

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 648**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

**C12N 5/0735** (2010.01)

**C12N 5/02** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2010 PCT/US2010/060770**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011 WO11079018**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2010 E 10840006 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2516626**

54 Título: **Diferenciación de células madre embrionarias humanas**

30 Prioridad:

**23.12.2009 US 289692 P**

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

**22.09.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DAVIS, JANET;  
PARMENTER, CHRISTINE y  
DITOLVO, KEVIN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 633 648 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 embrionarias humanas****DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para estimular la diferenciación de células madre pluripotenciales en células productoras de insulina. En particular, la presente invención proporciona un método para aumentar la expresión de NGN3 y NKX6.1 en las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.

**Antecedentes**

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

Durante el desarrollo embrionario de los vertebrados, una célula pluripotencial da lugar a un grupo de células que comprenden tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) en un proceso conocido como gastrulación. Los tejidos tales como, por ejemplo, el tiroides, el timo, el páncreas, el intestino y el hígado, se desarrollará a partir del endodermo, a través de una etapa intermedia. La etapa intermedia en este proceso es la formación de endodermo definitivo. Las células definitivas del endodermo expresan una serie de marcadores, tales como, beta HNF3, GATA4, MIXL1, CXCR4 y SOX 17.

La formación del páncreas surge de la diferenciación de endodermo definitivo en el endodermo pancreático. Las células del endodermo pancreático expresan el gen homeobox duodenal-pancreático, PDX1. En ausencia de PDX1, el páncreas no logra desarrollarse más allá de la formación de yemas ventrales y dorsales. Por tanto, la expresión de PDX1 marca una etapa crítica en la organogénesis pancreática. El páncreas madura contiene, entre otros tipos de células, tejido exocrino y tejido endocrino. Los tejidos exocrinos y endocrinos surgen de la diferenciación del endodermo pancreático.

Las células que soportan las propiedades de las células de los islotes se han derivado *in vitro*, según se ha informado, de células embrionarias de ratón. Por ejemplo, Lumelsky et al. (Science 292:1389, 2001) señalan que la diferenciación de las células madre de embriones de ratón en estructuras secretoras de insulina es similar a la de los islotes pancreáticos. Soria et al. (Diabetes 49:157, 2000) señalan que las células secretoras de insulina derivadas de las células madre de embriones de ratón normalizan la glucemia cuando se implantan en ratones con diabetes inducida por estreptozotocina.

En un ejemplo, Hori et al. (PNAS 99: 16105, 2002) divulgan que el tratamiento de las células madre de embriones de ratón con inhibidores de la fosfoinositido 3-quinasa (LY294002) produjo células que se parecían a las células  $\beta$ .

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

Micallef *et al.* informan que el ácido retinoico puede regular la implicación de las células madre embrionarias en la formación de endodermos pancreático positivo para PDX1. El ácido retinoico es el más efectivo en la inducción de la expresión de PDX1 cuando se añade a cultivos el día 4 de la diferenciación de la célula madre embrionaria, durante un período que se corresponde con el final de la gastrulación en el embrión (Diabetes 54:301, 2005).

Miyazaki *et al.* informan que una línea de células madre de embrión de ratón sobreexpresa Pdx1. Sus resultados muestran que la expresión exógena de Pdx1 potencia claramente la expresión de insulina, somatostatina, glucoquinasa, neurogenina 3, p48, Pax6, and HNF6 en las células diferenciadas resultantes (Diabetes 53: 1030, 2004).

Skoudy *et al.* informan que la activina A (miembro de la superfamilia de TGF- $\beta$ ) regula por aumento la expresión de los genes pancreáticos exocrinos (p48 y amilasa) y de los genes endocrinos (Pdx1, insulina y glucagón) en células madre de embrión de ratón. Se observó el máximo efecto utilizando activina A 1 nM. También se observó que el nivel de expresión de ARNm de insulina y Pdx1 no se veía afectado por el ácido retinoico; sin embargo, el tratamiento con FGF7 de 3nM dio como resultado un incremento en el nivel de la transcripción de Pdx1 (Biochem. J. 379: 749.2004).

