

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 028**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2011 E 11822351 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2611907**

54 Título: **Diferenciación de células madre pluripotentes**

30 Prioridad:

31.08.2010 US 378480 P

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

03.10.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

REZANIA, ALIREZA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 585 028 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).

Diferenciación de células madre pluripotentes**Descripción****5 Campo de la invención**

La presente invención proporciona métodos para impulsar la diferenciación de células madre pluripotentes en células productoras de insulina. En particular, la presente invención proporciona un método que utiliza un inhibidor de CYP26A para producir una población de células precursoras endocrinas pancreáticas.

10

Antecedentes

Los avances en terapia de sustitución celular para diabetes mellitus de tipo I y una escasez de islotes de células de Langerhans transplantables han centrado el interés en desarrollar fuentes de células productoras de insulina, o células β , apropiadas para injerto. Una técnica es la generación de células β funcionales a partir de células madre pluripotentes, como, por ejemplo, células madre embrionarias.

15

En el desarrollo embrionario de vertebrados, una célula pluripotente da lugar a un grupo de células que comprenden tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) en un proceso conocido como gastrulación. Tejidos tales como, por ejemplo, tiroides, timo, páncreas, intestino e hígado, se desarrollarán del endodermo, por medio de una fase intermedia. La fase intermedia en este proceso es la formación de endodermo definitivo. Las células de endodermo definitivo expresan un número de marcadores, como, HNF3 beta, GATA4, MIXL1, CXCR4 y SOX17.

20

La formación del páncreas aparece de la diferenciación de endodermo definitivo en endodermo pancreático. Las células del endodermo pancreático expresan el gen homeobox pancreático-duodenal, PDX1. En ausencia de PDX1, el páncreas falla en el desarrollo más allá de la formación de brotes ventrales y dorsales. Así, la expresión de PDX1 marca una etapa fundamental en la organogénesis pancreática. El páncreas maduro contiene, entre otros tipos de células, tejido exocrino y tejido endocrino. Los tejidos endocrinos y exocrinos aparecen de la diferenciación de endodermo pancreático.

25

30

El desarrollo pancreático *in vivo* se basa, al menos en parte, en la regulación apropiada de las señales que especifican los campos progenitores de órganos. Kinkel et al (PNAS 12 Mayo, 2009, vol. 106, nº 19 7864-7869) expone "los destinos de las células pancreáticas están especificados por el ácido retinoico (AR), y el tamaño y localización apropiados del campo pancreático depende del control limitado de señalización de AR. Aquí mostramos que las enzimas Cyp26 degradantes de AR juegan un papel fundamental en la definición de límite anterior normal del campo pancreático".

35

Las células que tienen las características de células islotes se han derivado supuestamente de células embrionarias del ratón. Por ejemplo, Lumelsky et al. (Science 292:1389, 2001) presenta la diferenciación de células madre embrionarias de ratón con estructuras que secretan insulina similares a islotes pancreáticos. Soria et al. (Diabetes 49:157, 2000) presenta que las células que secretan insulina derivadas de células madre embrionarias de ratón normalizan glicemia en ratones diabéticos inducidos con estreptozotocina.

40

En un ejemplo, Hori et al. (PNAS 99:15105, 2002) desvela que el tratamiento de células madre embrionarias de ratón con inhibidores de fosfoinositida 3-quinasa (LY294002) produjo células que se parecen a células β .

45

En otro ejemplo, Blyszczuk et al. (PNAS 100:998, 2003) presenta la generación de células productoras de insulina de células madre embrionarias de ratón que constitutivamente expresan Pax4.

50

Micallef et al. Presenta que el ácido retinoico puede regular el compromiso de células madre embrionarias para formar endodermo pancreático positivo PDX1. El ácido retinoico es más efectivo en la inducción de expresión Pdx1 cuando se añade a cultivos el día 4 de diferenciación de célula madre embrionaria durante un periodo correspondiente al final de gastrulación en el embrión (Diabetes 54:301, 2005).

55

Miyazaki et al., presenta una línea celular embrionaria de ratón que sobreexpresa Pdx1. Sus resultados muestran que la expresión exógena de Pdx1 mejoró claramente la expresión de insulina, somatostatina, glucoquinasa, neurogenina3, p48, Pax6 y genes Hnf6 en las células resultantes diferenciadas (Diabetes 53: 1030, 2004).

60

Skoudy et al. Presenta que la activina A (un miembro de la superfamilia TGF- β) regular por incremento la expresión de genes pancreáticos exogénicos (p48 y amilasa) y los genes endocrinos (Pdx1, insulina y glucagón) en células madre embrionarias de ratón. El efecto máximo se observó usando activina A 1nM. También se observó que el nivel de expresión de insulina y Pdx1 mRNA no estuvo afectado por el ácido retinoico; sin embargo, el tratamiento con 3nM FGF7 dio como resultado un mayor nivel de la transcripción para Pdx1 (Biochem. J. 379:749, 2004).

65

Shiraki et al., estudió los efectos de los factores de crecimiento que específicamente mejoran la diferenciación de células madre embrionarias en células positivas PDX1. Se observó que TGF-β2 produjo reproduciblemente una mayor proporción de células positivas PDX1 (Genes Cells. 2005 Jun; 10(6): 503-16).

Gordon et al. Demostró la inducción de células de endodermo de branquiuro [positivas]/HNF3 beta [positivas] de células madre embrionarias de ratón en ausencia de suero y en presencia de activina junto con un inhibidor de señalización Wnt (US 2006/0003446A1).

Gordon et al. (PNAS, Vol 103, página 16806, 2006) expone “la señalización simultánea de Wnt y TGF-beta/nodal/activina fue necesaria para la generación de la sucesión primitiva anterior”.

Sin embargo, el modelo de ratón de desarrollo de célula madre embrionaria puede no imitar exactamente el programa de desarrollo en mamíferos más grandes, como por ejemplo, humanos.

A diferencia de células madre embrionarias de ratón, cuya diferenciación puede prevenirse simplemente cultivándolas con Factor Inhibidor de la Leucemia (FIL), las células madre embrionarias humanas deben mantenerse bajo condiciones muy especiales (Patente de Estados Unidos N° 6.200.806; WO 99/20741; WO 01/51616).

D'Amour et al. Describe3 la producción de cultivos enriquecidos de endodermo definitivo derivado de células madre embrionaria humana en presencia de una alta concentración de activina y suero bajo (Nature Biotechnology 2005). El trasplante de estas células bajo la cápsula del riñón de ratones dio como resultado la diferenciación en células más maduras con características de algunos órganos del endodermo. Las células de endodermo definitivo derivada de células madre embrionaria humana pueden además diferenciarse en células positivas PDX2 después de la adición de FGF-10 (US 2005/0266554A1).

D'Amour et al. (Nature Biotechnology – 24, 1392 – 1401 ((2006)) declara: “Hemos desarrollado un proceso de diferenciación que convierte células madre embrionarias humanas (MEh) en células endocrinas capaces de sintetizar las hormonas pancreáticas: insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático y ghrelina. Este proceso imita la organogénesis pancreática *in vivo* al dirigir las células a través de fases que se parecen al endodermo definitivo, endodermo de tubo intestinal, endodermo pancreático y precursor endocrino en ruta a células que expresan hormonas endocrinas”.

En otro ejemplo, Fisk et al presenta un sistema para producir células islotes pancreáticas a partir de células madre embrionarias humanas (US2006/0040387A1). En este caso, la secuencia de diferenciación se dividió en tres fases. Primero las células madre embrionarias humanas se diferenciaron del endodermo usando una combinación de butirato sódico y activina A. Después, las células se cultivaron con antagonistas de TGF-β como Nogina en combinación con EGF o betacelulina para generar células positivas PDX1. La diferenciación terminal fue inducida por nicotinamida.

Aún falta una significativa necesidad para desarrollar métodos *in vitro* para generar un células que exprese insulina funcional, que se parezca lo máximo posible a una célula β. La presente invención toma una técnica alternativa para mejorar la eficiencia de diferenciación de células madre pluripotentes hacia células que expresan insulina, generando una población de células precursoras pancreáticas que utilizan un inhibidor de CYP26A.

Resumen

La invención proporciona un método para derivar una población de células precursoras endocrinas pancreáticas de células madre pluripotentes que comprende las etapas de:

- a.cultivar una población de células madre pluripotentes;
- b.diferencia las células madre pluripotentes en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo;
- c.diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo en una población de células de tubo intestinal primitivo;
- d.diferenciar la población de células de tubo intestinal primitivo en una población de células del intestino proximal posterior; y
- e. tratar la población de las células del intestino proximal posterior con un medio complementado con un inhibidor de CYP26A.

Resumen de la divulgación

La presente divulgación describe un método que utiliza un ácido inhibidor de CYP26A para producir una población de células precursoras endocrinas pancreáticas.

