



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 183 665**

⑫ Número de solicitud: 009902251

⑬ Int. Cl.⁷: **C12N 15/12**

C12N 5/08

C12Q 1/68

⑫

PATENTE DE INVENCIÓN

B1

⑭ Fecha de presentación: **14.10.1999**

⑮ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2003**

Fecha de la concesión: **17.05.2004**

⑯ Fecha de anuncio de la concesión: **01.08.2004**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.08.2004

⑲ Titular/es: **Universidad Miguel Hernández de Elche
Paseo Melchor Botella, s/n
03206 Elche, Alicante, ES**

⑳ Inventor/es: **Valera Abril, Alfonso y
Mayol Belda, Josefa María**

㉑ Agente: **Fernández Prieto, Ángel**

㉒ Título: **Segmentos de ADN útiles para seleccionar tipos celulares diferenciados y sus aplicaciones.**

㉓ Resumen:

Segmentos de ADN útiles para seleccionar tipos celulares diferenciados y sus aplicaciones.

El segmento de ADN comprende (i) las regiones que contribuyen a formar y estabilizar el complejo de factores de transcripción de un gen específico de un tipo celular que es expresado específicamente en un tipo celular diferenciado, y (ii) un gen de selección funcionalmente conectado, de manera que se exprese cuando el segmento de ADN sea reconocido y transcrita por el complejo de factores de transcripción del gen específico. El segmento de ADN puede utilizarse en la obtención y selección *in vitro* de tipos celulares diferenciados a partir de unas células precursoras. Con los tipos celulares obtenidos se pueden generar bancos celulares y tisulares con fines terapéuticos o de investigación.

ES 2 183 665 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Segmentos de ADN útiles para seleccionar tipos celulares diferenciados y sus aplicaciones.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere, en general, a la obtención de un tipo celular diferenciado a partir de unas células precursoras, y, en particular, a unos segmentos de ADN útiles para la selección de tipos celulares diferenciados y a sus aplicaciones, entre las que se encuentran, la obtención y selección *in vitro* de tipos celulares diferenciados a partir de unas células precursoras. Con las células así obtenidas se pueden generar bancos celulares y tisulares con fines biomédicos, biotecnológicos o de investigación.

10 **Antecedentes de la invención**

15 La diabetes mellitus es una grave enfermedad metabólica con un enorme impacto socioeconómico, que afecta entre 10 y 20 millones de personas en la Unión Europea (alrededor de un 5% de la población) [Hauner et al., 1992; de Leiva et al., 1996 (véase el apartado relativo a la Bibliografía)] y con una incidencia mundial estimada alrededor de un 6% [Taylor et al., (1988); McGarry, (1992)]. Todas las formas de diabetes se caracterizan por hiperglucemia derivada de la deficiencia parcial o total de insulina, con la aparición a largo plazo de alteraciones de la zona glomerulosa del riñón y complicaciones neurológicas [Williamson et al., (1993); Ruderman et al., (1992); Diabetes Control and Complications Trial Research Group, (1993)]. La diabetes mellitus también causa el desarrollo de patología microvascular en la retina, siendo actualmente la primera causa de pérdida de visión y ceguera en adultos. La diabetes mellitus insulinodependiente (IDDM, también conocida como de aparición juvenil, o tipo 1) representa aproximadamente el 15% de todas las diabetes humanas. A diferencia de lo que ocurre con la diabetes mellitus tipo 2, o no dependiente de insulina (NIDDM), la de tipo 1 implica la destrucción de las células beta productoras de insulina de los islotes de Langerhans en el páncreas. La destrucción de las células beta en la diabetes tipo 1 se considera el resultado de un ataque autoinmune, en el que el propio sistema inmunitario del paciente reconoce y destruye sus células beta, aunque no el resto de tipos celulares que completan el islete [Eisenbarth, (1986)]. A pesar de las modalidades actuales de tratamiento, los pacientes tipo 1 sufren episodios de niveles de glucosa en sangre anormalmente altos (hiperglicemia) [Nathan, (1992)]. Esos episodios descontrolados y recurrentes de hiperglicemia se consideran la causa del desarrollo de las complicaciones secundarias que conducen al fallo renal, ceguera, neuropatía o a enfermedades cardiovasculares [Nathan, (1992)]. El mantenimiento de la glucosa en sangre bajo un riguroso control es ampliamente reconocido como crucial en el tratamiento de todas las formas de diabetes para retrasar la aparición y reducir la gravedad de las complicaciones microvasculares y algunas complicaciones macrovasculares [Diabetes Control and Complications Trial. Research Group, (1991); Rechert et al., (1991); Nathan, (1993); Diabetes Control and Complications Trial Research Group, (1993)]. La mayor limitación de la terapia convencional de sustitución con insulina, tanto si se administra por inyección o por aparatos mecánicos, es su incapacidad para alcanzar un control fisiológico de suministro de insulina en respuesta a cambios en la glucemia. Para intentar aproximarse a este control, muchos pacientes son tratados con un régimen intensivo de administración de insulina. Sin embargo, esta terapia intensiva de insulina sólo pueda llevarse cabo en un subgrupo de pacientes especialmente motivados. Incluso esta forma intensificada de tratamiento con insulina solo consigue retrasar la aparición de las graves complicaciones secundarias de la diabetes. No existe actualmente forma alguna de terapia substitutoria con insulina que impida el desarrollo de las complicaciones diabéticas.

50 Bajo esas mismas circunstancias, el suministro de células beta pancreáticas puede recuperar la homeostasis de la glucosa. Una alternativa atractiva es el trasplante del tejido que produce insulina, lo que ofrece una aproximación mucho más fisiológica para la recuperación precisa de la homeostasis de la glucosa, y por tanto impedir las graves complicaciones de la diabetes. Sin embargo, si el trasplante de islotes se convierte en un tratamiento extendido para la diabetes, el suministro de páncreas humano de donantes de órganos tenderá a ser el factor limitante [Korbutt et al., (1997)]. En los trasplantes realizados actualmente se requieren uno o dos páncreas donados completos por individuo transplantado. Desgraciadamente, el número de páncreas donados es muy inferior a los requeridos para tratar los pacientes diabéticos tipo 1. Por lo tanto, de los millones de individuos diabéticos que podrían beneficiarse de tales trasplantes, sólo un número muy pequeño de ellos podrá ser tratado de esta manera. En un intento por superar este problema de suministro, se han sugerido dos aproximaciones: i) trasplante de islotes de animales (xenotrasplante) entre especies filogenéticamente más o menos próximas [Lacy, (1993); Pipeleers et al., (1994)], o ii) ingeniería celular de tejido productor de insulina [Kawakami et al., (1992); Ferber et al., (1994); Balley and Docherty, (1994)], tanto mediante modificación de líneas de células beta [Efrat, (1998)], como por producción ectópica de insulina [Valera et al., 1994)].

Se están llevando a cabo ensayos clínicos en fase 1 de trasplante de islotes de Langerhans fetales porcinos para el tratamiento de diabetes mellitus [Groth et al., (1994)], así como tejido de sistema nervioso central fetal porcino para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson [Isaacson et al., (1995); Deacon et al., (1997)]. También se ha descrito el trasplante hepático de babuinos a humanos [Starzl et al., (1993)] y la circulación extracorpórea a hígados porcinos para el tratamiento del fallo hepático fulminante [Charl et al., (1994)].

Aun cuando se lleguen a solucionar los problemas de rechazo y de que la fisiología del xenoinjerto pueda abastecer de forma eficiente las necesidades del transplantado, todavía quedaría por resolver el grave riesgo de la generación de nuevas enfermedades humanas. Esta preocupación ha sido recientemente confirmada por el descubrimiento de que retrovirus endógenos del cerdo pueden infectar células humanas [Patience et al., (1997)].

Mientras que el xenotrasplante está limitado por numerosos problemas fisiológicos, inmunológicos, éticos e infecciosos, la ingeniería celular se ha orientado hasta ahora a preparar células beta artificiales a partir de células somáticas.

Las líneas de células beta podrían ser modificadas para llevar a cabo la síntesis y secreción de insulina regulada por nutrientes. Por ejemplo, células beta de hámster (células HIT) transformadas con el virus SV40 [Santerre et al., (1981)], o las células BTC. Estas últimas son el resultado de la transformación de células usando el oncogen antígeno T del SV40 funcionalmente conectado al promotor del gen de la insulina. Se han descrita 13 líneas TC (tumoral cell) derivadas de insulinomas que aparecieron en ratones transgénicos que expresaban el oncogen de SV40 bajo el promotor del gen de la insulina [Efrat et al., (1988); D'Ambra et al., (1990); Efrat et al., (1993); Knaack et al., (1994); S. Efrat, patente norteamericana US 5.723.333 (1998)]. Estas líneas celulares fueron establecidas transformando las células con vectores, preferiblemente vectores retrovíricos, conteniendo dos o más oncogenes bajo el control de uno o más promotores inducibles y/o elementos genéticos. Un sistema que se mejoró mediante la inserción de un activador genético controlado por tetraciclina generado mediante la fusión del operón de resistencia a la tetraciclina codificado en el elemento genético Tn10 de la bacteria *Escherichia coli* con un dominio de activación de la proteína 16 del virión de herpes virus simplex [Gossen et al., PNAS 89:5547 (1992)]. Todas estas estrategias usan oncogenes insertados en el ADN para generar células tumorales, e incluso aunque se introduzca el activador genético controlado por tetraciclina, una mutación puntual en este gen provocará un tumor. Además, las células beta humanas son muy difíciles de transfectar.

Modificar células no beta autólogas para que sinteticen y secretén insulina permitiría superar el rechazo inmunitario. En este sentido, se ha conseguido biosíntesis de insulina en varios tipos celulares, como las células hepáticas [Valera et al., (1994)], fibroblastos y células musculares [Docherty, (1998); Gross et al., (1999)]. Sin embargo, dado que estas células somáticas no tienen los mecanismos intracelulares para procesar y almacenar insulina, estas aproximaciones producen una producción basal de insulina, a veces transitoria, y no regulada, insuficiente para mantener normoglucemia en los animales diabéticos, que necesitan de suministro adicional de insulina. Newgard y col. han usado una línea celular tumoral de origen endocrino, la AtT-20, a la que le han insertado el gen de la insulina y otros genes específicos de célula beta pancreática tales como el Glut-2 o la glucoquinasa [patentes norteamericanas US 5.427.940, US 5.744.327 y US 5.747.325] Aunque la modificación iterativa permita crear una línea celular que responda efectivamente a glucosa, esas células tumorales pueden generar tumores y además expresan otras hormonas como la ACTH (hormona adreno-corticotropa), la cual a su vez provoca diabetes mellitus por sí misma.

Otras posibilidades a investigar incluyen la generación de líneas celulares beta humanas a partir de recién nacidos afectados de nesidioblastosis y posterior reparación de los genes defectivos que causan la enfermedad, o el descubrimiento de los mecanismos y factores que controlan la maduración de los islotes y la regeneración a partir de células ductales [Macfarlane et al., (1997); Sharma et al., (1999)].

Una aproximación alternativa es el uso de células madre pluripotenciales para obtener *in vitro* células y tejidos para trasplante. El éxito en el cultivo de células embrionarias pluripotenciales humanas [Gearhart, (1998)] abrió grandes expectativas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, diabetes, lesión de médula espinal, repoblación hematopoyética, o reparación y regeneración de tejido dañado. Asimismo, esos resultados permitían pensar en la creación a medio plazo de bancos celulares de células madre, la creación de líneas celulares donantes universales, o incluso hacer células embrionarias de un individuo adulto mediante transferencia de núcleos. Sin embargo, las condiciones para inducir diferenciación dirigida de las células madre aún están por definir. A día de hoy, los estudios de diferenciación *in vitro* de las células pluripotenciales embrionarias se fundamentan en la selección y/o enriquecimiento de

linajes celulares específicos de entre todos los que puedan existir. Han de desarrollarse nuevas estrategias para obtener las grandes cantidades de poblaciones celulares puras necesarias para trasplante. Hasta el momento, los intentos de preparar células a partir de células embrionarias pluripotenciales con el fin de obtener poblaciones puras de células de un único fenotipo con aplicabilidad terapéutica han fracasado.

