación, por ejemplo, un medio de diferenciación que contiene un agente, preferiblemente un miembro de la familia de TGFβ, que puede activar una familia de receptores de TGFβ, por ejemplo, activina A, activina B, GDF-8, GDF-11 y Nodal. Los factores de crecimiento para la producción de endodermo se describen en la solicitud internacional n.º PCT/US2008/065686. Los métodos de producción de suspensión de agregados celulares en un medio de diferenciación pueden distinguirse de otros métodos, también descritos en el presente documento, que se proporcionan para la producción de cultivos en suspensión de agregados celulares en un medio de células madre pluripotentes, por ejemplo, StemPro® hES SFM (Invitrogen) basado en medios DC-HAIF a base de herregulina en el documento PCT/US2007/062755.

Los aspectos descritos en el presente documento se refieren a métodos para generar un agregado de células pluripotentes en suspensión a partir de un cultivo adherente pluripotente, cultivando una célula pluripotente en una condición de cultivo de crecimiento adherente que permite la expansión en un estado indiferenciado; disociando el cultivo de células pluripotentes adherentes en un único cultivo en suspensión de células; poniendo en contacto el cultivo en suspensión de células individuales con una primera condición de cultivo de diferenciación que permite la formación de agregados de células derivados de hES en suspensión agitando el cultivo en suspensión de células individuales hasta un período de tiempo en el que el cultivo en suspensión de células individuales forma un agregado celular derivado de pluripotentes en suspensión, generando así un agregado celular derivado de pluripotentes en suspensión. En aspectos preferidos, la agitación del cultivo en suspensión de células individuales se realiza mediante rotación a de aproximadamente 80 rpm a 160 rpm.

Los aspectos descritos en el presente documento también se refieren a métodos para generar un agregado de células derivadas de pluripotentes en suspensión a partir de una suspensión de células individuales derivadas de pluripotentes, cultivar una célula hES en una condición de cultivo de crecimiento adherente que permite la expansión en un estado indiferenciado; poner en contacto la célula hES indiferenciada con una primera condición de cultivo diferenciador adecuada para diferenciar la célula hES y dar como resultado una célula adherente derivada de pluripotentes; disociando la célula adherente derivada de hES en un único cultivo en suspensión celular; poner en contacto el cultivo en suspensión de células individuales con una segunda condición de cultivo de diferenciación que permite la formación de agregados de células derivadas de hES en suspensión agitando el cultivo en suspensión de células individuales hasta un período de tiempo en el que el cultivo en suspensión de células individuales forma un agregado celular derivado de pluripotentes, en suspensión, generando así un agregado celular derivado de pluripotentes en suspensión. En aspectos preferidos, la agitación del cultivo en suspensión de células individuales se realiza mediante rotación a de aproximadamente 80 rpm a 160 rpm.

En aspectos preferidos, los cultivos en suspensión a escala de fabricación utilizan la perfusión continua de medios como un método para mantener la viabilidad celular mientras se maximiza la densidad celular. En este contexto, el intercambio de medios contribuye a la cizalladura del fluido al cultivo que afecta a las células adherentes y los agregados suspendidos de manera diferente. Las células adherentes inmóviles están sometidas a la tensión de corte del fluido cuando el medio fluye tangencialmente a través de la superficie celular. Por el contrario, los

agregados suspendidos experimentan una tensión de corte significativamente menor en la superficie del agregado, ya que los agregados son libres de caer en respuesta a la tensión de corte aplicada. Se espera que la tensión de corte prolongada sea perjudicial para las células pluripotentes adherentes y que se prefiera el formato de agregado suspendido para una supervivencia y función óptimas. Por tanto, en base a la necesidad de un procedimiento de fabricación eficiente para la producción de células madre pluripotentes y/o células progenitoras multipotentes derivadas de células madre pluripotentes y la mecánica observada anteriormente relacionada con la tasa de cizalladura y la tensión de corte, los aspectos descritos en el presente documento proporcionan, por primera vez, métodos de fabricación para la producción de células madre pluripotentes y/o células progenitoras multipotentes derivadas de células madre pluripotentes en formato de suspensión, en particular, formato de suspensión de agregado de células.

En aún otro aspecto, las suspensiones de agregados de células hES se cultivaron en un medio sustancialmente libre de suero y además en ausencia de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) añadido de manera exógena. Esto se distingue de la patente estadounidense n.º 7.005.252 concedida a Thomson, J., que requiere el cultivo de células hES en un medio sin suero pero que contiene factores de crecimiento añadidos de manera exógena, incluyendo FGF. En algunos aspectos, las suspensiones de agregados de células iPS se cultivan en un medio sustancialmente libre de suero y además en ausencia de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) añadido de manera exógena.

En contraste con los agregados de células producidos por métodos previamente conocidos que pueden variar tanto en tamaño como en forma, los agregados de células y los métodos descritos en el presente documento tienen una distribución de forma y tamaño estrecha, es decir, los agregados de células son sustancialmente uniformes en tamaño y/o forma. La uniformidad de tamaño de los agregados de células es fundamental para el rendimiento de la diferenciación y la homogeneidad del cultivo. Al aplicar el análisis de transporte de masa básico a los agregados, se espera que la difusión de oxígeno y nutrientes en el centro de agregados grandes sea lenta en comparación con la difusión en agregados más pequeños, asumiendo la misma permeabilidad. Como la diferenciación de células ES agregadas, o células iPS, en células de linaje pancreático depende de la aplicación temporal de factores de crecimiento específicos, es probable que un cultivo con una mezcla de agregados de diferentes diámetros esté desincronizado en comparación con un cultivo uniforme (tamaño y forma) de agregados de células. Esta mezcla de agregados de células da lugar a heterogeneidad y puede dar como resultado un rendimiento de diferenciación malo y, en última instancia, no prestarse a ser susceptible de fabricación, ampliación y producción. Por tanto, tal como se usa en el presente documento, la expresión “sustancialmente uniforme” o “sustancialmente uniforme en tamaño y forma” o equivalentes de las mismas, se refiere a la extensión en uniformidad de los agregados y no es más de aproximadamente el 20%. En otro aspecto, la extensión en uniformidad de los agregados no es más de aproximadamente el 15%, el 10% o el 5%.

Aunque el número exacto de células por agregado no es crítico, los expertos en la técnica reconocerán que el tamaño de cada agregado (y por lo tanto el número de células por agregado) está limitado por la capacidad del oxígeno y los nutrientes para difundirse a las células centrales, y que este número también puede variar dependiendo del tipo de célula y los requisitos nutritivos de ese tipo de célula. Los agregados de células pueden comprender un número mínimo de células (por ejemplo, dos o tres células) por agregado, o pueden comprender muchos cientos o miles de células por agregado. Normalmente, los agregados de células comprenden de cientos a miles de células por agregado. Para los propósitos de la presente divulgación, los agregados de células tienen normalmente un tamaño de desde aproximadamente 50 micrómetros hasta aproximadamente 600 micrómetros, aunque, dependiendo del tipo de célula, el tamaño puede ser menor o mayor que este intervalo. En un aspecto, los agregados de células tienen un tamaño de desde aproximadamente 50 micrómetros hasta aproximadamente 250 micrómetros, o un tamaño de aproximadamente de 75 a 200 micrómetros, y preferiblemente tienen un tamaño de aproximadamente 100 a 150 micrómetros.

Todavía otros métodos describen la elaboración de cuerpos embrioides (EB). Tal como se usa en el presente documento, el término “cuerpos embrioides”, “cuerpos agregados” o equivalentes de los mismos, se refiere a agregados de células diferenciadas e indiferenciadas que aparecen cuando las células ES crecen en exceso en cultivos monocapa, o se mantienen en cultivos en suspensión en medios indefinidos o se diferencian a través de protocolos no dirigidos hacia múltiples tejidos de la capa germinal. Es decir, los EB no se forman a partir de una suspensión de células madre pluripotentes tal como se describe en el presente documento; tampoco los EB se forman a partir de cultivos adherentes de células multipotentes derivadas de pluripotentes. Estas características por sí solas hacen que la presente descripción se distinga claramente de un cuerpo embrioide.

A diferencia de los cuerpos embrioides, que son una mezcla de células diferenciadas e indiferenciadas y consisten normalmente en células de varias capas germinales y pasan por una diferenciación aleatoria, los agregados de células descritos en el presente documento son esencial o sustancialmente homocelulares, existiendo como agregados de células de tipo pluripotente, multipotente, bipotente o unipotente, por ejemplo, células embrionarias, células del endodermo definitivo, del endodermo del intestino proximal, del endodermo pancreático positivas para PDX1, células endocrinas pancreáticas y similares.

Los aspectos descritos en el presente documento abordan los problemas anteriores proporcionando un procedimiento de fabricación rentable o métodos que pueden producir de forma reproducible agregados de células que son sustancialmente uniformes en tamaño y forma utilizando un procedimiento que puede aplicarse fácilmente a

la fabricación a gran escala. En un aspecto particular, las células diferenciadas se expanden en un cultivo en suspensión, usando el medio celular de la presente divulgación. En otro aspecto particular, las células diferenciadas pueden mantenerse y expandirse en suspensión, es decir, permanecen indiferenciadas o se evita que se diferencien adicionalmente. El término "expandir" en el contexto de cultivo celular se usa tal como está en la técnica, y se refiere a la proliferación celular y al aumento del número de células, preferiblemente al aumento del número de células viables. En un aspecto específico, las células se expanden en una suspensión de cultivo cultivando durante más de aproximadamente un día, es decir, aproximadamente 24 horas. En un aspecto más específico, las células se expanden en un cultivo en suspensión cultivando durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, o al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 semanas.

Todavía otros aspectos de la divulgación proporcionan métodos de producción de suspensiones de agregados de células formadas a partir de cultivos de células madre pluripotentes diferenciadas, por ejemplo, células producidas a partir de las células pluripotentes descritas en el presente documento, e incluyendo células de las fases 1, 2, 3, 4 y 5 tal como se describe en d'Amour 2005 y 2006, citado anteriormente. Por tanto, los métodos de elaboración de los agregados de células descritos en el presente documento no se limitan a ninguna célula o fase celular pluripotente o multipotente, sino que la forma de uso y la necesidad de optimización del tipo de célula dictará qué métodos se prefieren.

Los métodos descritos en el presente documento para producir cultivos en suspensión de agregados de células pluripotentes, por ejemplo, células hES o iPS, y células derivadas de otras fuentes de células pluripotentes, por ejemplo, células germinales embrionarias o partenotes, son sustancialmente tal como se describen en los documentos PCT/US2007/062755, presentado el 23 de febrero de 2007, y titulado Compositions and methods for culturing differentiable cells y PCT/US2008/080516, presentado el 20 de octubre de 2008 y titulado Methods and compositions for feeder-free pluripotent stem cell media containing human serum.

Los métodos descritos en el presente documento no requieren de ninguna manera recubrir primero los recipientes de cultivo con una matriz extracelular, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense 6.800.480 concedida a Bodnar *et al.* y asignada a Geron Corporation. En algunos aspectos descritos en el presente documento, las células iPS pueden cultivarse de la misma manera que se cultivan otras células madre pluripotentes, por ejemplo, células hES e iPS, usando suero humano soluble tal como se describe sustancialmente en la solicitud estadounidense PCT/US2008/080516, presentada el 20 de octubre de 2008 y titulada Methods and compositions for feeder-free pluripotent stem cell media containing human serum.

Los métodos descritos en el presente documento no requieren de ninguna manera factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) añadido de manera exógena suministrado de una fuente que no sea simplemente una capa alimentadora de fibroblastos tal como se describe en la patente estadounidense n.º 7.005.252 concedida a Thomson, J. y asignada a la Wisconsin Alumni Research Foundation (WARF).

Composiciones de células multipotentes y diferenciadas

Las composiciones celulares producidas por los métodos descritos en el presente documento incluyen cultivos celulares que comprenden células madre pluripotentes, línea preprimitiva, mesendodermo, endodermo definitivo, endodermo del intestino proximal, endodermo del intestino proximal positivo para PDX1, endodermo pancreático positivo para PDX1 o endodermo pancreático positivo conjuntamente para PDX1/NKX6.1, precursor endocrino o precursor endocrino positivo conjuntamente para NGN3/NKX2.2, y células endocrinas secretoras de hormonas o células endocrinas positivas individualmente para INS, GCG, GHRL, SST, PP, en las que al menos aproximadamente el 5-90% de las células en cultivo son la línea preprimitiva, mesendodermo, endodermo definitivo, endodermo del intestino proximal, endodermo del intestino anterior positivo para PDX1, endodermo pancreático positivo para PDX1 o endodermo pancreático positivo conjuntamente para PDX1/NKX6.1, precursor endocrino o precursor hormonal NGN3/NKX2, células endocrinas secretoras de hormonas o células endocrinas positivas individualmente para INS, GCG, GHRL, SST, PP producidas.

Algunos aspectos descritos en el presente documento se refieren a composiciones, tales como poblaciones celulares y cultivos celulares que comprenden tanto células pluripotentes, como células madre y células iPS, tales como células multipotentes, como línea preprimitiva, mesendodermo o endodermo definitivo, así como más diferenciadas, pero células todavía potencialmente multipotentes, tales como endodermo del intestino proximal positivo para PDX1, endodermo pancreático positivo para PDX1 o endodermo pancreático positivo conjuntamente para PDX1/NKX6.1, precursor endocrino o precursor endocrino positivo conjuntamente para NGN3/NKX2.2 y células endocrinas secretoras de hormonas o células endocrinas positivas individualmente para INS, GCG, GHRL, SST, PP. Por ejemplo, usando los métodos descritos en el presente documento, pueden producirse composiciones que comprenden mezclas de células madre pluripotentes y otras células multipotentes o diferenciadas. En algunos aspectos, se producen composiciones que comprenden al menos aproximadamente 5 células multipotentes o diferenciadas por aproximadamente cada 95 células pluripotentes. En otros aspectos, se producen composiciones que comprenden al menos aproximadamente 95 células multipotentes o diferenciadas por cada 5 células pluripotentes. Además, se contemplan composiciones que comprenden otras razones de células multipotentes o diferenciadas con respecto a células pluripotentes. Por ejemplo, composiciones que comprenden al menos aproximadamente 1 célula multipotente o diferenciada por aproximadamente cada 1.000.000 de células

pluripotentes, al menos aproximadamente 1 célula multipotente o diferenciada por cada 100.000 células pluripotentes, al menos aproximadamente 1 célula multipotente o diferenciada por cada 10.000 células pluripotentes, al menos aproximadamente 1 célula multipotente o diferenciada por aproximadamente cada 1000 células pluripotentes, al menos aproximadamente 1 célula multipotente o diferenciada por aproximadamente cada 500 células pluripotentes, al menos aproximadamente 1 célula multipotente o célula diferenciada para aproximadamente cada 10 células pluripotentes, al menos aproximadamente 1 célula multipotente o diferenciada para aproximadamente cada 5 células pluripotentes, y hasta aproximadamente cada 1 célula pluripotente y al menos aproximadamente 1.000.000 de células multipotentes o diferenciadas para aproximadamente cada 1 célula pluripotente.

Algunos aspectos descritos en el presente documento se refieren a cultivos celulares o poblaciones de células que comprenden desde al menos aproximadamente el 5% de células multipotentes o diferenciadas hasta al menos aproximadamente el 99% de células multipotentes o diferenciadas. En algunos aspectos los cultivos celulares o poblaciones de células comprenden células de mamífero. En aspectos preferidos, los cultivos celulares o poblaciones de células comprenden células humanas. Por ejemplo, determinados aspectos específicos se refieren a cultivos celulares que comprenden células humanas, en los que desde al menos aproximadamente el 5% hasta al menos aproximadamente el 99% de las células humanas son células multipotentes o diferenciadas. Otros aspectos se refieren a cultivos celulares que comprenden células humanas, en los que al menos aproximadamente el 5%, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 15%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o mayor del 99% de las células humanas son células multipotentes o diferenciadas. En aspectos en los que los cultivos celulares o poblaciones de células comprenden células alimentadoras humanas, los porcentajes anteriores se calculan sin tener en cuenta las células alimentadoras humanas en los cultivos celulares

Las células pluripotentes, multipotentes o diferenciadas pueden diferenciarse, o diferenciarse adicionalmente, en células de línea preprimitiva, mesendodermo, endodermo definitivo así como células, tejidos y/u órganos derivados de las mismas. Las células del mesendodermo pueden diferenciarse en células de mesodermo y/o células del endodermo definitivo así como células, tejidos y/u órganos derivados de cualquiera de estos linajes. En algunos aspectos, las células de línea preprimitiva se convierten, a través de un intermediario de mesendodermo, en células diferenciadas terminalmente de linajes o bien de mesodermo o bien de endodermo definitivo. Por ejemplo, tales procesos pueden proporcionar la base para una producción eficiente de tejidos derivados de endodermo humano, tales como páncreas, hígado, pulmones, estómago, intestino, tiroides, paratiroides, timo, faringe, vesícula biliar y vejiga urinaria. De manera importante, la producción de células de línea preprimitiva y/o células del mesendodermo es un paso temprano en la diferenciación de una célula madre pluripotente en una célula β productora de insulina funcional. Como otro ejemplo, la diferenciación de células de línea preprimitiva y/o de células del mesendodermo puede proporcionar la base para la producción eficaz de tejidos derivados de mesodermo humano, tales como células sanguíneas, tejidos cardiovasculares, tejidos esqueléticos así como otros tejidos estructurales y conjuntivos.

Las composiciones y métodos descritos en el presente documento tienen diversas características útiles. Por ejemplo, los cultivos celulares y las poblaciones celulares que comprenden células multipotentes, por ejemplo, células de línea preprimitiva y/o células del mesendodermo, así como los métodos para producir tales cultivos celulares y poblaciones celulares, son útiles para modelar las fases tempranas del desarrollo humano. Además, las composiciones y métodos descritos en el presente documento también pueden servir para la intervención terapéutica en estados patológicos, tales como diabetes mellitus. Por ejemplo, dado que las células de línea preprimitiva y/o las células del mesendodermo sirven como fuente sólo para un número limitado de tejidos, pueden usarse en el desarrollo de tejidos puros o tipos de células. En algunos procesos para producir células de línea preprimitiva, las células pluripotentes usadas como material de partida son células madre pluripotentes, por ejemplo, células hES, hEG o iPS.

Células de trofoectodermo

Usando los métodos descritos en el presente documento, pueden producirse composiciones que comprenden células de trofoectodermo sustancialmente libres de otros tipos de células. En algunos aspectos descritos en el presente documento, las poblaciones de células de trofoectodermo o cultivos celulares producidos mediante los métodos descritos en el presente documento tienen sustancialmente una alta expresión de marcadores seleccionados del grupo que consiste en HAND1, Eomes, MASH2, ESXL1, HCG, KRT18, PSG3, SFXN5, DLX3, PSX1, ETS2 y ERB en comparación con los niveles de expresión de HAND1, Eomes, MASH2, ESXL1, HCG, KRT18, PSG3, SFXN5, DLX3, PSX1, ETS2 y ERB en células o poblaciones celulares que no son del trofoectodermo.

Células de línea preprimitiva

Usando los métodos descritos en el presente documento, pueden producirse composiciones que comprenden células de línea preprimitiva sustancialmente libres de otros tipos de células. En algunos aspectos descritos en el presente documento, las poblaciones de células de línea preprimitiva o cultivos celulares producidos mediante los métodos descritos en el presente documento expresan sustancialmente los genes marcadores FGF8 y/o NODAL en comparación con BRACHURY bajo, FGF4 bajo, SNAI1 bajo, SOX17 bajo, FOXA2 bajo, SOX7 bajo y SOX1 bajo.

Células extraembrionarias

Usando los métodos descritos en el presente documento, pueden producirse composiciones que comprenden células extraembrionarias sustancialmente libres de otros tipos de células. Las células del endodermo primitivo, visceral y parietal son células extraembrionarias. Las células del endodermo primitivo dan lugar a células del endodermo visceral y parietal. Las células del endodermo visceral son células del endodermo que forman parte del saco vitelino. Las células del endodermo visceral funcionan tanto en la captación como en el transporte de nutrientes. Las células del endodermo parietal son contiguas a un tejido extraembrionario conocido como membrana de Reichert. Una de las funciones de las células del endodermo parietal es producir componentes de la membrana basal. Juntas, las células del endodermo visceral y las células del endodermo parietal forman lo que a menudo se denomina endodermo extraembrionario. Como sugiere el nombre, las células del endodermo extraembrionario no dan lugar a estructuras embrionarias formadas durante el desarrollo. Por el contrario, las células del endodermo definitivo y otras células de linaje de endodermo o de linaje pancreático descritas en el presente documento son embrionarias o derivan de células embrionarias y dan lugar a tejidos que se derivan del tubo del intestino que se forma durante el desarrollo embrionario. En algunos aspectos descritos en el presente documento, las poblaciones de células extraembrionarias o cultivos celulares producidos mediante los métodos descritos en el presente documento tienen sustancialmente una alta expresión de marcadores seleccionados del grupo que consiste en los genes SOX7, SOX17, THBD, SPARC, DAB1, HNF4alfa o AFP en comparación con los niveles de expresión de al menos SOX7, SOX17, THBD, SPARC, DAB1 o AFP, que no se expresa en otros tipos de células o poblaciones celulares, por ejemplo, endodermo definitivo.

Células del mesendodermo

Usando los métodos descritos en el presente documento, pueden producirse composiciones que comprenden células del mesendodermo sustancialmente libres de otros tipos de células. En algunos aspectos descritos en el presente documento, las poblaciones de células de mesendodermo o cultivos celulares producidos mediante los métodos descritos en el presente documento tienen sustancialmente una alta expresión de marcadores seleccionados del grupo que consiste en los genes marcadores FGF4, SNAI1 MIXL1 y/o WNT3, en comparación con SOX17 bajo, CXCR4 bajo, FOXA2 bajo, SOX7 bajo y SOX1 bajo.