5 En una realización, la formación de la población de células precursoras endocrinas pancreática se consigue utilizando un protocolo de diferenciación en forma de etapas, donde una población de células madre pluripotentes primero se diferencia en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo. Después, la población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo se diferencia en una población de células de tubo intestinal primitivo. A continuación, la población de células de tubo intestinal primitivo se diferencia en una población de células de intestino proximal posterior. Después, la población de células de intestino proximal posterior se diferencia en una población de células precursoras endocrinas al tratar las células del intestino proximal posterior con un medio complementado con un inhibidor de CYP26A.

15 En una realización, la población de células precursoras endocrinas se diferencia además en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endocrino pancreático.

Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 muestra datos PCR en tiempo real obtenidos de muestras obtenidas de células en las fases III-IV, del protocolo descrito en el Ejemplo de Referencia 1, para a) PAX4, b) NGN3, c) PDX1, d) NEUROD, e) NKX6.1, f) CDX2 y g) Albúmina. El eje y es una expresión de pliegue sobre células H1 no diferenciadas. El panel H muestra la inmunotinción de NGN3 para cultivos tratados con control y CYP26A en la fase IV.

25 La Figura 2 muestra datos PCR en tiempo real obtenidos de muestras obtenidas de células en las fases III-IV, del protocolo descrito en el Ejemplo de Referencia 2, para a) NGN3, b) NEUROD, c) CDX2, d), NKX6.1 y e) PDX1. El eje y es una expresión de pliegue sobre células H1 no diferenciadas.

30 La Figura 3 muestra imágenes de fase de células en las fases I-VI del protocolo descrito en el Ejemplo de Referencia 3.

La Figura 4 muestra gráficos PACS para la expresión de KNX6.1 y CDX2 en células en las fases V y VII del protocolo descrito en el Ejemplo de Referencia 3.

Descripción detallada

35 Por motivos de claridad de la divulgación, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención está dividida en las siguientes subsecciones que describen o ilustran ciertas características, realizaciones o aplicaciones de la presente invención.

40 Definiciones

45 Las células madre son células no diferenciadas definidas por su habilidad en un único nivel celular para auto-renovarse y diferenciarse para producir células progenie, incluyendo progenitores auto-renovadores, progenitores no renovadores y células terminalmente diferenciadas. Las células madres también se caracterizan por su habilidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de varios linajes celulares a partir de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a múltiples capas de tejidos después del trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, sino a todos, los tejidos después de inyección de blastocitos.

50 Las células madre se clasifican por su potencial en el desarrollo como: (1) totipotentes, lo que significa que son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias; (2) pluripotentes, lo que significa que son capaces de dar lugar a todas las células embrionarias; (3) multipotentes, lo que significa que son capaces de dar lugar a un subconjunto de linajes celulares pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, células madre hematopoyéticas (CMH) puede producir progenie que incluye HSC (auto-renovación), progenitores oligopotes restringidos de célula sanguínea y todos los tipos y elementos celulares (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre); (4) oligopotentes, lo que significa que dan lugar a un subconjunto más restringido de linajes celulares que las células madre multipotentes; y (5) unipotentes, lo que significa que pueden dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

60 La diferenciación es el proceso por el que una célula no especializada (“no comprometida”) o menos especializada adquiere las características de una célula especializada como, por ejemplo, una célula nerviosa o una célula muscular. Una célula diferenciada o inducida por diferenciación es una que ha tomado una posición más especializada (“comprometida”) en el linaje de una célula. El término “comprometido/a”, cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una células que se ha sometido a la secuencia de diferenciación hasta un punto en el que, bajo circunstancias normales, continuará diferenciándose en un tipo específico de célula o subconjunto de tipos de célula, y no puede, bajo circunstancias normales, diferenciarse en un tipo diferente de célula o volver a ser un tipo

de célula menos diferenciada. La desdiferenciación se refiere al proceso por el que una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) en el linaje de una célula. Como aquí se usa, el linaje de una célula define la herencia de una célula, esto es, de qué célula viene y qué célula da lugar a. El linaje de una célula coloca a la célula en un programa hereditario de desarrollo y diferenciación. Un marcador específico de linaje se refiere a una característica específicamente asociada con el fenotipo de células de linaje de interés y puede usarse para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida con el linaje de interés.

“Las células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo” o “células de etapa 1” o “Etapa 1”, como aquí se usan, se refieren a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CERI, Nodal, FGF8, Braquiuro, proteína homeobox de tipo mezcla, FGF4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 u OTX2. Las células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo incluyen células precursoras de sucesión, células primitivas de sucesión, células de mesendodermo y células de endodermo definitivo.

“Las células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático”, como aquí se usan, se refieren a células que expresan uno de los siguientes marcadores: PDX1, NKX6.1, HNF1 beta, PTFI alfa, HNF6, HNF4 alfa, SOX9, HB9 o PROX1. Las células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático incluyen células de endodermo pancreático, células primitivas de tubo intestinal y células del intestino proximal posterior.

“El endodermo definitivo”, como aquí se usa, se refiere a células que tienen las características de células que surgen del epiblasto durante la gastrulación y que forma el tracto gastrointestinal y sus derivados. Las células de endodermo definitivo expresan los siguientes marcadores: HNF3 beta, GATA4, SOX17, Cerberus, OTX2, goosecoide, C-Kit, CD99 y MIXL1.

“Los marcadores”, como aquí se usan, son moléculas de ácido nucleico o polipéptido que se expresan diferenciadamente en una célula de interés. En este contexto, la expresión diferencial significa un mayor nivel para un marcador positivo y un menor nivel para un marcador negativo. El nivel detectable del ácido nucleico o polipéptido del marcador es suficientemente más alto o más bajo en las células de interés en comparación con otras células, de tal manera que las células de interés pueden identificarse y distinguirse de otras células usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica.

“La célula precursora endocrina pancreática”, como aquí se usa, se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: NGN3, NEUROD o NKX2.2.

“La célula de intestino proximal posterior”, como aquí se usa, se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: PDX1 o HNF6.

“La hormona pancreática inmadura que expresa células”, como aquí se usa, se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: insulina, glucagón, somatostatina, MAFB, PDX1, ARX, NKX.6, NKX2.2 o NEUROD.

“La célula primitiva de tubo de intestino”, como aquí se usa, se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: HNF1 beta o HNF4 alfa.

“La célula endocrina pancreática” o “célula que expresa hormona pancreática” o “células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático”, como aquí se usa, se refiere a una célula capaz de expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

Aislamiento, expansión y cultivo de células madre pluripotentes

Caracterización de células madre pluripotentes

Las células madre pluripotentes pueden expresar uno o más antígenos embrionarios específicos de la etapa (SSEA) 3 y 4, y los marcadores detectables usando anticuerpos designados Tra-1-60 Tra-1-81. La diferenciación de células madre pluripotentes in vitro da como resultado la pérdida de SSEA-4, la expresión de Tra 1-60 y Tra 1-81 (si está presente) y una mayor expresión de SSEA-1. Las células madre pluripotentes no diferenciadas tienen típicamente actividad de fosfatasa alcalina, que puede detectarse fijando las células con 4% formaldehído, y después desarrollando con Vector Rojo como sustrato, como lo describe el fabricante (Vector Laboratories, Burlingame Calif.). Las células madre pluripotentes no diferenciadas también expresan típicamente OCT4 y TERT, como lo detecta RT-PCR.

Otro fenotipo deseable de células madre pluripotentes propagadas es un potencial para diferenciarse en células de las tres capas germinales: tejidos de endodermo, mesodermo y ectodermo. La pluripotencia de células madre pluripotentes puede confirmarse, por ejemplo, inyectando células en ratones inmunodeficientes combinados severos (SCID), fijando los teratomas que se forman usando 4% formaldehído, y después examinándolos

histológicamente para evidencia de tipos de células de los tres grupos germinales. Alternativamente, la pluripotencia puede determinarse mediante la creación de cuerpos embrionarios y evaluando los cuerpos embrionarios para la presencia de marcadores asociados con las tres capas germinales.

5 Las líneas de células madre pluripotentes propagadas pueden identificarse con cariotipo usando una técnica de calificación G y compararse con cariotipos publicados de las correspondientes especies de primates. Si se desea obtener células que tengan un "cariotipo normal", lo que significa que las células son euploides, donde todos los cromosomas humanos están presentes y no se alteran perceptiblemente.

10 *Fuentes de células madre pluripotentes*

Los tipos de células madre pluripotentes que pueden usarse incluyen líneas establecidas de células pluripotentes derivadas de tejidos formados después de la gestación, incluyendo tejido pre-embionario tejido fetal tomado en cualquier momento durante la gestación, típicamente aunque no necesariamente antes de aproximadamente la semana 10 a 12 de gestación. Los ejemplos no limitativos son líneas establecidas de células madre embrionarias humanas o células germinales embrionarias humanas. También se contempla el uso de las composiciones de esta divulgación durante el establecimiento inicial o estabilización de tales células, en cuyo caso las células fuente serían células pluripotentes primarias tomadas directamente de los tejidos fuentes. También son adecuadas las células tomadas de una población de células madre pluripotentes ya cultivada en ausencia de células alimentadoras. También son adecuadas las líneas de células madre embrionarias humanas mutantes.