5 Los métodos que emplean un marcador externo de un tipo celular diferenciado no son capaces de producir una población pura y abundante de células. Otros métodos más elegantes están basados en una estrategia que permiten seguir y caracterizar linajes celulares y puntos de ramificación en el proceso de diferenciación. Brevemente, un gen marcador funcionalmente conectado a regiones de ADN reguladoras de la expresión dependiente de desarrollo y de linaje celular es introducido en células pluripotenciales 10 antes de la diferenciación celular.

Ott et al. (1994) han usado un método que se basa en mecanismos *in vivo* para obtener linajes celulares específicos diferenciados a partir de una célula pluripotencial embrionaria. Este es básicamente un método para la caracterización de linajes celulares derivados de células madre neuronales con un fragmento de ADN marcador que fueron reintroducidas en embriones en estadios tempranos de desarrollo. 15 El gen marcador se expresa durante la neurogénesis y las células que lo expresan son diseccionadas y mantenidas en cultivo. Este método permite la identificación histológica y aislamiento de células determinadas hacia el linaje neuronal que continua hasta diferenciación terminal en cultivo. Basado en esta estrategia, Gay [patente norteamericana US 5.639.618 (1997)] propone usar un gen marcador 20 cuya expresión puede seguirse por un sistema de separación de células activado por fluorescencia (FACS) o por inmunocitoquímica. Mientras que este último método puede llevarse a cabo *in vitro*, tiene el inconveniente de que sólo permite aislar poblaciones abundantes en el cultivo de linajes celulares de diferenciación temprana, lo que excluye los linajes celulares que aparecen en estadios tardíos del desarrollo. Además, dado que el método se restringe a aquellas proteínas que puedan ser seguidas por FACS o 25 por inmunocitoquímica, no produce el aislamiento de poblaciones puras. Este método, que ha sido escasamente demostrado experimentalmente, representa un avance respecto al trabajo anterior, aunque:

- sólo puede aplicarse a las células pluripotenciales embrionarias;
- el método de separación, FACS o inmunocitoquímica sólo permite separar poblaciones presentes en grandes números, y no aquéllas que representan una fracción marginal (1 entre un millón o menos);
- el método usa preferentemente proteínas marcadoras expresadas en membrana; y
- el método se restringe a los genes Otx, Dlx, Nlx, Emx, Wnt, En, Hox, y ACHR13, que son unos genes que codifican para grandes grupos de linajes celulares y no son específicos de un tipo celular específico.

Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar un procedimiento para diferenciar y aislar *in vitro* tanto células precursoras determinadas hacia un linaje celular específico como células diferenciadas 40 terminalmente, con una especificidad suficiente como para seleccionar *in vitro* 1 célula entre al menos 10^7 . Además, sería deseable que dicho procedimiento:

- a) permitiera obtener tipos celulares específicos a partir no sólo de células embrionarias pluripotenciales, sino también a partir de células de individuos, lo que abriría la posibilidad de nuevas aplicaciones terapéuticas y biomédicas, por ejemplo, la obtención de células específicas diferenciadas a partir de células precursoras del propio paciente; y/o
 - b) permitiera obtener tipos celulares específicos lo suficientemente diferenciados como para no tener el potencial de proliferación de las células madre, y, por tanto, capacidad hipotética de llegar a producir tumores en el individuo transplantado; y/o
 - c) estuviera provisto de sistemas de seguridad biológica que eviten la contaminación de las células con otros tipos celulares no deseados, y, ventajosamente, debería permitir insertar en la célula sistemas de bioseguridad adicionales, por ejemplo, el gen de la timidina quinasa que confiere sensibilidad al ganciclovir, con el fin de eliminar farmacológicamente, tanto *in vitro* o *in vivo*, las células diferenciadas; y/o
 - d) permitiera obtener tipos celulares específicos diferenciados que ya han demostrado su potencial terapéutico.
- 60 Además, no ha sido explorada todavía la posibilidad de que un tipo celular diferenciado con utilidad terapéutica pueda ser obtenido a partir de otra célula de adulto. Este es un nuevo postulado que contrasta con el proceso aceptado de desarrollo embrionario. La diferenciación celular es el proceso por

el que células embrionarias se hacen diferentes unas de otras, adquiriendo distintas identidades y funciones especializadas [Wolpert, (1998)]. Inicialmente las células son genómicamente equivalentes, y son programadas diferencialmente durante el desarrollo del individuo. En mamíferos existen más de 200 tipos celulares diferenciados claramente reconocibles. Las células diferenciadas llevan a cabo funciones especializadas y han alcanzado un estado terminal estable. El proceso central en la diferenciación celular es el cambio en la expresión génica. Ello conlleva la producción de proteínas específicas de tipo celular que caracterizan a una célula totalmente diferenciada, por ejemplo la hemoglobina en los hematíes, la insulina en las células beta pancreáticas, etc. En estadios tempranos las diferencias entre células no son fácilmente detectables, probablemente son cambios en uno o dos genes. Sin embargo, una vez determinada hacia un destino concreto, la célula pasa desde ese estado determinado a dar lugar a toda su progenie. Frecuentemente, las células determinadas experimentan varias rondas de divisiones celulares sin revelar en su apariencia externa su identidad y/o destino. Las células hijas heredan el programa de diferenciación de sus células parentales hasta que ese programa (diferenciación terminal) es ejecutado tras un considerable lapso de tiempo. Una característica central del desarrollo y la diferenciación celular establece que una vez el programa de diferenciación se halla instalado y se alcanza la diferenciación terminal, el estado de diferenciación de esa célula se mantiene durante toda su vida, y que aunque en el individuo adulto hay algunas células madre que mantienen la capacidad de formar nuevos tejidos, ello se halla restringido a aquellos tejidos que requieren continua regeneración, como la piel, el intestino, o el epitelio de la córnea. Es también ampliamente aceptado que otros tejidos pueden iniciar la regeneración bajo ciertas condiciones, como el hígado. Existen algunas excepciones a esta regla. Los experimentos clásicos de transdiferenciación [Okada, (1980); Schmidt and Alder, (1984); Okada, (1991); Anderson, (1989); Eguchi y Kodama, (1993)] y los más recientes de clonación en oveja y ratón a partir de núcleos de células de adulto sugieren que las células de adulto pueden ser probadas como donadoras para crear nuevos tipos celulares con utilidad terapéutica.

Transdiferenciación es un proceso irreversible por el que una célula diferenciada se convierte en un tipo celular diferente. Existe mucha confusión en la terminología usada para indicar cambios en la diferenciación celular.

Metaplasia es el término tradicional empleado para indicar el cambio de un tipo celular diferenciado a otro tipo celular. Este término fue introducido basándose en observaciones anatómicas e histológicas de tejidos de aparición inesperada y ectópica. La metaplasia puede aparecer como consecuencia de un crecimiento selectivo de células muy minoritarias presentes en un determinado órgano. En otros casos, la nueva diferenciación puede producirse como consecuencia de la re-diferenciación de células diferenciadas pre-existentes.

Transdeterminación (Hadorn, 1978) denota una alteración en las rutas de diferenciación futuras de una célula previamente determinada pero no diferenciada todavía. Desde un punto de vista tradicional, todas las células en desarrollo deben pasar por un estado de determinación antes de su diferenciación.

Por desdiferenciación se entiende el proceso por el que una célula pierde el estado diferenciado y expresa un fenotipo embrionario. La desdiferenciación puede aplicarse a cualquier cambio a un nuevo estado en el que la célula pierde sus características iniciales antes de la aparición de una nueva especificidad.

Modulación es otro término empleado para indicar flexibilidad en el estado de diferenciación. Existen numerosos ejemplos descritos en la bibliografía [Okada, 1991].

Experimentos recientes en los que se ha conseguido clonar un mamífero completo a partir del núcleo de una célula adulta sugiere que las células diferenciadas retienen la capacidad de reactivar genes reprimidos y retornar al estado pluripotencial. Ello implica que la diferenciación celular no implica la modificación irreversible del material genético requerido para desarrollar a término un mamífero. Esto ha sido demostrado en oveja y ratón. No puede excluirse la posibilidad de que una pequeña proporción de células madre relativamente indiferenciadas se encuentren en la célula mamaria para permitir su regeneración durante la gestación. Sin embargo, en términos de sus aplicaciones biotecnológicas, no es relevante que el núcleo proceda de una célula madre de un individuo adulto o de una célula quiescente en la fase G₀ del ciclo celular del mismo individuo. Lo que es fundamental es saber si una célula de un mamífero adulto puede generar otro tejido adulto como células beta pancreáticas, fotoreceptores o hepatocitos, o incluso cualquiera de ellos, para poder disponer de nuevas herramientas terapéuticas con las que poder tratar virtualmente cualquier enfermedad somática.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un nuevo procedimiento para generar células adultas diferenciadas a partir de otras células adultas, con lo que se pueden generar células del propio paciente

con utilidad terapéutica evitando explícitamente y por tanto eliminando la hipotética necesidad de crear células embrionarias pluripotenciales mediante técnicas de clonación. Por otro lado, se podrían usar estas células para generar bancos celulares y tisulares para situaciones de urgencia, como por ejemplo, ante un fallo hepático fulminante o mientras se está en la lista de espera de un trasplante.

5 Un objeto de esta invención lo constituye un segmento de ADN, útil para seleccionar tipos celulares diferenciados definidos, que comprende (i) las regiones que contribuyen a formar y estabilizar el complejo de factores de transcripción de un gen específico de un tipo celular que es expresado específicamente en un tipo celular diferenciado, y (ii) un gen de selección funcionalmente conectado, de manera que se exprese 10 cuando el segmento de ADN sea reconocido y transcrita por el complejo de factores de transcripción del gen específico.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye un procedimiento para la obtención de un tipo celular diferenciado que comprende el empleo de dicho segmento de ADN para transfectar células precursoras de dicho tipo celular diferenciado. Un procedimiento para madurar *in vitro* hasta diferenciación terminal las células diferenciadas obtenidas también constituyen un objeto de esta invención.

20 Las células precursoras transfectadas con dicho segmento de ADN así como las células diferenciadas obtenidas a partir de dichas células precursoras transfectadas constituyen objetos adicionales de la presente invención.

Otros objetos adicionales de la presente invención lo constituyen métodos para obtener células madre de individuos mamíferos adultos, así como células madre determinadas, que comprenden el empleo de dicho segmento de ADN.

25 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 es una representación esquemática del segmento de ADN utilizado en la realización del Ejemplo 1. Las flechas indican los sitios aproximados de corte de las enzimas de restricción correspondientes.

La Figura 2 es una gráfica que representa el nivel de glucosa en sangre a distintos tiempos en animales transplantados y en controles [véase el Ejemplo 1].

35 La Figura 3 es una gráfica que muestra la evolución del peso corporal con el tiempo en animales transplantados y en controles [véase el Ejemplo 1].

La Figura 4 es una gráfica que representa los resultados del test de tolerancia a la glucosa a distintos tiempos en animales transplantados y en controles [véase el Ejemplo 1].

40 La Figura 5 son microfotografías de un corte histológico del bazo de un animal transplantado representativo, analizado mediante técnicas inmunohistoquímicas que revelan la presencia de insulina como tinción de color ocre [véase el Ejemplo 1]. La Figura 5A presenta un corte de páncreas diabético sin islotes y la Figura 5B presenta un corte de bazo transplantado.

45 La Figura 6 son microfotografías de cortes histológicos de los tejidos derivados de las líneas transplantadas en los ratones immunosuprimidos [véase el Ejemplo 3], concretamente, de tejido mesodérmico (Figura 6A), de tejidos endodérmico y mesodérmico (Figura 6B), y de tejidos endodérmico, ectodérmico y neuroectodérmico (Figura 6C).

50 **Descripción detallada de la invención**

Las técnicas que se describen a continuación, tales como la generación y empleo de vectores de expresión, cultivos celulares, transfección, selección y crecimiento de clones celulares, obtención de animales 55 diabéticos mediante inyección de estreptozotocina, o trasplante de células y tejidos son conocidas y llevadas a cabo de manera rutinaria por personal con una preparación ordinaria en este campo de investigación. Salvo que se especifique de otro modo, toda la terminología técnica y científica tiene el mismo significado que el comúnmente entendido por una persona con una preparación ordinaria en el campo de investigación al que pertenece esta invención.