Métodos de cribado

En algunos aspectos, se emplean métodos de cribado para obtener determinadas poblaciones celulares que comprenden células pluripotentes, multipotentes y/o diferenciadas, tales como células madre pluripotentes humanas, células madre pluripotentes inducidas, células de línea preprimitiva, células del mesendodermo, células del endodermo definitivo, endodermo del intestino proximal o células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1, células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 o células del endodermo pancreático positivas para PDX1 o células progenitoras pancreáticas, células precursoras endocrinas y/o células endocrinas. A continuación, se proporciona a la población celular un factor de diferenciación candidato. En un primer punto de tiempo, que es anterior o aproximadamente al mismo tiempo que se proporciona el factor de diferenciación candidato, se determina la expresión de un marcador. Alternativamente, la expresión del marcador puede determinarse después de proporcionar el factor de diferenciación candidato. En un segundo punto de tiempo, que es posterior al primer punto de tiempo y posterior a la etapa de proporcionar el factor de diferenciación candidato a la población celular, se determina de nuevo la expresión del mismo marcador. Si el factor de diferenciación candidato puede promover la diferenciación de las células precursoras pancreáticas se determina comparando la expresión del marcador en el primer punto de tiempo con la expresión del marcador en el segundo punto de tiempo. Si la expresión del marcador en el segundo punto de tiempo aumenta o disminuye en comparación con la expresión del marcador en el primer punto de tiempo, entonces el factor de diferenciación candidato puede promover la diferenciación de células progenitoras pancreáticas.

Algunos aspectos de los métodos de cribado descritos en el presente documento utilizan poblaciones celulares o cultivos celulares que comprenden endodermo definitivo humano, endodermo del intestino proximal negativo para PDX-1, endodermo del intestino proximal positivo para PDX-1, endodermo pancreático positivo para PDX-1 o células progenitoras pancreáticas o precursoras endocrinas. Por ejemplo, la población celular puede ser una población sustancialmente purificada de endodermo pancreático positivo para PDX-1 o células progenitoras pancreáticas. Por ejemplo, la población celular puede ser una población enriquecida de células progenitoras pancreáticas humanas, en la que al menos aproximadamente del 50% al 97% de las células humanas en la población celular son células progenitoras pancreáticas humanas, y el resto comprende células precursoras endocrinas o endocrinas y otros tipos de células.

En aspectos de los métodos de cribado descritos en el presente documento, la población celular se pone en

contacto o se le proporciona de otro modo un factor de diferenciación candidato (de prueba). El factor de diferenciación candidato puede comprender cualquier molécula que pueda tener el potencial de promover la diferenciación de cualquiera de las células mencionadas anteriormente, por ejemplo, células progenitoras pancreáticas humanas. En algunos aspectos descritos en el presente documento, el factor de diferenciación candidato comprende una molécula que se sabe que es un factor de diferenciación para uno o más tipos de células. En aspectos alternativos, el factor de diferenciación candidato comprende una molécula que no se sabe que promueva la diferenciación celular. En aspectos preferidos, el factor de diferenciación candidato comprende una molécula que no se sabe que promueva la diferenciación de las células progenitoras pancreáticas humanas.

En algunos aspectos de los métodos de cribado descritos en el presente documento, el factor de diferenciación candidato comprende una molécula pequeña. En aspectos preferidos, una molécula pequeña es una molécula que tiene una masa molecular de aproximadamente 10.000 uma o menos.

En otros aspectos descritos en el presente documento, el factor de diferenciación candidato comprende una molécula grande, por ejemplo, un polipéptido. El polipéptido puede ser cualquier polipéptido que incluye, pero no se limita a, una glicoproteína, una lipoproteína, una proteína de la matriz extracelular, una citocina, una quimiocina, una hormona peptídica, una interleucina o un factor de crecimiento. Los polipéptidos preferidos incluyen factores de crecimiento.

En algunos aspectos de los métodos de cribado descritos en el presente documento, los factores de diferenciación candidatos comprenden uno o más factores de crecimiento seleccionados del grupo que consiste en anfirregulina, estimulador de linfocitos B, IL-16, timopoyetina, TRAIL/Apo-2, factor potenciador de colonias de prelinfocitos B, factor 1 relacionado con la diferenciación endotelial (EDF1), polipéptido II activador de monocitos endoteliales, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), factor potenciador de linfocitos citolíticos naturales (NKEFA), proteína morfogenética ósea 2, proteína morfogenética ósea 8 (proteína osteogénica 2), proteína morfogenética ósea 6, proteína morfogenética ósea 7, factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), proteína CGI-149 (factor de diferenciación neuroendocrina), citocina A3 (proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa), proteína relacionada con la diferenciación celular de glioblastoma (GBDR1), factor de crecimiento derivado de hepatoma, precursor de neuromedina U-25, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento endotelial vascular B (VEGF-B), precursor RANTES específico de células T, factor 1 derivado de células dendríticas tímicas, transferrina, interleucina-1 (IL 1), interleucina-2 (IL 2), interleucina-3 (IL 3), interleucina-4 (IL 4), interleucina-5 (IL 5), Interleucina-6 (IL 6), interleucina-7 (IL 7), interleucina-8 (IL 8), interleucina-9 (IL 9), interleucina-10 (IL 10), interleucina-11 (IL 11), interleucina-12 (IL 12), interleucina-13 (IL 13), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), eritropoyetina, trombopoyetina, vitamina D3, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor neurotrófico derivado del cerebro, factor inhibidor de la leucemia, hormona tiroidea, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), aFGF, FGF-4, FGF-6, FGF-7/factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, factor de crecimiento nervioso β , activina A, factor de crecimiento transformante β 1 (TGF β 1), interferón α , interferón β , interferón γ , factor de necrosis tumoral α , factor de necrosis tumoral β , actividad promotora de estallidos (BPA), actividad promotora de eritroides (EPA), PGE2, factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1), IGF-II, factor de crecimiento de neutrofina (NGF), neutrofina-3, neutrofina 4/5, factor neurotrófico ciliar, nexina derivada de glial, dexametasona, β -mercaptoetanol, ácido retinoico, hidroxianisol butilado, 5-azacitidina, anfotericina B, ácido ascórbico, ascorbato, isobutilxantina, indometacina, β -glicerolfosfato, nicotinamida, DMSO, tiazolidinedionas, TWS119, oxitocina, vasopresina, hormona estimulante de melanocitos, corticotropina, lipotropina, tirotrópina, hormona del crecimiento, prolactina, hormona luteinizante, gonadotropina coriónica humana, hormona estimulante del folículo, factor de liberación de corticotropina, factor de liberación de gonadotropina, factor de liberación de prolactina, factor de inhibición de prolactina, factor de liberación de hormona del crecimiento, somatostatina, factor de liberación de tirotrópina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, hormona paratiroidea, péptido 1 similar al glucagón, polipéptido insulínico dependiente de glucosa, gastrina, secretina, colecistoquinina, motilina, péptido intestinal vasoactivo, sustancia P, polipéptido pancreático, péptido tirosina, neuropéptido tirosina, insulina, glucagón, lactógeno placentario, relaxina, angiotensina II, calcitriol, péptido natriurético auricular y melatonina. tiroxina, triyodotironina, calcitonina, estradiol, estrona, progesterona, testosterona, cortisol, corticosterona, aldosterona, epinefrina, norepinefrina, androstieno, calcitriol, colágeno, dexametasona, β -mercaptoetanol, ácido retinoico, hidroxianisol butilado, 5-azacitidina, anfotericina B, ácido ascórbico, ascorbato, isobutilxantina, indometacina, β -glicerolfosfato, nicotinamida, DMSO, tiazolidinedionas y TWS119.

En algunos aspectos de los métodos de cribado descritos en el presente documento, el factor de diferenciación candidato se proporciona a la población celular en una o más concentraciones. En algunos aspectos, el factor de diferenciación candidato se proporciona a la población celular de modo que la concentración del factor de diferenciación candidato en el medio que rodea a las células oscila entre aproximadamente 0,1 ng/ml y 10 mg/ml. En algunos aspectos, la concentración del factor de diferenciación candidato en el medio que rodea a las células oscila entre aproximadamente 1 ng/ml y aproximadamente 1 mg/ml. En otros aspectos, la concentración del factor de diferenciación candidato en el medio que rodea a las células oscila entre aproximadamente 10 ng/ml y aproximadamente 100 μ g/ml. En otros aspectos, la concentración del factor de diferenciación candidato en el medio que rodea a las células oscila entre aproximadamente 100 ng/ml y aproximadamente 10 μ g/ml. En aspectos

preferidos, la concentración del factor de diferenciación candidato en el medio que rodea a las células oscila entre aproximadamente 5 ng/ml y 1000 µg/ml.

5 En algunos aspectos, las etapas de los métodos de cribado descritos en el presente documento comprenden determinar la expresión de al menos un marcador en un primer punto de tiempo y un segundo punto de tiempo. En algunos de estos aspectos, el primer punto de tiempo puede ser anterior o aproximadamente al mismo tiempo que se proporciona a la población celular el factor de diferenciación candidato. Alternativamente, en algunos aspectos, el primer punto de tiempo es posterior a proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato. En algunos aspectos, la expresión de una pluralidad de marcadores se determina en un primer punto de tiempo.

10 Además de determinar la expresión de al menos un marcador en un primer punto de tiempo, algunos aspectos de los métodos de cribado descritos en el presente documento contemplan determinar la expresión de al menos un marcador en un segundo punto de tiempo, que es posterior al primer punto de tiempo y que es posterior a proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato. En tales aspectos, la expresión del mismo marcador se determina tanto en el primer como en el segundo punto de tiempo. En algunos aspectos, la expresión de una pluralidad de marcadores se determina tanto en el primer como en el segundo punto de tiempo. En tales aspectos, la expresión de la misma pluralidad de marcadores se determina tanto en el primer como en el segundo punto de tiempo. En algunos aspectos, la expresión del marcador se determina en una pluralidad de puntos de tiempo, cada uno de los cuales es posterior al primer punto de tiempo y cada uno de los cuales es posterior a proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato. En determinados aspectos, la expresión del marcador se determina mediante Q-PCR. En otros aspectos, la expresión del marcador se determina mediante inmunocitoquímica.

25 En determinados aspectos de los métodos de cribado descritos en el presente documento, el marcador que tiene su expresión determinada en los puntos de tiempo primero y segundo es un marcador que está asociado con la diferenciación de células progenitoras pancreáticas a células que son las precursoras de células diferenciadas terminalmente que constituyen tejidos de islotes pancreáticos. Tales células pueden incluir células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras.

30 En algunos aspectos de los métodos de cribado descritos en el presente documento, se deja pasar suficiente tiempo entre proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato y determinar la expresión del marcador en el segundo punto de tiempo. El tiempo suficiente entre proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato y determinar la expresión del marcador en el segundo punto de tiempo puede ser de desde aproximadamente 1 hora hasta como mucho aproximadamente 10 días. En algunos aspectos, la expresión de al menos un marcador se determina múltiples veces después de proporcionar a la población celular el factor de diferenciación candidato. En algunos aspectos, el tiempo suficiente es al menos aproximadamente 1 hora, al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 12 horas, al menos aproximadamente 16 horas, al menos aproximadamente 1 día, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 4 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 6 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 8 días, al menos aproximadamente 9 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 11 días, al menos aproximadamente 12 días, al menos aproximadamente 13 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 1 semana, al menos aproximadamente 2 semanas, al menos aproximadamente 3 semanas, al menos aproximadamente 4 semanas, al menos aproximadamente 5 semanas, al menos aproximadamente 6 semanas, al menos aproximadamente 7 semanas o al menos aproximadamente 8 semanas.

45 En algunos aspectos de los métodos descritos en el presente documento, se determina además si la expresión del marcador en el segundo punto de tiempo ha aumentado o disminuido en comparación con la expresión de este marcador en el primer punto de tiempo. Un aumento o disminución en la expresión del al menos un marcador indica que el factor de diferenciación candidato puede promover la diferenciación de las células precursoras endocrinas. De manera similar, si se determina la expresión de una pluralidad de marcadores, se determina además si la expresión de la pluralidad de marcadores en el segundo punto de tiempo ha aumentado o disminuido en comparación con la expresión de esta pluralidad de marcadores en el primer punto de tiempo. Puede determinarse un aumento o disminución en la expresión del marcador midiendo o evaluando de otro modo la cantidad, el nivel o la actividad del marcador en la población celular en los puntos de tiempo primero y segundo. Tal determinación puede ser relativa a otros marcadores, por ejemplo, la expresión génica de mantenimiento, o absoluta. En determinados aspectos, en los que la expresión del marcador aumenta en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo, la cantidad de aumento es de al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces o más de al menos aproximadamente 100 veces. En algunos aspectos, la cantidad de aumento es de menos de 2 veces. En aspectos en los que la expresión del marcador disminuye en el segundo punto de tiempo en comparación con el primer punto de tiempo, la cantidad de disminución es de al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos

aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces o más de al menos aproximadamente 100 veces. En algunos aspectos, la cantidad de disminución es de menos de 2 veces.

Monitorización de la producción de células multipotentes o diferenciadas

5 La progresión de células pluripotentes a células multipotentes a células multipotentes adicionales o células diferenciadas, tales como células progenitoras pancreáticas o células secretoras de hormonas endocrinas, puede monitorizarse determinando la expresión de marcadores característicos de las células específicas, incluyendo marcadores genéticos y marcadores fenotípicos tales como, la expresión de hormonas de los islotes y el procesamiento de proinsulina en insulina y péptido C en células endocrinas. En algunos procesos, la expresión de determinados marcadores se determina detectando la presencia o ausencia del marcador. Alternativamente, la expresión de determinados marcadores puede determinarse midiendo el nivel al que el marcador está presente en las células del cultivo celular o la población celular. Por ejemplo, en determinados procesos, se determina la expresión de marcadores característicos de células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduros, así como la falta de expresión significativa de marcadores característicos de células pluripotentes, endodermo definitivo, endodermo del intestino proximal, endodermo del intestino proximal positivo para PDX1, precursor endocrino, endodermo extraembrionario, mesodermo, ectodermo, células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos maduras y/u otros tipos de células.

20 Tal como se describe en relación con la monitorización de la producción de otros tipos de células menos diferenciadas del linaje de endodermo definitivo, pueden usarse técnicas cualitativas o semicuantitativas, tales como métodos de transferencia de transferencia e inmunocitoquímica, para medir la expresión del marcador. Alternativamente, la expresión del marcador puede cuantificarse con precisión mediante el uso de una técnica tal como Q-PCR. Además, se apreciará que a nivel de polipéptidos, muchos de los marcadores de las células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos son proteínas secretadas. Como tal, pueden utilizarse técnicas para medir el contenido de marcadores extracelulares, tales como ELISA.

25 Por ejemplo, en un aspecto, PDX1 es un gen marcador que está asociado con el endodermo del intestino proximal positivo para PDX1. Como tal, en algunos aspectos de la presente divulgación, se determina la expresión de PDX1. En otros aspectos, también se determina la expresión de otros marcadores, que se expresan en el endodermo del intestino proximal positivo para PDX1, que incluyen, pero no se limitan a, SOX17, HNF6, SOX9 y PROX1. Dado que PDX1 también puede expresarse por determinados otros tipos de células (es decir, endodermo visceral y determinado ectodermo neural), algunos aspectos de la presente divulgación se refieren a la demostración de la ausencia o ausencia sustancial de la expresión del gen marcador que está asociada con el endodermo visceral y/o ectodermo neural. Por ejemplo, en algunos aspectos, se determina la expresión de marcadores, que se expresan en endodermo visceral y/o células neurales, que incluyen, pero no se limitan a, SOX7, AFP, SOX1, ZIC1 y/o NFM.

30 En algunos aspectos, los cultivos de células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 producidos mediante los métodos descritos en el presente documento están sustancialmente libres de células que expresan los genes marcadores SOX7, AFP, SOX1, ZIC1 o NFM. En determinados aspectos, los cultivos de células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 producidos mediante los procesos descritos en el presente documento están sustancialmente libres de endodermo visceral, endodermo parietal y/o células neurales.

35 La progresión del desarrollo de las células pluripotentes descritas en el presente documento (por ejemplo, células producidas como resultado de las fases o etapas 1-5 tal como se describe en D'Amour *et al.* 2006, citado anteriormente) puede monitorizarse determinando la expresión de marcadores característicos de tipo de célula derivada de hES o derivada de iPS a lo largo de la ruta de desarrollo. En algunos procesos, la identificación y caracterización de un tipo de célula derivada de hES o derivada de iPS se realiza mediante la expresión de un determinado marcador o diferentes niveles de expresión y patrones de más de un marcador. Es decir, la presencia o ausencia, la expresión alta o baja, de uno o más marcadores típica e identifica un tipo de célula. Además, determinados marcadores pueden tener una expresión transitoria, por lo que el marcador se expresa mucho durante una fase de desarrollo y se expresa mal en otra fase de desarrollo. La expresión de determinados marcadores puede determinarse midiendo el nivel al que el marcador está presente en las células del cultivo celular o la población celular en comparación con un marcador de control estandarizado o normalizado. En tales procesos, la medición de la expresión del marcador puede ser cualitativa o cuantitativa. Un método para cuantificar la expresión de marcadores producidos por genes marcadores es mediante el uso de PCR cuantitativa (Q-PCR). Los métodos para realizar Q-PCR se conocen bien en la técnica.

40 En algunos aspectos de la presente divulgación, la presencia, ausencia y/o nivel de expresión de un marcador se determina mediante PCR cuantitativa (Q-PCR). Por ejemplo, la cantidad de transcrito producido mediante determinados marcadores genéticos, tales como SOX17, CXCR4, OCT4, AFP, TM, SPARC, SOX7, CDX2, MIXL1, GATA4, HNF3 β , HNF4 α , GSC, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1, CRIP1 y otros marcadores descritos en el presente documento se determina mediante Q-PCR cuantitativa.

45 En otros aspectos, la inmunohistoquímica se usa para detectar las proteínas expresadas por los genes mencionados anteriormente. En todavía otros aspectos, la Q-PCR puede usarse junto con técnicas inmunohistoquímicas o técnicas de citometría de flujo para caracterizar e identificar con eficacia y precisión tipos de células y determinar

tanto la cantidad como las proporciones relativas de tales marcadores en un tipo de célula objeto. En un aspecto, la Q-PCR puede cuantificar los niveles de expresión de ARN en un cultivo celular que contiene una población mixta de células. Sin embargo, la Q-PCR no puede proporcionar ni calificar si los marcadores o proteínas en cuestión se coexpresan en la misma célula. En otro aspecto, Q-PCR se usa junto con métodos de citometría de flujo para caracterizar e identificar tipos de células. Por tanto, mediante el uso de una combinación de los métodos descritos en el presente documento, y tales como los descritos anteriormente, puede lograrse y demostrarse la caracterización e identificación completas de diversos tipos de células, incluyendo células de tipo de linaje de endodermo.

Por ejemplo, en un aspecto preferido, los progenitores pancreáticos o el endodermo pancreático o el endodermo pancreático positivo para PDX-1, expresa al menos PDX1, Nkx6.1, PTF1A, CPA y/o cMYC tal como se demuestra mediante Q-PCR y/o ICC, pero una célula de este tipo al menos coexpresa PDX1 y Nkx6.1 tal como se demuestra mediante ICC y no expresa otros marcadores, incluyendo SOX17 CXCR4, o CER, que va a identificarse como una célula expresora positiva para PDX1. De manera similar, para la identificación adecuada de una célula pancreática secretora de hormonas madura, *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, se ha demostrado que el péptido C (un producto del procesamiento adecuado de la proinsulina en una célula β madura y funcional) y la insulina se coexpresan mediante ICC en la célula secretora de insulina.

Aun así, también pueden usarse otros métodos que se conocen en la técnica para cuantificar la expresión del gen marcador. Por ejemplo, la expresión de un producto del gen marcador puede detectarse usando anticuerpos específicos para el producto del gen marcador de interés (por ejemplo, por ejemplo, inmunotransferencia de tipo Western, análisis de citometría de flujo y similares). En determinados procesos, la expresión de genes marcadores característicos de células derivadas de hES así como la falta de expresión significativa de genes marcadores característicos de células derivadas de hES. En solicitudes relacionadas, tal como se indicó anteriormente, se describen otros métodos para caracterizar e identificar tipos de células derivadas de hES.