Shiraki et al. estudiaron los efectos de los factores de crecimiento que potencian específicamente la diferenciación de las células madre embrionarias en el interior de las células positivas para Pdx1. Observaron que la reproducibilidad de TGF- $\beta$ 2 producía una mayor proporción de células positivas para PDX1 (Genes Cells. 2005 Jun; 10(6): 503-16.).

Gordon *et al.* demostraron la inducción de células del endodermo [positiva]/ HNF3 beta [positiva] a partir de células madre de embriones de ratón, en ausencia de suero y en presencia de activina, junto con un Inhibidor de la señalización de Wnt (documento US 2006/0003446A1).

5 Gordon et al. (PNAS, Vol. 103, página 16806, 2006) declara "se requirió la señalización simultánea de Wnt y TGF-beta/ nodal/ activina para la generación de la línea primitiva anterior."

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

15 Thomson et al. aislaron células madre embrionarias de blastocitos humanos (Science 282:114, 1998). Al mismo tiempo, Gearhart y colaboradores derivaron líneas de células germinales embrionarias humanas (hEG) a partir del tejido gonadal fetal (Shamblott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998). A diferencia de las células madre embrionarias de ratón, a las que se puede impedir la diferenciación simplemente mediante el cultivo con el factor inhibidor de la leucemia (LIF), las células madre embrionarias humanas deben conservarse en condiciones muy especiales (patente de Estados Unidos n.º 6.200.806; documento WO 99/20741; documento WO 01/51616).

20 D'Amour et al. describen la producción de cultivos enriquecidos con endodermo definitivo derivado de células madre embrionarias de seres humanos en presencia de una elevada concentración de activina y baja de suero (Nature Biotechnology 2005). El trasplante de estas células bajo la cápsula renal de los ratones dio como resultado la diferenciación en células más maduras con las características de algunos órganos endodérmicos. Las células de endodermo definitivo derivado de células madre embrionarias pueden diferenciarse adicionalmente en células positivas para PDX1 tras la adición de FGF1 (documento US 2005/266554A1).

25 D'Amour et al. (Nature Biotechnology – 24, 1392 – 1401 (2006)) indican: "Hemos desarrollado un proceso de diferenciación que convierte las células madre embrionarias de humanos (hES) en células endocrinas capaces de sintetizar las hormonas pancreáticas: insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático y grelina. Este proceso imita la organogénesis pancreática *in vivo* conduciendo las células a través de varias etapas que se parecen al endodermo definitivo, al endodermo del tubo intestinal, al endodermo pancreático y al precursor endocrino, en ruta hacia las células que expresan hormonas endocrinas".

30 En otro ejemplo, Fisk *et al.* señalan un sistema para producir células de los islotes pancreáticos a partir de células madre embrionarias humanas (documento US2006/0040387A1). En este caso, la vía de diferenciación se dividió en tres etapas. Primero, las células madre embrionarias humanas se diferenciaron en endodermo utilizando una combinación de butirato de sodio y activina A. A continuación, se cultivaron las células con antagonistas de TGF-β, tal como Noggin combinado con EGF o beta-celulina para generar células positivas para PDX1. La diferenciación terminal se indujo con nicotinamida.

40 En un ejemplo, Benvenisty *et al.* indica: "Concluimos que la sobreexpresión de PDX1 potenciaba la expresión de los genes pancreáticos enriquecidos, que la inducción de la expresión de insulina puede requerir señales adicionales que solo están presentes *in vivo*" (Benvenisty et al, Stem Cells 2006; 24:1923–1930).

45 En otro ejemplo, Grapin-Botton *et al* indican: "La activación temprana de Ngn3 indujo casi exclusivamente células [positivas] de glucagón al tiempo que agotaba la reserva de progenitores en el páncreas. Como de E11,5, los progenitores de PDX-1 se hicieron competentes para diferenciarse en células [positivas] de insulina y [positivas] de PP (Johansson KA et al, Developmental Cell 12, 457 – 465, marzo de 2007).