Cultivo de células madre pluripotentes

25 En una realización, las células madre pluripotentes se cultivan en una capa de células alimentadoras que mantienen a las células madre pluripotentes de varias maneras. Alternativamente, las células madre pluripotentes se cultivan en un sistema de cultivo que está esencialmente libre de células alimentadoras, pero que, sin embargo, mantiene la proliferación de células madre pluripotentes sin sufrir una sustancial diferenciación. El crecimiento de células madre pluripotentes en un cultivo libre de alimentadores sin diferenciación se mantiene usando un medio acondicionado cultivando previamente otro tipo de célula. Alternativamente, el crecimiento de células madre pluripotentes en un cultivo libre de alimentadores sin diferenciación se mantiene usando un medio químicamente definido.

35 En una realización, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en una capa celular alimentadora de fibroblasto embrionario de ratón de acuerdo con los métodos desvelados en Reubinoff et al (Nature Biotechnology 18: 399-404 (2000)). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en una capa celular alimentadora de fibroblasto embrionario de ratón de acuerdo con los métodos desvelados en Thompson et al. (Science 6 noviembre 1998: Vol. 282, nº 5391, págs.: 1145 – 1147). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en uno cualquiera de las capas celulares alimentadoras desveladas en Richards et al (Stem Cell 21: 546-556, 2003).

40 En una realización, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en una capa celular alimentadora humana de acuerdo con los métodos desvelados en Wang et al (Stem Cell 23: 1221-1227, 2005). En una realización alternativa, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en la capa celular alimentadora humana desvelada en Stojkovic et al (Stem Cell 2005 23: 306-314, 2005). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en la capa celular alimentadora humana desvelada en Miyamoto et al (Stem Cell 22: 433-440, 2004). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en la capa celular alimentadora humana desvelada en Amit et al (Biol. Reprod 68: 2150-2156, 2003). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en la capa celular alimentadora humana desvelada Izunza et al. (Stem Cell 23: 544-549, 2005).

50 En una realización, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en un medio de cultivo derivado de acuerdo con los métodos desvelados en US200020072117. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en un medio de cultivo derivado de acuerdo con los métodos desvelados en US6642048. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en un medio de cultivo derivado de acuerdo con los métodos desvelados en WO2005014799. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en un medio de cultivo derivado de acuerdo con los métodos desvelados en Xu et al (Stem Cell 22: 972-980, 2004). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en un medio de cultivo derivado de acuerdo con los métodos desvelados en US20070010011. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en un medio de cultivo derivado de acuerdo con los métodos desvelados en US20050233446. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en un medio de cultivo derivado de acuerdo con los métodos desvelados en US6800480. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en un medio de cultivo derivado de acuerdo con los métodos desvelados en WO2005065354.

65 En una realización, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos desvelados en Cheon et al (BioReprod DOI:10.1095/biolreprod.105.046870, octubre 19, 2005). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos desvelados en Levenstein et al (Stem Cell 24: 568-574, 2006). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los

métodos desvelados en US20050148070. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos desvelados en US20050244962. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos desvelados en WO2005086845.

5 Las células madre pluripotentes pueden colocarse en placas en un sustrato adecuado de cultivo. En una realización, el sustrato adecuado de cultivo es un componente de matriz extracelular, como, por ejemplo, aquellos derivados de membrana de base o pueden formar parte de enlaces de adhesión molecular receptor-ligando. E una realización, el sustrato adecuado de cultivo es MATRIGEL® (Becton Dickenson). MATRIGEL® es una preparación soluble de células tumorales de Engelbreth-Holm que gelifica a temperatura ambiente para formar una membrana de base reconstituida.

10 Otro componente de matriz extracelular y mezclas de componentes son adecuados como alternativa. Dependiendo del tipo de célula que se está proliferando, éste puede incluir laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, heparán sulfato y similares, solos o en varias combinaciones.

15 Las células madre pluripotentes pueden colocarse en placa en un sustrato en una distribución adecuada y en presencia de un medio que impulse la supervivencia, propagación y retención celular de las características deseable. Todas estas características se benefician de una atención cuidadosa en la distribución de siembra y un experto en la técnica puede determinarlas fácilmente.

20 Los medios de cultivo adecuados pueden hacerse a partir de los siguientes componentes, como, por ejemplo, medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), Gibco # 11965-092; medio de Eagle modificado de Dulbecco Knockout (DMEM KO), Gibco # 10829-018; F12 de Ham/50% medio basal DMEM; 200 mM L-glutamina, Gibco # 15039-027; solución de aminoácido no esencial, Gibco 11140-050; β-mercaptoetanol, Sigma # M7522; factor de crecimiento de fibroblasto básico recombinante humano (FCFb), Gibco # 13256-029.

Formación de células precursoras endocrinas pancreáticas a partir de células madre pluripotentes

30 La presente invención proporciona métodos para la formación de una población de células precursoras pancreáticas a partir de una población de células madre pluripotentes. En una realización, la presente invención proporciona métodos para diferenciar además las células precursoras endocrinas en células que expresan marcadores del linaje endocrino pancreático.

35 En una realización, la presente invención proporciona un método para producir células precursoras pancreáticas, que comprende las etapas de:

- a. Cultivar una población de células madre pluripotentes;
- 40 b. Diferenciar la población de células madre pluripotentes en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo;
- c. Diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo en una población de células de tubo intestinal primitivo;
- 45 d. Diferenciar la población de células de tubo intestinal primitivo en una población de células del intestino proximal posterior; y
- e. Diferenciar la población de células del intestino proximal posterior en una población de células precursoras endocrinas pancreáticas tratando la población de células del intestino proximal posterior con un medio complementado con un inhibidor de CYP26A.

50 La población de células precursoras endocrinas puede además tratarse para formar una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.

55 La eficiencia de diferenciación puede determinarse exponiendo una población celular tratada a un agente (tal como un anticuerpo) que específicamente reconoce un marcador de proteína expresado por células que expresan marcadores característicos del tipo deseado de célula.

60 Los métodos para evaluar la expresión de marcadores de proteínas y de ácido nucleico en células cultivadas o aislada son estándar en la técnica. Estos incluyen reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), hibridación Northern, hibridación in situ (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al, eds. 2001 suplemento)) e inmunoensayos como análisis inmunohistoquímicos de material seccionado, electrotransferencia, y para marcadores que son accesible en células intactas, análisis de citometría de flujo (FACS) (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

65

Las características de células madre pluripotentes son bien conocidas para aquellos expertos en la técnica, y continúan identificándose características adicionales de células madre pluripotentes. Los marcadores de células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, la expresión de uno o más de los siguientes: ABCG2, cripto, FOXD3, CONNEXIN43, CONNEXIN45, OCT4, SOX2, NANOG, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, Tra 1-81.

Después de tratar las células madre pluripotentes con los métodos de la presente invención, las células diferenciadas pueden purificarse exponiendo una población de célula tratada a un agente (tal como un anticuerpo) que específicamente reconoce un marcador proteico, como CXCR4, expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo.

Las células madre pluripotentes para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, la línea de célula madre embrionaria humana SA002 (Cellartis, Suecia). También adecuadas para su uso en la presente invención son las células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores característicos de células pluripotentes: ABCG2, cripto, CD9, FOXD3, CONNEXIN43, CONNEXIN45, OCT4, SOX2, NANOG, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60 y Tra 1-81.

Los marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo se seleccionan del grupo consistente en SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Branquiuro, proteína homeobox de tipo mezcla, FGF4, CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 y OTX2. Adecuada para su uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo es una célula precursora primitiva de sucesión. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo es una célula mesendodermo. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo es una célula de endodermo definitivo.

Los marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo (que incluye células del tubo intestinal primitivo y células del intestino proximal posterior) se seleccionan del grupo consistente en PDX1, NKX6.1, HNF1 beta, PTF1 alfa, HNF6, HNF4 alfa, SOX9, HB9 y PROX1. Adecuada para su uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático es una célula de endodermo pancreático.

Los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo consistente en NGN2, NEUROD, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4, NGN3 Y PTF-1 alfa. En una realización, una célula endocrina pancreática es capaz de expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático. Adecuada para su uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endocrino pancreático es una célula endocrina pancreática. La célula endocrina pancreática puede ser una célula que expresa hormona pancreática. Alternativamente, la célula endocrina pancreática puede ser una célula que secreta hormona pancreática.

En un aspecto de la presente invención, la célula endocrina pancreática es una célula que expresa marcadores característicos del linaje celular β . Una célula que expresa marcadores característicos del linaje celular β . Una célula que expresa marcadores característicos del linaje celular β expresa PDX1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN2, NKX2.2, NKX6.1, NEUROD, ISL1, HNF3 beta, MAFA, PAX4 y PAX6. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje celular β es una célula β .

Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de células madre pluripotentes

Las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo pueden formarse a partir de poblaciones de células madre pluripotentes mediante cualquier método en la técnica.

Por ejemplo, las poblaciones de células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en D' Amour et al, Nature Biotechnology 23, 1534 – 1541 (2005).

Por ejemplo, las poblaciones de células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en Shinozaki et al, Development 131, 1651 – 1662 (2004).

Por ejemplo, las poblaciones de células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en McLean et al., Stem Cells 25, 29 – 38 (2007).

5 Por ejemplo, las poblaciones de células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en D' Amour et al., Nature Biotechnology 24, 1392 – 1401 (2006).

10 Por ejemplo, las poblaciones de células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en la solicitud de patente de Estados Unidos N° de Serie 11/736.908.

15 Por ejemplo, las poblaciones de células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en la solicitud de patente de Estados Unidos N° de Serie 11/779.311.

20 Por ejemplo, las poblaciones de células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en la solicitud de patente de Estados Unidos N° de Serie 12/493.741.

25 Por ejemplo, las poblaciones de células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en la solicitud de patente de Estados Unidos N° de Serie 12/494.789.

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

30 Las células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático incluyen células de endodermo pancreático, células de tubo intestinal primitivo y células de intestino proximal posterior. En una realización, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo formadas mediante los métodos de la presente invención se diferencian además en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático mediante un método en la técnica.

35 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo obtenidas de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden además diferenciarse en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en D' Amour et al., Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006).

40 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo obtenidas de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden además diferenciarse en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en la solicitud de patente de Estados Unidos N° de Serie 11/736.908.

Formación de población de células precursoras endocrinas pancreáticas

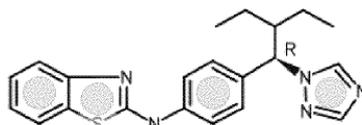
45 En una realización, la presente invención proporciona un método para producir células precursoras pancreáticas, que comprende las etapas de:

- 50 a. Cultivar una población de células madre pluripotentes;
- b. Diferenciar la población de células madre pluripotentes en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo;
- c. Diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo en una población de células de tubo intestinal primitivo;
- 55 d. Diferenciar la población de células de tubo intestinal primitivo en una población de células del intestino proximal posterior; y
- e. Diferenciar la población de células del intestino proximal posterior en una población de células precursoras endocrinas pancreáticas tratando la población de células del intestino proximal posterior con un medio complementado con un inhibidor de CYP26A.

60 El inhibidor de CYP26A puede usarse en una concentración de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1000 nM. Alternativamente, el inhibidor de CYP26A puede usarse en una concentración de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 nM.

65

Cualquier inhibidor de CYP26A es adecuado para su uso en la presente invención. Por ejemplo, el inhibidor de CYP26A puede seleccionarse de los compuestos desvelados en la patente de Estados Unidos N° 7.468.391. Alternativamente, el inhibidor de CYP26A puede seleccionarse de los compuestos desvelados en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 2005/0187298A1. Alternativamente, el inhibidor de CYP26A puede seleccionarse de los compuestos desvelados en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 2004/0106216A1. Alternativamente, el inhibidor de CYP26A puede seleccionarse de los compuestos desvelados en WO2005058301A1. Alternativamente, el inhibidor de CYP26A puede seleccionarse de los compuestos desvelados en PNAS 12 Mayo, 2009, vol. 106, n° 19 7864-7869. En una realización, el inhibidor de CYP26A es N-{4-[2-Etil-1-(1H-1, 2, 4, triazol-1-il)butilo]fenilo}-1, 3-benzotiazol-2-amina. Véase la Fórmula I.



Fórmula I

En una realización, el medio complementado con un inhibidor de CYP26A se complementa además con al menos un factor seleccionado del grupo consistente en un factor capaz de inhibir un BMP, un inhibidor señalizador receptor de TGF β , vitamina A y un activador de PKC.

En una realización, el factor capaz de inhibir BMP es nogina. Puede usarse nogina en una concentración de desde aproximadamente 50ng/ml a aproximadamente 500 μ g/ml. En una realización, se usa nogina en una concentración de 100ng/ml.

En una realización, el inhibidor señalizador de TGF β es un inhibidor de ALK5. En una realización, el inhibidor de ALK5 es un inhibidor II de ALK5. El inhibidor II de ALK5 puede usarse en una concentración de desde aproximadamente 0,1 μ M a aproximadamente 10 μ M. En una realización, el inhibidor II de ALK5 se usa en una concentración de 1 μ M.

En una realización, el activador de PKC se selecciona del grupo consistente en (2S, 5S)-(E, E)-8-(5-(4-(Trifluorometil) fenil)-2,4-pentadiemoilamino) benzolactam, Indolactam V (ILV), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), y forbol-12,13-dibutirato (PDBu). En una realización, el activador de proteína quinasa C es (2S, 5S)-(E, E)-8-(5-(4-(Trifluorometil) fenil)-2,4-pentadiemoilamino) benzolactam. (2S, 5S)-(E, E)-8-(5-(4-(Trifluorometil)fenil)-2,4-pentadiemoilamino) benzolactam puede usarse en una concentración de desde aproximadamente 20nM a aproximadamente 500nM. (2S, 5S)-(E, E)- 8-(5-(4-(Trifluorometil)fenil)-2,4-pentadiemoilamino) benzolactam, es aquí referido como "TPB".

Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático

En una realización, la población de células precursoras endocrinas pancreáticas producidas mediante los métodos de la presente invención se diferencian en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático mediante un método en la técnica.

Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático pueden además diferenciarse en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en D' Amour et al., Nature Biotechnology, 2006.

Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático pueden además diferenciarse en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en D' Amour et al., Nature Biotechnology, 2006. (este párrafo es idéntico al anterior).

Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático pueden además diferenciarse en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en la solicitud de patente de Estados Unidos N° de Serie 11/736.908.

Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático pueden además diferenciarse en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje de

endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en la solicitud de patente de Estados Unidos N° de Serie 11/779.311.

5 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático pueden además diferenciarse en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en la solicitud de patente de Estados Unidos N° de Serie 60/953.178.

10 Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático pueden además diferenciarse en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo de acuerdo con los métodos desvelados en la solicitud de patente de Estados Unidos N° de Serie 60/990.529.

15

La presente invención se ilustra más, pero no se limita a, los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

20 Ejemplo de Referencia 1

Diferenciación de células de línea de célula madre embrionaria humana H1 en células precursoras endocrinas pancreáticas en medio de cultivo celular que carece de SFB y que contiene un inhibidor de CYP26A.

25

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (p40-p50) se cultivaron en platos cubiertos con MATRIGEL® (dilución 1:30) (BD Biosciences; Cat # 356231) en MEF-CM (medio acondicionado con fibroblasto embrionario de ratón) como colonias y se diferenciaron en células precursoras endocrinas pancreáticas de la siguiente manera:

30

a. Fase I (Endodermo definitivo): Células madre embrionarias humanas se cultivaron en medio RPMI complementado con 2% BSA libre de ácido graso (Catálogo# 68700, Proliant, IA), y 100 ng/ml activina A (R&D Systems, MN) más 20 ng/ml WNT-3a (Catálogo# 100-18B-PeproTech, NJ), durante un día, seguido de tratamiento con medio RPMI complementado con 2% BSA y 100 ng/ml activina A más 8 ng/ml de bFGF durante dos días adicionales, después

35

b. Fase II (Tubo de intestino primitivo): Las células se trataron con RPMI + 2% BSA libre de ácido graso y 50 ng/ml FGF7, durante días, después

40

c. Fase III (Intestino proximal posterior): Las células se trataron con DMEM/Glucosa alta complementado con dilución 1:200 de ITS-X (Invitrogen, CA) y 0,1% BSA (rico en lípido) (Invitrogen, Ca, N° 11021-045), 50 ng/ml FGF7, 0,25 µM SANT-1,2 ácido retinoico (AR) (Sigma, MO); 100 mg/ml de Nogina (R&D Systems, MN), 2,5 µM 4-[4-(4-Fluorofenil)-1-(3-fenilpropil)-5-piridin-4-il-1H-imidazol-2-il]but-3-in-1-ol (un inhibidor de P38 desvelado en la patente de Estados Unidos 6.521.655), y activina A en 20 ng/ml durante cinco días, después,

45

d. Fase IV (precursor endocrino pancreático): Las células se trataron con DMEM/Glucosa alta complementado con dilución 1:200 de ITS-X (Invitrogen, CA) y 0,1% BSA (Invitrogen, Ca), 100 ng/ml Nogina, 1 mM inhibidor de ALK5 (SD-208, desvelado en Molecular Pharmacology 2007 72:152-161), 500 nM TPB (modulador de proteínas precursora amiloide α) (Catálogo #565740, EMD, CA), y 10-100 nM del inhibidor de CYP26A N-{4-[2-Etil-1-(1H-1, 2, 4-triazol-1-il)butil]fenil}-1, 3-benzothiazol-2-amina, y 10-100 nM Vitamina A (Catálogo# R7632, Sigma, MO) durante cuatro días, o

50

En algunos cultivos, la Fase IV se extendió a seis días. mRNA se aisló en las fases III y IV para análisis PCR a tiempo real de genes pancreáticos relacionados. Como se muestra en la Figura 1, la adición del inhibidor de CYP26A en la fase IV impulsó de manera significativa la expresión de marcadores precursores endocrinos (NGN3, Pax4, NeuroD) junto con el marcador de endodermo pancreático NKX6.1 de una manera dependiente de dosis. La adición de Vitamina A junto con el inhibidor de CYP26A no modificó de manera significativa la expresión de endodermo pancreático o marcadores de precursor endocrino. Además, la adición del inhibidor de CYP26A en la fase IV disminuyó la expresión de CDX2 (un marcador intestinal) y albúmina (un marcador del hígado). La inmunotinción para NGN3 (Catálogo# AF3444, R&D Systems, MN) en la fase IV mostró claramente un impulso significativo en la expresión de NGN3 para cultivos tratados con 100 nM del inhibidor de CYP26A.