Las combinaciones de cebador/sonda de amplificación adecuadas para su uso en ensayos de amplificación incluyen las siguientes: insulina (*INS*) (GenBank NM_000207): cebadores AAGAGGCCATCAAGCAGATCA (SEQ ID NO: 1); CAGGAGGCGCATCCACA (SEQ ID NO: 2); Nkx6.1 (NM_006168): cebadores CTGGCCTGTACCCCTCATCA (SEQ ID NO: 3); CTTCCCGTCTTTGTCCAACAA (SEQ ID NO: 4); Pdx1 (NM_000209): cebadores AAGTCTACCAAAGCTCACGCG (SEQ ID NO: 5); GTAGGCGCCGCTGC (SEQ ID NO: 6); Ngn3 (NM_020999): cebadores GCTCATCGTCTCTATTCTTTTGC (SEQ ID NO: 7); GGTTGAGGCGTCATCCTTTCT (SEQ ID NO: 8); FOXA2 (HNF3B) (NM_021784): cebadores GGGAGCGGTGAAGATGGA (SEQ ID NO: 9); TCATGTTGCTCACGGAGGAGTA (SEQ ID NO: 10); glucagón (GCG) (NM_002054): cebadores AAGCATTACTTTGTGGCTGGATT (SEQ ID NO: 11); TGATCTGGATTTCTCCTCTGTGTCT (SEQ ID NO: 12); HNF6 (NM_030712): cebadores CGCTCCGCTTAGCAGCAT (SEQ ID NO: 13); GTGTTGCCTCTATCCTTCCCAT (SEQ ID NO: 14); HNF4Alfa (NM_000457): cebadores GAAGAAGGAAGCCGTCCAGA (SEQ ID NO: 15); GACCTTCGAGTGCTGATCCG (SEQ ID NO: 16); Sox17 (NM_022454): cebadores GGCGCAGCAGAATCCAGA (SEQ ID NO: 17); NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNN (SEQ ID NO: 18); *HLxB9* (NM_005515): cebadores CACCGCGGCATGATC (SEQ ID NO: 19); ACTTCCCAGGAGGTTGCA (SEQ ID NO: 20); Nkx2.2 (NM_002509): cebadores GGCCTTCAGTACTCCCTGCA (SEQ ID NO: 21); GGGACTTGGAGCTTGAGTCT (SEQ ID NO: 22); PTF1a (NM_178161): cebadores GAAGGTCATCATCTGCCATCG (SEQ ID NO: 23) GGCCATAATCAGGGTCGCT (SEQ ID NO: 24); SST (NM_001048): cebadores CCCCAGACTCCGTCAGTTTC (SEQ ID NO: 25); TCCGTCTGGTTGGGTTTCAG (SEQ ID NO: 26); PAX6 (NM_000280): cebadores CCAGAAAGGATGCCTCATAAAGG (SEQ ID NO: 27); TCTGCGCGCCCCTAGTTA (SEQ ID NO: 28); cebadores Oct4: TGGGCTCGAGAAGGATGTG (SEQ ID NO: 29) GCATAGTCGCTGCTTGATCG (SEQ ID NO: 30); cebadores MIXL1 CCGAGTCCAGGATCCAGGTA (SEQ ID NO: 31) CTCTGACGCCGAGACTTGG (SEQ ID NO: 32); cebadores GATA4 CCTCTTCAATGCGGAAAG (SEQ ID NO: 33) CGGGAGGAAGGCTCTACT (SEQ ID NO: 34); cebadores GSC GAGGAGAAAGTGGAGGTCTGGTT (SEQ ID NO: 35) CTCTGATGAGGACCGCTTCTG (SEQ ID NO: 36); cebadores CER ACAGTGCCCTTCAGCCAGACT (SEQ ID NO: 37) ACAACTACTTTTTTCACAGCCTTCGT (SEQ ID NO: 38); cebadores AFP GAGAAACCCACTGGAGATGAACA (SEQ ID NO: 39) CTCATGGCAAAGTTCTTCCAGAA (SEQ ID NO: 40); cebadores SOX1 ATGCACCGCTACGACATGG (SEQ ID NO: 41) CTCATGTAGCCCTGCGAGTTG (SEQ ID NO: 42); cebadores ZIC1 CTGGCTGTGGCAAGGTCTTC (SEQ ID NO: 43) CAGCCCTCAAACCTCGCACTT (SEQ ID NO: 44); cebadores NFM ATCGAGGAGCGCCACAAC (SEQ ID NO: 45) TGCTGGATGGTGTCTGGT (SEQ ID NO: 46). Hay otros cebadores disponibles a través de ABI Taqman, incluyendo FGF17 (Hs00182599_m1), VWF (Hs00169795_m1), CMKOR1 (Hs00604567_m1), CRIP1 (Hs00832816_g1), FOXQ1 (Hs00536425_s1), CALC (Hs00156229_m1) y CHGA (Hs0015441_m1).

Resumen de la producción de endodermo pancreático positivo para PDX1 (fases 1 a 4) y producción de insulina *in vivo*

Los métodos para la producción de determinadas células de linaje de endodermo y de linaje de endodermo pancreático se proporcionan en el presente documento, y se comentan en otra parte en solicitudes relacionadas tales como la solicitud estadounidense n.º 11/773.944, titulada METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES, presentada el 5 de julio de 2007, que es una continuación en parte de la solicitud de patente estadounidense n.º 11/681.687, titulada ENDOCRINE PRECURSOR CELLS, PANCREATIC HORMONE-EXPRESSING CELLS AND METHODS OF PRODUCTION, presentada el 2 de marzo de 2007.

En resumen, los métodos de diferenciación dirigida en el presente documento para células madre pluripotentes, por ejemplo, células hES e iPS, pueden describirse en al menos cuatro o cinco fases. La fase 1 es la producción de endodermo definitivo a partir de células madre pluripotentes y tarda aproximadamente de 2 a 5 días, preferiblemente 2 ó 3 días. Las células madre pluripotentes se suspenden en un medio que comprende RPMI (menos suero), un factor de crecimiento miembro de la superfamilia de TGF β , tal como activina A, activina B, GDF-8 o GDF-11 (100 ng/ml), un miembro de la familia de Wnt o un activador de la ruta Wnt, tal como Wnt3a (25 ng/ml), y alternativamente un inhibidor de rho-cinasa o ROCK, tal como Y-27632 (10 μ M) para potenciar el crecimiento, la supervivencia y la proliferación, así como para promover la adhesión célula-célula. Después de aproximadamente 24 horas, el medio se cambia por medio que comprende RPMI con suero, tal como FBS al 0,2%, y un factor de crecimiento de miembro de la superfamilia de TGF β , tal como activina A, activina B, GDF-8 o GDF-11 (100 ng/ml) y alternativamente un inhibidor de la rho-cinasa o ROCK durante otras 24 (día 2) a 48 horas (día 3). De manera importante, la producción de endodermo definitivo requiere condiciones de cultivo celular con bajo contenido de suero y, por tanto, bajo contenido de insulina o factor de crecimiento similar a insulina. Véase McLean *et al.* (2007) Stem Cells 25: 29-38. McLean *et al.* también muestran que poner en contacto células hES con insulina en concentraciones tan pequeñas como 0,2 μ g/ml en la fase 1 puede ser perjudicial para la producción de endodermo definitivo. Aún otros expertos en la técnica han modificado la diferenciación de la fase 1 de células pluripotentes al endodermo definitivo sustancialmente tal como se describe en este caso y en D'Amour *et al.* (2005), por ejemplo, al menos, Agarwal *et al.*, Efficient Differentiation of Functional Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells, Stem Cells (2008) 26: 1117-1127; Borowiak *et al.*, Small Molecules Efficiently Direct Endodermal Differentiation of Mouse and Human Embryonic Stem Cells, (2009) Cell Stem Cell 4: 348-358; y Brunner *et al.*, Distinct DNA methylation patterns characterize differentiated human embryonic stem cells and developing human fetal liver, (2009) Genome Res. 19: 1044-1056. La diferenciación, especificación, caracterización e identificación adecuadas de definitivo son necesarias para derivar otras células de linaje de endodermo. Las células del endodermo definitivo en esta fase coexpresan SOX17 y HNF3 β (FOXA2) y no expresan apreciablemente al menos HNF4alfa, HNF6, PDX1, SOX6, PROX1, PTF1A, CPA, cMYC, NKX6.1, NGN3, PAX3, ARX, NKX2.2, INS, GSC, GHRL, SST o PP.

La fase 2 toma el cultivo celular del endodermo definitivo de la fase 1 y produce endodermo del intestino proximal o endodermo del intestino proximal negativo para PDX1 incubando los cultivos en suspensión con RPMI con cantidades crecientes de suero, tal como suero al 2%, tal como FBS al 2%, en una dilución 1:1000 de ITS, KGF 25 ng (o FGF7) y, alternativamente, un inhibidor de ROCK durante 24 horas (día 4) para potenciar el crecimiento, la supervivencia, la proliferación y promover la adhesión célula-célula. Después de 24 horas (día 4), el medio se cambia por el mismo medio menos un inhibidor de TGF β , pero alternativamente todavía un inhibidor de ROCK para potenciar el crecimiento, supervivencia y proliferación de las células, durante otras 24 (día 5) a 48 horas (día 6). Una etapa crítica para la especificación adecuada del endodermo del intestino proximal es la eliminación de los factores de crecimiento de la familia de TGF β . Por tanto, puede añadirse un inhibidor de TGF β a cultivos de células de la fase 2, tal como el inhibidor de TGF β 2,5 μ M n.º 4 o SB431542 5 μ M, un inhibidor específico de la cinasa similar al receptor de activina (ALK), que es un receptor de TGF β de tipo I. El endodermo del intestino proximal o las células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1 producidas a partir de la fase 2 coexpresan SOX17, HNF1 β y HNF4alfa y no coexpresan apreciablemente al menos SOX17 y HNF3 β (FOXA2), ni HNF6, PDX1, SOX6, PROX1, PTF1A, CPA, cMYC, NKX6.1, NGN3, PAX3, ARX, NKX2.2, INS, GSC, GHRL, SST o PP, que son el rasgo característico del endodermo definitivo, endodermo pancreático positivo para PDX1 o células progenitoras pancreáticas o precursores endocrinos, así como por separado o células de tipo polihormonal.

La fase 3 toma el cultivo de células del endodermo del intestino proximal de la fase 2 y produce una célula del endodermo del intestino proximal positiva para PDX1 mediante DMEM o RPMI en B27 al 1%, ciclopamina KAAD 25 μ M, un retinoide, tal como ácido retinoico (RA) 0,2 μ M o un análogo del ácido retinoico tal como 3 nM de TTNPB y 30 ng/ml de nogina durante aproximadamente de 24 (día 7) a 48 horas (día 8). Nuevamente, puede usarse un inhibidor de ROCK tal como Y-27632 para potenciar el crecimiento, la supervivencia, la proliferación y promover la adhesión célula-célula. Las células del intestino proximal positivas para PDX1 producidas a partir de la fase 3 coexpresan PDX1 y HNF6, así como SOX9 y PROX, y no coexpresan apreciablemente marcadores indicativos de células del endodermo definitivo o endodermo del intestino proximal (endodermo del intestino proximal negativo para PDX1) o células del intestino proximal positiva para PDX1 células del endodermo tal como se describió anteriormente en las fases 1 y 2.

La fase 4 (días 9-14) toma el medio de la fase 3 y lo cambia por medio que contiene DMEM en un complemento de B27 al 1% v/v, más KGF 50 ng/ml y 50 ng/ml de EGF. Nuevamente, puede usarse un inhibidor de ROCK tal como Y-27632 para potenciar el crecimiento, la supervivencia, la proliferación y promover la adhesión célula-célula. Las células del endodermo pancreático positivas para PDX1 producidas a partir de la fase 4 coexpresan al menos PDX1 y Nkx6.1, así como PTF1A, y no expresan de manera apreciable marcadores indicativos de células del endodermo definitivo o endodermo del intestino proximal (endodermo del intestino proximal negativo para PDX1) tal como se describió anteriormente en las fases 1, 2 y 3.

Alternativamente, las células de la fase 4 pueden diferenciarse adicionalmente en la fase 5 para producir células de tipo precursoras o progenitoras endocrinas y/o células de tipo endocrinas pancreáticas mono o polihormonales de las células de la fase 4 en un medio que contiene DMEM en complemento de B27 al 1% v/v durante aproximadamente de 1 a 6 días (días 15-20). Los precursores endocrinos producidos a partir de la fase 5

coexpresan al menos NGN3 y PAX4 así como Nkx2.2, y no expresan de manera apreciable marcadores indicativos de células del endodermo definitivo o endodermo del intestino proximal (endodermo del intestino proximal negativo para PDX1) o endodermo pancreático positivo para PDX1 o células progenitoras tal como se describió anteriormente en las fases 1, 2, 3 y 4.

5 El endodermo pancreático positivo para PDX1 producido a partir de la fase 4 se cargan y está contenido completamente en un dispositivo de macroencapsulación y se trasplanta a un paciente, y las células del endodermo pancreático positivas para PDX1 maduran en células secretoras de hormonas pancreáticas, por ejemplo, células secretoras de insulina, *in vivo*. Se describe en detalle la encapsulación de las células del endodermo pancreático positivas para PDX1 y la producción de insulina *in vivo* en la solicitud estadounidense n.º 12/618.659 (la solicitud '659'), titulada ENCAPSULATION OF PANCREATIC LINEAGE CELLS DERIVED FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS, presentada el 13 de noviembre de 2009. La solicitud '659 reivindica el beneficio de prioridad a la solicitud de patente provisional n.º 61/114.857, titulada ENCAPSULATION OF PANCREATIC PROGENITORS DERIVED FROM HES CELLS, presentada el 14 de noviembre de 2008; y la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/121.084, titulada ENCAPSULATION OP PANCREATIC ENDODERM CELLS, presentada el 9 de diciembre de 2008.

aspectoPor ejemplo, activina A, un miembro de la superfamilia de TGFβ de factores de crecimiento o proteínas de señalización, se usa para producir endodermo definitivo a partir de células pluripotentes, por ejemplo, células hES y células iPS, sin embargo, pueden usarse otros miembros de la superfamilia de TGFβ, por ejemplo, GDF-8 y GDF-11, para producir endodermo definitivo tales como los descritos en la solicitud internacional PCT/US2008/065686, titulada GROWTH FACTORS FOR PRODUCTION OF DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 3 de junio de 2008.

El ácido retinoico (RA) se usa para diferenciar las células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1 en la fase 2 de las células del intestino proximal positivas para PDX1 en la fase 3. Sin embargo, pueden usarse otros retinoides o análogos del ácido retinoico tales como ácido 4-[(E)-2-(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalenil)-1-propenil]benzoico (o TTNPB) y análogos similares (por ejemplo, 4-HBTTNPB).

25 Nogina es una proteína, por ejemplo, que inactiva miembros de las proteínas de señalización de la superfamilia de TGFβ, tales como la proteína morfogenética ósea 4 (BMP4). Sin embargo, otros inhibidores de BMP4 tales como cordina y gastrulación retorcida (Tsg) o anticuerpos neutralizantes anti-BMP pueden impedir la unión de BMP a sus receptores de superficie celular, inhibiendo así eficazmente la señalización de BMP. Alternativamente, se ha clonado y secuenciado el gen de la nogina humana. Véase la patente estadounidense n.º 6.075.007. El análisis de la secuencia de nogina muestra una región carboxilo terminal que tiene homología con un inhibidor de proteasa de tipo Kunitz, lo que indica que potencialmente otros inhibidores de proteasa de tipo Kunitz pueden tener un efecto similar sobre la inhibición de BMP.

Por último, los dispositivos de macroencapsulación descritos en el presente documento y en la solicitud estadounidense n.º 12/618.659, son de nuevo sólo a modo de ejemplo.

35 Producción y composiciones de endodermo definitivo (fase 1)

En algunos procesos, la diferenciación en endodermo definitivo se logra proporcionando al cultivo de células pluripotentes un factor de crecimiento de la superfamilia de TGFβ en una cantidad suficiente para promover la diferenciación en endodermo definitivo. Los factores de crecimiento de la superfamilia de TGFβ que son útiles para la producción de endodermo definitivo se seleccionan de los subgrupos de Nodal/activina, GDF-8, -9, -10, -11 y similares o BMP. En algunos procesos de diferenciación preferidos, el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en Nodal, activina A, activina B, GDF-8, GDF-11 y BMP4. Además, el factor de crecimiento Wnt3a, otros miembros de la familia de Wnt y los activadores de la ruta Wnt son útiles para la producción de células del endodermo definitivo. En determinados procesos de diferenciación, pueden usarse combinaciones de cualquiera de los factores de crecimiento mencionados anteriormente. Este y otros métodos se describen en detalle en la patente estadounidense n.º 7.510.876.

Con respecto a algunos de los procesos para la diferenciación de células pluripotentes en células del endodermo definitivo, los factores de crecimiento mencionados anteriormente se proporcionan a las células para que los factores de crecimiento estén presentes en los cultivos en concentraciones suficientes para promover la diferenciación de al menos una porción de las células pluripotentes en células del endodermo definitivo. En algunos procesos, los factores de crecimiento mencionados anteriormente están presentes en el cultivo celular a una concentración de al menos aproximadamente 5 ng/ml, al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml, al menos aproximadamente 50 ng/ml, al menos aproximadamente 75 ng/ml, al menos aproximadamente 100 ng/ml, al menos aproximadamente 200 ng/ml, al menos aproximadamente 300 ng/ml, al menos aproximadamente 400 ng/ml, al menos aproximadamente 500 ng/ml, al menos aproximadamente 1000 ng/ml, al menos aproximadamente 2000 ng/ml, al menos aproximadamente 3000 ng/ml, al menos aproximadamente 4000 ng/ml, al menos aproximadamente 5000 ng/ml o más de aproximadamente 5000 ng/ml.

En determinados procesos para la diferenciación de células pluripotentes en células del endodermo definitivo, los factores de crecimiento mencionados anteriormente se eliminan del cultivo celular después de su adición. Por

ejemplo, los factores de crecimiento pueden eliminarse en aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días o aproximadamente diez días después su adición. En un proceso preferido, los factores de crecimiento se eliminan aproximadamente cuatro días después de su adición.

En algunos aspectos de los procesos descritos en el presente documento, las células del endodermo definitivo se enriquecen, aíslan y/o purifican antes de una diferenciación adicional. En tales aspectos, las células del endodermo definitivo pueden enriquecerse, aislarse y/o purificarse usando cualquier método conocido. En aspectos preferidos, las células del endodermo definitivo se enriquecen, aíslan y/o purifican usando uno o más de los métodos descritos en la solicitud de patente estadounidense n.º 11/021.618, titulada DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 23 de diciembre de 2004, y la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/736.598, titulada MARKERS OF DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 14 de noviembre de 2005.

En un aspecto preferido, las células del endodermo definitivo producidas y descritas en el presente documento tienen niveles relativamente altos de expresión de genes CER, GSC, CXCR4, SOX17 y FOXA2 cuando se normalizan y se comparan con niveles de genes de control, tales como genes de mantenimiento.

Producción y composiciones de endodermo del intestino proximal negativo para PDX1 (fase 2)

Las células del endodermo definitivo pueden especificarse hacia la diferenciación pancreática mediante una diferenciación adicional de estas células para producir células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1. En algunos de los procesos de diferenciación descritos en el presente documento, los cultivos celulares así como las poblaciones de células enriquecidas o purificadas que comprenden células del endodermo definitivo pueden usarse para diferenciación adicional en cultivos celulares y/o poblaciones de células enriquecidas que comprenden células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1.

Normalmente, las células del endodermo definitivo se diferencian en células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1 reduciendo o eliminando o retirando la señalización del factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β en un cultivo celular o población celular de células del endodermo definitivas para SOX17. En algunos aspectos, la reducción o eliminación de la señalización del factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β está mediada por dilución o retirada de un factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β añadido de manera exógena, tal como activina A, del cultivo celular o la población celular del endodermo definitivo. En otros aspectos, la señalización del factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β se reduce o elimina proporcionando a las células del endodermo definitivo un compuesto que bloquea la señalización del factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β , tal como folistatina y/o nogina. En algunos aspectos, la señalización del factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β puede reducirse o eliminarse durante aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días, aproximadamente diez días o más de aproximadamente diez días después de la diferenciación de las células pluripotentes humanas en células del endodermo definitivo.

En algunos aspectos, la diferenciación de células del endodermo definitivo en las células del endodermo del intestino proximal se potencia proporcionando el cultivo de células del endodermo definitivo o la población celular con un factor de crecimiento de la familia de FGF y/o un inhibidor de la ruta de hedgehog. En tales aspectos, el factor de crecimiento de la familia de FGF y/o el inhibidor de la ruta de hedgehog se proporciona aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días, aproximadamente diez días o más de aproximadamente diez días después de reducir o eliminar la señalización del factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β en el cultivo de células del endodermo definitivo. En un aspecto preferido, el factor de crecimiento de la familia de FGF y/o el inhibidor de la ruta de hedgehog se proporcionan aproximadamente al mismo tiempo que se reduce o elimina la señalización del factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β en el cultivo de células del endodermo definitivo.

En un aspecto preferido, el factor de crecimiento de la familia de FGF proporcionado al cultivo celular o población celular del endodermo definitivo es FGF10 y/o FGF7. Sin embargo, se apreciará que pueden proporcionarse otros factores de crecimiento de la familia de FGF o análogos o miméticos del factor de crecimiento de la familia de FGF en lugar de o además de FGF10 y/o FGF7. Por ejemplo, puede proporcionarse un factor de crecimiento de la familia de FGF seleccionado del grupo que consiste en FGF1, FGF2, FGF3 y similares hasta e incluyendo FGF23. En tales aspectos, el factor de crecimiento de la familia de FGF y/o el análogo o mimético del factor de crecimiento de la familia de FGF se proporciona a las células de un cultivo celular de manera que esté presente en una concentración de al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml, al menos aproximadamente 50 ng/ml, al menos aproximadamente 75 ng/ml, al menos aproximadamente 100 ng/ml, al menos aproximadamente 200 ng/ml, al menos aproximadamente 300 ng/ml, al menos aproximadamente 400 ng/ml, al menos aproximadamente 500 ng/ml, o al menos aproximadamente 1000 ng/ml.

En otros aspectos preferidos, el inhibidor de hedgehog es KAAD-ciclopatina. Sin embargo, se apreciará que

pueden usarse otros inhibidores de hedgehog. Tales inhibidores incluyen, pero no se limitan a, análogos de KAAD-ciclopamina, jervina, análogos de jervina, anticuerpos bloqueadores de la ruta de hedgehog y cualquier otro inhibidor de la función de la ruta de hedgehog conocido por los expertos en la técnica. Cuando se usa solo o junto con el factor de crecimiento de la familia de FGF, el inhibidor hedgehog puede proporcionarse a una concentración de al menos aproximadamente 0,01 μ M a 50 μ M.

En un proceso preferido para la producción de una población de células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1 a partir de células del endodermo definitivo, la señalización del factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β se reduce o elimina durante aproximadamente dos días después de la diferenciación de una parte sustancial de las células pluripotentes humanas en endodermo definitivo. (por ejemplo, después de un protocolo de diferenciación de tres días, cuatro o cinco días tal como se describe en los ejemplos siguientes). Aproximadamente al mismo tiempo, el cultivo celular o la población celular de las células del endodermo definitivo recibe nogina y KAAD-ciclopamina, por ejemplo, 50 ng/ml de nogina y KAAD-ciclopamina 0,2 mM en medio DMEM en presencia de RA 2 mM o TTNP 3 nM.