1. *El segmento de ADN*

El control transcripcional es crucial para diferenciación celular puesto que determina qué genes son transcritos y por tanto qué proteínas producirá la célula. La expresión génica está regulada por la acción coordinada de proteínas reguladoras (factores de transcripción) que se unen a regiones claves del ADN para control de la expresión de los genes. Las interacciones de los factores de transcripción pueden ser muy complejas y el número, tipo y combinaciones de las proteínas reguladoras que forman el complejo de transcripción es conocido sólo muy parcialmente y en unos pocos casos. Por tanto, la posibilidad de dirigir la diferenciación celular empleando este escaso conocimiento es excesivamente limitada.

En la presente invención se emplea una alternativa mucho más sencilla. Aunque una única proteína reguladora puede participar en más de un complejo de transcripción, cada gen es activado por una combinación específica y singular de factores que, como un todo, reconocen y transcriben el ADN de ese gen entre las decenas de miles de genes presentes en el genoma de una célula de mamífero. Por tanto, si se suministra el segmento de ADN que es reconocido por el complejo de transcripción, se podrá expresar cualquier gen (por ejemplo un gen de selección) insertado funcionalmente a ese segmento de ADN sólo cuando la combinación de factores que forman el complejo de transcripción del segmento de ADN se encuentren en la célula. El punto clave es construir un segmento de ADN que sea reconocido por el complejo de transcripción de un gen específico de un tipo celular concreto y que permita seleccionar dicho tipo celular. A modo de ejemplo, el segmento de ADN que permite seleccionar con éxito células beta pancreáticas a partir de células pluripotenciales de ratón, de células de teratocarcinoma humano, y de células intestinales adultas murinas y humanas debería ser reconocido por el complejo de transcripción del gen de la insulina. Preferiblemente, el gen específico empleado debe ser de la especie a la que pertenecen las células precursoras.

Se entiende por “factor de transcripción” cualquier proteína requerida para iniciar o regular la transcripción. Incluye tanto proteínas reguladoras específicas de grupo de genes como proteínas comunes de la maquinaria general de transcripción. El “complejo de factores de transcripción” es el grupo de factores que reconoce las regiones reguladoras de ADN de un gen para iniciar su transcripción. Las “regiones reguladoras de ADN” incluyen no sólo las secuencias de unión para los factores de transcripción, identificadas o no, sino también otras regiones que tengan un papel relevante en la unión al ADN del complejo de factores de transcripción.

Se entiende por “segmento de ADN”, en general, cualquier ADN exógeno que contenga un gen de selección conectado funcionalmente a las regiones reguladoras de ADN de un gen específico. Este concepto es especialmente relevante en el desarrollo de la presente invención. Este fragmento de regiones de ADN que se denomina segmento de ADN viene definido exclusivamente por el resultado final de la selección del tipo celular específico con un fenotipo definido.

La invención proporciona un segmento de ADN, útil para seleccionar tipos celulares diferenciados, en ocasiones denominado segmento de ADN de la invención, que comprende (i) las regiones que contribuyen a formar y estabilizar el complejo de factores de transcripción de un gen específico de un tipo celular que es expresado específicamente en un tipo celular diferenciado, y (ii) un gen de selección funcionalmente conectado, de manera que se exprese cuando el segmento de ADN sea reconocido y transcrita por el complejo de factores de transcripción del gen específico.

El gen específico es un gen que se expresa preferiblemente en un solo tipo celular diferenciado, aunque también se pueden usar genes específicos que se expresan en más de un tipo celular diferenciado aunque lo hagan preferentemente en un tipo celular diferenciado concreto. Por tanto, en general, cualquier gen específico de un tipo celular que sea expresado específicamente en un tipo celular diferenciado puede ser utilizado en el segmento de ADN de la invención. En una realización particular de esta invención, dicho gen específico de un tipo celular que es expresado específicamente en un tipo celular diferenciado es un gen seleccionado de mamífero, incluido el hombre. Así, se emplearía el gen de la insulina para obtener las células beta pancreáticas, el gen de la rodopsina para los fotorreceptores de la retina, el gen de la ornitina transcarbamilasa para el hígado o el gen de la albúmina, entendiéndose éstos como ejemplos no limitantes de genes específicos de tipos celulares diferenciados.

El gen de selección es un gen cuya expresión proporciona una característica fenotípica que permite seleccionar células transfectedas con dicho gen de selección. Puede, por tanto, utilizarse cualquier gen de selección, que cumpla la condición previamente establecida, en el segmento de ADN de la invención. En una realización particular de esta invención dicho gen de selección se selecciona entre un gen de resistencia, por ejemplo, el gen de la resistencia a la genoticina, el gen de la resistencia al dihidrofolato, el

gen de la resistencia a la puromicina, el gen de resistencia al interferón gamma, y el gen de resistencia al metotrexato (multidrug resistance gene), un gen de temperatura y sus combinaciones.

Como el gen específico puede expresarse en distintas etapas del desarrollo, pero sólo se van a seleccionar aquellas células determinadas a ser un tipo celular concreto, una estrategia para incrementar la especificidad del procedimiento para la selección de dicho tipo celular implica el uso de un gen secundario que también se exprese en el tipo celular específico. Tras la inserción de otro gen de selección positiva, diferente del que se halla conectado funcionalmente al gen específico, en una región del gen secundario que permita la expresión del segundo gen de selección cuando las regiones del ADN del gen secundario sean reconocidas por su complejo de factores transcripción, se introducen los genes específico y secundario y sus respectivos genes de selección, en la célula precursora a diferenciar. En este caso, la selección del tipo celular podría hacer mediante una selección positiva doble. El gen secundario puede expresarse en otros tipos celulares, pero la combinación de la expresión del gen específico y del gen secundario debe ser exclusiva del fenotipo del tipo celular que se pretende obtener.

Por tanto, la invención también proporciona un segmento de ADN de la invención, que comprende, además, un gen secundario que se expresa en el tipo celular en el que se expresa el gen específico, funcionalmente conectado a un segundo gen de selección, diferente al gen de selección conectado al gen específico. Preferentemente, dicho segmento de ADN comprende además, la región que contribuye a formar y estabilizar el complejo de factores de transcripción de dicho gen secundario del tipo celular a seleccionar.

Cualquier gen secundario de un tipo celular en el que se expresa específicamente un gen específico puede ser utilizado en el segmento de ADN de la invención siempre y cuando la combinación de la expresión del gen específico y del gen secundario sea exclusiva del fenotipo del tipo celular que se pretende obtener. En una realización particular, dicho gen secundario se selecciona del grupo formado por el gen de la glucoquinasa o el gen del transportador de glucosa Glut-2 para las células beta pancreáticas y el gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa o el gen de la albúmina para el hígado.

La invención también contempla el desarrollo de un segmento de ADN de la invención que comprende, además, 2 o más genes no específicos del tipo celular a seleccionar pero cuya expresión combinada es específica del tipo celular a seleccionar, conectados operativamente con sus regiones reguladoras correspondientes, y estando cada una de dichas regiones reguladoras funcionalmente conectadas con, al menos, un gen de selección.

El segmento de ADN de la invención también puede contener, ventajosamente, un sistema de seguridad biológica que evite la contaminación de las células con otros tipos celulares no deseados, y, preferentemente, un sistema de bioseguridad celular adicional, por ejemplo, el gen de la timidina quinasa de herpesvirus que confiere sensibilidad al ganciclovir, con el fin de eliminar farmacológicamente, *in vitro* o *in vivo*, las células manipuladas.

Las técnicas generales para la obtención del segmento de ADN de la invención, técnicas microbiológicas, técnicas de clonaje y manipulación de ADN, técnicas electroforéticas, etc. son las descritas por Ausubel y col. en el manual de laboratorio *Current Protocols in Molecular Biology*, Ed. John Wiley & Sons Inc., New York (1995); y por Sambrook y col. en el libro *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed. CSHL Press (1989).

2. Procedimiento de obtención de un tipo celular diferenciado

La invención proporciona un procedimiento para la obtención y el aislamiento de células diferenciadas específicas a partir de unas células precursoras que comprende el empleo del segmento de ADN de la invención. De forma más concreta, la invención proporciona un procedimiento para la obtención *in vitro* de un tipo celular diferenciado a partir de células precursoras, en ocasiones denominado procedimiento de la invención o Procedimiento de Selección de Tipos Celulares, que comprende las etapas generales de:

- 55 a) transfectar células precursoras con un segmento de ADN de la invención;
- b) cultivar las células precursoras transfectadas bajo condiciones adecuadas para que se conviertan en el tipo celular diferenciado;
- 60 c) seleccionar el tipo celular diferenciado que expresa el gen específico y, consecuentemente, el gen de selección; y
- d) cultivar y crecer el tipo celular diferenciado hasta alcanzar la cantidad requerida.

Las células precursoras, antes de ser transfectadas con el segmento de ADN de la invención, se cultivan bajo condiciones que garanticen que se mantienen en estado indiferenciado, por ejemplo, mediante la adición al medio de cultivo [tal como medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM)] de un 15 a 20 % de suero fetal bovino y de factores que inhiban la diferenciación espontánea de las células, como el factor 5 inhibidor de leucemia (1.000 U/ml, ESGRO, Life Technologies, Inc.). Las células precursoras indiferenciadas, en un número de aproximadamente 10^5 - 10^7 células por sesión de transfección, se transfectan con un segmento de ADN de la invención.

Las condiciones adecuadas para cultivar las células precursoras transfectadas con el fin de que se 10 conviertan en el tipo celular diferenciado, se centran en crear un microambiente *in vitro* adecuado para que puedan establecerse gradientes de diferenciación en grupos de células agregadas (cuerpos embrionarios) de manera que aparezcan células determinadas hacia múltiples linajes celulares; para ello las células precursoras se cultivan, por ejemplo, en DMEM con 10 % de suero fetal bovino, se retiran los factores 15 que inhiben la diferenciación, y se mantienen en cultivo en suspensión, de manera que las células forman espontáneamente agregados y al cabo de 2-7 días éstos se convierten en cuerpos embrionarios [Robertson, (1987)].

A continuación, se colocan los cuerpos embrionarios en placas de cultivo a las que se pueden adherir 20 y se selecciona el tipo celular diferenciado que expresa el gen específico, y, consecuentemente, el gen de selección, mediante la modificación de las condiciones de cultivo (por ejemplo, mediante la adición de un agente citotóxico durante 1-2 semanas) que eliminará toda célula que no tenga activado el gen específico, de este modo sólo el tipo celular de interés sobrevivirá y se dispondrá de cultivos fenotípicamente homogéneos en cuanto a la expresión del gen específico.

25 Seguidamente, el tipo celular diferenciado seleccionado se cultiva y crece, por ejemplo, en condiciones de cultivo adherente (cultivo en monocapa en placa) hasta alcanzar la cantidad necesaria (usualmente de 10^4 a 10^{10} células) para obtener respuesta terapéutica efectiva, para realizar ensayos de investigación, para producir derivados biotecnológicos, o para cualquier otro tipo de aplicación.

30 Una vez obtenido el número de células necesario, puede iniciarse la diferenciación terminal, en el caso de que el tipo celular buscado posea esa característica (por ejemplo, en el caso de la obtención de células beta pancreáticas, neuronas, cardiomiositos, células epiteliales corneales, células de la sangre, células cromafines de la médula adrenal o fotorreceptores de la retina). Las condiciones para que se inicie la diferenciación terminal variarán en función del tipo celular, por ejemplo, adicionando factores diferenciadores 35 al medio de cultivo; así, para obtener neuronas se añadirá ácido retinoico y adenosin monofosfato cíclico (AMP cíclico); se añadirá dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener cardiomiositos; se añadirán glucocorticoides para obtener células cromafines; o se añadirá nicotinamida para obtener células beta pancreáticas.