50 La expresión de NGN3 en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático puede reducir la capacidad de las células para diferenciarse adicionalmente en células que expresan insulina. Estudios previos han demostrado que las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que expresan NGN3 son más propensas a producir células que expresan glucagón que células que expresan insulina, cuando se someten a una mayor diferenciación. Sin embargo, la expresión de NGN3 se requiere para formar células endocrinas pancreáticas, o células precursoras endocrinas pancreáticas (células que pueden formar, por ejemplo, glucagón, o células que expresan insulina). Por lo tanto, la regulación temporal de NGN3 es importante para guiar el destino final de las células precursoras endocrinas pancreáticas hacia células que expresan insulina.

60 En consecuencia, sigue existiendo una necesidad significativa de desarrollar condiciones que permitan establecer líneas de células madre pluripotenciales que puedan expandirse para abordar las necesidades clínicas actuales, al tiempo que retienen el potencial para su diferenciación en células que expresan insulina. La presente invención adopta un enfoque alternativo para mejorar la eficacia de la diferenciación de células madre embrionarias humanas a células que expresan insulina, proporcionando un método para aumentar la expresión de NGN3 y NKX6.1 en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.

65

**SUMARIO**

En una realización, la presente invención proporciona un método para aumentar la expresión de NGN3 y NKX6.1 en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, que comprende las etapas de:

a) cultivar las células madre pluripotenciales

b) diferenciar las células madre pluripotenciales en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en un medio que comprende activita A,

c) diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, complementando el medio utilizado para diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, wortmannina, SB-203580, SB-202190, tirfostina 25, tirfostina AG1478, tirfostina 46, GW 5074, kenpaulona, HNMPA, AG490, Y27632 y ML-7, y

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

En una realización, el medio usado para diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se complementa con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, wortmanina, SB-203580, SB-202190, Tirfostina 25, Tirfostina, AG1478, tirfostina 46, GW 5074, kenpaulona, HNMPA, AG490, Y27632 y ML-7.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA**

En aras de la claridad de la divulgación, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las subsecciones que describen o ilustran ciertas características, realizaciones o aplicaciones de la presente invención.

**Definiciones**

Las células madre son células indiferenciadas definidas por su capacidad a nivel de una sola célula tanto para autorrenovarse como para diferenciarse para producir células descendientes, incluidas células progenitoras autorrenovantes, progenitoras no renovantes y células terminalmente diferenciadas. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de diversos linajes celulares a partir de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a los tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, si no todos, los tejidos después de inyectarse en blastocistos.

Las células madre se clasifican de acuerdo con su potencial de desarrollo como: (1) *totipotenciales*, que son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias; (2) *pluripotenciales*, que significa que son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias; (3) *multipotenciales*, que significa que son capaces de dar lugar a un subconjunto de linajes celulares, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico concreto (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir una descendencia que incluye HSC (autorrenovantes), progenitoras oligopotenciales limitadas a células sanguíneas, y todos los tipos de células y elementos (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre. (4) oligopotenciales, que significa que son capaces de dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes celulares que las células madre multipotenciales; y (5) unipotenciales, que significa que son capaces de dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre espermatoogénicas).

La diferenciación es el proceso mediante el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, tal como, por ejemplo, una célula nerviosa o una célula muscular. Una célula diferenciada o inducida por diferenciación es la que ha adquirido una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término "comprometida", cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha avanzado en la vía de diferenciación hasta un punto en la que, en circunstancias normales, continuará diferenciándose hasta un tipo de célula o subconjunto de tipos de células específico, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse a un tipo de célula diferente o volver a un tipo de célula menos diferenciada. Desdiferenciación se refiere al proceso mediante el cual una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Tal como se utiliza en el presente documento, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células procedía y a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula coloca a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un marcador específico de linaje se refiere a una característica específicamente asociada con el fenotipo de células de un linaje de interés y puede usarse para evaluar la diferenciación de una célula no

comprometida con el linaje de interés.

"Células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo", o "células de Etapa 1", o "Etapa 1", como se usa en el presente documento, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox similar a Mix, FGF4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 o OTX2. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo incluyen células precursoras de línea primitiva, células de línea primitiva, células del mesoendodermo y células de endodermo definitivo.