En algunos aspectos, las células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1 pueden diferenciarse adicionalmente en células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 poniendo en contacto las células con un medio que comprende, o proporciona a las células de otro modo, un retinoide, tal como ácido retinoico (RA). En algunos aspectos, el retinoide se proporciona a las células de un cultivo celular de manera que esté presente en una concentración de al menos aproximadamente 1 nM a 50 μ M. En tales aspectos, el retinoide se proporciona a las células aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días, aproximadamente diez días. días o más de aproximadamente diez días después de reducir o eliminar la señalización del factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β en el cultivo de células del endodermo definitivo. En un aspecto preferido, se proporciona desde aproximadamente 0,05 μ M de RA hasta aproximadamente 2 μ M de RA al cultivo de células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX-1 aproximadamente de 2 a 3 días después de reducir o eliminar la señalización del factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β .

En algunos de los procesos de diferenciación descritos en el presente documento, los factores de diferenciación mencionados anteriormente se eliminan del cultivo celular después de su adición. Por ejemplo, los factores de diferenciación mencionados anteriormente pueden eliminarse en aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días o aproximadamente diez días después de su adición.

En un aspecto preferido, las células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1 producidas y descritas en el presente documento tienen niveles relativamente altos de expresión génica de SOX17, FOXA1, HNF1B y HNF4A cuando se normalizan a niveles de genes de control, tales como genes de mantenimiento. En particular, los niveles de expresión del gen HNF4A no aumentan sustancialmente hasta que se elimina la señalización del factor de crecimiento de la superfamilia de TGF β (por ejemplo, activina) de un cultivo de endodermo definitivo, por ejemplo.

Producción y composiciones de endodermo del intestino proximal positivo para PDX1 (fase 3)

Las células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1 pueden especificarse adicionalmente para la diferenciación pancreática mediante una diferenciación adicional de estas células para producir células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 o endodermo pancreático positivo para PDX1 o equivalentes de los mismos. En algunos de los procesos de diferenciación descritos en el presente documento, los cultivos celulares así como las poblaciones de células enriquecidas o purificadas que comprenden células del endodermo definitivo pueden usarse para diferenciación adicional en cultivos celulares y/o poblaciones celulares enriquecidas que comprenden células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1.

Normalmente, las células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1 se diferencian de las células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 proporcionando a un cultivo celular que comprende células del endodermo del intestino proximal positivas para SOX17 un retinoide, tales como ácido retinoico (RA). En algunos de los procesos de diferenciación, las células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1 en cultivo también reciben un miembro de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos antes o aproximadamente al mismo tiempo que la adición de RA. Un factor de crecimiento de fibroblastos preferido es FGF-7. En otro proceso preferido, el factor de crecimiento de fibroblastos comprende cualquier factor de crecimiento de fibroblastos o un ligando que estimule o interactúe de otro modo con el receptor IIIb del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2 (IIIb)). En procesos aún más preferidos, el factor de crecimiento de la familia de FGF se usa junto con un inhibidor de la ruta de hedgehog. Un inhibidor de la ruta de hedgehog preferido es KAAD-ciclopamina. En procesos de diferenciación especialmente preferidos, se proporcionan FGF-10 y/o KAAD-ciclopamina a un cultivo celular que comprende células del endodermo definitivo negativas para PDX1 en presencia de RA. En determinados procesos, BMP4 puede incluirse con FGF 10 y/o KAAD-ciclopamina en presencia de RA. En algunos procesos, el retinoide se usa junto con un miembro de la superfamilia de factores de crecimiento TGF β y/o el medio de

Connaught Medical Research Labs (medio CRML) (Invitrogen, Carlsbad, CA).

5 Con respecto a algunos de los aspectos de los procesos de diferenciación descritos en el presente documento, el retinoide y/o una combinación de los factores de diferenciación mencionados anteriormente se proporcionan a las células para que estos factores estén presentes en el cultivo celular o la población celular en concentraciones suficientes para promover la diferenciación de al menos una parte del cultivo de células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1 o de la población celular en células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1.

10 En otros procesos, el FGF-10 se proporciona a las células de un cultivo celular de manera que esté presente en una concentración de al menos aproximadamente 1 ng/ml, al menos aproximadamente 2 ng/ml, al menos aproximadamente 5 ng/ml, en al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml y hasta 50 μ M. En algunos aspectos de la presente divulgación, un factor de crecimiento de fibroblastos o un ligando que estimula o interactúa de otro modo con el receptor IIIb del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2 (IIIb)) se proporciona solo o en combinación con el inhibidor de la ruta de hedgehog.

15 En un proceso preferido para la producción de una población de células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 a partir de células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1, se proporciona un cultivo celular o una población celular enriquecida de células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1 con FGF-7, KAAD-ciclopamina y ácido retinoico (RA), por ejemplo, 25 ng/ml de FGF-7 y KAAD-ciclopamina 0,2 μ M en medio CMRL en presencia de RA 2 μ M.

20 En algunos procesos descritos en el presente documento, el factor de señalización de TGF β , por ejemplo, activina A y/o activina B, GDF-8, GDF-11 y similares se proporcionan al cultivo celular junto con el retinoide y/o el factor de crecimiento de fibroblastos y el inhibidor de hedgehog. Por ejemplo, en tales procesos, se proporciona activina A y/o activina B y/o GDF-8 y/o GDF-11 al cultivo celular en una concentración de al menos aproximadamente 5 ng/ml, al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 25 ng/ml, al menos aproximadamente 50 ng/ml, al menos aproximadamente 75 ng/ml, al menos aproximadamente 100 ng/ml, al menos aproximadamente 200 ng/ml, al menos aproximadamente 300 ng/ml, al menos aproximadamente 400 ng/ml, al menos aproximadamente 500 ng/ml o al menos aproximadamente 1000 ng/ml.

30 En algunos procesos, los factores de diferenciación y/o el medio CRML se proporciona a las células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1 aproximadamente un día, dos días, tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días, aproximadamente diez días o aproximadamente más de diez días después del inicio de la diferenciación a partir de células pluripotentes. En procesos preferidos, se proporcionan factores de diferenciación y/o medio CRML a las células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1 aproximadamente tres, cuatro o cinco días después del inicio de la diferenciación de las células madre pluripotentes.

35 En determinados procesos descritos en el presente documento, los factores de diferenciación mencionados anteriormente se eliminan del cultivo celular después de su adición. Por ejemplo, los factores de diferenciación mencionados anteriormente se pueden eliminar en aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente cinco días, aproximadamente seis días, aproximadamente siete días, aproximadamente ocho días, aproximadamente nueve días o aproximadamente diez días después de su adición.

40 Estos y otros métodos se describen en detalle en la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/730.917, titulada PDX1- EXPRESSING DORSAL AND VENTRAL FOREGUT ENDODERM, presentada el 27 de octubre de 2005, y las células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 pueden encontrarse en la solicitud de patente estadounidense n.º 11/115.868, titulada PDX1 EXPRESSING ENDODERM, presentada el 26 de abril de 2005.

45 En un aspecto preferido, las células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 producidas y descritas en el presente documento tienen niveles relativamente altos de expresión génica de PDX1, NKX6.1, PTF1A, CPA y cMYC cuando se normalizan y se comparan con niveles de genes de control, tales como genes de mantenimiento.

Producción y composiciones de endodermo pancreático positivo para PDX1 (fase 4)

50 La producción y las composiciones de endodermo pancreático positivo para PDX1 o "epitelio pancreático" o más generalmente progenitores pancreáticos se describe en detalle en la solicitud estadounidense n.º 12/167.227, titulada METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES, presentada el 2 de julio de 2008, que se emitió el 19 de mayo de 2009 como la patente estadounidense n.º 7.534.608. La solicitud 12/167.227 es una continuación de la solicitud estadounidense n.º 11/773.944, titulada METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES, presentada el 5 de julio de 2007, que es una continuación en parte de la solicitud de patente estadounidense n.º 11/681.687, titulada ENDOCRINE PRECURSOR CELLS, PANCREATIC HORMONE-EXPRESSING CELLS AND METHODS OF PRODUCTION, presentada el 2 de marzo de 2007.

El ejemplo 22 de la solicitud 12/167.227 describe en detalle diversas modificaciones de las condiciones de cultivo celular descritas en el presente documento en las fases 1 a 4. En general, las células de tipo endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 en la fase 3 se cultivan en medios que contienen DMEM en complemento de B27 al 1% v/v más nogina u otro inhibidor específico de BMP4 durante aproximadamente de 1 a 3 días, o de aproximadamente 1 a 4 días, o de 1 a 5 días, o de aproximadamente 1 a 6 días. Al final de la fase 4, se produce un endodermo pancreático positivo para PDX1, cuya célula al menos coexpresa PDX1 y Nkx6.1 así como PTF1A. El cultivo celular no expresa de manera apreciable células indicativas de células endocrinas individuales o polihormonales de la fase 5, o células del endodermo definitivo de la fase 1, o células del endodermo del intestino proximal negativas para PDX1 de la fase 2, o células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 de la fase 3.

Producción y composiciones de células precursoras endocrinas (fase 5)

Algunos aspectos descritos en el presente documento se refieren a métodos para producir células precursoras endocrinas a partir de células pluripotentes. Tal como se describió anteriormente, las células precursoras endocrinas pueden producirse diferenciando primero células pluripotentes para producir células del endodermo definitivo y luego diferenciando adicionalmente las células del endodermo definitivo para producir células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1. En tales aspectos, las células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 se diferencian adicionalmente en células precursoras endocrinas multipotentes, que pueden diferenciarse en células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos humanos.

En un aspecto, las células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 se diferencian en células precursoras endocrinas al continuar la incubación de las células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 en presencia de un retinoide, tal como ácido retinoico, durante un tiempo suficiente para producir células precursoras endocrinas. En algunos aspectos, la cantidad de tiempo suficiente para la producción de células precursoras endocrinas oscila entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 10 días después de la expresión del marcador PDX1 en una porción de las células en el cultivo celular. En algunos aspectos, el retinoide se mantiene en el cultivo celular durante aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días o más de aproximadamente 10 días después de la expresión del marcador PDX1 en un porción de las células en el cultivo celular.

En algunos procesos descritos en el presente documento, la concentración de retinoide usada para diferenciar las células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 en el cultivo celular o la población celular en células precursoras endocrinas oscila entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 100 μ M.

En algunos aspectos preferidos, la diferenciación de células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 en células precursoras endocrinas pancreáticas se media proporcionando un cultivo celular o población celular que comprende células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 humanas con un inhibidor de gamma secretasa. En un aspecto preferido, el inhibidor de gamma secretasa es éster butílico de N-[N-(3,5-difluorofenacetil-L-alanil)]-S-fenilglicina (DAPT).

En otros aspectos, el inhibidor de gamma secretasa se proporciona al comienzo del proceso de diferenciación, por ejemplo, en la fase pluripotente, y permanece en el cultivo celular durante la diferenciación en células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos. En todavía otros aspectos, el inhibidor de gamma secretasa se añade después del inicio de la diferenciación pero antes de la diferenciación en la fase de endodermo del intestino proximal positivo para PDX1. En aspectos preferidos, el inhibidor de gamma secretasa se proporciona al cultivo celular o población celular aproximadamente al mismo tiempo que se proporcionan los factores de diferenciación que promueven la conversión del endodermo definitivo en endodermo positivo para PDX1. En otros aspectos preferidos, el inhibidor de gamma secretasa se proporciona al cultivo celular o la población celular después de que una parte sustancial de las células en el cultivo celular o la población celular se hayan diferenciado en células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1.

Con respecto a algunos aspectos relacionados con la diferenciación de las células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 en células precursoras endocrinas, el inhibidor de gamma secretasa se proporciona a las células para que esté presente en el cultivo celular o la población celular a concentraciones suficientes para promover la diferenciación de al menos una porción de las células positivas para PDX1 en células precursoras endocrinas. En algunos aspectos, el inhibidor de gamma secretasa está presente en el cultivo celular o la población celular a una concentración que oscila entre aproximadamente 0,01 μ M y aproximadamente 1000 μ M. En aspectos preferidos, el inhibidor de gamma secretasa está presente en el cultivo celular o la población celular a una concentración que oscila entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 100 μ M.

En determinados aspectos de los procesos para producir células precursoras endocrinas tal como se describe en el presente documento, el inhibidor de gamma secretasa se proporciona después de que uno o más factores de diferenciación proporcionados previamente se hayan eliminado de los cultivos celulares. Por ejemplo, el uno o más

factores de diferenciación proporcionados previamente pueden eliminarse aproximadamente de 1 día a 10 días o más de aproximadamente 10 días antes de la adición del inhibidor de gamma secretasa. En otros aspectos, el inhibidor de gamma secretasa se proporciona a cultivos celulares o poblaciones de células que comprenden uno o más factores de diferenciación que se proporcionaron previamente o se proporcionaron aproximadamente al mismo tiempo que el inhibidor de gamma secretasa. En aspectos preferidos, los factores de diferenciación que se proporcionaron o proporcionaron anteriormente aproximadamente al mismo tiempo que el inhibidor de gamma secretasa incluyen, pero no se limitan a, FGF-10, KAAD-ciclopatamina, activina A, activina B, GDF-8, GDF-11, BMP4 y/o RA.

En algunos aspectos de la divulgación descrita en el presente documento, se proporciona exendina 4 al cultivo celular o población celular en diferenciación aproximadamente al mismo tiempo que el inhibidor de gamma secretasa. En determinados aspectos, la exendina 4 se proporciona de modo que esté presente en el cultivo celular o la población celular a una concentración de al menos aproximadamente 0,1 ng/ml a 1000 ng/ml.

En un proceso preferido para la producción de células precursoras endocrinas a partir de células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1, se proporciona un cultivo celular o una población celular de células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 con DAPT 3 μ M y exendina 4 40 ng/ml. En aspectos especialmente preferidos, las células se diferencian en CMRL. En otro proceso especialmente preferido, para la producción de células precursoras endocrinas a partir de células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1, se proporciona un cultivo celular o una población celular de células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 con DAPT 3 μ M y exendina 4 40 ng/ml presencia de RA 2 μ M.

Se apreciará que la expresión del marcador NGN3, NKX2.2 y/o PAX4 se induce en un intervalo de diferentes niveles en células precursoras endocrinas dependiendo de las condiciones de diferenciación. Como tal, en algunos aspectos descritos en el presente documento, la expresión del marcador NGN3, NKX2.2 y/o PAX4 en células precursoras endocrinas o poblaciones celulares es al menos de aproximadamente 2 veces mayor a al menos aproximadamente 10.000 veces mayor que la expresión del marcador NGN3, NKX2.2 y/o PAX4 en células precursoras no endocrinas o poblaciones celulares, por ejemplo, células madre pluripotentes, células del endodermo definitivo, células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1, células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras, células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos maduras, células del endodermo extraembrionario, células de mesodermo y/o células del ectodermo. En otros aspectos, la expresión del marcador NGN3, NKX2.2 y/o PAX4 en células precursoras endocrinas o poblaciones celulares es de al menos aproximadamente 4 veces mayor, al menos aproximadamente 6 veces mayor a 10.000 veces mayor que la expresión del marcador NGN3, NKX2.2 y/o PAX4 en células precursoras no endocrinas o poblaciones celulares, por ejemplo, células madre pluripotentes, células del endodermo definitivo, células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1, células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras, células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos maduras, células del endodermo extraembrionario, células de mesodermo y/o células del ectodermo. En algunos aspectos, la expresión del marcador NGN3, NKX2.2 y/o PAX4 en células precursoras endocrinas o poblaciones celulares es infinitamente mayor que la expresión del marcador NGN3, NKX2.2 y/o PAX4 en células precursoras no endocrinas o poblaciones celulares, por ejemplo, células pluripotentes tales como células iPS y células hES, células del endodermo definitivo, células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1, células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras, células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos maduros, células del endodermo extraembrionario, células de mesodermo y/o células del ectodermo.

Aspectos adicionales de la presente divulgación se refieren a composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden células humanas, incluyendo células precursoras endocrinas humanas, en las que la expresión del marcador NGN3 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1, NFM, MAFA, SYP, CHGA, INS, GCG, SST, GHRL y/o PAX6 en al menos aproximadamente el 2% de las células humanas. En otros aspectos, la expresión del marcador NGN3 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1, NFM, MAFA, SYP, CHGA, INS, GCG, SST, GHRL y/o PAX6 en al menos de aproximadamente el 5% al 98% de las células humanas. En algunos aspectos, el porcentaje de células humanas en los cultivos celulares o poblaciones, en los que la expresión de NGN3 es mayor que la expresión de los marcadores AFP, SOX7, SOX1, ZIC1, NFM, MAFA, SYP, CHGA, INS, GCG, SST, GHRL y/o PAX6, se calcula sin tener en cuenta las células alimentadoras.

Se apreciará que algunos aspectos de la presente divulgación se relacionan con composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden células precursoras endocrinas humanas, en las que la expresión de NKX2.2 y/o PAX4 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1, NFM, MAFA, SYP, CHGA, INS, GCG, SST, GHRL y/o PAX6 en desde al menos aproximadamente 2% hasta más de al menos aproximadamente 98% de las células humanas. En algunos aspectos, la expresión de NKX2.2 y/o PAX4 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1, NFM, MAFA, SYP, CHGA, INS, GCG, SST, GHRL y/o PAX6 en al menos aproximadamente el 5% de las células humanas al 98% de las células humanas. En algunos aspectos, el porcentaje de células humanas en los cultivos o poblaciones celulares, donde la expresión de NKX2.2 y/o PAX4 es mayor que la expresión de AFP, SOX7, SOX1, ZIC1, NFM, MAFA, SYP, CHGA, INS, GCG, SST, GHRL y/o PAX6 se calcula sin tener en cuenta las células alimentadoras.

Aspectos adicionales de la presente divulgación se refieren a composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden células de mamífero diferenciadas del endodermo definitivo *in vitro*, tales como células humanas diferenciadas del endodermo definitivo *in vitro*, en las que la expresión del marcador NGN3, NKX2.2 y/o PAX4 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1, NFM, MAFA, SYP, CHGA, INS, GCG, SST, GHRL y/o PAX6 en al menos aproximadamente el 2% de las células diferenciadas del endodermo definitivo *in vitro*. En otros aspectos, la expresión del marcador NGN3, NKX2.2 y/o PAX4 es mayor que la expresión del marcador AFP, SOX7, SOX1, ZIC1, NFM, MAFA, SYP, CHGA, INS, GCG, SST, GHRL y/o PAX6 en al menos de aproximadamente el 5% de las células diferenciadas del endodermo definitivo *in vitro* al 98% de las células diferenciadas del endodermo definitivo *in vitro*.

Usando los procesos descritos en el presente documento, pueden producirse composiciones que comprenden células precursoras endocrinas sustancialmente libres de otros tipos de células. En algunos aspectos de la presente divulgación, las poblaciones de células precursoras endocrinas o cultivos celulares producidos mediante los métodos descritos en el presente documento están sustancialmente libres de células que expresan significativamente los marcadores AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM. En algunos aspectos, las poblaciones de células precursoras endocrinas de cultivos celulares producidos mediante los métodos descritos en el presente documento están sustancialmente libres de células que expresan significativamente los marcadores AFP, SOX7, SOX1, ZIC1, NFM, MAFA, SYP, CHGA, INS, GCG, SST, GHRL y/o PAX6.

En un aspecto de la presente divulgación, una descripción de una célula precursora endocrina basada en la expresión de marcadores es NGN3 alto, NKX2.2 alto, PAX4 alto, AFP bajo, SOX7 bajo, SOX1 bajo, ZIC1 bajo NFM bajo, MAFA bajo ; SYP bajo; CHGA bajo; INS bajo, GCG bajo, SST bajo, GHRL bajo y/o PAX6 bajo.

Producción de células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras

Aspectos descritos en el presente documento se refieren a métodos de producción de células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras a partir de células pluripotentes. Tal como se describió anteriormente, pueden producirse células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras diferenciando en primer lugar células pluripotentes para producir células del endodermo definitivo, diferenciando las células del endodermo definitivo para producir células del endodermo del intestino proximal, diferenciando el endodermo del intestino proximal para producir células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 y después diferenciando adicionalmente las células del endodermo del intestino proximal positivas para PDX1 para producir células precursoras endocrinas. En algunos aspectos, el procedimiento continúa permitiendo que las células precursoras endocrinas se diferencien adicionalmente para dar células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras.

En algunos aspectos de la presente divulgación, la diferenciación a partir de células precursoras endocrinas en células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras procede continuando la incubación de un cultivo de células precursoras endocrinas con un inhibidor de gamma secretasa durante un tiempo suficiente de modo que las células dejan de expresar sustancialmente NGN3 y empiezan a expresar PAX6, y para permitir que las células se vuelvan competentes para expresar al menos una hormona de célula de islote pancreático. En algunos aspectos, el inhibidor de gamma secretasa se retira aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días o más de aproximadamente 10 días después de la inducción de células precursoras endocrinas. En un aspecto preferido, el inhibidor de gamma secretasa es éster t-butilico de N-[N-(3,5-difluorofenacetil-L-alanil)]-S-fenilglicina (DAPT).

Determinados procedimientos para la producción de células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras dados a conocer en el presente documento se median proporcionando un cultivo celular o población celular que comprende células precursoras endocrinas humanas con uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en nicotinamida, exendina 4, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF1). En algunos aspectos, se proporcionan juntos los cuatro de los factores anteriormente descritos. En algunos aspectos, se proporcionan uno o más de los factores anteriormente descritos al cultivo celular antes de la diferenciación de células precursoras endocrinas y siguen estando presentes en el cultivo celular durante la diferenciación de al menos una porción de las células en el cultivo celular en células precursoras endocrinas. En otros aspectos, se proporcionan uno o más de los factores anteriormente descritos al cultivo celular en o aproximadamente en el momento de diferenciación de una porción sustancial de las células en células precursoras endocrinas y siguen estando presentes en el cultivo celular hasta que al menos una porción sustancial de las células se han diferenciado en células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras. En algunos aspectos de la presente divulgación, se proporcionan uno o más de los factores anteriormente descritos al comienzo del procedimiento de diferenciación, por ejemplo, en la fase de células pluripotentes, y permanecen en el cultivo celular a lo largo de toda la diferenciación en células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras.