40 Asimismo, la invención proporciona un método para obtener células precursoras de individuos humanos adultos a partir de muestras de tejidos que conserven la capacidad de multiplicarse *in vivo*, como, por ejemplo, el epitelio gastrointestinal, células de la piel, las células epiteliales del limbo ocular, células de la glándula mamaria, células hepáticas, células de epitelio de las mucosas, células hematopoyéticas, ependimocitos, o células ductales pancreáticas. Para ello se sigue un protocolo similar al detallado en el Ejemplo 3 (aplicado a células epiteliales) que comprende, brevemente, la disagregación suave de la muestra de tejido mediante el uso de una solución tamponada que contiene un agente reductor, por ejemplo, ditiotreitol, y un agente quelante de calcio, por ejemplo, etilendiaminotetraacetato (EDTA), seguida de cultivo durante varios días (1-3 semanas) en condiciones que mantengan las células disagregadas en estado indiferenciado [tal como se ha mencionado previamente, por ejemplo, añadiendo al medio de cultivo suero de fetal bovino y factores que inhiban la diferenciación espontánea de las células]. Al cabo de este periodo 45 de cultivo aparecen clones celulares, y tras aislamiento y crecimiento se comprueba su capacidad para dar lugar a tejidos. Para ello se inoculan a nivel subcutáneo 10^6 - 10^7 células en ratones inmunosuprimidos. Tras 2-3 semanas se analizan los diferentes tejidos que estas células han formado, y se verifica el grado de pluripotencialidad que poseen las células precursoras generadas. Cuanto mayor sea el número de tipos celulares y tejidos diferenciados obtenidos, mayor será el grado de pluripotencialidad de las células precursoras. Las células que sólo dan un tipo de tejido, pueden ser empleadas preferentemente en la obtención 50 de los tipos celulares diferenciados que componen ese tejido, mientras que las células que dan lugar a múltiples tejidos pueden utilizarse como células precursoras para la obtención de un mayor número de tipos celulares.

55 Mediante el procedimiento de la invención puede obtenerse cualquiera de los más de 200 tipos celulares diferenciados que conforman el cuerpo humano (como ejemplo, véanse los tipos celulares descritos más arriba), así como células precursoras de individuos adultos que estén determinadas a dar lugar a

un linaje específico. Por ejemplo, en el caso de las células de la sangre, células precursoras de la serie de roja, precursoras de monocitos, precursoras de neutrófilos, o precursoras de linfocitos; en el caso de las células gliales, precursoras de astrocitos, oligodendrocitos, células de schwann, células ependimarias o microglía; en el caso de las células neuronales, precursoras de los diferentes tipos especializados de neuronas presentes en las siete regiones anatómicas del sistema nervioso central, o en el caso de las células que conforman los islotes pancreáticos, células precursoras de los tipos endocrinos especializados (células alfa o productoras de glucagon, beta o productoras de insulina, delta o productoras de somatostatina, o células PP).

10 Cuando las células diferenciadas que se obtienen son de un individuo, el procedimiento de la invención permite crear células diferenciadas con las características inmunológicas del propio individuo. Dichas células personales serían adecuadas para su eventual trasplante al propio individuo y su empleo evitaría el problema de rechazo inmunológico en caso de autotransplante.

15 El procedimiento de la invención abre la posibilidad obtener material biológico del propio individuo para la terapia celular efectiva de muchas enfermedades, prácticamente de cualquier enfermedad somática, por ejemplo, la diabetes mellitus, la enfermedad de Parkinson, la retinitis pigmentosa, etc.

20 Además, el procedimiento de la invención es una fuente continua de células de un determinado tipo seleccionado, lo que permite nuevas aproximaciones terapéuticas para transplantes, por ejemplo, el trasplante hepático o pancreático, la reposición de células musculares en el caso de la distrofia muscular o del infarto de miocardio, la reposición de células de la sangre en casos de cáncer en el tejido hematopoyético, etc.

25 El procedimiento de la invención se ilustra más adelante con unos ejemplos concretos de obtención de células beta pancreáticas que pueden ser empleadas en múltiples aplicaciones, por ejemplo, en el tratamiento de la diabetes mellitus (tanto tipo 1 como tipo 2), en la detección de antígenos asociados a la diabetes, e incluso en la producción a gran escala de insulina correctamente empaquetada.

30 El procedimiento de la invención se basa, entre otras cosas, en que bajo condiciones de cultivo *in vitro* controladas tanto las células embrionarias como las células de individuo adulto pueden diferenciar a otros tipos celulares. Por otra parte, el procedimiento de la invención permite (i) obtener líneas celulares con las que obtener, seleccionar y aislar tipos celulares tan escasamente representados en el cultivo como 1 célula entre 10^8 células, y (ii) la expansión y maduración de las células seleccionadas hasta obtener el tipo celular específico de utilidad terapéutica.

Dado que es un procedimiento universal, incluye la generación de cualquier tipo celular y sus aplicaciones, por ejemplo, biomédicas o de investigación.

40 3. *Células precursoras*

Una de las mayores dificultades al definir las células precursoras es que lo son si poseen unas determinadas capacidades funcionales, que solo pueden verificarse comprobando que realmente las tienen. Inicialmente, se denominaba “célula madre” a una población de células precursoras que tenía una gran capacidad de automantenimiento [Lajtha, (1970)]. Una definición más reciente distingue entre células madre activas, potenciales, específicas de linaje y determinadas [Potten y Loeffler, (1990); Potten, (1996)]. Las “células madre activas” son células precursoras indiferenciadas capaces de proliferar, automantenerse, producir un gran número de linajes celulares derivados, regenerar tejidos tras una lesión, y poseer flexibilidad en el uso de esas capacidades. Las “células madre potenciales” son la versión latente o quiescente 50 de las células madre activas. Las “células madre determinadas” son células transitorias con capacidad de división y que pueden compartir con las células terminalmente diferenciadas la capacidad de realizar funciones específicas de tejido. Algunas de estas células madre determinadas dan lugar a unos pocos tipos celulares, y en muchas ocasiones son de hecho células precursoras unipotenciales, determinadas a un único tipo celular. En este sentido es diferente a la “célula madre específica de linaje”, que es una célula 55 precursora determinada a dar lugar a todos los tipos celulares de un determinado linaje, por ejemplo el linaje neuronal, etc.

“Células madre de adulto” hace referencia a una población de células precursoras que son capaces de dividirse y diferenciar terminalmente solamente tras haberse multiplicado. Estas células madre de adulto son responsables y necesarias para el crecimiento de los tejidos durante el desarrollo, la regeneración de ciertos órganos como el hígado, o la continua producción de células de la sangre o de la piel. Los resultados obtenidos por los inventores indican que, bajo determinadas condiciones, las células pre-

cursoras de adulto pueden ser también pluripotenciales. “Célula madre pluripotencial”, término que ha sido restringido hasta ahora a células madre embrionarias, se refiere a aquellas células precursoras que pueden diferenciar una gran variedad de linajes celulares. La “célula madre embrionaria”, que es también pluripotencial, es aquélla que ha sido aislada de un embrión. La “célula madre inmortal” se define como 5 una población celular que retiene permanentemente sus características embrionarias y que puede multiplicarse en cultivo ilimitadamente, o diferenciar a múltiples linajes y tipos celulares bajo determinadas condiciones. De acuerdo con los resultados de los inventores, el origen de estas células madre inmortales puede ser una célula madre de adulto.

10 Para la realización del procedimiento de la invención puede utilizarse cualquier célula precursora, por ejemplo, células madre (stem cells) embrionarias pluripotenciales, células de carcinoma embrionario, o células de individuos humanos adultos que, bajo condiciones de cultivo definidas, se comportan como células madre (células madre de adulto), por ejemplo, células del epitelio gastrointestinal, células de la piel, las células epiteliales del limbo ocular, células de la glándula mamaria, células hepáticas, células de epitelio de las mucosas, células hematopoyéticas, ependimocitos, o células ductales pancreáticas. 15

4. *Comprobación de la pluripotencialidad de una célula madre de adulto*

Como se ha indicado anteriormente, existe un experimento sencillo para comprobar la posibilidad de 20 preparar nuevas células y tejidos usando células obtenidas a partir de individuos adultos como donantes. Brevemente:

- 25 a) se generan una o varias líneas celulares a partir de una muestra de tejido adulto (véanse los ejemplos descritos anteriormente)
- b) se trasplanta un cierto número de estas células (de uno a diez millones) a ratones inmunosuprimidos para evitar el rechazo inmunitario; y
- c) se analizan al cabo de varios días del trasplante los tipos de tejidos formados.

30 Los resultados obtenidos por los inventores [véase el Ejemplo 3] ponen de manifiesto que las líneas celulares generadas de mamíferos adultos (ratón y humano) tienen el potencial de dar lugar a tipos celulares y tejidos (tejido neuronal, epitelio mucosecretor, músculo estriado, cartílago, hueso, etc.) derivados de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo).

35 5. *Transfección y selección de células*

El término “transfección” se refiere a cualquier método para introducir un segmento de ADN en una célula eucariótica. El término así definido incluye tanto métodos que empleen sistemas víricos (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, herpesvirus, virus sindbis, etc.) como no víricos (electroporación, lipofección, mediada por fosfato cálcico, por DEAE dextrano, por captación celular, por 40 métodos mecánicos, etc.), y también por cualquier otro método de transferencia de ADN [Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Ed. John Wiley & Sons Inc., New York (1995); y Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed. CSHL Press (1989)].

45 En una realización particular de esta invención, la selección del tipo celular a partir de células madre embrionarias o de adulto permite seleccionar células madre determinadas a ser células beta pancreáticas.

El desarrollo embrionario sigue un modelo exquisitamente organizado en el que un gran número de factores, muchos aún desconocidos, y la propia biografía celular determina la ruta de diferenciación que seguirá una determinada célula. Bajo determinadas condiciones de cultivo [Roberston, (1987)], la posibilidad de que una célula madre se vuelva determinada tras una división asimétrica es aleatoria. La selección de un determinado tipo celular permite aislar, bajo condiciones controladas, aquellas células que cumplen dos requisitos capacidad de dividirse y la expresión del gen específico. La proporción de estas células presentes en el cultivo previo a la selección es extremadamente baja, por lo que el procedimiento de la invención debe ser muy potente y suficientemente específico para no dar falsos positivos. Al utilizar 50 células madre adultas para generar una línea celular empleada para producir células beta pancreáticas el proceso es similar al que se ha descrito previamente.

60 En una realización particular del procedimiento de la invención, la selección del tipo celular diferenciado que expresa el gen específico se realiza en cultivo.

Alternativamente, la selección de dicho tipo celular diferenciado que expresa el gen específico puede realizarse mediante un procedimiento de doble selección positiva utilizando un segmento de ADN de la

invención que comprende un gen secundario, funcionalmente conectado a otro gen de selección diferente del conectado al gen específico, además del gen específico.

6. *Maduración de la célula beta pancreática*

5 Cuando el gen específico corresponde a una célula diferenciada terminalmente, la célula seleccionada debe ser una célula madre determinada que mantenga su capacidad de división hasta que otros factores provoquen su diferenciación terminal. En el caso de la célula beta pancreática, existen numerosos factores extracelulares que inhiben su proliferación [Hügl et al., (1998)]. Los más efectivos son los inhibidores de 10 fosfoproteinofosfatasas, como el ortovanadato, o los inhibidores de las señales intracelulares mediadas por las proteinoquinasas que fosforilan residuos tirosina, como la genisteína, la wortmanina, y el compuesto 2-(4-morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopiran-4-ona identificado como LY294002 [Vlahos et al., (1994)].

15 El proceso que lleva a la maduración de la célula beta no es bien conocido y es un activo campo de investigación. Este proceso implica tanto proliferación celular y diferenciación terminal. Puesto que las células beta pancreáticas no se dividen, este proceso requiere comportamientos opuestos en la práctica. Algunos factores como la betacelulina, el factor de crecimiento de tumores alfa, el factor de crecimiento nervioso, o la activina A activan la proliferación, mientras que nicotinamida, el butirato de sodio, la vitamina D₃ o los inhibidores genisteína y wortmanina detienen la proliferación. Por ejemplo, la nicotinamida 20 provoca crecimiento y maduración de las células beta pancreáticas [Otonkoski et al., (1993); Anderson et al., (1994)], y de los hepatocitos [Mitaka et al., (1995); Fardel et al., (1992)]. La combinación de vitamina D₃ y butirato de sodio se ha descrito como muy efectiva para inhibir el crecimiento de las célula beta pancreáticas [Lee et al., (1994)].