"Células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático", como se usa en el presente documento, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: PDX1, HNF1 beta, PTF1 alfa, HNF6, NKX6.1, o HB9. Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático incluyen células de endodermo pancreático, células de tubo intestinal primitivo y células de intestino anterior posterior.

"Endodermo definitivo", como se usa en el presente documento, se refiere a células que llevan las características de las células derivadas de la epiblasto durante la gastrulación y que forman el tracto gastrointestinal y sus derivados. Las células del endodermo definitivo expresan los siguientes marcadores: HNF3 beta, GATA4, SOX17, Cerberus, OTX2, gooseoid, C-Kit, CD99 y MIXL1.

"Marcadores", como se usa en el presente documento, son las moléculas de ácido nucleico o polipeptídicas que se expresan diferencialmente en una célula de interés. En este contexto, la expresión diferencial significa un aumento del nivel de un marcador positivo y una disminución del nivel de un marcador negativo. El nivel detectable del marcador ácido nucleico o polipéptido es suficientemente más alto o más bajo en las células de interés en comparación con otras células, de tal manera que la célula de interés puede identificarse y distinguirse de otras células utilizando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica.

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

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

#### *Caracterización de células madre pluripotenciales*

Las células madre pluripotenciales pueden expresar uno o más de los antígenos embrionarios específicos de la etapa (SSEA) 3 y 4, y marcadores detectables usando los anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81 (Thomson et al., Science 282:1145, 1998). La diferenciación de las células madre pluripotenciales in vitro da como resultado la pérdida de expresión de SSEA-4, Tra 1-60 y Tra 1-81 (si está presente) y el aumento de expresión de SSEA-1. Las células madre pluripotenciales no diferenciadas tienen, típicamente, actividad de fosfatasa alcalina, que puede detectarse mediante la fijación de las células con paraformaldehído al 4 % y, después, desarrollando con Vector Red como sustrato, como describe el fabricante (Vector Laboratories, Burlingame Calif.). Las células madre pluripotenciales no diferenciadas también expresan típicamente OCT4 y TERT, según lo detectado mediante RT-PCR.

Otro fenotipo deseable de células madre pluripotenciales propagadas es un potencial de diferenciarse en células de las tres capas germinales: tejidos de endodermo, mesodermo y ectodermo. Pluripotencia de las células madre pluripotenciales se puede confirmar, por ejemplo, mediante la inyección de células en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID), fijando los teratomas que se forman usando 4 % de paraformaldehído y, después, examinándolos histológicamente para detectar evidencia de tipos de células de las tres capas germinales. Como alternativa, la pluripotencia se puede determinar mediante la creación de cuerpos embrioides y la evaluación de los cuerpos embrioides para determinar la presencia de marcadores asociados con las tres capas germinales.

Las líneas de células madre pluripotenciales propagadas pueden cariotiparse utilizando una técnica de bandas G estándar y se comparan con los cariotipos publicados de las especies de primates correspondientes. Es deseable obtener células que tienen un "cariotipo normal", lo que significa que las células son euploides, en las que todos los cromosomas humanos están presentes y no están alterados de forma notable.

#### *Fuentes de células madre pluripotenciales*

Los tipos de células madre pluripotenciales incluyen líneas establecidas de células pluripotenciales derivadas de tejido formado después de la gestación, incluyendo tejido preembrionario (tal como, por ejemplo, un blastocisto), tejido embrionario o tejido fetal tomado en cualquier momento durante la gestación, típicamente, pero no necesariamente, antes de aproximadamente 10-12 semanas de gestación. Ejemplos no limitantes son líneas establecidas de células madre embrionarias humanas o células germinales embrionarias humanas, tales como, por ejemplo, las líneas de células madre embrionarias humanas H1, H7 y H9 (WiCell). También se describe el uso de las

composiciones de la presente divulgación durante el establecimiento o estabilización inicial de dichas células, en cuyo caso las células fuente serían células pluripotenciales primarias extraídas directamente de los tejidos fuente. También se describen células tomadas de una población de células madre pluripotenciales ya cultivadas en ausencia de células alimentadoras. También se describen líneas mutantes de células madre embrionarias humanas, tales como, por ejemplo, BG01v (BresaGen, Athens, GA).