En algunos procedimientos para la producción de células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras dados a conocer en el presente documento, se proporcionan nicotinamida, dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD) o ácido nicotínico a las células de modo que están presentes en el cultivo celular o la población celular a concentraciones suficientes para fomentar la diferenciación de al menos una porción de las células

precursoras endocrinas en células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras. En algunos aspectos, nicotinamida está presente en el cultivo celular o la población celular a una concentración de al menos aproximadamente 0,1 mM, al menos aproximadamente 0,5 mM, a 1000 mM.

5 En otros procedimientos para la producción de células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras dados a conocer en el presente documento, se proporciona exendina 4 a las células de modo que está presente en el cultivo celular o la población celular a concentraciones suficientes para fomentar la diferenciación de al menos una porción de las células precursoras endocrinas en células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras. En algunos aspectos, exendina 4 está presente en el cultivo celular o la población celular a una concentración de al menos aproximadamente 1 ng/ml, al menos aproximadamente 5 ng/ml, a 1000 ng/ml.

10 En todavía otros procedimientos para la producción de células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras dados a conocer en el presente documento, se proporciona HGF a las células de modo que está presente en el cultivo celular o la población celular a concentraciones suficientes para fomentar la diferenciación de al menos una porción de las células precursoras endocrinas en células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras. En algunos aspectos, HGF está presente en el cultivo celular o la población celular a una
15 concentración de al menos aproximadamente 1 ng/ml, al menos aproximadamente 5 ng/ml, a 1000 ng/ml.

En aún otros procedimientos para la producción de células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras dados a conocer en el presente documento, se proporciona IGF1 a las células de modo que está presente en el cultivo celular o la población celular a concentraciones suficientes para fomentar la diferenciación de al menos una porción de las células precursoras endocrinas en células que expresan hormonas de los islotes
20 pancreáticos inmaduras. En algunos aspectos, IGF1 está presente en el cultivo celular o la población celular a una concentración de al menos aproximadamente 1 ng/ml a 1000 ng/ml.

En determinados aspectos de los procedimientos para producir células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras tal como se describen en el presente documento, se proporcionan uno o más de nicotinamida, exendina 4, HGF e IGF1 después de haberse retirado uno o más factores de diferenciación
25 anteriormente proporcionados de los cultivos celulares. En otros aspectos, se proporcionan uno o más de nicotinamida, exendina 4, HGF e IGF1 al cultivo celular o población celular que comprende uno o más factores de diferenciación que se proporcionaron anteriormente o se proporcionaron aproximadamente al mismo tiempo que uno o más de nicotinamida, exendina 4, HGF e IGF1. En aspectos preferidos, los factores de diferenciación que se proporcionaron anteriormente o se proporcionaron aproximadamente al mismo tiempo que uno o más de
30 nicotinamida, exendina 4, HGF e IGF1 incluyen, pero no se limitan a, DAPT, FGF-10, KAAD-ciclopamina, activina A, activina B, BMP4 y/o RA.

Aspectos adicionales de la presente divulgación se refieren a composiciones, tales como cultivos celulares o poblaciones celulares, que comprenden células humanas, incluyendo células humanas que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras, en las que la expresión de marcador MAFB, SYP, CHGA, NKX2.2, ISL1, PAX6,
35 NEUROD, PDX1, HB9, GHRL, IAPP, INS GCG, SST, PP y/o péptido C es mayor que la expresión del marcador NGN3, MAFA, MOX1, CER, POU5F1, AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM en al menos aproximadamente el 2% de las células humanas. En otros aspectos, la expresión del marcador MAFB, SYP, CHGA, NKX2.2, ISL1, PAX6, NEUROD, PDX1, HB9, GHRL, IAPP INS GCG, SST, PP y/o péptido C es mayor que la expresión del marcador NGN3, MAFA, MOX1, CER, POU5F1, AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 y/o NFM en al menos aproximadamente el 5% de
40 las células humanas, en de al menos aproximadamente el 10% de las células humanas al 95% de las células humanas o en al menos aproximadamente el 98% de las células humanas.

En algunos aspectos, el porcentaje de células humanas en los cultivos o poblaciones celulares, en los que la expresión de MAFB, SYP, CHGA, NKX2.2, ISL1, PAX6, NEUROD, PDX1, HB9, GHRL, IAPP, INS GCG, SST, PP, y/o péptido C es mayor que la expresión del marcador NGN3, MAFA, MOX1, CER, POU5F1, AFP, SOX7, SOX1,
45 ZIC1 y/o NFM, se calcula sin tener en cuenta las células alimentadoras.

En determinados aspectos de la presente divulgación, los cultivos celulares y/o las poblaciones celulares que comprenden células que expresan hormonas de los islotes pancreáticos inmaduras también incluyen un medio que comprende una o más hormonas secretadas seleccionadas de grelina, insulina, somatostatina y/o glucagón. En otros aspectos, el medio comprende péptido C. En un aspecto preferido, la concentración de una o más hormonas secretadas o péptido C en el medio oscila entre al menos aproximadamente 1 pmol de grelina, insulina, somatostatina, glucagón o péptido C/ μ g de ADN celular y al menos aproximadamente 1000 picomoles (pmol) de grelina, insulina, somatostatina, glucagón o péptido C/ μ g de ADN celular.
50

Método de producción de insulina *in vivo*

55 En algunos aspectos, células progenitoras pancreáticas derivadas *in vitro* o células de tipo endodermo pancreático positivas para PDX-1 o equivalentes de las mismas descritas anteriormente se trasplantan al interior de un sujeto mamífero. Estos métodos se describen en detalle en la solicitud internacional PCT/US2007/015536, titulada METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES. En un aspecto preferido, el sujeto mamífero es un sujeto humano. Sujetos particularmente preferidos son aquellos que se ha identificado que tienen un estado que limita la

capacidad del sujeto para producir niveles suficientes de insulina en respuesta a concentraciones de glucosa en sangre fisiológicamente altas. Un intervalo de niveles de glucosa en sangre que constituye un nivel de glucosa en sangre fisiológicamente alto para cualquier especie de mamífero particular puede determinarse fácilmente por los expertos habituales en la técnica. Se considera que cualquier nivel de glucosa en sangre persistente que da como resultado una enfermedad o estado reconocido es un nivel de glucosa en sangre fisiológicamente alto.

Aspectos adicionales de la presente divulgación se refieren a una célula que secreta insulina *in vivo* que se deriva a partir de una célula madre pluripotente *in vitro* o progenie de la misma, por ejemplo, células multipotentes, tales como célula del endodermo del intestino proximal positiva para PDX-1, una célula progenitora pancreática o del endodermo pancreático positiva para PDX-1, un precursor endocrino, tal como un precursor endocrino positivo para NGN3, o una célula que secreta hormonas diferenciadas funcionales, tal como una célula que secreta insulina, glucagón, somatostatina, grelina o polipéptido pancreático. Cualquiera de las células multipotentes o diferenciadas de manera terminal anteriormente descritas puede trasplantarse al interior del huésped, o mamífero, y madurar para dar células que secretan hormonas fisiológicamente funcionales, tales como células que secretan insulina, en respuesta a niveles de glucosa en sangre del huésped. En aspectos preferidos, la célula no forma un teratoma *in vivo*, y si lo forma, permanece localizado en la zona de trasplante y puede escindirarse o extirparse fácilmente. En aspectos especialmente preferidos, la célula no contiene ninguna anomalía cariotípica durante el procedimiento de diferenciación *in vitro*, o cuando se trasplanta al mamífero *in vivo*, o cuando se madura y se desarrolla para dar islotes funcionales *in vivo*.

Además, aunque aspectos descritos en el presente documento se refieren a una célula pluripotente modificada por ingeniería o genéticamente recombinante, célula multipotente o diferenciada derivada a partir de la célula pluripotente, tal como una célula iPS humana, basándose en la descripción proporcionada en el presente documento, se prevé que, dado que las células iPS demuestran una fisiología y perfiles de expresión de marcadores genéticos similares a los de las células hES y células derivadas de hES, tendrán características fisiológicas similares *in vivo*.

Método de encapsulación de progenitores pancreáticos

En algunos aspectos, la composición de células pluripotentes, multipotentes y diferenciadas descrita en el presente documento puede encapsularse en un dispositivo biológico y/o mecánico no biológico, en el que el dispositivo encapsulado separa y/o aísla las composiciones celulares a partir del huésped.

Se describen en detalle métodos de encapsulación en la solicitud estadounidense 61/114.857, presentada el 14 de noviembre de 2008, titulada ENCAPSULATION OF PANCREATIC PROGENITORS DERIVED FROM HES CELLS, y la solicitud estadounidense n.º 61/121.086 presentada el 12 de diciembre de 2008, titulada ENCAPSULATION OF PANCREATIC ENDODERM CELLS; y que describe la encapsulación de células del endodermo pancreático usando una membrana semipermeable, por ejemplo, un dispositivo Theracyte™ o Gore.

En un aspecto, se encapsulan células derivadas de hES usando un polietilenglicol (PEG) biocompatible. La encapsulación basada en PEG se describe en más detalle en la patente estadounidense n.º 7.427.415, titulada IMPLANTATION OF ENCAPSULATED BIOLOGICAL MATERIALS FOR TREATING DISEASES; la patente estadounidense n.º 6.911.227, titulada GELS FOR ENCAPSULATION OF BIOLOGICAL MATERIALS; y las patentes estadounidenses n.ºs 6.911.227, 5.529.914, 5.801.033, 6.258.870, tituladas GELS FOR ENCAPSULATION OF BIOLOGICAL MATERIALS; y que describen el recubrimiento conformal de agregados celulares usando polietilenglicol.

En un aspecto, el dispositivo de encapsulación contiene las células derivadas pluripotentes, por ejemplo, célula del endodermo del intestino proximal positiva para PDX-1, una célula progenitora o del endodermo pancreático positiva para PDX-1, un precursor endocrino, tal como un precursor endocrino positivo para NGN3, o una célula que secreta hormonas diferenciadas funcionales, tal como una célula que secreta insulina, glucagón, somatostatina, grelina o polipéptido pancreático, en una membrana semipermeable que impide el paso de la población celular trasplantada, reteniéndolas en el dispositivo, mientras que al mismo tiempo permite el paso de determinados polipéptidos secretados, por ejemplo, insulina, glucagón, somatostatina, grelina, polipéptido pancreático y similares. Alternativamente, el dispositivo tiene una pluralidad de membranas, incluyendo una membrana vascularizante.

Uso de agentes para potenciar y fomentar el crecimiento, supervivencia, proliferación y adhesión célula-célula de células humanas madre pluripotentes, por ejemplo, células hES y células iPS

La regulación celular puede afectarse mediante la transducción de señales extracelulares a través de la membrana que, a su vez, modulan rutas bioquímicas dentro de la célula. La fosforilación de proteína representa una ruta mediante la cual se propagan señales intracelulares de una molécula a otra dando como resultado finalmente una respuesta celular. Estas cascadas de transducción de señales están altamente reguladas y con frecuencia se solapan tal como se demuestra mediante la existencia de muchas proteína cinasas así como fosfatasa. Se ha notificado que, en seres humanos, se sabe que las proteína tirosina cinasas tienen un papel significativo en el desarrollo de muchos estados patológicos incluyendo diabetes, cáncer y también se han asociado con una amplia variedad de síndromes congénitos. Las serina treonina cinasas, por ejemplo, Rho cinasas, son una clase de

enzimas, que, si se inhiben, pueden tener relevancia para el tratamiento de enfermedad humana, incluyendo diabetes, cáncer y una variedad de trastornos cardiovasculares inflamatorios y SIDA. La mayoría de los inhibidores identificados hasta ahora actúan en el sitio de unión a ATP. Tales inhibidores competitivos con ATP han demostrado selectividad gracias a su capacidad para seleccionar como diana las zonas peor conservadas del sitio de unión a ATP.

La familia de Rho cinasas de pequeñas proteínas de unión a GTP contiene al menos 10 miembros incluyendo Rho A-E y G, Rac 1 y 2, Cdc42, y TC10. Los inhibidores se denominan con frecuencia ROK o inhibidores de ROCK o inhibidores de Rho cinasa, y se usan de manera intercambiable en el presente documento. Los dominios de efector de RhoA, RhoB y RhoC tienen la misma secuencia de aminoácidos y parecen tener dianas intracelulares similares. La Rho cinasa funciona como mediador posterior primario de Rho y existe como dos isoformas: α (ROCK2) y β (ROCK1). Las proteínas de la familia de Rho cinasas tienen un dominio catalítico (cinasa) en su dominio N-terminal, un dominio de hélice superenrollada en su porción central, y un supuesto dominio de homología a pleckstrina (PH) en su región C-terminal. El dominio de unión a Rho de ROCK está ubicado en la porción C-terminal del dominio de hélice superenrollada y la unión de la forma unida a GTP de Rho da como resultado la potenciación de la actividad cinasa. La ruta mediada por Rho/Rho cinasa desempeña un papel importante en la transducción de señales iniciada por muchos agonistas, incluyendo angiotensina II, serotonina, trombina, endotelina 1, norepinefrina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, ATP/ADP y nucleótidos extracelulares y urotensina II. Mediante la modulación de sus efectores/sustratos diana, la Rho cinasa desempeña un papel importante en diversas funciones celulares incluyendo contracción de músculo liso, organización del citoesqueleto de actina, adhesión y motilidad celulares y expresión génica. Gracias al papel que desempeñan las proteínas de Rho cinasa en la mediación de varias funciones celulares que se percibe que están asociadas con la patogénesis de arteriosclerosis, los inhibidores de estas cinasas también pueden ser útiles para el tratamiento o la prevención de diversas enfermedades cardiovascular arterioscleróticas y participar en la contracción endotelial.

En algunos aspectos, se añaden agentes que fomentan y/o respaldan el crecimiento, supervivencia, proliferación y adhesión célula-célula celulares a diversas condiciones de medios de cultivo celular, incluyendo, pero sin limitarse a, inhibidores de Rho-cinasa Y-27632, fasudil (también denominado HA1077), H-1152P e ITS (insulina/transferrina/selenio; Gibco), Wf-536, Y-30141 (descrito en la patente estadounidense n.º 5.478.838) y derivados de los mismos, y ácido nucleico antisentido para ROCK, ácido nucleico que induce interferencia de ARN (por ejemplo, ARNip), péptidos competitivos, péptidos antagonistas, anticuerpos inhibidores, fragmentos ScFV de anticuerpos, variantes negativas dominantes y vectores de expresión de los mismos. Además, dado que otros compuestos de bajo peso molecular se conocen como inhibidores de ROCK, tales compuestos o derivados de los mismos también pueden usarse en la presente divulgación (por ejemplo, véanse las solicitudes de patente estadounidense n.ºs 20050209261, 20050192304, 20040014755, 20040002508, 20040002507, 20030125344 y 20030087919, y las publicaciones de patente internacionales n.ºs 2003/062227, 2003/059913, 2003/062225, 2002/076976 y 2004/039796).

En la presente divulgación, también puede usarse una combinación de uno o dos o más de los inhibidores de ROCK. Estos agentes funcionan, en parte, fomentando la nueva asociación de cultivos de células hES, células iPS o diferenciadas disociadas, por ejemplo, endodermo definitivo, endodermo del intestino proximal, endodermo pancreático, epitelio pancreático, poblaciones de progenitores pancreáticos, poblaciones y progenitores endocrinos y similares. Asimismo, los agentes pueden funcionar cuando no se realiza disociación celular. El aumento del crecimiento, supervivencia, proliferación y adhesión célula-célula de las células humanas madre pluripotentes se logró independientemente de si las células se produjeron a partir de agregados celulares en suspensión o a partir de cultivos en placas adherentes (con o sin componentes de matriz extracelular, con o sin suero, con o sin alimentadores de fibroblastos, con o sin FGF, con o sin activina). El aumento de la supervivencia de estas poblaciones celulares facilita y mejora los sistemas de purificación usando un clasificador celular y, por tanto, permite una recuperación mejorada de las células. El uso de inhibidores de Rho cinasa tales como Y27632 también puede permitir la expansión de tipos de células diferenciadas fomentando su supervivencia durante pases en serie de células individuales disociadas o a partir de conservación criogénica. Aunque se han sometido a prueba inhibidores de Rho cinasa tales como Y27632 con células humanas madre pluripotentes (por ejemplo, células hES e iPS) y células diferenciadas de las mismas, pueden aplicarse inhibidores de Rho cinasa a otros tipos de células, por ejemplo, en general, células epiteliales incluyendo, pero sin limitarse a, tipos de células de intestino, pulmón, timo, riñón así como neuronales tales como epitelio retiniano pigmentado.

La concentración del inhibidor de ROCK en el medio de cultivo celular no se limita a la descrita en los ejemplos a continuación siempre que la concentración pueda lograr los efectos deseados tales como que se logre potenciar, aumentar y/o fomentar el crecimiento, supervivencia, proliferación y adhesión célula-célula de células. Un experto en la técnica reconocerá que puede ser necesaria la optimización de diversos inhibidores de ROCK en diversas condiciones. Por ejemplo, cuando se emplea Y-27632, una concentración preferible puede oscilar entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1000 μ M, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 μ M, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 50 μ M, y lo más preferiblemente de aproximadamente 5 a 20 μ M. Cuando se usa fasudil/HA1077, puede usarse a aproximadamente dos o tres veces la concentración de Y-27632 anteriormente mencionada. Cuando se usa H-1152, puede usarse a aproximadamente una fracción, por ejemplo, aproximadamente 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50 ó 1/60 de

la cantidad de la concentración de Y-27632 anteriormente mencionada. La concentración de inhibidor de ROCK usado dependerá, en parte, de la bioactividad y potencia del inhibidor y de las condiciones en las que se usa.

El tiempo para tratar con el inhibidor de ROCK no está particularmente limitado siempre que se logren los efectos deseados tales como potenciar, aumentar y/o fomentar el crecimiento, supervivencia, proliferación y adhesión célula-célula de células. Los ejemplos a continuación describen cultivos de células humanas madre pluripotentes y/o cultivos celulares diferenciados tratados durante aproximadamente 12 horas, 24 horas, 48 horas o más.

La densidad de los cultivos de células humanas madre pluripotentes tratados con el inhibidor de ROCK tampoco está limitada siempre que sea una densidad a la que se logran los efectos deseados tales como potenciar, aumentar y/o fomentar el crecimiento, supervivencia, proliferación y adhesión célula-célula de células. La densidad celular de las células sembradas puede ajustarse dependiendo de una variedad de factores, incluyendo, pero sin limitarse al uso de cultivos adherentes o en suspensión, la formulación específica de los medios de cultivo celular usados, las condiciones de crecimiento y el uso contemplado de las células cultivadas. Los ejemplos de densidades de cultivo celular incluyen, pero no se limitan a, $0,01 \times 10^5$ células/ml, $0,05 \times 10^5$ células/ml, $0,1 \times 10^5$ células/ml, $0,5 \times 10^5$ células/ml, $1,0 \times 10^5$ células/ml, $1,2 \times 10^5$ células/ml, $1,4 \times 10^5$ células/ml, $1,6 \times 10^5$ células/ml, $1,8 \times 10^5$ células/ml, $2,0 \times 10^5$ células/ml, $3,0 \times 10^5$ células/ml, $4,0 \times 10^5$ células/ml, $5,0 \times 10^5$ células/ml, $6,0 \times 10^5$ células/ml, $7,0 \times 10^5$ células/ml, $8,0 \times 10^5$ células/ml, $9,0 \times 10^5$ células/ml o $10,0 \times 10^5$ células/ml o más, por ejemplo, hasta 5×10^7 células/ml o más, o cualquier valor entre medias, se han cultivado con buen crecimiento, supervivencia, proliferación y adhesión célula-célula celulares.

Uso de agentes que activan a miembros de la familia de receptores de TGF β

En todavía otro aspecto, los agentes que activan un miembro de la familia de receptores de TGF β incluyen miembros de la superfamilia de TGF β de factores de crecimiento, que se describen en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, "miembro de la superfamilia de TGF β " o equivalentes del mismo se refiere a más de 30 proteínas estructuralmente relacionadas incluyendo subfamilias que incluyen TGF β 1, TGF β 2, TF- β 3, GDF-15, GDF-9, BMP-15, BMP-16, BMP-3, GDF-10, BMP-9, BMP-10, GDF-6, GDF-5, GDF-7, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-2, BMP-4, GDF-3, GDF-1, GDF 11, GDF8, activinas β C, β E, β A y β B, BMP-14, GDF-14, MIS, inhibina alfa, Lefty1, Lefty2, GDNF, neurteurina, persefina y artemina. Véase Chang *et al.* (2002) *Endocrine Rev.* 23(6):787-823.

Un miembro de la familia de TGF β puede sustituirse por, o usarse junto con, un activador de la ruta de señalización de TGF β , que es un compuesto que estimula uno o más de los polipéptidos o las interacciones que participan en la transducción o realización de otro modo de cambios en las propiedades de una célula en respuesta a un miembro de la familia de TGF β . Una ruta de señalización de TGF β incluye los propios miembros de la familia de TGF β . Los miembros de la superfamilia de TGF β transmiten señales al núcleo mediante señalización a través de receptores de serina-treonina cinasa tipo II y I y efectores intracelulares conocidos como Smad. Estos receptores se dividen en dos subfamilias conocidas como receptores tipo I y tipo II que actúan de manera cooperativa para unirse a ligando y transducir señales (Attisano *et al.*, *Mol Cell Biol* 16 (3), 1066-1073 (1996)). Los ligandos se unen a receptores tipo I y II en la superficie celular, fomentando la activación del receptor tipo I mediante fosforilación. Este complejo activado activa a su vez las Smad intracelulares, que ensamblan complejos de múltiples subunidades que regulan la transcripción. Los miembros de la superfamilia de TGF β se dividen en dos subgrupos de señalización: los funcionalmente relacionados con TGF β /activina y los relacionados con la subfamilia de BMP/GDF. Se piensa que la mayoría de los ligandos de TGF β se unen en primer lugar a un receptor tipo II y después este complejo de ligando/receptor tipo II recluta o fosforila un receptor tipo I (Mathews, L S, *Endocr Rev* 15:310-325 (1994); Massague, *Nature Rev: Mol Cell Biol.* 1, 169-178 (2000)). La cinasa receptora tipo II mediante fosforilación y activación de la cinasa receptora tipo I, que después fosforila y activa las proteínas Smad. Los ligandos TGF β /activina se unen a receptores tipo II de TGF β y activina y pueden activar Smad-2 y -3. Nodal y Lefty señalizan a través de esta ruta de tipo activina. Los ligandos BMP/GDF se unen a receptores tipo II de BMP y pueden activar Smad 1, 5 y 8. Véase Derynck, R *et al.* *Cell* 95, 737-740 (1998)). Tras la estimulación de ligando, los Smad se mueven al interior del núcleo y funcionan como componentes de complejos de transcripción.