55

60

Ejemplo de Referencia 2

65

Un método alternativo para la diferenciación de células de la línea de célula madre embrionaria humana H1 en células precursoras endocrinas pancreáticas en medio de cultivo celular que carece de SFB y que contiene un inhibidor de CYP26A.

5 Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (p40-p52) se cultivaron como células sencillas en una densidad de 100000 células/m² en platos cubiertos con MATRIGEL® (dilución 1:30) (BD Biosciences; Cat # 356231) en MEF-CM (medio acondicionado con fibroblasto embrionario de ratón complementado con 16 ng/ml de FGF2 (Catálogo# 100-18B, PeproTech, NJ) y 10 µM de Y27632 (Inhibidor Rock, , Catálogo# Y0503, Sigma, MO). 72 horas después de la siembra, los cultivos se diferenciaron en endodermo definitivo (ED) de la siguiente manera:

15 a. Fase I (Endodermo Definitivo): Las células madre embrionarias humanas se trataron con medio MCDB-131 (Catálogo# 10372-019, Invitrogen, CA) complementado con 2% BSA libre de ácido graso (Catálogo# 68700, Proliant, IA), 0,0025 g/ml bicarbonato de sodio (Catálogo # S3187, Sigma, MO), 1X GlutaMax™ (Catálogo # 35050-079, Invitrogen, Ca) y 100 ng/ml activina A (R&D Systems, MN) más 20 ng/ml WNT-3a (Catalog# 1324-WN-002, R&D Systems, MN) durante un día, seguido de tratamiento con medio MCDB-131 complementado con 2% BSA, bicarbonato de sodio, Glutamax y 100 ng/ml activina A durante tres días más, después

20 b. Fase II (Tubo de intestino primitivo): Las células se trataron con MCDB-131 + 2% BSA libre de ácido graso y 50 ng/ml FGF7 y durante tres días, después

25 c. Fase III (Intestino proximal posterior): Las células se trataron con MCDB-131/Glucosa alta (25 mM glucosa) complementado con dilución 1:200 de ITS-X (Invitrogen, CA), 1X GlutaMax™ (Catálogo # 35050-079, Invitrogen, Ca), 0,0025 g/ml bicarbonato de sodio (Catálogo # S3187, Sigma, MO), 0,1% BSA (rico en lípico) (Invitrogen, Ca N° 11021-045), 50 ng/ml FGF7, 0,25 µM SANT-1, 2 µM ácido retinoico (AR) (Sigma, MO), 2,5 µM 4-[4-(4-Fluorofenil)-1-(3-fenilpropil)- 5-piridin-4-yl-1H-imidazol-2-il]but-3-in-1-ol (un inhibidor de p38, desvelado en la patente de Estados Unidos 6.521.65), 100 nM LDN-193189 (inhibidor de receptor BMP, Catálogo # 04-0019, Stemgent, CA), 500 nM del inhibidor de CYP26A N-{4-[2-Etil-1-(1H-1, 2, 4-triazol-1-il)butil]fenil}-1, 3-benzotiazol-2-amina, y activina A en 20 ng/ml durante cuatro días, después

35 d. Fase IV (Precursor endocrino pancreático): Las células se trataron con MCDB-131/Glucosa alta (25 mM glucosa) complementado con dilución 1:200 de ITS-X (Invitrogen, CA) y 0,1% BSA (Invitrogen, CA), 1X, GlutaMax™ (Catálogo# 35050-079, Invitrogen, Ca), 0,0025 g/ml bicarbonato de sodio (Catálogo # S3187, Sigma, MO), 1 µM inhibidor de ALK5 (SD-208, desvelado en Molecular Pharmacology 2007 72:152-161), 500 nM PDBu (activador de PKC) (Catálogo #P1269, Sigma, MO), 100 nM LDN-193189 (receptor inhibidor de BMP, Catálogo # 04-0019, Stemgent, CA), 0,25 µM SANT-1 (#S4572, Sigma, MO), y 500 nM del inhibidor de CYP26A N-{4-[2-Etil-1-(1H-1,2, 4-triazol-1-il)butil]fenil}-1, 3-benzotiazol-2-amina durante siete días, o

40 e. Fase IV (precursor endocrino pancreático): Las células se trataron con MCDB-131/Glucosa alta (25 mM glucosa) complementado con dilución 1:200 de ITS-X (Invitrogen, CA), y 0,1% BSA (Invitrogen, CA), 1X GlutaMax™ (Catálogo# 35050-079, Invitrogen, Ca), 0,0025 g/ml bicarbonato de sodio (Catálogo # S3187, Sigma, MO), 1 µM inhibidor de ALK5 (SD-208, desvelado en Molecular Pharmacology 2007 72:152-161), 500 nM PDBu (activador de PKC) (Catálogo #P1269, Sigma, MO), 100 nM LDN-193189 (receptor inhibidor de BMP, Catálogo # 04-0019, Stemgent, CA), 0,25 µM SANT-1 (#S4572, Sigma, MO) durante siete días.

50 Se aisló mRNA en las etapas III y IV para análisis PCR en tiempo real de genes pancreáticos relacionados. De manera similar a los resultados observados en el Ejemplo de Referencia 1 anterior, la adición del inhibidor de CYP26A en la fase IV mejoró la expresión de marcadores precursores endocrinos pancreáticos, como NGN3 y NeuroD (Véase Figura 2). La adición del inhibidor en las etapas III y IV mejoró además la expresión de NGN3 y NeuroD. Sorprendentemente, la adición del inhibidor de CYP26A en la fase III (en presencia de ácido retinoico) significativamente reguló mediante reducción de PDX-1 y NKX6.1, mientras mejoró la expresión de CDX2. Estos resultados sugieren que la fase óptima para la adición de inhibidor de CYP26A es la fase IV.

55 **Ejemplo de Referencia 3**

Un método alternativo para la diferenciación de células de la línea de célula madre embrionaria humana H1 en células endocrinas pancreáticas en medio de cultivo celular que carece de SFB y que contiene un inhibidor de CYP26A.

60 Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (p40-p52) se cultivaron como células sencillas en una densidad de 100000 células/m² en platos cubiertos con MATRIGEL® (dilución 1:30) (BD Biosciences; Cat # 356231) en MEF-CM (medio acondicionado con fibroblasto embrionario de ratón complementado con 16 ng/ml de FGF2 (Catálogo# 100-18B, PeproTech, NJ) y 10 µM de Y27632 (Inhibidor Rock, , Catálogo# Y0503, Sigma, MO). 72 horas después de la siembra, los cultivos se diferenciaron en endodermo definitivo (ED) de la siguiente manera:

65

- 5 a. Fase I (Endodermo Definitivo): Las células madre embrionarias humanas se cultivaron como células sencillas en platos cubiertos con Matrigel con medio MCDB-131 (Catálogo# 10372-019, Invitrogen, CA) complementado con 2% BSA libre de ácido graso (Catálogo# 68700, Proliant, IA), 0,0025 g/ml bicarbonato de sodio (Catálogo# S3187 Sigma, MO), 1X GlutaMax™ (Catálogo # 35050-079, Invitrogen, Ca) y 100 ng/ml GDF-8 (R&D Systems, MN) más 2,5 µg/ml del inhibidor de GSK3B 14-Prop-2-en-1-il,3,5,7,14,17,23,27-heptaazatetraciclo [19.3.1.1≈2,6≈1≈8,12≈]heptacos-1(25), 2(27), 3, 5, 8 (26), 9, 11, 21-23-nonaen-16-uno durante un día seguido de tratamiento con medio MCDB-131 complementado con 2% BSA, bicarbonato de sodio, Glutamax y 100 ng/ml GDF-8 durante tres días más, después
- 10 b. Fase II (Tubo de intestino primitivo): Las células se trataron con MCDB-131 + 2% BSA libre de ácido graso y 50 ng/ml FGF7 y durante dos días, después
- 15 c. Fase III (Intestino proximal posterior): Las células se trataron con MCDB-131/Glucosa alta (25 mM glucosa) complementado con dilución 1:200 de ITS-X (Invitrogen, CA), 1X GlutaMax™ (Catálogo # 35050-079, Invitrogen, Ca), 0,0025 g/ml bicarbonato de sodio (Catálogo # S3187, Sigma, MO), 0,1% BSA (rico en lípico) (Invitrogen, Ca N^o 11021-045), 50 ng/ml FGF7, 0,25 µM SANT-1, 2 µM ácido retinoico (AR) (Sigma, MO), 2,5 µM 4-[4-(4-Fluorofenil)-1-(3-fenilpropil)-5-piridin-4-il-1H-imidazol-2-il]but-3-in-1-ol), 100 nM LDN-193189 (inhibidor de receptor BMP, Catálogo # 04-0019, Stemgent, CA) y activina A en 20 ng/ml durante cuatro días, después
- 20 d. Fase IV (Precursor pancreático): Las células se trataron con MCDB-131/Glucosa alta (25 mM glucosa) complementado con dilución 1:200 de ITS-X (Invitrogen, CA) y 0,1% BSA (Invitrogen, CA), 1X, GlutaMax™ (Catálogo# 35050-079, Invitrogen, Ca), 0,0025 g/ml bicarbonato de sodio (Catálogo # S3187, Sigma, MO), 100 nM LDN-193189 (inhibidor de receptor BMP, Catálogo # 04-0019, Stemgent, CA), 50 nM PDBu (activador PKC) (Catálogo #P1269, Sigma, SO), 0,25 µM SANT-1 (#S4572, Sigma, MO), y 100 nM del inhibidor de CYP26A N-{4-[2-Etil-1-(1H-1,2, 4-triazol-1-il)butil]fenil}-1, 3-benzotiazol-2-amina durante tres días, después
- 25 e. Fase V (precursor endocrino pancreático): Las células se trataron con MCDB-131/Glucosa alta (25 mM glucosa) complementado con dilución 1:200 de ITS-X (Invitrogen, CA), y 0,1% BSA (Invitrogen, CA), 1X GlutaMax™ (Catálogo# 35050-079, Invitrogen, Ca), 0,0025 g/ml bicarbonato de sodio (Catálogo # S3187, Sigma, MO), 100 nM LDN-193189 (inhibidor de receptor BMP, Catálogo # 04-0019, Stemgent, CA), 0,25 µM SANT-1 (#S4572, Sigma, MO), 2 µM inhibidor de ALK5 (SD-208, desvelado en Molecular Pharmacology 2007 72:152-161) y 100 nM del inhibidor de CYP26A N-{4-[2-Etil-1-(1H-1,2, 4-triazol-1-il)butil]fenil}-1, 3-benzotiazol-2-amina durante tres días, después
- 30 f. Fase VI (células que expresan hormona pancreática inmadura). Las células se trataron con MCDB-131/Glucosa alta (25 mM glucosa) complementado con dilución 1:200 de ITS-X (Invitrogen, CA), y 0,1% BSA (Invitrogen, CA), 1X GlutaMax™ (Catálogo# 35050-079, Invitrogen, Ca), 0,0025 g/ml bicarbonato de sodio (Catálogo # S3187, Sigma, MO), 100 nM LDN-193189 (inhibidor de receptor BMP, Catálogo # 04-0019, Stemgent, CA) y 2 µM inhibidor de ALK5 (SD-208, desvelado en Molecular Pharmacology 2007 72:152-161) durante tres días, después
- 35 g. Fase VII (células que expresan hormona pancreática). Las células se trataron con MCDB-131/Glucosa alta (25 mM glucosa) complementado con dilución 1:200 de ITS-X (Invitrogen, CA), y 0,1% BSA (Invitrogen, CA), 1X GlutaMax™ (Catálogo# 35050-079, Invitrogen, Ca), 0,0025 g/ml bicarbonato de sodio (Catálogo # S3187, Sigma, MO), 100 nM LDN-193189 (inhibidor de receptor BMP, Catálogo # 04-0019, Stemgent, CA) y 2 µM inhibidor de ALK5 (SD-208, desvelado en Molecular Pharmacology 2007 72:152-161) y 100 nM Vitamina A (Catálogo# R7632, Sigma, MO) durante tres días.
- 40
- 45
- 50

55 En algunos de los cultivos, la fase VII se extendió hasta 18 días. Se recogieron muestras en las fases V, VI y para análisis PCR en tiempo real, tinción con inmunofluorescencia (IF) y análisis FACS. Tanto para FACS como para tinción con inmunofluorescencia (IF), el anticuerpo NKX6.1 se obtuvo del banco de hibridomas de la Universidad de Iowa (Catálogo# ab76541, Cambridge, MA), y el anticuerpo PDX-1 se compró en Abcam (Catálogo# ab47267). La Figura 3 subraya la morfología de cultivos en varias etapas de diferenciación. Siguiendo la etapa II, los cultivos mostraron morfología homogénea a lo largo de las etapas III-VI. La Figura 4 representa la expresión de NKX6.1 como lo midió FACS para varias etapas de diferenciación. Esta figura subraya que el protocolo desvelado en el Ejemplo de Referencia 3 puede conservar la expresión de NKX6.1 a lo largo de las etapas tardías de diferenciación. La Figura 5 muestra la tinción IF para la expresión de PDX1, NKX6.1 y CDX2 para la etapa V y etapa VII del protocolo. Más del 90% de las células positivas para NKX6.1 fueron también positivas para PDX1, mientras que menos del 10% de las células se tiñeron positivas para CDX2.

60

65 Aunque varios aspectos de la invención se han ilustrado anteriormente por referencia a los ejemplos y realizaciones preferentes, se apreciará que el alcance de la invención está definida por la descripción anterior sino por las siguientes reivindicaciones construidas bajo principios de la ley de patentes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para derivar una población de células precursoras endocrinas pancreáticas de células madre pluripotentes que comprende las etapas de:
- 6 a. cultivar una población de células madre pluripotentes;
- 7 b. diferenciar las células madre pluripotentes en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo;
- 8 c. diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo en una población de células de tubo intestinal primitivo;
- 9 d. diferenciar la población de células de tubo intestinal primitivo en una población de células del intestino proximal posterior; y
- 10 e. tratar la población de las células del intestino proximal posterior con un medio complementado con un inhibidor de CYP26A.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, donde el inhibidor de CYP26A se usa en una concentración de desde aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1000 nM.
3. El método de la reivindicación 1, donde el inhibidor de CYP26A se usa en una concentración de desde aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 nM.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el inhibidor de CYP26A es N-{4-[2-Etil-1-(1H-1, 2, 4-triazol-1-il)butil]fenil}-1, 3-benzotiazol-2-amina.
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la población de células precursoras endocrinas pancreáticas se diferencia además en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el medio complementado con un inhibidor de CYP26A se complementa además con al menos un factor seleccionado del grupo consistente en un factor capaz de inhibir BMP, un inhibidor señalizador de receptor TGFβ, vitamina A y activador de proteína quinasa C (PCK).
7. El método de la reivindicación 6, donde el factor capaz de inhibir BMP es nogina.
- 35 8. El método de la reivindicación 7, donde la nogina se usa en una concentración de desde aproximadamente 50ng/ml a aproximadamente 500μg/ml o en una concentración de 100ng/ml.
9. El método de la reivindicación 6, donde el inhibidor señalizador de receptor TGFβ es un inhibidor de ALK5, opcionalmente un inhibidor II de ALK5.
- 40 10. El método de la reivindicación 9, donde el inhibidor II de ALK5 se usa en una concentración de desde aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 10 μM o en una concentración de 1 μM.
- 45 11. El método de la reivindicación 6, donde el activador PCK se selecciona del grupo consistente en (2S, 5S)-(E, E)-8-(5-(4-(Trifluorometil) fenil)-2,4-pentadienilamino) benzolactam, Indolactam V (ILV), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) y forbol-12,13-dibutirato (PDBu).
- 50 12. El método de la reivindicación 11, donde el activador de PCK es (2S, 5S)-(E, E)-8-(5-(4-(Trifluorometil) fenil)-2,4-pentadienilamino) benzolactam, opcionalmente usado en una concentración de desde aproximadamente 20nM a aproximadamente 500nM.