25 El Ejemplo 1 que acompaña a esta descripción demuestra que las células madre determinadas obtenidas tras la selección de células que expresan el gen específico ya empezaban a manifestar características fenotípicas incipientes de las células beta pancreáticas (contenido de insulina, liberación de insulina al medio). Sin embargo, sólo tras 1-3 semanas en un medio de cultivo de diferenciación con nicotinamida 5-25 mM seguidas de 1-3 semanas en otro medio de cultivo de diferenciación terminal con glucosa 3-5 mM 30 y nicotinamida 5-25 mM se generaba una población celular pura que presentaba un contenido de insulina igual que la célula beta pancreática madura, que respondía eficiente y fisiológicamente a los secretagogos igual que la célula beta pancreática madura, y que no se dividían, como tampoco lo hacen las células beta maduras.

35 7. *Otras aplicaciones de la invención*

La presente invención es de carácter universal, por lo que incluye la obtención de cualquier tipo celular de interés y sus aplicaciones, biomédicas, biotecnológicas o de investigación, por ejemplo, la obtención de células para el tratamiento de enfermedades que cursen con alteración, degeneración y/o pérdida celular (diabetes, Parkinson, Alzheimer, cardiopatías, retinitis pigmentosa y otras retinopatías, leucemia, alteraciones musculoesqueléticas, hepatopatías, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, anemias no regenerativas, etc), obtención de productos derivados de tipos celulares específicos para el desarrollo de productos útiles en aplicaciones biomédicas, biotecnológicas o de investigación; por ejemplo, obtención de fármacos de origen biológico para el bloqueo de la desdiferenciación tumoral, o anticuerpos antiidiotípico 40 para el bloqueo de reacciones inmunitarias indeseables, obtención de antígenos celulares para la detección de anticuerpos útiles para el diagnóstico de enfermedades; obtención de reactivos biológicos para la investigación encaminada al desarrollo de nuevos procedimientos diagnósticos, pronósticos o de tratamiento de enfermedades; empleo de las células obtenidas por el procedimiento de la invención para el estudio de los procesos que conducen a la diferenciación y a la desdiferenciación celular, particularmente en el 45 estudio del proceso tumoral.

50 Por tanto, las células precursoras transfundidas con un segmento de ADN de la invención, así como las células diferenciadas obtenidas a partir de dichas células precursoras constituyen objetos adicionales de la presente invención.

55 Asimismo, la invención proporciona un método para cultivar *in vitro* células diferenciadas en medio líquido, por ejemplo, células beta pancreáticas obtenibles por el procedimiento de invención, que comprende cultivar *in vitro* dichas células diferenciadas obtenibles por el procedimiento de la invención en un medio líquido bajo condiciones que permiten el crecimiento de dichas células diferenciadas.

60 La invención también proporciona un método para obtener un producto de interés que comprende la expresión de células diferenciadas obtenibles por el procedimiento de la invención En una realización

particular, dicho producto de interés se selecciona entre fármacos de origen biológico para el bloqueo de la desdiferenciación tumoral, anticuerpos antiidiotípico para el bloqueo de reacciones inmunitarias indeseables, antígenos celulares para la detección de anticuerpos útiles para el diagnóstico de enfermedades, y reactivos biológicos para la investigación encaminada al desarrollo de nuevos procedimientos diagnósticos, pronósticos o de tratamiento de enfermedades. En una realización concreta de esta invención, dicho producto de interés es la insulina, y se obtiene mediante perfusión de células beta pancreáticas obtenibles por el procedimiento de la invención en un medio líquido tamponado que contiene secretagogos.

Todas estas aplicaciones son posibles dado que el procedimiento descrito en la invención permite obtener 10 grandes cantidades de células (10^{10} células o incluso más) de tipos celulares específicos *in vitro* que normalmente se encuentran en mucha menor proporción en los individuos adultos. Asimismo, se evitan la donación cadavérica, o la presencia de agentes infecciosos potencialmente transmisibles en la elaboración de derivados biológicos.

15 La invención proporciona un método para obtener *in vitro* células precursoras de individuos mamíferos adultos, incluida la especie humana (véanse los ejemplos de aplicación indicados anteriormente). Estas células se pueden transfectar con segmento de ADN de la invención, cultivar las células transfectadas bajo condiciones adecuadas para que se conviertan en células precursoras específicas de un determinado destino celular y seleccionar dichas células precursoras que expresan el gen específico y el gen de selección.

20 La invención proporciona un método para obtener *in vitro* células precursoras determinadas de individuos mamíferos adultos, incluida la especie humana, que comprende transfectar células de dichos individuos mamíferos adultos con el segmento de ADN de la invención, cultivar las células transfectadas bajo 25 condiciones adecuadas para que se conviertan en células precursoras determinadas y seleccionar dichas células precursoras determinadas que expresan el gen específico y el gen de selección.

La invención también proporciona un método para madurar *in vitro* hasta diferenciación terminal al tipo celular diferenciado obtenido por el procedimiento de la invención que comprende la adición de 30 los factores necesarios para alcanzar la diferenciación terminal del tipo celular diferenciado (véanse los ejemplos indicados anteriormente).

La invención también se refiere al empleo del segmento de ADN de la invención, de los tipos celulares diferenciados obtenidos por el procedimiento de la invención, opcionalmente madurados hasta diferenciación terminal, de las células precursoras transfectadas con el segmento de ADN de la invención, en todo 35 tipo de aplicaciones, especialmente, en aplicaciones terapéuticas, biomédicas o de investigación (véanse los ejemplos de aplicación indicados anteriormente).

Los siguientes ejemplos demuestran ciertos aspectos de la puesta en práctica del objeto de esta invención. Es previsible que personal con una preparación ordinaria en este campo de investigación pueda 40 utilizar la invención en toda su extensión. Los ejemplos que se presentan a continuación deben ser considerados meramente ilustrativos del objeto de la presente invención y, por tanto, no limitantes del alcance de la misma

Ejemplo 1

45 *Obtención y valoración terapéutica de células beta pancreáticas diferenciadas a partir de células madre (o células precursoras) embrionarias de ratón*

1.a) *Cultivo de células madre embrionarias murinas (CMEM)*

50 El cultivo de las CMEM se realizó siguiendo protocolos estandarizados [Robertson, (1987)].

1.b) *Transfección del segmento de ADN*

55 El segmento de ADN cuyas características se muestran en la Figura 1 se transfeció a las CMEM mediante electroporación lipofección, obteniéndose similares resultados en ambos casos, y cultivo de las células transfectadas durante 24-48 horas sin selección alguna. El segmento de ADN incluye las regiones que contribuyen a formar y estabilizar el complejo de factores de transcripción del gen de la insulina humana (gen específico), un gen que confiere resistencia al antibiótico geneticina (gen de selección) funcionalmente conectado al gen de la insulina humana, un gen de selección constitutivo (gen de resistencia a la higromicina) que permite la selección de las células que hayan incorporado el segmento de ADN y el gen de la timidina quinasa (TK) que confiere sensibilidad al ganciclovir (ganc) (sistema de bioseguridad).

El segmento de ADN se obtuvo mediante técnicas generales de biología molecular, como se ha indicado anteriormente.

1.c) *Selección de células transfectadas*

5 La selección de las células transfectadas se realizó mediante la adición al medio de cultivo de higromicina (0,1 mg/ml) durante 10-14 días, y posterior aislamiento y expansión de clones celulares individuales. Todos los clones aislados dieron resultados similares, y todos ellos diferenciaron a células beta pancreáticas maduras.

10 1.d) *Inducción de la diferenciación in vitro de los clones resistentes al antibiótico higromicina*

Se generaron agregados celulares mediante cultivo en suspensión, siguiendo protocolos estandarizados [Robertson, (1987)]. Tras 5-7 días, los agregados celulares fueron distribuidos en placas de cultivo de 15 tejidos gelatinizadas y se mantuvieron en cultivo durante otros 3-7 días.

1.e) *Selección de células que expresan insulina*

La selección de las células que expresan insulina de entre los clones celulares diferenciados *in vitro* se 20 realizó mediante la adición al medio de cultivo del antibiótico geneticina (0,2 mg/ml) durante 10-14 días, seguidos por la expansión de las células resistentes aparecidas.

1.f) *Inducción de diferenciación terminal in vitro de las células seleccionadas que expresan insulina*

25 Se generaron agregados celulares (conteniendo 10^2 a 10^3 células por agregado) siguiendo el protocolo indicado en 1.d). Tras 2 días en cultivo, se añadió al medio de cultivo nicotinamida 20 mM y se continuó el cultivo de los agregados celulares durante 2 semanas. A continuación, se cambió el medio de cultivo habitual (medio esencial mínimo modificado por Dulbecco, o DMEM) al medio de diferenciación terminal que consiste en una base de medio CMRL-1099 (Life Technologies) suplementada con nicotinamida 20 30 mM, y se mantuvieron las células en cultivo durante otros 7-14 días. La Tabla 1 muestra el contenido y la secreción de insulina en función de la evolución de la diferenciación de varios clones celulares obtenidos mediante el Procedimiento de Selección de Tipos Celulares objeto de la presente invención.

TABLA 1

35 *Contenido y secreción de insulina en función de la diferenciación de varias líneas celulares independientes obtenidas por el Procedimiento de Selección de Tipos Celulares*

	Grado de diferenciación	Línea de células	Contenido de insulina (ng/μg prot)	Secrección basal de insulina (pg/μg prot)	Secrección estimulada (pg/μg prot)
40	Célula aislada sin diferenciación terminal [1.e)]	H1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1
		H2	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1
		H3	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1
		R1	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1
		R2	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1
		R3	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1
45	Célula agregada en diferenciación terminal [1.f)]	H1	16,1 ± 1,4	81,0 ± 5,8	511,8 ± 31,9
		H2	17,3 ± 2,7	72,7 ± 3,5	481,2 ± 20,1
		H3	16,2 ± 2,1	75,2 ± 3,9	519,3 ± 42,6
		R1	15,5 ± 1,1	71,2 ± 2,2	441,9 ± 38,1
		R2	18,1 ± 2,5	86,9 ± 4,4	602,6 ± 44,0
		R3	16,9 ± 1,9	79,5 ± 3,1	535,9 ± 59,4
50	Control positivo	Célula beta de páncreas de adulto	20,1 ± 1,0	95,1 ± 2,3	655,3 ± 18,7

1.g) *Valoración terapéutica de las células beta pancreáticas obtenidas a partir de CMEM mediante el Procedimiento de Selección de Tipos Celulares*

Para la valoración terapéutica de las células beta pancreáticas obtenidas a partir de CMEM mediante el Procedimiento de Selección de Tipos Celulares se realizó el ensayo que se describe a continuación. Se hicieron animales diabéticos mediante una inyección endovenosa única de estreptozotocina (0,2 mg/g peso vivo). Sólo se emplearon ratones diabéticos extremos con unos niveles de glucosa en sangre superiores a 500 mg/dl durante al menos tres días, y que presentaran grandes cantidades de glucosa y cuerpos cetónicos en orina determinados mediante tira reactiva de orina (++) (Amestix, Ames). Células diferenciadas (del apartado 1.f) en forma de agregados celulares (10^3 a 10^4 por ratón) fueron trasplantadas al bazo de los ratones diabéticos en una sesión única. Posteriormente, se determinaron la glucosa en sangre y el peso de los animales trasplantados con una frecuencia diaria durante las dos primeras semanas, y después dos veces por semana. Los animales experimentaron una reducción progresiva en la hiperglicemia hasta alcanzar la normalización de los valores de glucosa en sangre en la primera semana tras el trasplante, y ganaron peso hasta que alcanzaron el peso corporal normal [véanse las Figuras 2 y 3].

Con el fin de confirmar el valor terapéutico de las células trasplantadas en la recuperación de la homeostasis de la glucosa, se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa en los animales trasplantados a las dos semanas y al mes de haber efectuado el trasplante. Los animales a los que se les administraron las células presentaron un test de tolerancia a la glucosa normal al igual que los animales sanos que se emplearon como control [véase la Figura 4].

Con el fin de verificar la presencia y actividad de las células trasplantadas en los animales, algunos de los ratones fueron sacrificados, y se analizaron mediante inmunohistoquímica tanto el bazo, donde se hallaban sus células trasplantadas, como el páncreas, para verificar que no existían islotes endógenos normales, y que, por tanto, la desaparición del proceso diabético era debido a la administración de las células beta obtenidas por el Procedimiento de Selección de Tipos Celulares proporcionado por esta invención [véanse las Figuras 5A y 5B].