La señalización de TGF β se regula de manera positiva y negativa a través de diversos mecanismos. La regulación positiva amplifica señales hasta un nivel suficiente para la actividad biológica. Los ligandos de la superfamilia de TGF β se unen a un receptor tipo II, que recluta y fosforila un receptor tipo I. Después, el receptor tipo I fosforila SMAD reguladas por receptor (R-SMAD, por ejemplo, SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 y SMAD8) que ahora pueden unirse al mediador común Smad o co-SMAD. Los complejos de R-SMAD/coSMAD se acumulan en el núcleo en el que actúan como factores de transcripción y participan en la regulación de la expresión de genes objetivo. Por ejemplo, los factores de diferenciación de crecimiento incluyen 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 15. Y en un aspecto preferido, GDF8 y GDF11 son miembros de la familia de TGF β que también son activadores de la ruta de señalización de TGF β (regulación positiva) y actúan mediante unión a la porción de dominio de unión a ligando extracelular del receptor ActRII y después formando un complejo con ActRI, conduciendo a la inhibición del regulador negativo de Smad7 y la fosforilación del complejo de Smad2/Smad3. El complejo de Smad2/Smad3 se asocia con Smad4 para regular la expresión de determinados genes.

La regulación negativa de la señalización de TGFβ se produce a niveles extracelular, de membrana, citoplasmático y nuclear. La transducción de señales puede interrumpirse con el fin de suprimir la señalización iniciada mediante TGFβ. Esto puede lograrse mediante cualquier medio conocido en la técnica en el que la interacción entre el/los receptor(es) de TGFβ y la proteína SMAD se antagoniza o previene, incluyendo proteínas que bloquean o compiten con interacciones de receptor de TGFβ y proteína SMAD. Alternativamente, la transcripción o traducción de receptor de TGFβ o proteína SMAD puede alterarse mediante cualquier medio conocido en la técnica con el fin de prevenir la transmisión de señales a lo largo de la ruta de señalización. La regulación positiva y negativa de diversas proteínas miembros de TGFβ se muestra adicionalmente a modo de ejemplo mediante una descripción más detallada de algunos de los factores a continuación.

- 5
- 10 Tal como con el uso de cualquier agente, la concentración de cualquier miembro de la superfamilia de TGFβ en el medio de cultivo celular no está limitada a la descrita en los ejemplos a continuación siempre que la concentración pueda lograr los efectos deseados tales como activar un miembro de la familia de receptores de TGFβ, por ejemplo. Por ejemplo, cuando se emplean activinas, por ejemplo, activina A y/o B, o GDF8 y GDF-11, una concentración preferible puede oscilar entre aproximadamente 10 y aproximadamente 300 nM, más preferiblemente de
- 15 aproximadamente 50 a aproximadamente 200 nM, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 75 a aproximadamente 150 nM, y lo más preferiblemente de aproximadamente 100 a 125 nM. Un experto habitual en la técnica puede someter fácilmente a prueba cualquier concentración y, usando técnicas convencionales en la técnica, puede determinar la eficacia de tal concentración, por ejemplo, evaluando la diferenciación mediante determinación de la expresión y ausencia de expresión de un panel de marcadores genéticos para cualquier tipo de célula.
- 20 Estos y otros factores de crecimiento usados para diferenciar células humanas madre pluripotentes se describen en más detalle en la solicitud estadounidense 12/132.437, titulada GROWTH FACTORS FOR PRODUCTION OF DEFINITIVE ENDODERM, presentada el 3 de junio de 2008.

Ejemplos

EJEMPLO 1

25 DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS IPS HUMANAS EN PROGENITORES PANCREÁTICOS Y CÉLULAS ENDOCRINAS A TRAVÉS DE PRODUCTOS INTERMEDIOS DE ENDODERMO DEFINITIVO Y ENDODERMO

Se diferenciaron células humanas madre pluripotentes inducidas (iPS) en agregados en suspensión usando un procedimiento en cuatro (4) fases a lo largo del transcurso de aproximadamente 2 semanas (o 14 días) para generar una población de tipos de células pancreáticas incluyendo progenitores pancreáticos, progenitores endocrinos y

30 células endocrinas que expresan hormonas. Las líneas de células iPS humanas empleadas en el presente documento las proporcionó S. Yamanaka, Universidad de Kioto, Japón.

Las células iPS descritas en el presente documento las proporcionó Shinja Yamanaka. Se hicieron crecer células iPS no diferenciadas en fibroblastos de embrión de ratón inactivados de manera mitótica o preferiblemente libres de

35 de desactivación al 20%. Se inició la diferenciación mediante disociación de las células iPS no diferenciadas para dar células individuales usando Accutase, se tomaron muestras de células para aislamiento y análisis de ARN. Se resuspendieron las células a 1-2 millones de células por mililitro en RPMI + el 0,2% vol/vol de FBS que contenía una dilución 1:5000 de insulina-transferrina-selenio (ITS), activina A (100 ng/ml), wnt3a (50 ng/ml) e inhibidor de rho-cinasa o de ROCK, Y-27632, a 10 uM, se colocaron en una placa de 6 pocillos de ultra-baja unión, se colocaron en una plataforma rotatoria y se hicieron rotar a aproximadamente 100 rpm. Se hicieron rotar los cultivos a 100 rpm

40 durante el resto del procedimiento de diferenciación con intercambio de medios diario.

Los métodos descritos en el presente documento para producir cultivos en suspensión de agregados de células pluripotentes, por ejemplo, células hES o iPS, y células derivadas a partir de células pluripotentes, son sustancialmente tal como se describe en el documento PCT/US2007/062755, presentado el 23 de febrero de 2007, y

45 titulado Compositions and methods for culturing differential cells y el documento PCT/US2008/080516, presentado el 20 de octubre de 2008, y titulado Methods and compositions for feeder-free pluripotent stem cell media containing human serum.

Los métodos descritos en el presente documento no requirieron de ninguna manera recubrir en primer lugar los recipientes de cultivo con una matriz extracelular, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense

50 6.800.480 concedida a Bodnar *et al.* y asignada a Geron Corporation. Los métodos, como con otros métodos para cultivar otras células madre pluripotentes, por ejemplo, células hES e iPS, se cultivaron usando suero humano soluble sustancialmente tal como se describe en la solicitud estadounidense, PCT/US2008/080516, presentada el 20 de octubre de 2008, y titulada Methods and compositions for feeder-free pluripotent stem cell media containing human serum.

Los métodos descritos en el presente documento no requirieron de ninguna manera factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) añadido de manera exógena suministrado a partir de una fuente distinta de simplemente una

55 capa de alimentadores de fibroblastos tal como se describe en la patente estadounidense n.º 7.005.252 concedida a

Thomson, J. y asignada a la Wisconsin Alumni Research Foundation (WARF), que se incluye en el presente documento como referencia en su totalidad.

5 Durante aproximadamente las primeras 24 horas de rotación, las células individuales adheridas entre sí formaron agregados celulares, y se tomaron suficientes muestras de células para aislamiento y análisis de ARN. Los agregados celulares oscilaron entre aproximadamente 60 micrómetros y 120 micrómetros de diámetro. Aproximadamente 1 día (o 24 horas) después de poner las muestras de células iPS en la plataforma rotatoria, se alimentaron los cultivos con RPMI + el 0,2% vol/vol de FBS que contenía una dilución 1:5000 de ITS, activina A (100 ng/ml) durante los siguientes dos (2) días, día 2 y día 3, tomándose muestras de células diariamente para aislamiento y análisis de ARN. Después de 3 días de diferenciación, a los cultivos se les alimentó RPMI + el 0,2% de vol/vol FBS que contenía una dilución 1:1000 de ITS, KGF (o FGF7, 25 ng/ml), e inhibidor de TGFβ n.º 4 (2,5 uM) durante un día (o 24 horas). Durante los siguientes dos días (día 5 y día 6) a las suspensiones de agregados de células iPS se les alimentaron los mismos medios de cócteles de factor de crecimiento, con la excepción de que se retiró el inhibidor de TGFβ de los medios de cultivo. De nuevo, se tomaron muestras de células para aislamiento de ARN al final de esta fase (fase 2, o día 6). Para la fase 3 (día 7 y día 8), se cambiaron los medios de cultivo celular a DMEM + el 1% vol/vol de complemento B27 que contenía TTNPB [ácido 4-[E-2-(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalenil)-1-propenil]benzoico] (3 nM), KAAD-ciclopamina (0,25 uM) y nogina (50 ng/ml). De nuevo, se tomaron muestras de células para aislamiento y análisis de ARN al final de esta fase (fase 3, día 8). Para la fase 4 (días 9-14), se cambiaron los medios a DMEM + el 1% vol/vol de complemento B27 que contenía KGF (50 ng/ml) y EGF (50 ng/ml). De nuevo, se tomaron muestras de células para aislamiento y análisis de ARN al final de la fase 4 (o día 14).

Se realizó PCR en tiempo real para medir la expresión génica para diversos genes marcadores durante el transcurso de la diferenciación. En primer lugar se normalizó la expresión génica de los marcadores o genes específicos con respecto a los niveles de expresión promedio de genes de mantenimiento, expresión de ciclofilina G y proteína de unión a TATA (TBP). Después se visualizó la expresión génica relativa normalizada en los gráficos de barras con respecto al nivel de expresión en las células iPS no diferenciadas y por tanto representa la regulación por incremento en veces para los diversos marcadores de diferenciación. Para OCT4, se normalizó la expresión génica para establecer la muestra más baja en el conjunto de datos (día 14) y por tanto representa la regulación por disminución en veces durante el transcurso de la diferenciación.

Las figuras 2A-L son gráficos de barras que muestran la expresión génica relativa del gen identificado (por ejemplo, Oct4, brachyury, Cer1, GSC, FOXA2, FOXA1, HNF6, PDX1, PTF1A, NKX6.1, NGN3 e INS) con respecto al nivel de expresión del mismo gen en las células iPS no diferenciadas. Se normalizó el nivel de expresión de los genes con respecto a un conjunto de genes de mantenimiento (control) y se comparó el nivel de expresión génica en los dos puntos de tiempo diferentes indicados tanto si había regulación por incremento como por disminución para ese gen o marcador de expresión. Para OCT4 (figura 2A), se normalizó la expresión génica y se estableció la muestra de nivel expresión más bajo a 1 (día 14). Por tanto, tal como se indica por la figura 2A, los niveles de expresión relativos de OCT4 representan la regulación por disminución en veces (eje Y) durante el transcurso de la diferenciación (eje X, fase 0 a 4, o día 0 a día 14).

Tal como se muestra en la figura 2A, OCT4 (POU5F1) se expresa a altos niveles en las células iPS no diferenciadas y muestra una regulación por disminución posterior durante el transcurso de la diferenciación (día 0 a día 14). En el día 14, los niveles de expresión de OCT4 disminuyeron más de 3000 veces con respecto a los niveles de expresión observados en células no diferenciadas. En cambio, hubo una regulación por incremento transitoria de la expresión de gen de brachyury (BRACHYURY, figura 2B) durante los primeros 2 días (día 1 y día 2). La regulación por incremento transitoria de brachyury fue un resultado de la diferenciación dirigida de células pluripotentes/iPS en mesendodermo mediante la aplicación de activina A y wnt3a. Se diferenció adicionalmente el mesendodermo en endodermo definitivo durante los días 2 y 3 mediante exposición continuada a activina A que se indicó mediante la regulación por incremento de CER1, GSC y FOXA2 al final de la fase 1 en el día 3 (figuras 2C-E). Durante la fase 2, se dirigió adicionalmente el endodermo definitivo para diferenciarse en endodermo de tubo del intestino tal como se indica mediante la regulación por incremento de FOXA1, mantenimiento de la expresión de FOXA2 y regulación por disminución de CER1 y GSC en el día 6 de diferenciación (figuras 2C-F). Durante la fase 3, tras la exposición a retinoide, ciclopamina y nogina, se dirigió adicionalmente el endodermo de tubo del intestino para diferenciarse en endodermo del intestino proximal posterior/que expresa PDX1 tal como se indica mediante la regulación por incremento de HNF6 y PDX1 en el día 8 (figuras 2G-H). Durante la fase 4, tras la exposición a KGF y EGF, se dirigió adicionalmente el endodermo del intestino proximal posterior/que expresa PDX1 para diferenciarse en progenitores pancreáticos, progenitores endocrinos y células endocrinas que expresan hormonas tal como se indica mediante la regulación por incremento de PTF1A, NKX6-1, NGN3 e INS en el día 14 (figuras 2I-L).

EJEMPLO 2

LOS INHIBIDORES DE RHO-CINASA FOMENTAN EL CRECIMIENTO, SUPERVIVENCIA, PROLIFERACIÓN Y ADHESIÓN CÉLULA-CÉLULA DE CÉLULAS iPS

Los métodos para diferenciar diversas líneas de células hES e iPS son sustancialmente tal como se describe en el presente documento y en el ejemplo 1. Además de las condiciones de cultivo tal como se describe para las fases 1,

2, 3, 4 y 5, se añadió inhibidor apoptótico y/o inhibidor de rho-cinasa o de ROCK a los medios de cultivo para potenciar y fomentar crecimiento, supervivencia, proliferación y adhesión célula-célula durante la diferenciación. Normalmente se añadieron aproximadamente 10 μ M de un inhibidor de Rho-cinasa, por ejemplo, Y-27632, a los cultivos celulares en cada una de las fases. Alternativamente, se añadió un inhibidor de Rho-cinasa al menos a las fases 1 y 2 y las fases 4 y 5, o cualquier combinación de las mismas. La morfología y los perfiles de expresión de marcadores genéticos de los cultivos de células en suspensión iPS diferenciadas (agregados) son sustancialmente similares a los de cultivos celulares en suspensión derivados de células hES.

Las figuras 3 y 4 muestran la inmunocitoquímica (ICC) de cultivos de células iPS a partir de las fases 4 y 5, respectivamente. La figura 3 muestra un agregado celular a partir de la fase 4 que expresa marcadores genéticos típicos característicos de endodermo pancreático positivo para PDX1 (también denominado epitelio pancreático o progenitores pancreáticos) incluyendo células positivas conjuntamente para PDX1 / NKX6.1. Aunque no se muestra en la figura 3, las células en fase 4 no expresan proteínas que secretan hormonas o marcadores genéticos más típicos de células en fase 5 tales como insulina (INS), glucagón (GCG), somatostatina (SST) y polipéptido pancreático (PP). La figura 4 muestra agregados celulares de células que expresan hormonas a partir de la fase 5. Estos resultados de ICC se confirmaron adicionalmente usando QPCR. Sin embargo, dado que QPCR es un estudio de población total del nivel total de ARN expresado en la muestra o el cultivo celular, no puede mostrar definitivamente que ninguna célula individual exprese múltiples marcadores.

EJEMPLO 3

ENCAPSULACIÓN DE PROGENITORES PANCREÁTICOS DERIVADOS DE iPS

Hasta ahora, se han notificado métodos para la producción de células iPS y fuentes para la producción de células iPS. Sin embargo, no hay ninguna descripción suficiente de diferenciación de ninguna célula iPS para dar ninguna célula diferenciada funcional para su posible uso en una terapia celular para tratar una enfermedad particular, por ejemplo, diabetes.

Para determinar si los cultivos de células progenitoras pancreáticas o de endodermo pancreático positivas para PDX1 en fase 4 derivados de células humanas iPS podían totalmente desarrollarse y madurar *in vivo* para dar células que secretaban insulina sensibles a glucosa, se cargaron las poblaciones progenitoras pancreáticas sustancialmente tal como se describe en los ejemplos 1 y 2 en dispositivos de macroencapsulación sustancialmente similares a los descritos en la solicitud estadounidense 12/618.659, titulada ENCAPSULATION OF PANCREATIC LINEAGE CELLS DERIVED FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS, presentada el 13 de noviembre de 2009; y las patentes estadounidenses n.ºs 7.534.608 y 7.695.965 tituladas METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES. En resumen, se cargaron aproximadamente 5-10 μ l de agregados en suspensión celular sedimentados por gravedad en cada dispositivo, que tenían de manera sustancial aproximadamente de 1,5 a 3 x 10⁶ células.

Después se prepararon las células encapsuladas en el dispositivo para su implantación en un mamífero, por ejemplo en ratones SCID/Bg inmunodeprimidos, pero pueden implantarse en animales más grandes incluyendo ratas, cerdos, monos o paciente humano. Los métodos de implantación de las células encapsuladas y dispositivo son sustancialmente como el descrito en la solicitud estadounidense 12/618.659, las patentes estadounidenses n.ºs 7.534.608 y 7.695.965, incluyendo células progenitoras pancreáticas implantadas en una matriz de GELFOAM e implantadas bajo la almohadilla de grasa epididimal (EFP).

No se necesitó ninguna inmunosupresión en estos estudios, sin embargo, puede requerirse inmunosupresión para determinados mamíferos durante un periodo intermedio inicial hasta que los progenitores dentro del dispositivo maduren completamente y sean sensibles a la glucosa. En algunos mamíferos, los regímenes de inmunosupresión pueden ser durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más semanas y dependerán del mamífero.

Se dejó que las células trasplantadas se diferenciaron y maduraran adicionalmente *in vivo*. Para determinar si las células trasplantadas tenían una función fisiológica normal como una célula beta que se produce de manera natural, por ejemplo, se determinarán los niveles de insulina humana sometiendo a prueba los niveles de péptido C humano. El péptido C humano se escinde o se procesa a partir de pro-insulina humana, por tanto, la detección de péptido C humano específicamente, y péptido C de ratón no endógeno, indica que la secreción de insulina se deriva a partir de las células injertadas (exógenas). Los animales con implantes se someterán a prueba para detectar los niveles de péptido C humano aproximadamente cada dos, tres o cuatro semanas inyectándoles un bolo de arginina o glucosa, preferiblemente glucosa. Las células beta entonces maduras (derivadas a partir de células iPS pluripotentes) deben ser fisiológicamente funcionales y sensibles a glucosa, no a diferencia de las células beta endógenas o que se producen de manera natural. Normalmente cantidades de péptido C humano por encima de 50 pM o el nivel basal promedio (umbral), son un indicador de la función de las células ahora beta a partir de los progenitores trasplantados.

De manera similar a lo descrito en Kroon *et al.* 2008, la solicitud estadounidense 12/618.659, las patentes estadounidenses n.ºs 7.534.608 y 7.695.965, se espera que los progenitores pancreáticos encapsulados derivados a partir de células iPS maduren para dar agrupaciones de islotes pancreáticos funcionales que tienen células

endocrinas, acinares y ductales, no a diferencia de las de islotes que se producen de manera natural. También se prevé que progenitores pancreáticos purificados o enriquecidos derivados a partir de células hIPS antes del trasplante también madurarán y se desarrollarán para dar islotes pancreáticos funcionales y producirán insulina *in vivo*. Determinados aspectos para purificar y enriquecer diversas poblaciones celulares diferenciadas se describen en más detalle en la solicitud estadounidense 12/107.020, titulada METHODS FOR PURIFYING ENDODERM AND PANCREATIC ENDODERM CELLS DERIVED FROM HES CELLS, presentadas el 8 de abril de 2008. Se prevé además que progenitores pancreáticos derivados de células hIPS que se han criopreservado pueden descongelarse y adaptarse en cultivo antes del trasplante y madurar y producir insulina *in vivo* en consecuencia. Y esa hipoglucemia puede mejorarse en animales diabéticos inducidos que tienen los progenitores pancreáticos trasplantados derivados a partir de células hIPS.

En resumen, células progenitoras pancreáticas completamente encapsuladas derivadas a partir de células hIPS en un dispositivo de macroencapsulación maduran para dar islotes pancreáticos fisiológicamente funcionales y se espera que produzcan insulina en respuesta a glucosa *in vivo*.

EJEMPLO 4

15 COMPOSICIONES DE CÉLULAS PROGENITORAS PANCREÁTICAS Y QUE SECRETAN HORMONAS

Se analizaron poblaciones de células hIPS diferenciadas usando citometría de flujo para determinar su contenido de células progenitoras pancreáticas o de endodermo pancreático positivas para PDX1 (en la fase 4); y células endocrinas o precursoras endocrinas (en la fase 5) tal como se muestra en las tablas 4 y 5, respectivamente. Los valores mostrados son el porcentaje de células totales que pertenecen a una población dada. Los números de los progenitores pancreáticos (NKX6.1(+) / PDX1(+)) / cromogranina A(-)) en los agregados celulares en suspensión fueron compatibles con los observados en agregados en suspensión de células progenitoras pancreáticas derivados de células hES y agregados en la fase ESC tal como se describe en la solicitud estadounidense 12/264.760, titulada STEM CELL AGGREGATE SUSPENSION COMPOSITIONS AND METHODS OF DIFFERENTIATION THEREOF, presentada el 4 de noviembre de 2008. Los niveles de células endocrinas y/o precursoras endocrinas también fueron sustancialmente compatibles con los obtenidos en cultivos celulares derivados de hES en la solicitud estadounidense 12/107.020, titulada METHODS FOR PURIFYING ENDODERM AND PANCREATIC ENDODERM CELLS DERIVED FROM HES CELLS, presentada el 8 de abril de 2008. De manera similar a los agregados en suspensión de células derivadas de hES, variar las concentraciones de diferentes factores de crecimiento en el medio de cultivo en determinadas fases de diferenciación (por ejemplo, fase 4) debe aumentar y/o reducir determinadas poblaciones de tipos de células de endodermo pancreático, endocrinas, endodermo positivas para PDX1 o no pancreáticas.