50

55

60

65

Figura 1

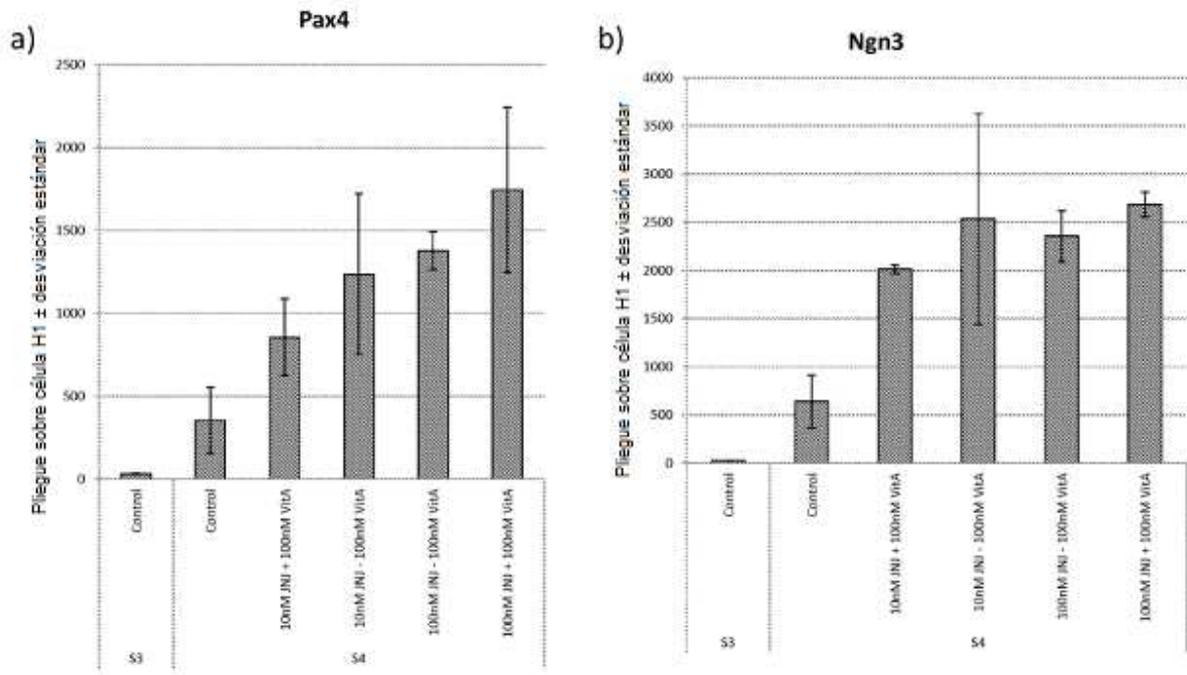


Figura 1 Continuación

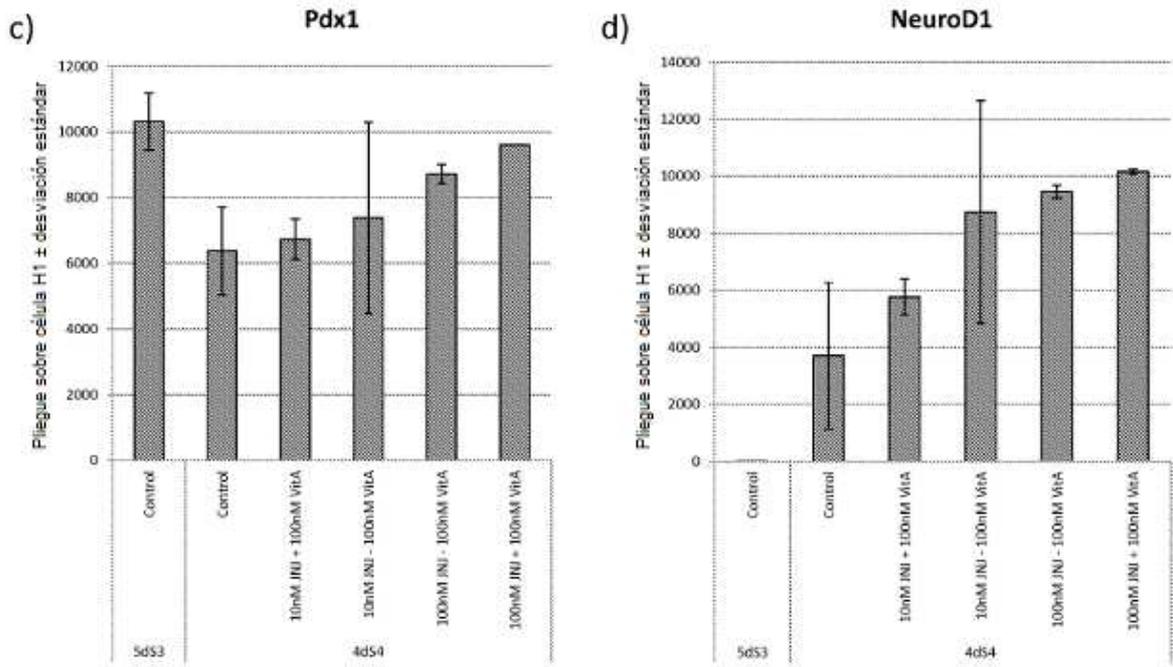


Figura 1 Continuación

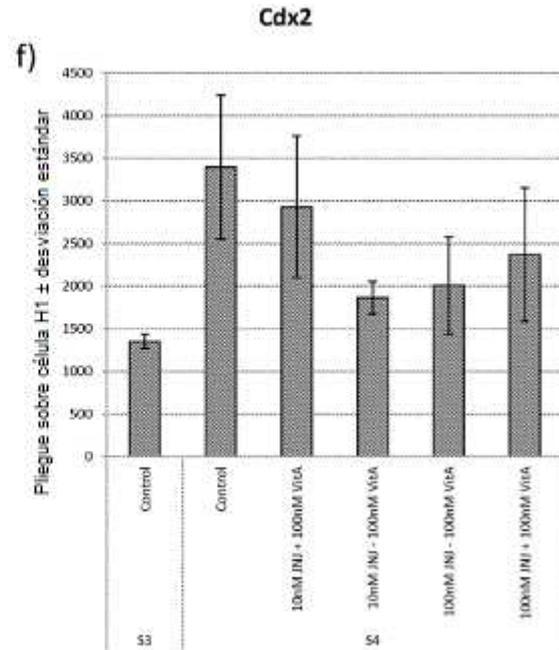
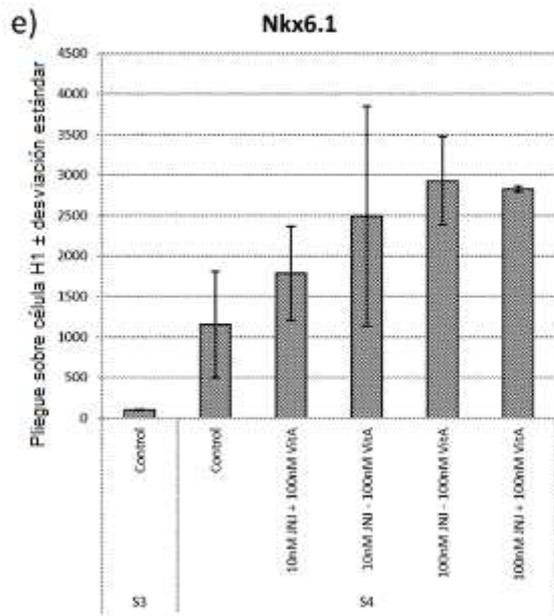


Figura 1 Continuación

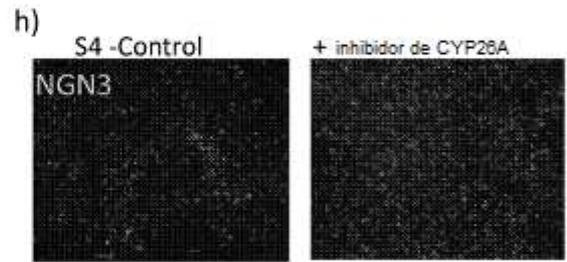
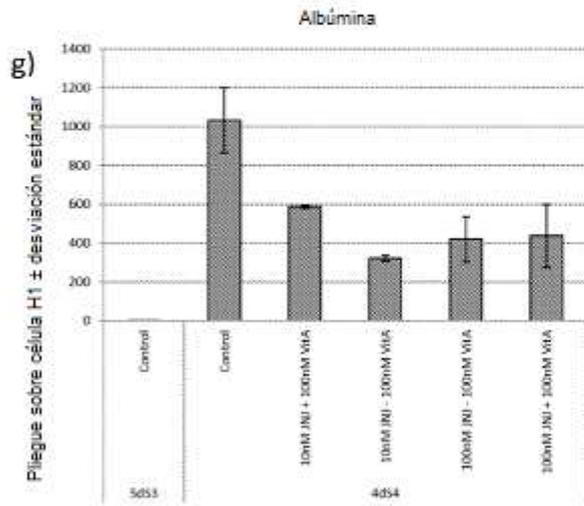