Las células madre embrionarias humanas descritas pueden prepararse como describen Thomson et al. (patente de Estados Unidos n.º 5.843.780; Science 282:1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:7844, 1995).

#### Cultivo de células madre pluripotenciales

En una realización, las células madre pluripotenciales se cultivan típicamente sobre una capa de células alimentadoras que soportan las células madre pluripotenciales de varias maneras. Como alternativa, las células madre pluripotenciales se cultivan en un sistema de cultivo que está esencialmente libre de células alimentadoras, pero, no obstante, apoya la proliferación de células madre pluripotenciales sin experimentar una diferenciación sustancial. El crecimiento de células madre pluripotenciales en cultivos libres de alimentación sin diferenciación se soporta utilizando un medio acondicionado por cultivo previo con otro tipo celular. Como alternativa, el crecimiento de células madre pluripotenciales en cultivo libre de alimento sin diferenciación se soporta utilizando un medio químicamente definido.

Por ejemplo, Reubinoff et al (Nature Biotechnology 18: 399 – 404 (2000)) y Thompson et al (Science 6 November 1998: Vol. 282. no. 5391, pp. 1145 – 1147) divulgan el cultivo de líneas de células madre pluripotenciales de blastocistos humanos usando una capa de células de alimentación de fibroblastos embrionarios de ratón.

Richards et al, (Stem Cells 21: 546–556, 2003) evaluaron un panel de 11 capas de células alimentadoras de adultos humanos, fetales y neonatal neonatales n para determinar su capacidad para soportar el cultivo de células madre pluripotenciales humanas. Richards *et al*, indica: "Las líneas de células madre embrionarias humanas cultivadas en los alimentadoras de fibroblastos de piel adultos conservan la morfología de las células madre embrionarias humanas y siguen siendo pluripotenciales".

El documento US20020072117 divulga líneas celulares que producen medios que soportan el crecimiento de células madre pluripotenciales de primates en cultivo libre de alimentación. Las líneas celulares empleadas son líneas de células mesenquimatosas y similares a fibroblastos obtenidas a partir de tejido embrionario o diferenciadas de células madre embrionarias. El documento US20020072117 también divulga el uso de las líneas celulares como una capa de células de alimentación primaria.

En otro ejemplo, Wang et al (Stem Cells 23: 1221–1227, 2005) divulga métodos para el crecimiento a largo plazo de células madre pluripotenciales humanas en capas celulares de alimentación derivadas de células madre embrionarias humanas.

En otro ejemplo, Stojkovic et al (Stem Cells 2005 23: 306–314, 2005) divulgan un sistema de células de alimentación derivado de la diferenciación espontánea de células madre embrionarias humanas.

En un ejemplo adicional, Miyamoto et al (Stem Cells 22: 433–440, 2004) divulgan una fuente de células alimentadoras obtenidas de placenta humana.

Amit et al (Biol. Reprod 68: 2150–2156, 2003) divulga una capa de células de alimentación derivada de prepucio humano.

En otro ejemplo, Inzunza et al (Stem Cells 23: 544-549, 2005) divulgan una capa de células de alimentación derivadas de fibroblastos de prepucio posnatal humano.

El documento US6642048 divulga medios que soportan el crecimiento de células madre pluripotenciales de primates (pPS) en cultivo libre de alimentación y líneas celulares útiles para la producción de tales medios. El documento US6642048 indica: "Esta invención incluye líneas celulares mesenquimatosas y similares a fibroblastos obtenidas de tejido embrionario o diferenciadas de células madre embrionarias. Los métodos para derivar tales líneas celulares, medios de procesamiento y células madre en crecimiento utilizando los medios acondicionados se describen e ilustran en la presente divulgación."

En otro ejemplo, el documento WO2005014799 divulga medio acondicionado para el mantenimiento, proliferación y diferenciación de células de mamífero. El documento WO2005014799 indica: "El medio de cultivo producido de acuerdo con la presente invención está acondicionado por la actividad de secreción celular de células murinas, en particular, los hepatocitos transgénicos diferenciados e inmortalizados, denominados MMH (hepatocito murino Met)".