Tabla 4: composiciones de células progenitoras pancreáticas (porcentaje de células totales)

Experimento	Línea de células iPS	PDX1+	NKX6.1+	Endodermo pancreático (NKX6.1(+) / PDX1(+)) / cromogranina A(-))	Endocrinas (cromogranina A+)
1	G4	56,4	39,2	33,3	12,7
1	B7	88,3	40,9	30,4	42,3
2	B7	84,1	53,1	38,8	51,8
3	B7	94,0	43,7	32,7	49,5

Tabla 5: composiciones de células endocrinas (porcentaje de células totales)

Experimento	Línea de células iPS	Insulina +	Glucagón +	Somatostatina +
4	B7	15,9	15,0	12,1
5	B7	17,4	15,9	10,5

Se apreciará que los resultados de Q-PCR descritos en el presente documento pueden confirmarse adicionalmente mediante inmunocitoquímica (ICC) y realizarse fácilmente por los expertos habituales en la técnica.

35 aspecto. Tal como se usa en las reivindicaciones a continuación y a lo largo de toda esta divulgación, por la expresión “que consiste esencialmente en” quiere decirse que incluye cualquier elemento indicado después de la expresión, y limitado a otros elementos que no interfieren con o contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos indicados. Por tanto, la expresión “que consiste esencialmente en” indica que los elementos indicados se requieren o son obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no dependiendo de si afectan o no a la actividad o acción de los elementos indicados. Además, se apreciará que, en aspectos en los que se mencionan valores numéricos, tales como cantidades, concentraciones, porcentajes, proporciones o intervalos, el valor al que se hace referencia puede ser “al menos aproximadamente” el valor numérico, “aproximadamente” el valor numérico o “al menos” el valor numérico.

Lista de secuencias

<110> Agulnick, Alan

D'Amour, Kevin Allen

<120> COMPOSICIONES CELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS REPROGRAMADAS DESDIFERENCIADAS

<130> CYTHERA.068A

<150> 61/171759

<151> 22-04-2009

<160> 46

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebadores de oligonucleótidos

<400> 1

aagaggccat caagcagatc a

21

<210> 2

<211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebadores de oligonucleótidos
 <400> 2
 caggaggcgc atccaca 17
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebadores de oligonucleótidos
 <400> 3
 ctggcctgta cccctcatca 20
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebadores de oligonucleótidos
 <400> 4
 cttcccgctct ttgtccaaca a 21
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebadores de oligonucleótidos
 <400> 5
 aagtctacca aagctcacgc g 21
 <210> 6
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebadores de oligonucleótidos

<400> 6	
gtaggcgccg cctgc	15
<210> 7	
<211> 24	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 7	
gctcatcgct ctctattctt ttgc	24
<210> 8	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 8	
ggttgaggcg tcatccttc t	21
<210> 9	
<211> 18	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 9	
gggagcggtg aagatgga	18
<210> 10	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 10	
tcatgttgct cacggaggag ta	22
<210> 11	
<211> 24	
<212> ADN	

<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 11	
aagcatttac tttgtggctg gatt	24
<210> 12	
<211> 25	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 12	
tgatctggat ttctcctctg tgtct	25
<210> 13	
<211> 18	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 13	
cgctccgctt agcagcat	18
<210> 14	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 14	
gtgttgctc ttccttccc at	22
<210> 15	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 15	
gaagaaggaa gccgtccaga	20

<210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebadores de oligonucleótidos
 <400> 16
 gaccttcgag tgctgatccg 20
 <210> 17
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebadores de oligonucleótidos
 <400> 17
 ggcgagcag aatccaga 18
 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebadores de oligonucleótidos
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(20)
 <223> n = a, c, t o g
 <400> 18
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 20
 <210> 19
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebadores de oligonucleótidos
 <400> 19
 caccgcgggc atgatc 16
 <210> 20

<211> 19	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 20	
acttcccag gaggtcga	19
<210> 21	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 21	
ggccttcagt actccctgca	20
<210> 22	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 22	
gggacttga gcttgagtcc t	21
<210> 23	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 23	
gaaggatc atctgcatc g	21
<210> 24	
<211> 19	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	

<400> 24	
ggccataatc aggtcgct	19
<210> 25	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 25	
cccagactc cgtcagttc	20
<210> 26	
<211> 19	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 26	
tccgtctggt tgggtcag	19
<210> 27	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 27	
ccagaaagga tgccataa agg	23
<210> 28	
<211> 18	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 28	
tctgcgcgcc cctagta	18
<210> 29	
<211> 19	
<212> ADN	

<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 29	
tgggctcgag aaggatgtg	19
<210> 30	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 30	
gcatagtcgc tgctgatcg	20
<210> 31	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 31	
ccgagtccag gatccagta	20
<210> 32	
<211> 19	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 32	
ctctgacgcc gagacttg	19
<210> 33	
<211> 19	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 33	
cctcttcaa tgcgaaag	19

<210> 34	
<211> 19	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 34	
cgggaggaag gctctcact	19
<210> 35	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 35	
gaggagaaag tggaggtctg gtt	23
<210> 36	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 36	
ctctgatgag gaccgcttct g	21
<210> 37	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 37	
acagtgcctt tcagccagac t	21
<210> 38	
<211> 25	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	

<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 38	
acaactactt ttcacagcc ttcgt	25
<210> 39	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 39	
gagaaacca ctggagatga aca	23
<210> 40	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 40	
ctcatggcaa agttctcca gaa	23
<210> 41	
<211> 19	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 41	
atgcaccgct acgacatgg	19
<210> 42	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 42	
ctcatgtagc cctgcgagtt g	21
<210> 43	
<211> 20	

<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 43	
ctggctgtgg caaggtcttc	20
<210> 44	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 44	
cagccctcaa actcgcaact	20
<210> 45	
<211> 18	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 45	
atcgaggagc gccacaac	18
<210> 46	
<211> 19	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebadores de oligonucleótidos	
<400> 46	
tgctggatgg tgcctggt	19

REIVINDICACIONES

1. Cultivo celular *in vitro* que comprende células del endodermo definitivo derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas e Y-27632 y el cultivo celular comprenden al menos el 15% de células del endodermo definitivo humanas.
- 5 2. Cultivo celular según la reivindicación 1, en el que las células del endodermo definitivo son para su uso en el tratamiento de diabetes.
3. Cultivo celular según la reivindicación 1, en el que las células del endodermo definitivo son competentes para diferenciarse en células que expresan hormonas del islote pancreático humanas.
- 10 4. Cultivo celular según la reivindicación 1, en el que las células del endodermo definitivo son competentes para diferenciarse en células del endodermo del intestino proximal humanas.
5. Cultivo celular según la reivindicación 4, en el que las células del endodermo definitivo son competentes para diferenciarse en células del endodermo pancreático positivas para PDX1 humanas.
6. Cultivo celular según la reivindicación 1, que comprende además un factor de crecimiento del subgrupo de Nodal/activina de la superfamilia de TGF β .
- 15 7. Cultivo celular según la reivindicación 6, en el que el factor de crecimiento del subgrupo de Nodal/activina de la superfamilia de TGF β se selecciona del grupo que consiste en Nodal, activina A, activina B y combinaciones de los mismos.

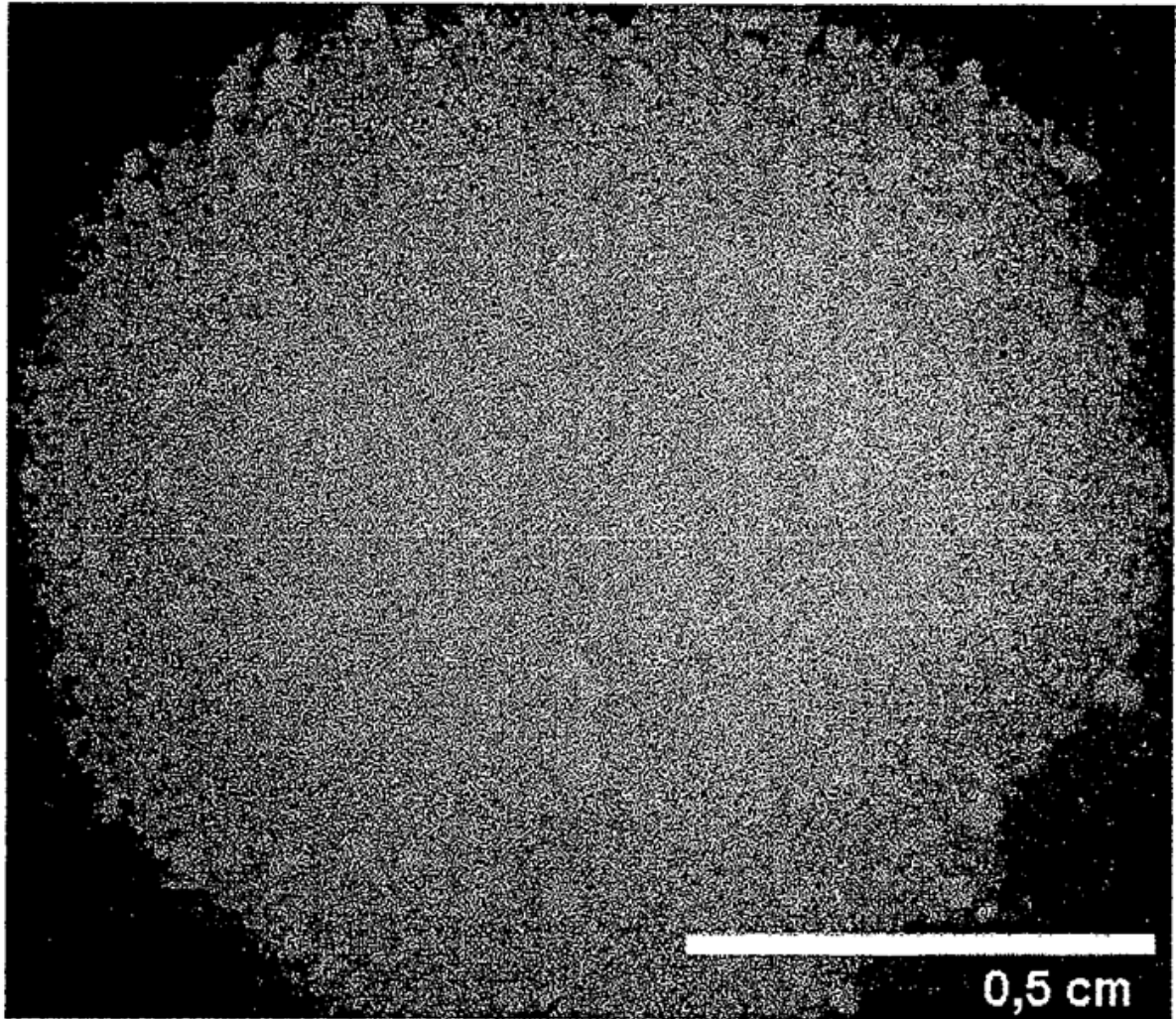
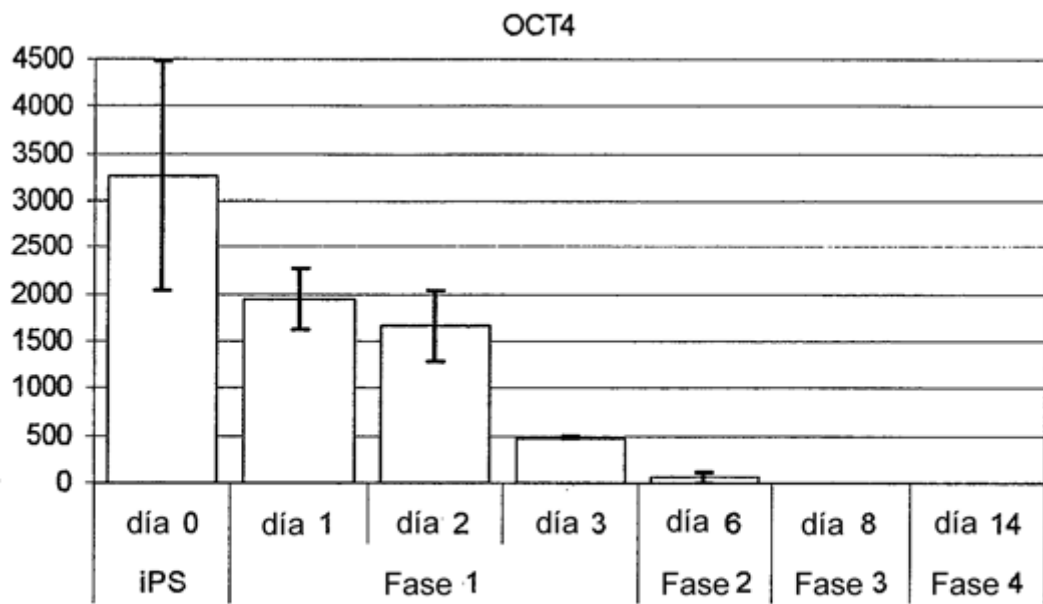


Figura 1

A



B

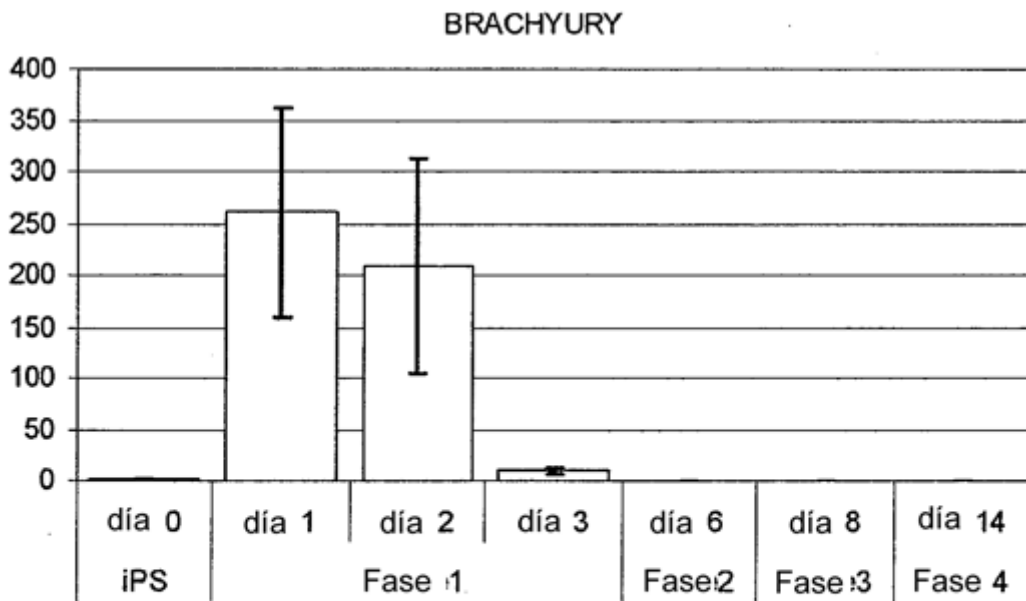
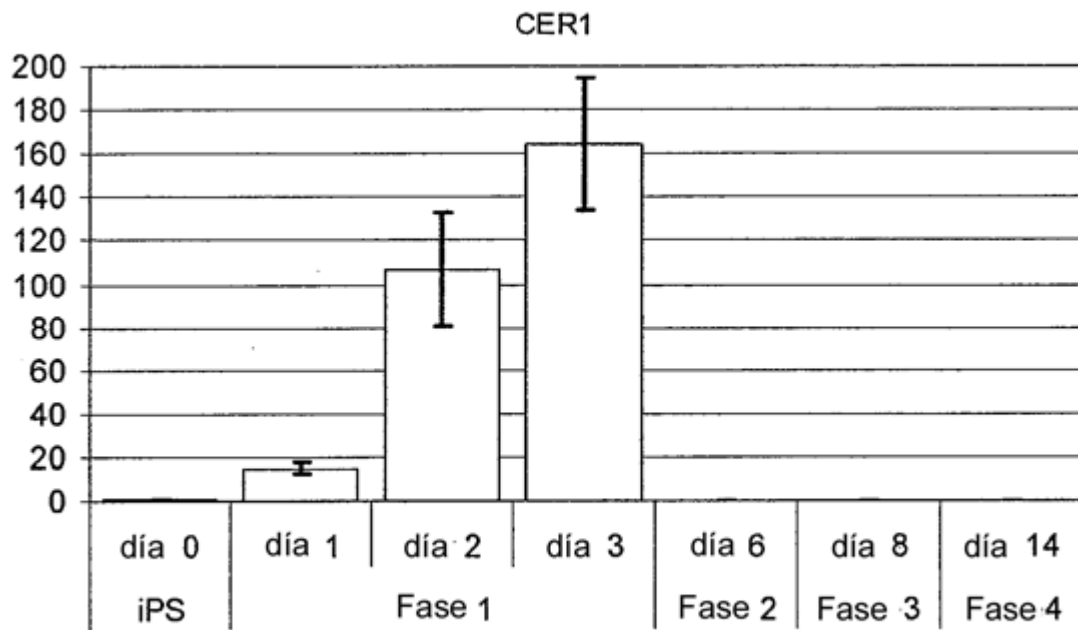


Figura 2A-B

C



D

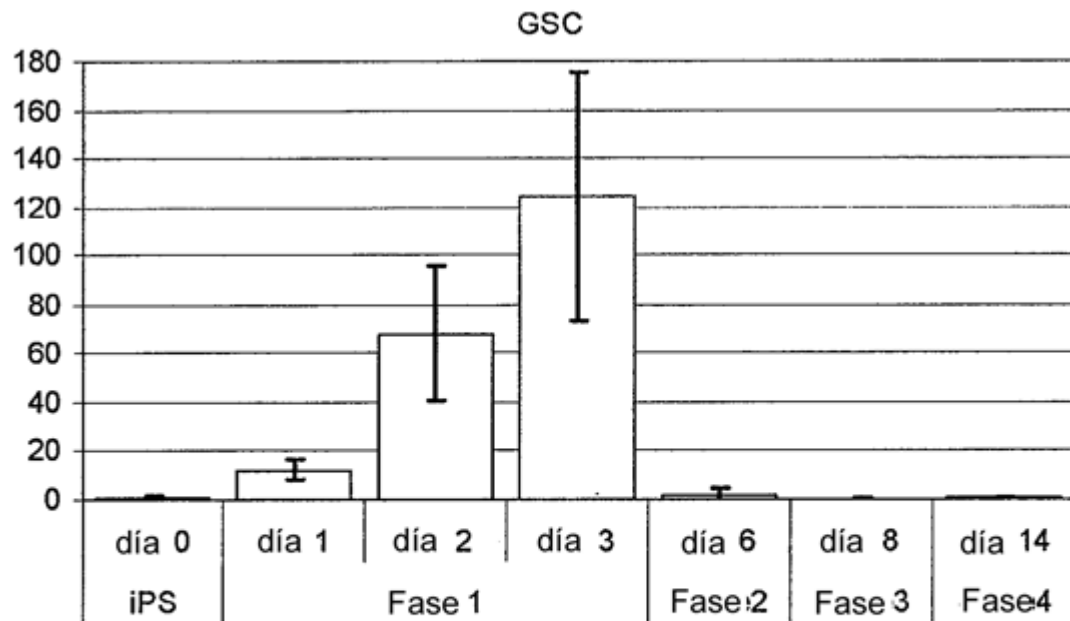
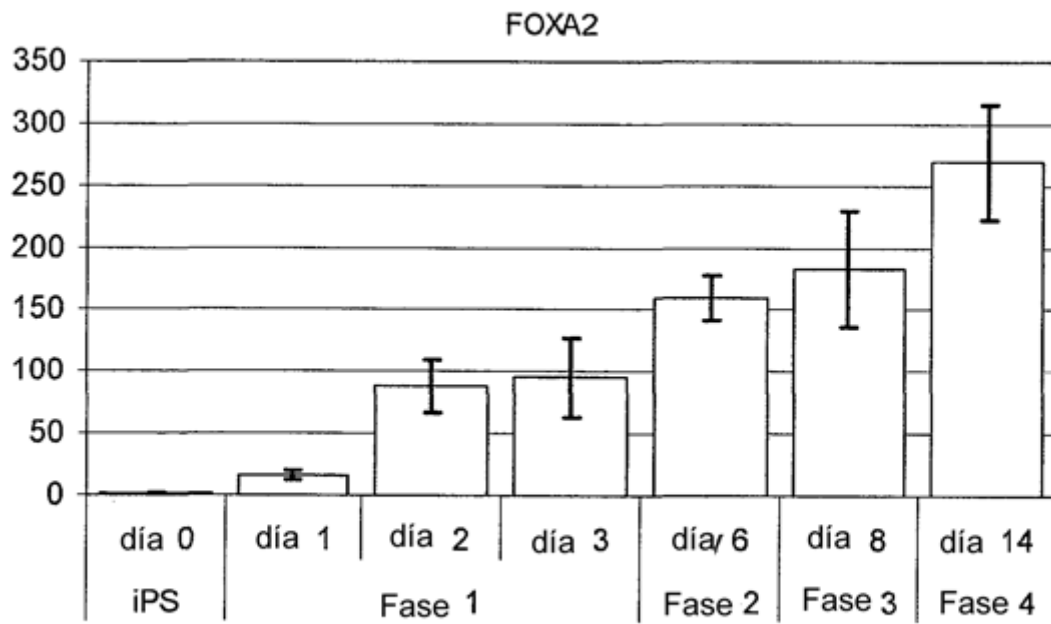