Figura 2

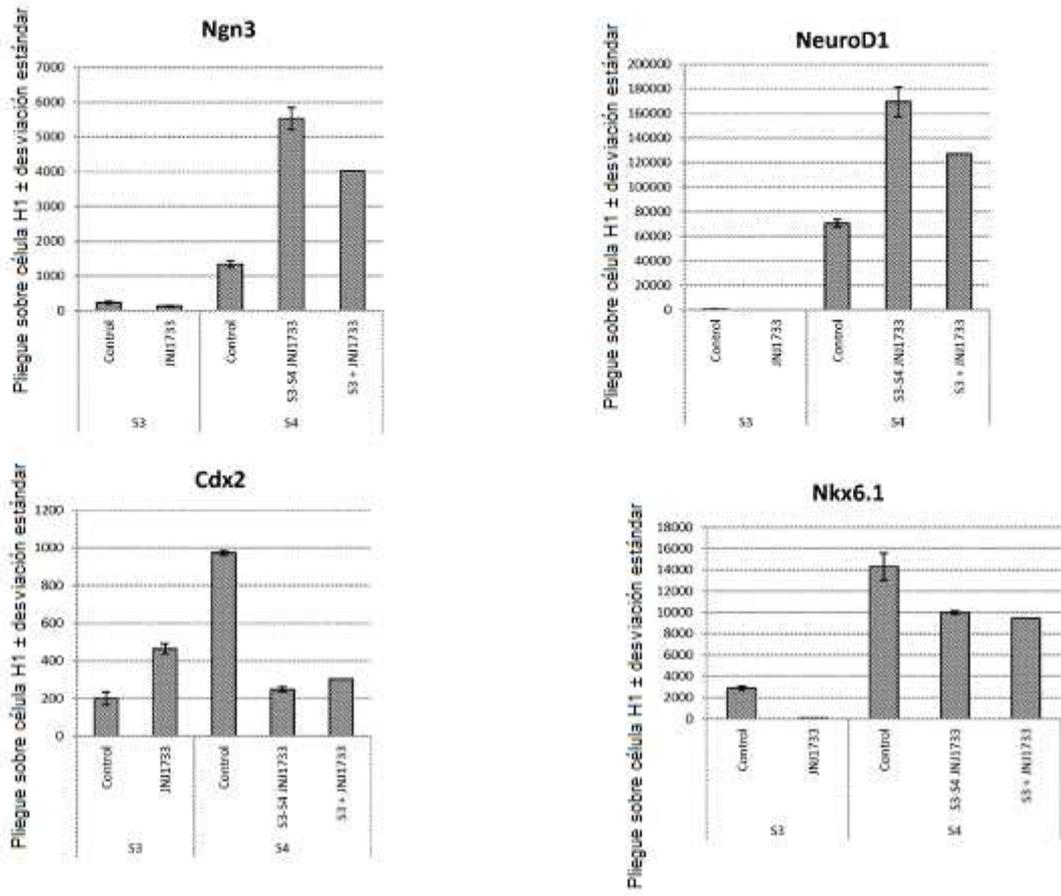


Figura 2 Continuación

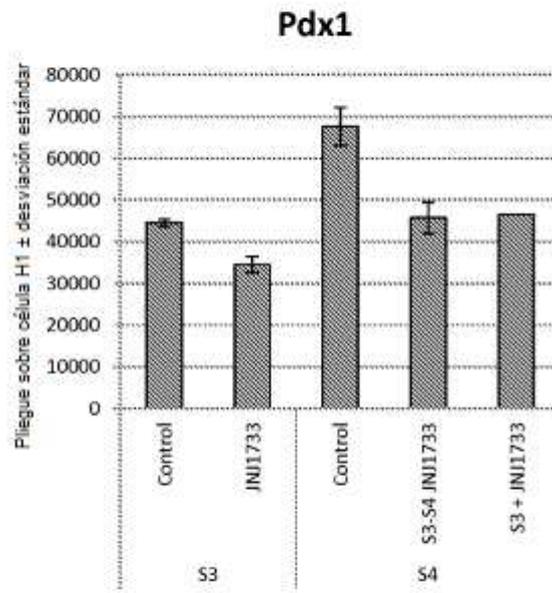


Figura 3

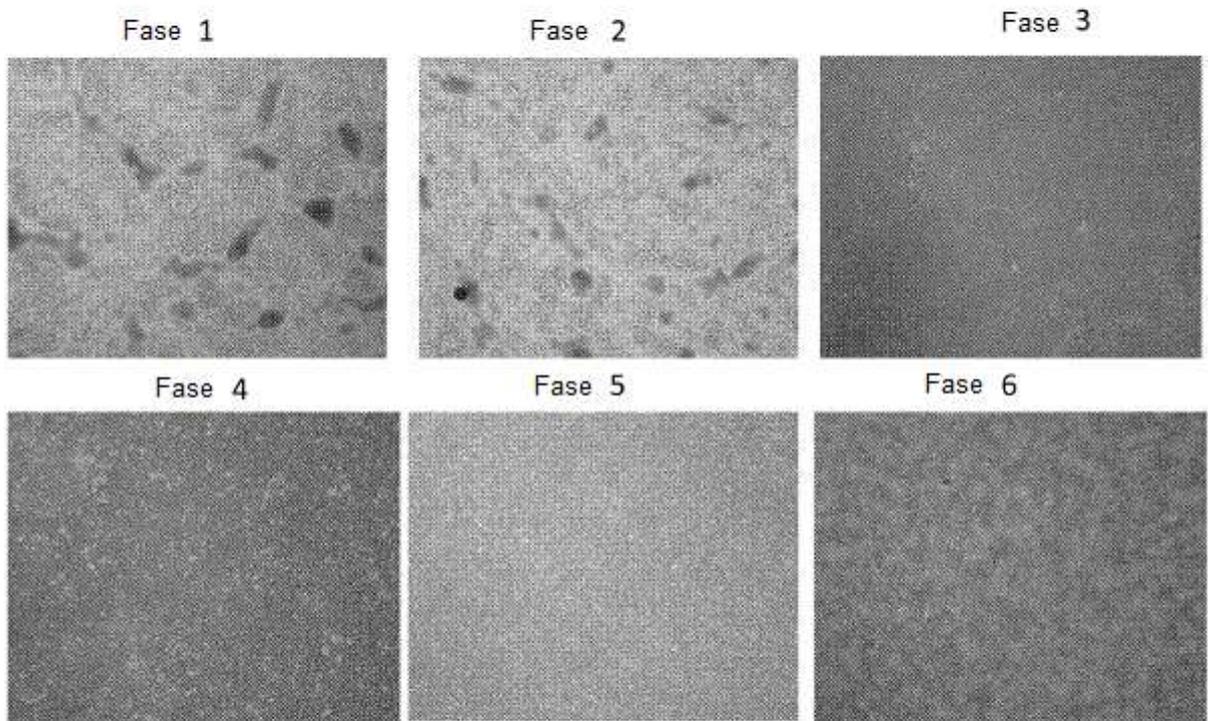


Figura 4

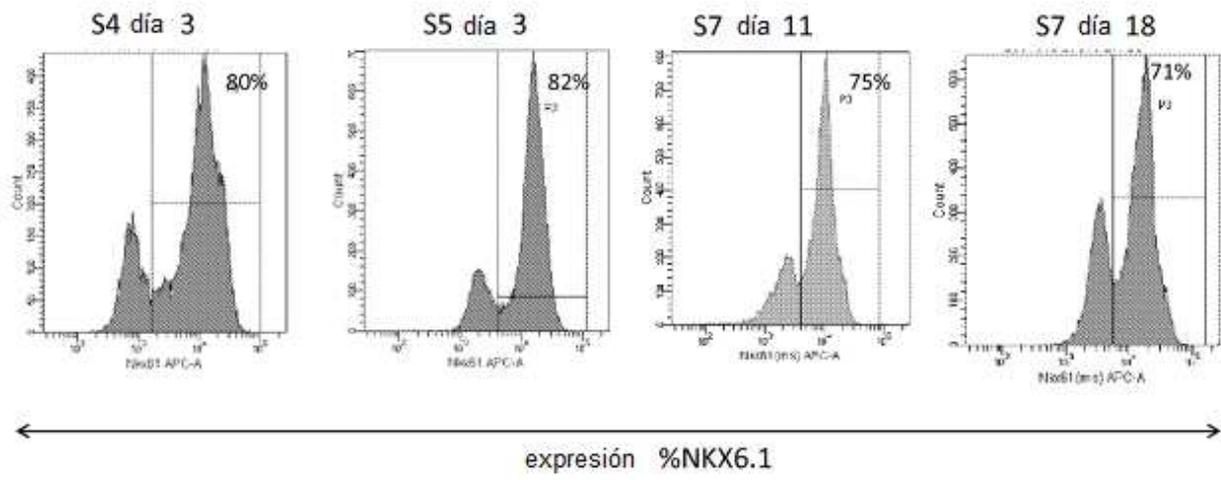


Figura 5