En otro ejemplo, Xu et al (Stem Cells 22: 972–980, 2004) divulga un medio condicionado obtenido a partir de

derivados de células madre embrionarias humanas que se han modificado genéticamente para sobreexpresar transcriptasa inversa de telomerasa humana.

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

10 Un sistema de cultivo alternativo emplea un medio exento de suero suplementado con factores de crecimiento capaces de estimular la proliferación de células madre embrionarias. Por ejemplo, Cheon *et al* (BioReprod DOI: 10,1095/biolreprod. 105,046870, October 19, 2005) divulgan un sistema de cultivo sin alimentador, sin suero, en el que se mantienen las células madre embrionarias en un medio de reemplazo de suero (SR) sin acondicionar suplementado con diferentes factores de crecimiento capaces de desencadenar la autorrenovación de células madre embrionarias.

15 En otro ejemplo, Levenstein et al (Stem Cells 24: 568–574, 2006) divulgan métodos para el cultivo a largo plazo de células madre embrionarias humanas en ausencia de fibroblastos o medio acondicionado, utilizando medios suplementados con bFGF.

20 En otro ejemplo, el documento US20050148070 divulga un método para cultivar células madre embrionarias humanas en medios definidos sin suero y sin células alimentadoras de fibroblastos, comprendiendo el método: cultivar las células madre en un medio de cultivo que contiene albúmina, aminoácidos, vitaminas, minerales, al menos uno de transferrina o sustituto de transferrina, al menos una insulina o sustituto de insulina, el medio de cultivo esencialmente libre de suero fetal de mamífero y que contiene al menos aproximadamente 100 ng / ml de un factor de crecimiento de fibroblastos capaz de activar un receptor de señalización del factor de crecimiento de fibroblastos, en el que el factor de crecimiento se suministra a partir de una fuente distinta de una capa alimentadora de fibroblastos, soportando la proliferación de células madre en un estado indiferenciado sin células alimentadoras o medio acondicionado.

30 En otro ejemplo, el documento US20050233446 divulga un medio definido útil en el cultivo de células madre, incluyendo células madre primordiales de primate no diferenciadas. En solución, el medio es sustancialmente isotónico en comparación con las células madre que se están cultivando. En un cultivo dado, el medio particular comprende un medio base y una cantidad de cada uno de bFGF, insulina y ácido ascórbico necesarios para soportar el crecimiento sustancialmente indiferenciado de las células madre primordiales.

35 En otro ejemplo, el documento US6800480 indica "En una realización, se proporciona un medio de cultivo celular para cultivar células madre primordiales derivadas de primates en un estado sustancialmente indiferenciado, que incluye un medio básico de baja presión osmótica y niveles bajos de endotoxina, que es eficaz para soportar el crecimiento de células madre primordiales derivadas de primates. El medio básico se combina con un suero nutriente eficaz para soportar el crecimiento de células madre primordiales derivadas de primates y un sustrato seleccionado del grupo que consiste en células alimentadoras y un componente de matriz extracelular derivado de células alimentadoras. El medio incluye además aminoácidos no esenciales, un antioxidante, y un primer factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en nucleósidos y una sal de piruvato."

45 En otro ejemplo, el documento US20050244962 indica: En un aspecto, la invención proporciona un método para cultivar células madre embrionarias de primate. Se cultivan las células madre en un cultivo esencialmente libre de suero fetal de mamífero (preferiblemente, también esencialmente libre de cualquier suero animal) y en presencia de factor de crecimiento de fibroblastos que se suministra a partir de una fuente que distinta de solo la capa alimentadora de fibroblastos. En una forma preferida, la capa alimentadora de fibroblastos, previamente requerida para sostener un cultivo de células madre, se hace innecesaria mediante la adición de suficiente factor de crecimiento de fibroblastos.

50 En un ejemplo adicional, el documento WO2005065354 describe un medio de cultivo isotónico definido que está esencialmente libre de alimentación y exento de suero, que comprende: a. un medio basal; b. una cantidad de bFGF suficiente para soportar el crecimiento de células madre de mamífero sustancialmente indiferenciadas; c. una cantidad de insulina suficiente para soportar el crecimiento de células madre de mamífero sustancialmente indiferenciadas; y d. una cantidad de ácido ascórbico suficiente para soportar el crecimiento de células madre de mamíferos sustancialmente indiferenciadas.