Figura 2C-D

E



F

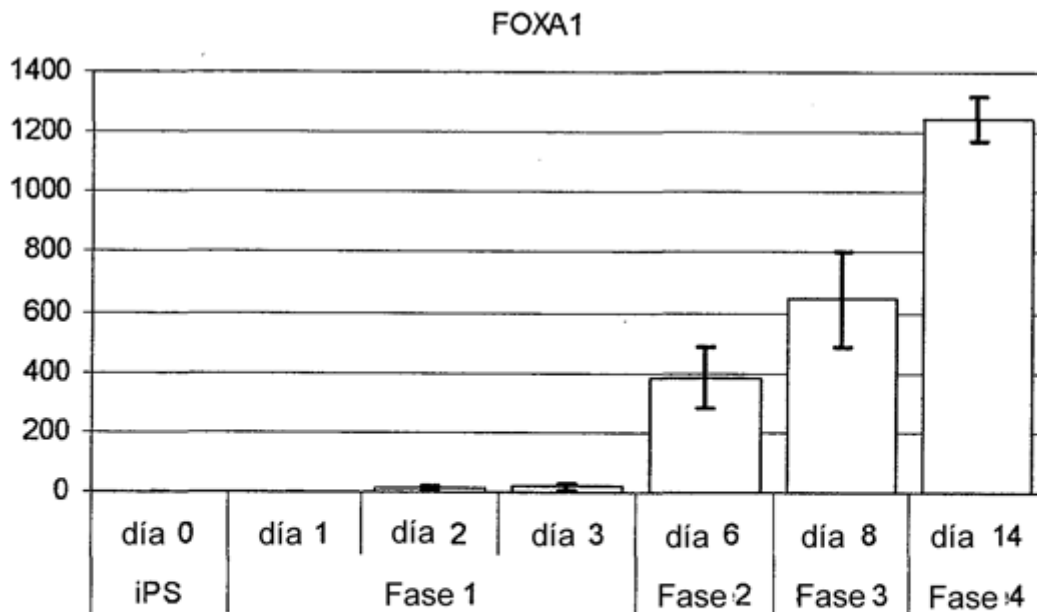
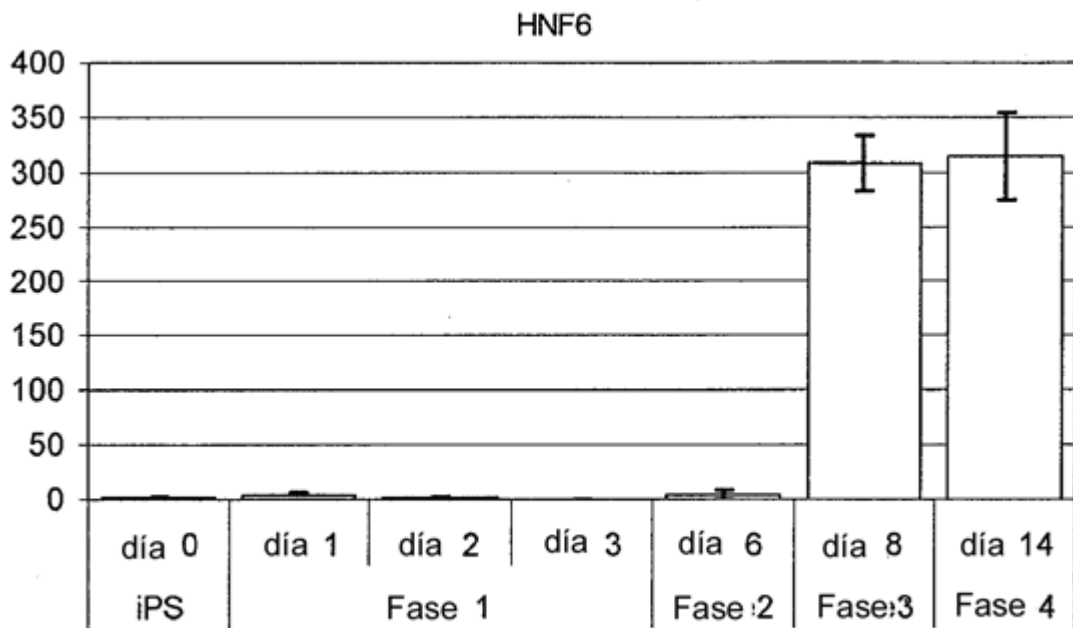


Figura 2E-F

G



H

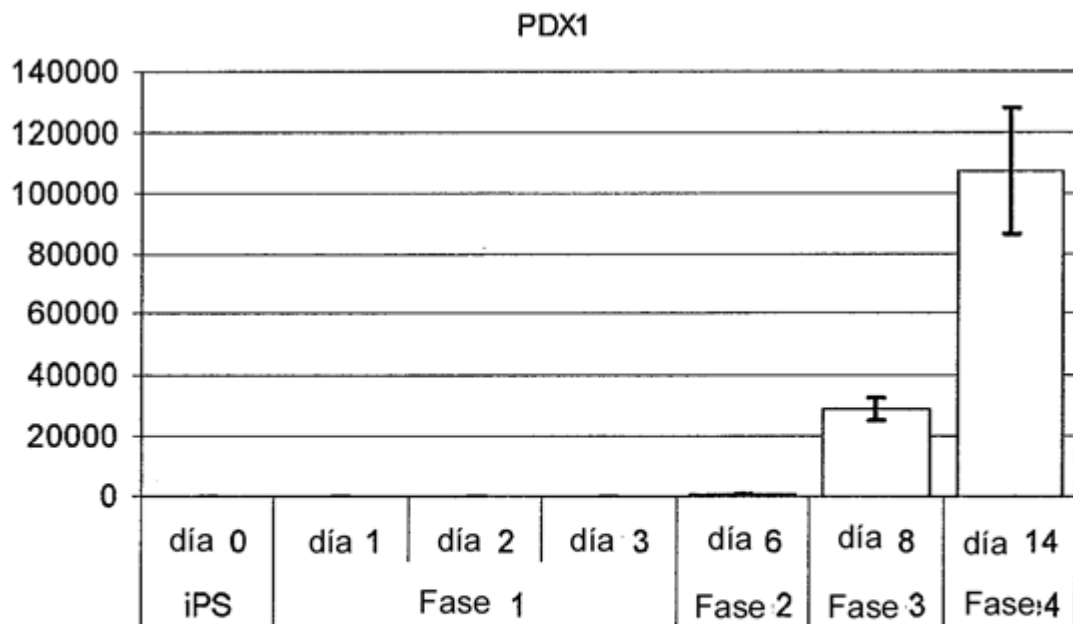
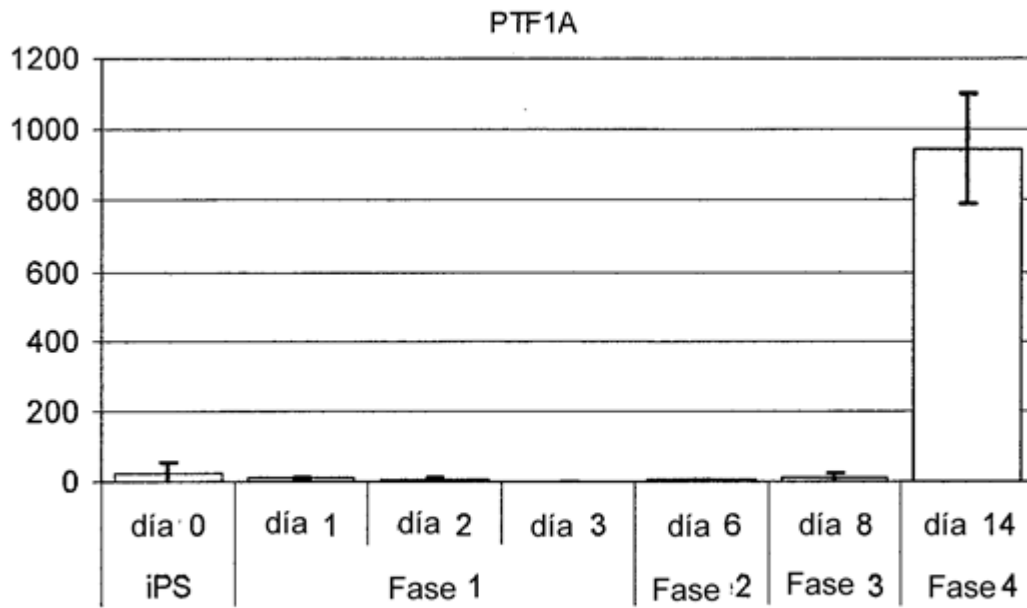


Figura 2G-H

I



J

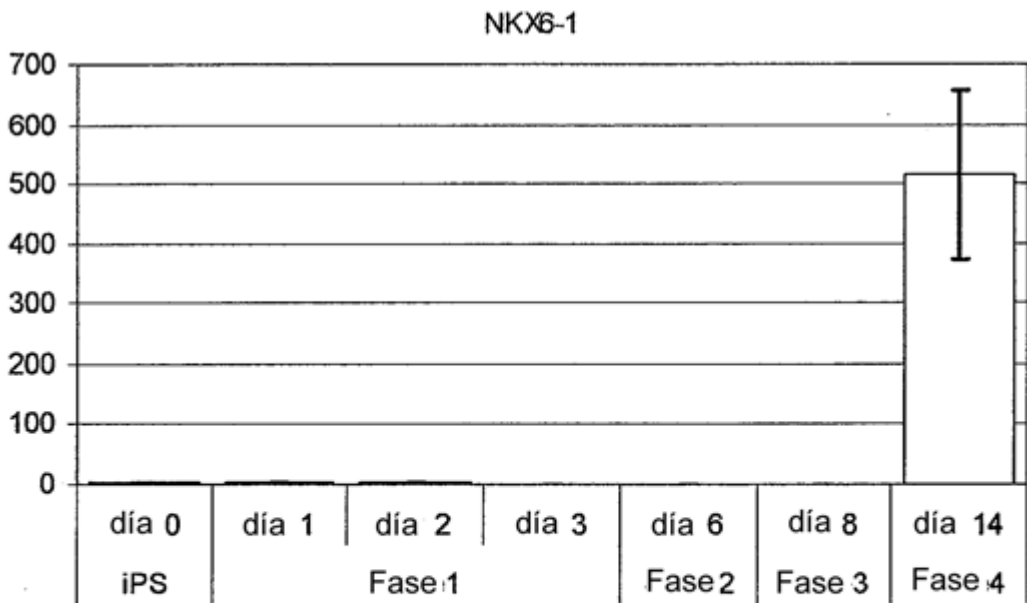
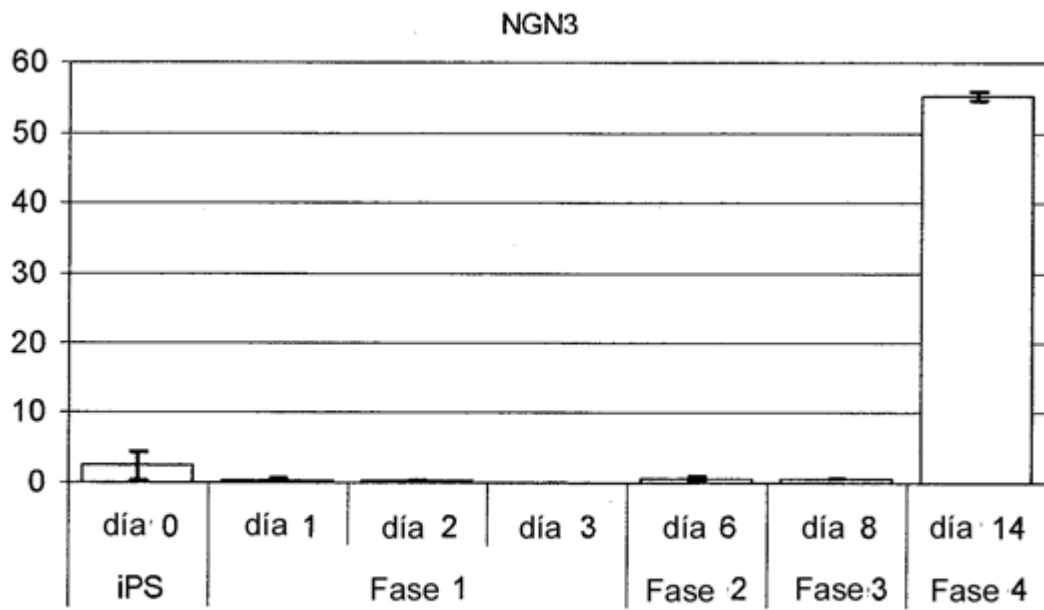


Figura 2I-J

K



L

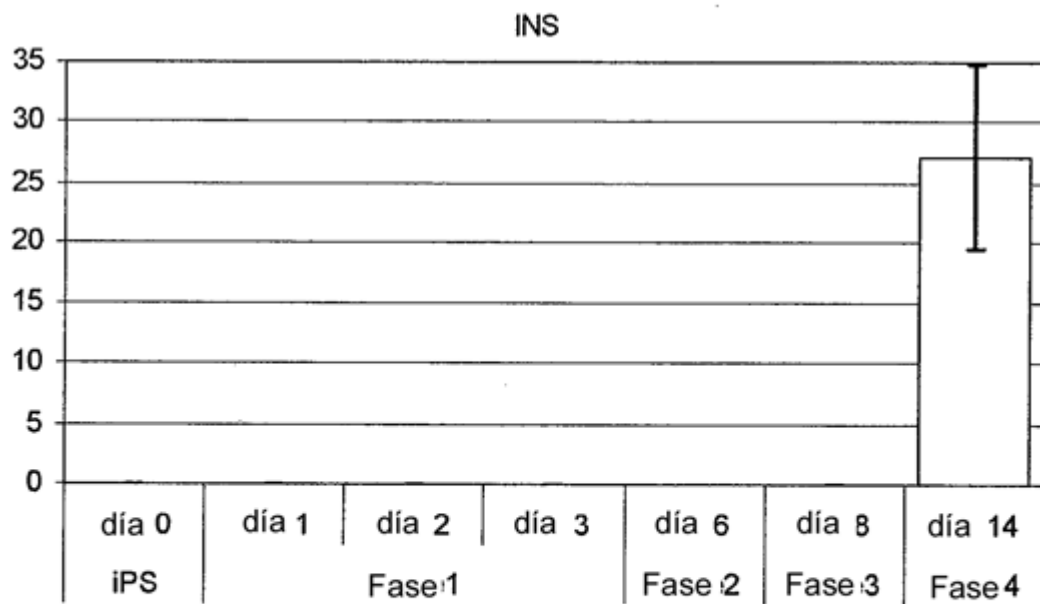
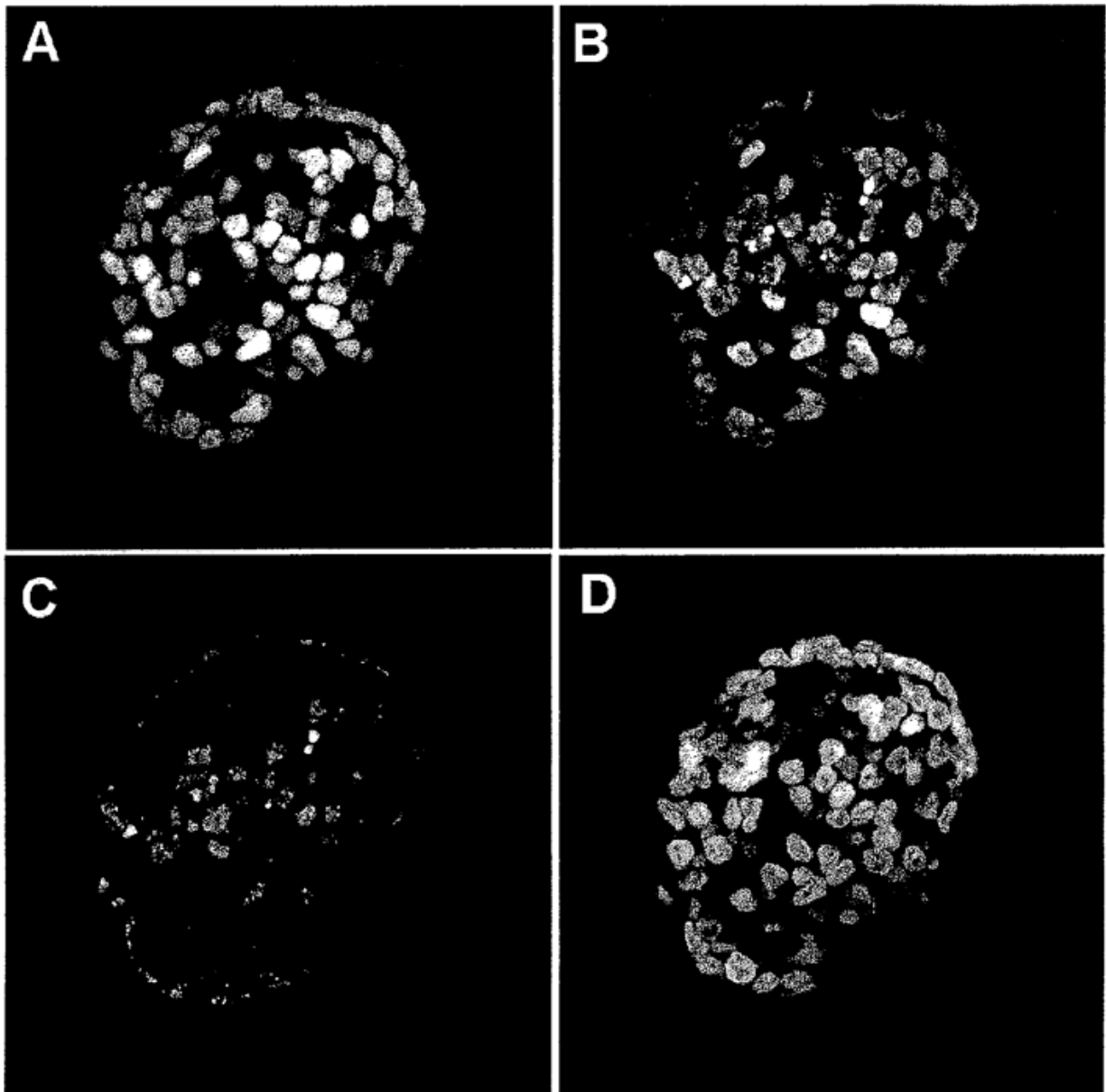


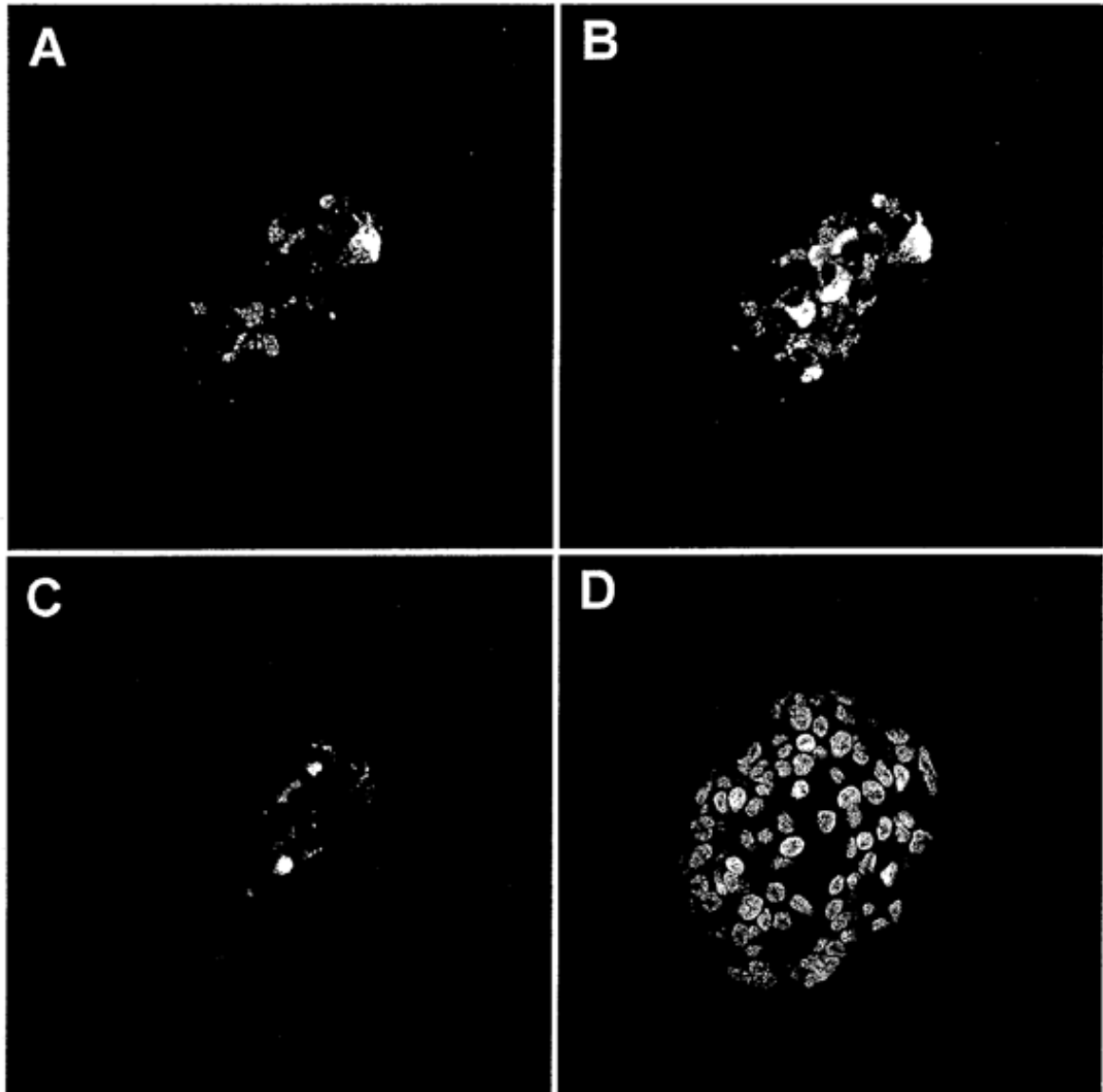
Figura 2 K-L



E2021 usando una línea celular G4 hIPS en la diferenciación de fase 4 (células del endodermo pancreático positivas para PDX1)

- A) Pdx1***
- B) Nkx6.1***
- C) Ptf1a***
- D) Dapi***

Figura 3



E2021 línea celular G4 hIPS en la fase 5

A) Glucagón

B) Insulina

C) Somatostatina

D) Dapi

Figura 4