30 Ejemplo 2

Obtención y valoración terapéutica de células beta pancreáticas diferenciadas a partir de células de teratocarcinoma humano

35 2.a) *Establecimiento y cultivo de células madre (o precursoras) de teratocarcinoma humano obtenidas a partir de un tumor testicular (CTCE)*

El establecimiento y cultivo de células madre de teratocarcinoma humano obtenidas a partir de un tumor testicular (CTCE) se llevó a cabo siguiendo protocolos estandarizados [Robertson, 1987].

40 2b)-2f)

Se procedió de manera igual al procedimiento descrito en los apartados 1b)-1f) del Ejemplo 1. La Tabla 2 muestra el contenido y la secreción de insulina antes y después de la diferenciación de varios clones celulares obtenidos mediante el Procedimiento de Selección de Tipos Celulares objeto de la presente invención.

50

55

(Ver Tabla 2 en la página siguiente)

60

TABLA 2

Contenido y secreción de insulina en función de la diferenciación de varias líneas celulares independientes obtenidas por el Procedimiento de Selección de Tipos Celulares

5	Grado de diferenciación	Línea de células	Contenido de insulina (ng/μg prot)	Secreción basal de insulina (pg/μg prot)	Secreción estimulada (pg/μg prot)
10	Célula aislada sin diferenciación terminal	TCX1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,1
		TCX2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1
		TCX3	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1
15	Célula agregada en diferenciación terminal	TCX1	12,5 ± 1,1	58,4 ± 3,6	380,9 ± 28,8
		TCX2	13,7 ± 1,4	61,1 ± 2,3	401,5 ± 40,1
		TCX3	10,2 ± 0,9	55,9 ± 4,2	338,1 ± 36,7

20 Como control positivo se emplearon células beta pancreáticas de ratón adulto. Los resultados obtenidos no fueron significativamente diferentes de los que se indican en la Tabla 1.

25 2.g) *Valoración terapéutica de las células beta pancreáticas obtenidas a partir de células de teratocarcinoma humano mediante el Procedimiento de Selección de Tipos Celulares*

Actualmente se está en fase de evaluación terapéutica *in vivo* en ratones diabéticos inmunosuprimidos a los que se les van a administrar las células beta obtenidas por el Procedimiento de Selección de Tipos Celulares proporcionado por esta invención.

30 Ejemplo 3

Obtención y valoración de células madre (o precursoras) de adulto a partir de una muestra de células epiteliales intestinales humanas

35 3.a) *Establecimiento y cultivo de células madre de adulto humano (CMAH) obtenidas a partir de una muestra de células epiteliales intestinales humanas*

40 El establecimiento y cultivo de células madre de adulto humano (CMAH) obtenidas a partir de una muestra de células epiteliales intestinales humanas se llevó a cabo siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

- 1) incubación durante una hora a 4°C de la muestra en suero salino fisiológico al que se le adicionó ditiotreitol 10 mM;
- 2) eliminación del medio de incubación y sustitución por el medio de disgregación, compuesto por una solución salina tamponada estándar (PBS) a la que se añaden ditiotreitol 10 mM y etilendiamino-tetraacetato 2 mM;
- 3) incubación durante 1 hora a 4°C en medio de disgregación en agitación continua;
- 4) recuperación de las células aisladas en suspensión mediante centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos, y eliminación del medio de disgregación;
- 5) resuspensión en medio de aislamiento, compuesto por medio estándar DMEM suplementado con 15 % de suero fetal bovino inactivado por calor, una mezcla estándar de aminoácidos esenciales (Life Technologies) 100 mM, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, 10 microgramos/ml de estreptomicina, 10 Unidades/ml de penicilina y 10 microgramos/ml de insulina;
- 6) distribución de las células en placas de petri gelatinizadas, que se mantienen en cultivo hasta la aparición de clones celulares (1 a 3 semanas); y
- 7) aislamiento y expansión de los clones celulares obtenidos. Cada uno de los clones expandidos da lugar a una línea celular independiente.

3.b) *Evaluación de la potencialidad de las líneas de CMAH*

Con el fin de verificar la potencialidad de las líneas de CMAH, se trasplantaron a ratones inmunosuprimidos a nivel subcutáneo 10^6 células por ratón y por línea de CMAH analizada, en sesión única. Al 5 cabo de 2-3 semanas se analizó el trasplante mediante obtención de biopsia y examen anatomo-patológico.

El examen de las muestras obtenidas de las líneas de CMAH indicó que dos de las seis líneas analizadas en este primer estudio dieron lugar a tejidos derivados de las tres capas embrionarias, ectodermo, 10 mesodermo y endodermo [véanse las Figuras 6A, 6B y 6C]. Estos resultados indican claramente que las dos líneas de CMAH obtenidas de la muestra de epitelio intestinal humano adulto se comportan realmente como células madre pluripotenciales activas.

Ejemplo 4

15 15 *Obtención y valoración terapéutica de células beta pancreáticas diferenciadas a partir de células madre (o precursoras) de adulto derivadas de una muestra de células epiteliales intestinales murinas*

4.a) *Establecimiento y cultivo de células madre de adulto murino (CMAM) obtenidas a partir de una muestra de células epiteliales intestinales de ratón*

20 El establecimiento y cultivo de células madre de adulto murino (CMAM) obtenidas a partir de una muestra de células epiteliales intestinales de ratón se realizó siguiendo el protocolo detallado en los apartados 3.a) y 3.b) del Ejemplo 3.

25 4b)-4f)

30 Se procede de igual manera al procedimiento descrito en los apartados 1.b)-1.f) del Ejemplo 1, empleando líneas CMAM pluripotenciales como células a transfectar. La Tabla 3 muestra el contenido y la secreción de insulina antes y después de la diferenciación de varios clones celulares obtenidos mediante el Procedimiento de Selección de Tipos Celulares objeto de la presente invención.

TABLA 3

35 *Contenido y secreción de insulina en función de la diferenciación de varias líneas celulares independientes obtenidas por el Procedimiento de Selección de Tipos Celulares*

Grado de diferenciación	Línea de células	Contenido de insulina (ng/μg prot)	Secreción basal de insulina (pg/μg prot)	Secreción estimulada (pg/μg prot)
Célula aislada sin diferenciación terminal	Ix1	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,2
	Ix2	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Célula agregada en diferenciación terminal	Ix1	18,2 ± 1,8	83,8 ± 6,1	62,6 ± 47,0
	Ix2	17,0 ± 1,3	76,3 ± 4,3	458,3 ± 29,9

50 Como control positivo se emplearon células beta pancreáticas de ratón adulto. Los resultados obtenidos no fueron significativamente diferentes de los que se indican en la Tabla 1.

55 4.g) *Valoración terapéutica de las células beta pancreáticas diferenciadas a partir de células madre de adulto derivadas de células epiteliales intestinales murinas*

Actualmente se está en fase de evaluación terapéutica *in vivo* en ratones diabéticos a los que se les van a administrar las células beta pancreáticas obtenidas a partir de CMAM por el Procedimiento de Selección de Tipos Celulares proporcionado por la presente invención.

60

Ejemplo 5

Obtención y valoración terapéutica de células beta pancreáticas humanas diferenciadas a partir de CMAH derivadas de una muestra de células epiteliales intestinales humanas

5 5.a) *Cultivo de CMAH pluripotenciales*

CMAH pluripotenciales se obtuvieron y cultivaron según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3.
10 5b)-5f)

Se procede de igual manera al procedimiento descrito en los apartados 1.b)-1.f) del Ejemplo 1, empleando líneas CMAH pluripotenciales como células a transfectar. La Tabla 4 muestra el contenido y la secreción de insulina antes y después de la diferenciación de varios clones celulares obtenidos mediante el
15 Procedimiento de Selección de Tipos Celulares objeto de la presente invención.

TABLA 4

Contenido y secreción de insulina en función de la diferenciación de varias líneas celulares independientes obtenidas por el Procedimiento de Selección de Tipos Celulares

Grado de diferenciación	Línea de células	Contenido de insulina (ng/μg prot)	Secreción basal de insulina (pg/μg prot)	Secreción estimulada (pg/μg prot)
Célula aislada sin diferenciación terminal	MEB1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1
	MEB2	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,2
	MEB3	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Célula agregada en diferenciación terminal	MEB1	11,8 ± 1,7	63,5 ± 2,7	421,7 ± 34,7
	MEB2	9,5 ± 1,0	51,1 ± 3,5	342,1 ± 32,4
	MEB3	11,2 ± 1,1	59,8 ± 3,1	395,2 ± 29,9

35 Como control positivo se emplearon células beta pancreáticas de ratón adulto. Los resultados obtenidos no fueron significativamente diferentes de los que se indican en la Tabla 1.

40 5.g) *Valoración terapéutica de las células beta pancreáticas humanas diferenciadas a partir de CMAH derivadas de células epiteliales intestinales humanas*

Actualmente se está en fase de evaluación terapéutica *in vivo* en ratones diabéticos inmunosuprimidos a los que se les van a administrar las células beta pancreáticas humanas obtenidas a partir de CMAH por el Procedimiento de Selección de Tipos Celulares proporcionado por esta invención.

45 Aunque la invención ha sido descrita haciendo especial referencia a los ejemplos presentados, cualquier persona familiarizado con la técnica apreciará rápidamente que los experimentos específicos detallados son sólo meramente ilustrativos de la invención. Debe entenderse, por tanto, que se pueden realizar una o varias modificaciones en el procedimiento o tipo de célula precursora o tipo celular diferenciado sin salirse del marco descrito ni del fundamento de la presente invención.
50

Depósito de material biológico

55 El 23 de septiembre de 1999 se depositó en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Burjasot (Valencia), un cultivo de *Escherichia coli* B22, que contiene la construcción de la Figura 1 sin el gen de TK, al que le correspondió el número de depósito CECT 5197.

Bibliografía

60 **Anderson, (1989).** *Trends Genet.* 5:174-178.

Anderson et al., (1994). *Endocrinology* 135:1559-65.

- Balley CJ & Docherty K, (1994).** *Frontiers of insulin secretion and pancreatic B-cell research* PR Flatt and S Lenzen, eds. Smith-Gordon Publishers, London, pp. 613-620.
- Charl et al., (1994).** *N. Eng. J. Med.* 331:234.
- ⁵ **D'Ambra et al., (1990).** *Endocrinology* 126:2815.
- Diabetes Control and Complications Trial Research Group American Diabetes Association (1993).** *Diabetes* 42:1555-1558.
- ¹⁰ **Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group (1991).** *Am. J. Med.* 90:450-459.
- ¹⁵ **Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group (1993).** *N. Eng. J. Med.* 329:977-986.
- De Leiva A, Lefebvre PJ, Nerup J, (1996).** *Diabetes* 39:1-11 (annexe).
- Deacon et al. (1997).** *Nature Med.* 3:350.
- ²⁰ **Docherty, (1996).** *Biochem. Soc. Trans.* 24(2):368.
- Efrat et al., (1988).** *PNAS* 85:9037.
- ²⁵ **Efrat et al., (1993).** *Diabetes* 42:901.
- Efrat, (1998).** Patente norteamericana US 5.723.333.
- Eguchi & Kodama, (1993).** *Cur. Opin. Cell Biol.* 5:1023-1032.
- ³⁰ **Elsenbarth, (1968).** *N. Eng. J. Med.* 314:1360-1368.
- Fardel et al., (1992).** *Biochem. Pharmacol.* 44:2259-62.
- ³⁵ **Ferber S, Beltran del Rio H, Johnson JH, Noel RJ, Cassidy LE, Clark S, Becker TC, Hughes SD, Newgard CB, (1994).** *J. Biol. Chem.* 269:11523-11579.
- Gearhart, (1998).** *Science* 282:1061.
- ⁴⁰ **Gross et al., (1999).** *Hum. Gene. Ther.* 10(7):1207.
- Groth et al. (1994).** *Lancet* 344:1402-1404.
- ⁴⁵ **Hadorn, (1978).** *The Genetics and biology of Drosophila.* Vol. 2 (ed. M. Ashburner and TRF Wright), pp. 556-617, Academic Press, New York and London.
- Hauner H, von Ferber L, Köster I (1992).** *Lancet* 339:905-909.
- Hügl et al., 1998.** *J. Biol. Chem.* 273(28):17771-9.
- ⁵⁰ **Isaacson et al., (1995).** *Nature Med.* 1:1189.
- Kawakami et al., (1992).** *Diabetes* 11:956.
- ⁵⁵ **Knaack et al., Diabetes** 43:1413 (1994).
- Korbut GS, Warlock GL, Rajotte RV, (1997).** *Physiology and Pathophysiology of the Islets of Langerhans*, B. Soria, ed. Plenum Press, New York, pp. 397-410.
- ⁶⁰ **Lacy, (1993).** *Diabetes Rev.* 1:76-92.
- Lajtha, (1970).** *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 27:59-65.