60 En otro ejemplo, el documento WO2005086845 describe un método para el mantenimiento de una célula madre indiferenciada, comprendiendo dicho método exponer una célula madre a un miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento transformante-beta (TGF-β), un miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento de fibroblastos FGF), o nicotinamida (NIC) en una cantidad suficiente para mantener la célula en un estado indiferenciado durante un tiempo suficiente para conseguir el resultado deseado.

65 Las células madre pluripotenciales pueden sembrarse sobre un sustrato de cultivo adecuado. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es un componente de matriz extracelular, tal como, por ejemplo, los derivados de la membrana basal o que pueden formar parte de los acoplamientos receptor de la molécula de adhesión-ligando. En

una realización, el sustrato de cultivo adecuado es MATRIGEL® (Becton Dickinson). MATRIGEL® es una preparación soluble de células tumorales Engelbreth-Holm Swarm que se gelifican a temperatura ambiente para formar una membrana basal reconstituida.

- 5 Otros componentes de la matriz extracelular y mezclas de componentes son adecuados como alternativa. Dependiendo del tipo de células que se proliferan, esto puede incluir laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, sulfato de heparano y similares, solos o en diversas combinaciones.

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

15 Pueden prepararse medios de cultivo adecuados a partir de los siguientes componentes, tales como, por ejemplo, el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Gibco n.º 11965-092; medio de Eagle modificado por Dulbecco Knockout (KO DMEM), Gibco n.º 10829-018; medio basal de Ham F12/50 % DMEM; L-glutamina ; 200 mM, Gibco n.º 15039-027; solución de aminoácidos no esenciales, Gibco 11140-050; β-mercaptoetanol, Sigma n.º M7522; factor de crecimiento de fibroblastos básicos recombinantes humanos (bFGF), Gibco n.º 13256-029.

20 **Formación de una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con una expresión incrementada de NGN3 y NKX6.1**

25 En una realización, la presente invención proporciona un método para aumentar la expresión de NGN3 y NKX6.1 en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, que comprende las etapas de:

- a) cultivar las células madre pluripotenciales
- b) diferenciar las células madre pluripotenciales en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en un medio que comprende activina A,
- 30 c) diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, complementando el medio utilizado para diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, wortmanina, SB-203580, SB-202190, tirfostina 25, tirfostina AG1478, tirfostina 46, GW 5074, kenpaulona,
- 35 HNMPA, AG490, Y27632 y ML-7, y
- d) diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.

40 *Diferenciación de las células madre pluripotenciales en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo*

45 La formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se puede determinar determinando la presencia de los marcadores antes y después de seguir un protocolo particular. Las células madre pluripotenciales típicamente no expresan tales marcadores. Por lo tanto, la diferenciación de las células pluripotenciales se detecta cuando las células comienzan a expresarlos.

50 Las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo por cualquier método conocido en la materia o por cualquier método propuesto en la presente invención.

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

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

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

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

5 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo cultivando las células madre pluripotenciales en medio que contiene activina A en ausencia de suero, cultivando a continuación las células con activina A y suero y, después, luego cultivando las células con activina A y suero de una concentración diferente. Un ejemplo de este método se describe en Nature Biotechnology 23, 1534 – 1541 (2005).

10 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo cultivando las células madre pluripotenciales en medio que contiene activina A en ausencia de suero, cultivando a continuación las células con activina A y suero de otra concentración. Un ejemplo de este método se describe en D'Amour et al, Nature Biotechnology, 2005.

15 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo cultivando las células madre pluripotenciales en medio que contiene activina A y un ligando Wnt en ausencia de suero, eliminando a continuación el ligando Wnt y cultivando las células con activina A y suero. Un ejemplo de este método se describe en Nature Biotechnology 24, 1392 – 1401 (2006).

20 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo tratando las células madre pluripotenciales de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 11/736.908, cedida a LifeScan, Inc.

Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo tratando las células madre pluripotenciales de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 11/779.311, cedida a LifeScan, Inc.