- Lee et al., (1994). *Endocrinology* 134:1602-10.
- Macfarlane et al., (1997). *FEBS lett.* 413(2):394.
- 5 McGarry, (1992). *Science* 258:766.
- Mitaka et al., (1995). *BBRC* 214:310-7.
- 10 Nathan, (1992). *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 21:221-235.
- Nathan, (1993). *N. Eng. J. Med.* 23:1676-1685.
- 15 Okada, (1980). *Cur. Top. Dev. Biol.* 15: 349-390.
- Okada, (1991) *Transdifferentiation. Flexibility in cell differentiation.* Oxford Science Publications, Clarendon Press, Oxford.
- 20 Otonkoski et al., (1993). *J. Clin. Invest.* 92:1459-66.
- Ott et al., (1994). "Use of recombinant embryonic stem cells to isolate neural stem cells", Keystone Symposium (Abstract H222). *J. Cell Biochem. Suppl.* 18A:187.
- 25 Patience et al., (1997). *Nature Med.* 3:282.
- Pielleers DG, Keymeulen B, Korbut GS, (1994). *The Diabetes Annual/8*, S. Marshall, P. Home, eds. Elsevier Science Publishers, Amsterdam pp. 299-330.
- Potten CS, ed., (1996). *The Stem Cell Handbook.* Academic Press, New York.
- 30 Potten CS & Loeffler M, (1990). *Development* 110: 1001-1020.
- Reichart P, Berglund B, Britz A, Cars I, Nilson BY, Rosenquist U, (1991). *J. Intern. Med.* 230:101-108.
- 35 Roberston, (1987). *Teratocarcinomas and embryonic stem cell. A practica approach.* IRL Press, Oxford, Washington.
- Ruderman et al., (1992). *FASEB J.* 6:2905.
- 40 Santerre, et al., (1981). *PNAS* 78(7):4339.
- Schmidt V & Alder H, (1984). *Cell* 38:801-809.
- 45 Sharma et al., (1999), *Diabetes* 48(3):507.
- Starzl et al., (1993). *Lancet* 341:65-71.
- Taylor, et al., (1988). *Biochem J.* 250:625.
- 50 Valera et al., (1994), *FASEB J.* 8:440.
- Vlahos et al., (1994), *J. Biol. Chem.* 269(7):5241.
- 55 Williamson et al., (1993) *Diabetes* 42:801.
- Wolpert (1998). *Principles of development.* Ed. Oxford Univ. Press, United Kingdom.

REIVINDICACIONES

1. Un segmento de ADN que comprende (i) las regiones que contribuyen a formar y estabilizar el complejo de factores de transcripción de un gen específico de un tipo celular que es expresado específicamente en un tipo celular diferenciado, y (ii) un gen de selección funcionalmente conectado, de manera que se exprese cuando el segmento de ADN sea reconocido y transcrita por el complejo de factores de transcripción del gen específico.
- 5 2. Segmento de ADN según la reivindicación 1, en el que dicho gen específico es un gen que se expresa preferiblemente en un solo tipo celular diferenciado.
- 10 3. Segmento de ADN según la reivindicación 1, en el que dicho gen específico es un gen que se expresa en uno o más tipos celulares diferenciados.
- 15 4. Segmento según la reivindicación 1, en el que dicho gen específico es un gen de origen humano y se selecciona entre el gen de la insulina, el gen de la rodopsina humana, el gen de la ornitina transcarbamilasa y el gen de la albúmina.
- 20 5. Segmento según la reivindicación 1, en el que dicho gen de selección se selecciona entre un gen de resistencia, un gen de temperatura, y sus combinaciones.
- 25 6. Segmento según la reivindicación 5, en el que dicho gen de selección se selecciona del grupo formado por el gen de la resistencia a la geneticina, el gen de la resistencia al dihidrofolato, el gen de la resistencia a la puromicina, el gen de la resistencia al interferón gamma y el gen de la resistencia al metotrexato.
- 30 7. Segmento de ADN según la reivindicación 1, que comprende, además, un gen secundario que se expresa en el tipo celular en el que se expresa el gen específico, funcionalmente conectado a un segundo gen de selección, diferente al gen de selección conectado al gen específico.
- 35 8. Segmento de ADN según la reivindicación 7, que comprende, además, la región que contribuye a formar y estabilizar el complejo de factores de transcripción de dicho gen secundario del tipo celular a seleccionar.
9. Segmento de ADN según la reivindicación 7, en el que dicho gen secundario del tipo celular a aislar se selecciona del grupo formado por el gen de la glucoquinasa, el gen del transportador de glucosa Glut-2, el gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y el gen de la albúmina.
- 35 10. Segmento de ADN según la reivindicación 1, que comprende, además, 2 o más genes no específicos del tipo celular a aislar pero cuya expresión combinada es específica del tipo celular a aislar, operativamente conectados con sus regiones reguladoras correspondientes, estando cada una de dichas regiones reguladoras funcionalmente conectadas con, al menos, un gen de selección.
- 40 11. Segmento de ADN según la reivindicación 1, que contiene, además, un sistema genético de seguridad biológica que permite eliminar las células manipuladas.
- 45 12. Segmento de ADN según la reivindicación 11, en el que dicho sistema genético de seguridad biológica es el gen de la timidina quinasa de herpesvirus.
13. Un procedimiento para la obtención *in vitro* de un tipo celular diferenciado a partir de células precursoras, que comprende:
- 50 a) transfectar células precursoras con un segmento de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12;
- 55 b) cultivar las células precursoras transfectadas bajo condiciones adecuadas para que se conviertan en el tipo celular diferenciado;
- c) seleccionar el tipo celular diferenciado que expresa el gen específico y el gen de selección; y
- d) cultivar y crecer el tipo celular diferenciado.
- 60 14. Procedimiento según la reivindicación 13, que comprende, además, el cultivo de las células precursoras, antes de ser transfectadas con dicho segmento de ADN, bajo condiciones que garanticen que se mantienen en estado indiferenciado.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el cultivo de las células precursoras, antes de ser transfectadas con dicho segmento de ADN, bajo condiciones que garanticen que se mantienen en estado indiferenciado, comprende la adición al medio de cultivo de factores que inhiben la diferenciación espontánea de las células.

5 16. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicha célula precursora se selecciona del grupo formado por células madre embrionarias pluripotenciales, células de carcinoma embrionario, y células de individuos humanos adultos que, bajo condiciones de cultivo definidas, se comportan como células madre de adulto.

10 17. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicho gen específico es un gen de origen humano y se selecciona entre el gen de la insulina, el gen de la rodopsina, el gen de la ornitina transcarbamila y el gen de la albúmina.

15 18. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la transfección de dichas células precursoras con el segmento de ADN se realiza mediante un método de transferencia vírica.

19. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la transfección de dichas células precursoras con el segmento de ADN se realiza mediante un método de transferencia no vírica.

20 20. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que selección del tipo celular diferenciado que expresa el gen específico se realiza en cultivo.

25 21. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que selección del tipo celular diferenciado que expresa el gen específico se realiza mediante un procedimiento de doble selección positiva usando un segmento de ADN que comprende un gen secundario que se expresa en el tipo celular en el que se expresa el gen específico, funcionalmente conectado a un segundo gen de selección, diferente al gen de selección conectado al gen específico.

30 22. Procedimiento según la reivindicación 13, que comprende, además, añadir los factores necesarios para que el tipo celular diferenciado obtenido alcance la diferenciación terminal.

23. Una célula precursora transfectada con un segmento de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

35 24. Una célula diferenciada obtenida a partir de una célula precursora según la reivindicación 22.

25 40 Células diferenciadas según la reivindicación 24, seleccionadas entre células beta pancreáticas, neuronas, cardiomiositos, células epiteliales corneales, células de la sangre, células cromafines de la médula adrenal y fotorreceptores de la retina.

26. Un método para cultivar *in vitro* células diferenciadas, que comprende cultivar células diferenciadas obtenibles según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22, en un medio líquido bajo condiciones que permiten el crecimiento de dichas células diferenciadas.

45 27. Un método para obtener un producto de interés que comprende la expresión de células diferenciadas obtenibles según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22.

28. Método según la reivindicación 27, en el que dicho producto de interés se selecciona entre fármacos 50 de origen biológico para el bloqueo de la desdiferenciación tumoral, anticuerpos antiidiotípico para el bloqueo de reacciones inmunitarias indeseables, antígenos celulares para la detección de anticuerpos útiles para el diagnóstico de enfermedades, y reactivos biológicos para la investigación encaminada al desarrollo de nuevos procedimientos diagnósticos, pronósticos o de tratamiento de enfermedades.

55 29. Empleo de las células según cualquiera de las reivindicaciones 23, 24 ó 25 para el estudio de los procesos que conducen a la diferenciación y a la desdiferenciación celular.

Figura 1

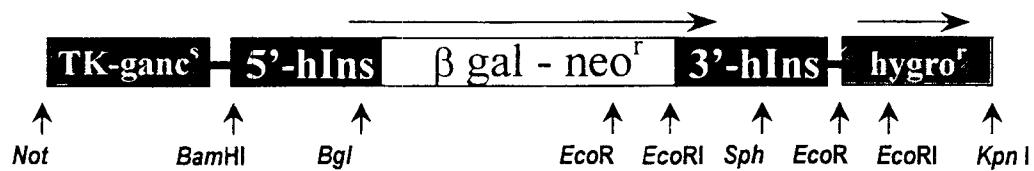


Figura 2

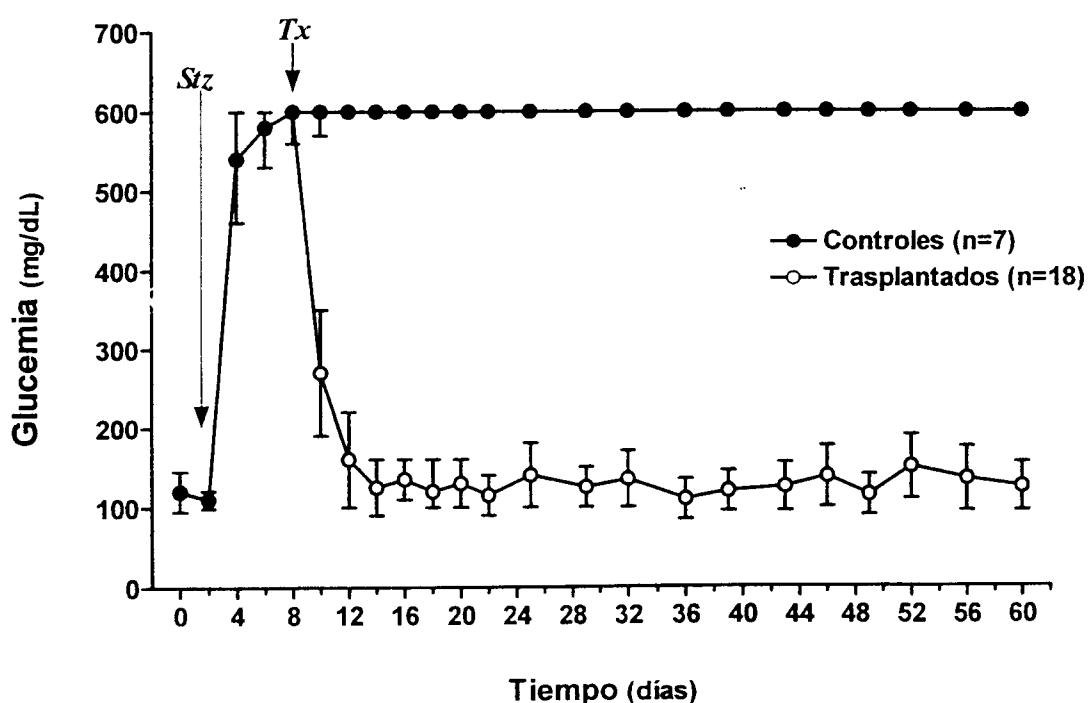


Figura 3

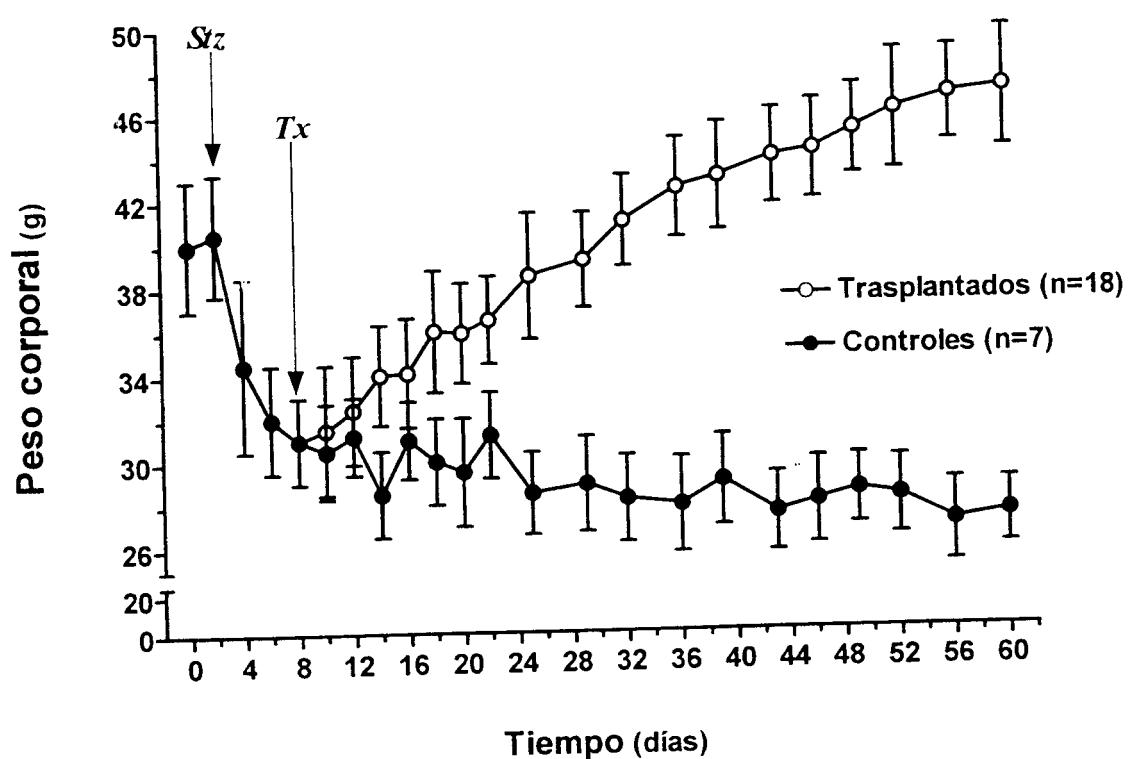
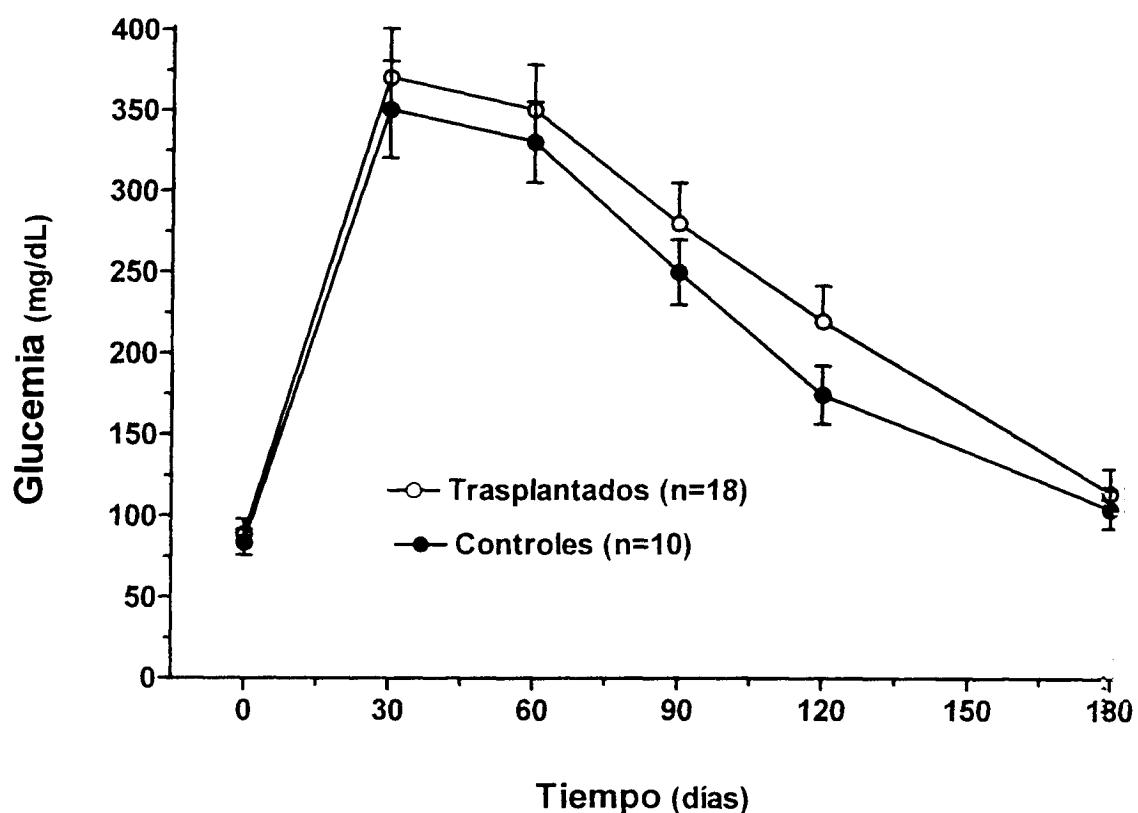


Figura 4



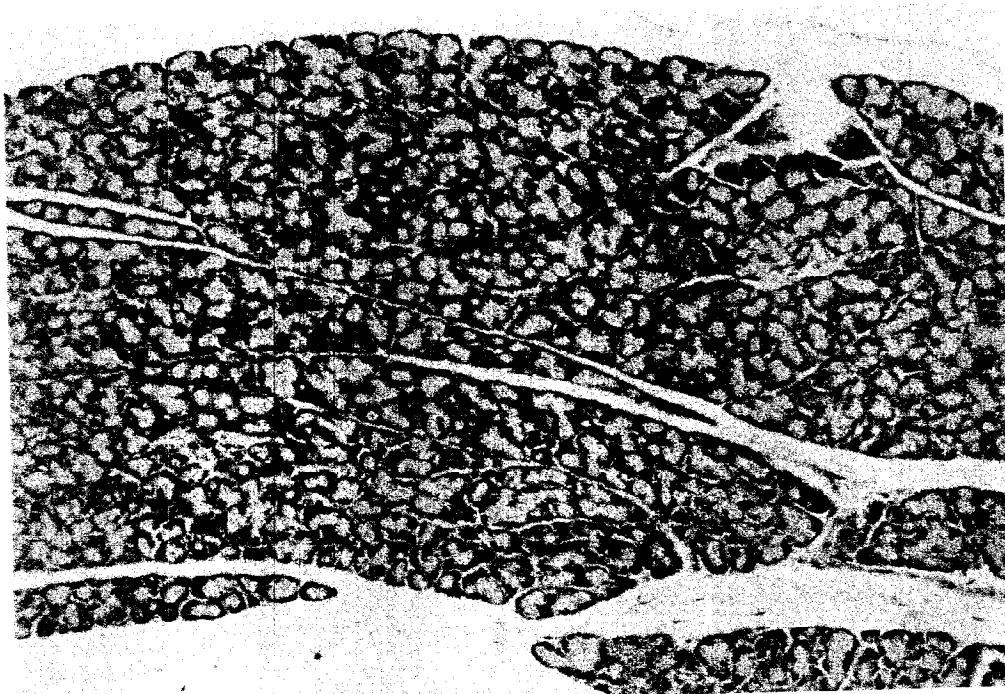


Figura 5A

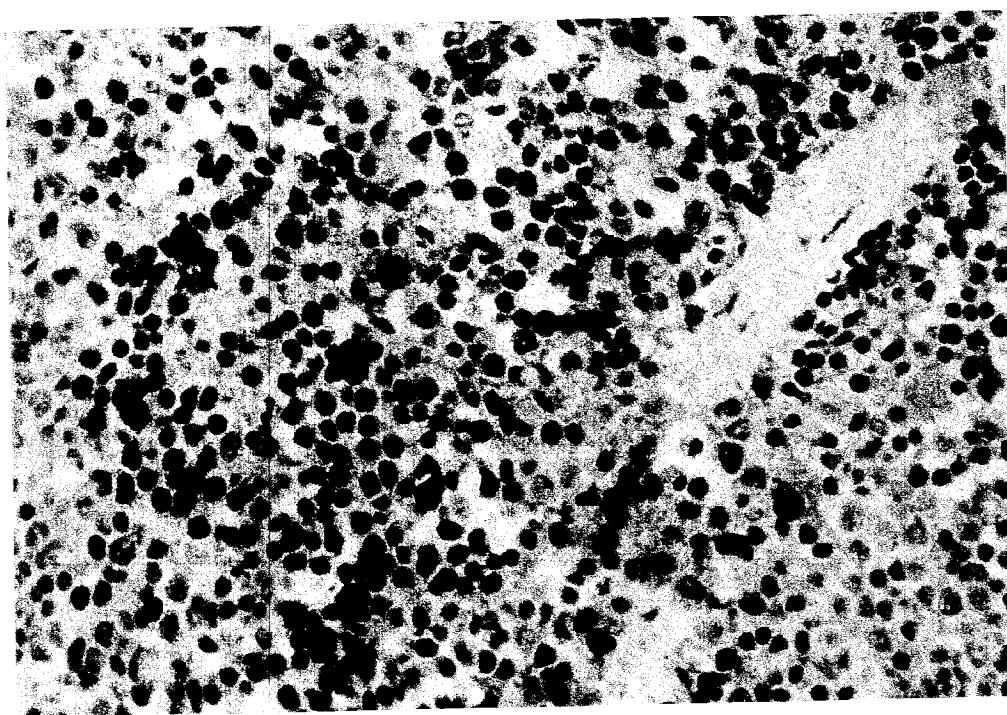


Figura 5B

ES 2 183 665 B1



Figura 6A



Figura 6B

ES 2 183 665 B1



Figura 6C



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.7:** C12N 15/12, 5/08, C12Q 1/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HERRERA, P.L. et al. "Two transgenic approaches to define the cell lineages in endocrine pancreas development", MOLECULAR AND CELULAR ENDOCRINOLOGY, 1998, Vol. 140, páginas 45-50. Todo el documento.	1,13,23,26
X	JUN-HSIANG, L. et al. ^ tissue-specific promoter that can drive a foreign gene to express in the suprabasal urothelial cells of transgenic mice", PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1995, Vol. 92, páginas 679-683. Todo el documento.	1
X	WO 9844142 A (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 08.10.1998, página 2, línea 9 - página 6, línea 22; página 14, línea 25 - página 22, línea 32; reivindicaciones 1-7.	1,13,23,26
X	WO 9835022 A (OSIRIS THERAPEUTICS) 13.08.1998, páginas 3-4; ejemplos 1,5.	1,13,23,26
A	WO 9424274 A (THE UNIVERSITY OF EDINBURGH) 27.10.1994, todo el documento.	1-29

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

O: referido a divulgación no escrita

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

A: refleja el estado de la técnica

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 18.02.2003	Examinador J.L. Vizán Arroyo	Página 1/1
--	---------------------------------	---------------