25 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo tratando las células madre pluripotenciales de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 60/990.529.

30 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo tratando las células madre pluripotenciales de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 61/076.889.

35 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo tratando las células madre pluripotenciales de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 61/076.900.

40 Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo tratando las células madre pluripotenciales de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 61/076.908.

Por ejemplo, las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo tratando las células madre pluripotenciales de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 61/076.915.

45 *Diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo pancreático*

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

55 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático de acuerdo con los métodos divulgados en D'Amour et al., Nature Biotechnol. 24:1392–1401, 2006.

60 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con un factor de crecimiento de fibroblastos y el inhibidor de la vía de señalización hedgehog KAAD-ciclopamina, eliminando después el medio que contiene el factor de crecimiento de fibroblastos y KAAD-ciclopamina y, posteriormente, cultivando las células en medio que contiene ácido retinoico, un factor de crecimiento de fibroblastos y KAAD-ciclopamina. Un ejemplo de este método se describe en Nature Biotechnology 24, 1392 – 1401 (2006).

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

ácido retinoico y al menos un factor de crecimiento de fibroblastos durante un periodo de tiempo, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 11/736.908, asignado a LifeScan, Inc.

- 5 En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con ácido retinoico y al menos un factor de crecimiento de fibroblastos durante un periodo de tiempo, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 11/779.311, asignado a LifeScan, Inc.
- 10 En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endodermo pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo de acuerdo con los métodos divulgados en la solicitud de patente n.º de serie 60 / 990.529.
- 15 La eficacia de la diferenciación puede determinarse exponiendo una población de células tratadas a un agente (tal como un anticuerpo) que reconozca específicamente un marcador de proteína expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.
- 20 Los métodos para evaluar la expresión de marcadores de proteínas y ácidos nucleicos en células cultivadas o aisladas son convencionales en la técnica. Estos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR), transferencias de tipo Northern, hibridación *in situ* (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 2001 suplemento)), e inmunoensayos, tales como análisis inmunohistoquímico del material seccionado, transferencia de tipo Western, para marcadores que son accesibles en células intactas, tal como análisis por citometría de flujo (FACS) (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).
- 25 Las características de las células madre pluripotenciales son bien conocidas por los expertos en la técnica y siguen identificándose características adicionales de las células madre pluripotenciales. Los marcadores de las células madre pluripotenciales incluyen, por ejemplo, la expresión de uno o más de los siguientes: ABCG2, cripto, FOXD3, CONNEXINA43, Connexina45, OCT4, SOX2, Nanog, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, Tra 1-81.
- 30 Después de tratar las células madre pluripotenciales con los métodos de la presente invención, las células diferenciadas pueden purificarse exponiendo una población de células tratadas a un agente (tal como un anticuerpo) que reconozca específicamente un marcador de proteína, tal como CXCR4, expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. Se divulgan células madre pluripotenciales que incluyen, por ejemplo, la línea de células madre embrionarias humanas H9 (código NIH: WA09), la línea de células madre embrionarias humanas H1 (código NIH: WA01), la línea de células madre embrionarias humanas H7 (código NIH: WA07) y la línea de células madre embrionarias humanas SA002 (Cellartis, Suecia).
- 35 Son adecuadas para su uso en la presente invención las células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores característicos de células pluripotenciales: ABCG2, cripto, CD9, FOXD3, CONNEXINA43, CONNEXINA45, OCT4, SOX2, Nanog, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60 y Tra 1-81.
- 40 Los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se seleccionan del grupo que consiste en SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox similar a Mix, FGF4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 y OTX2. Es adecuada para su uso en la presente invención una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una célula precursora líneas primitivas. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo es una célula del mesoendodermo. En un aspecto
- 45 50 alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo es una célula del endodermo definitivo.
- 55 Los marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se seleccionan del grupo que consiste en PDX1, HNF1 beta, PTF1 alpha, HNF6, HB9 y PROX1. Es adecuada para su uso en la presente invención una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático es una célula del endodermo pancreático.
- 60 En una realización, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian aún más en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. La presente invención proporciona métodos para aumentar la expresión de NGN3 y NKX6.1 en las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.
- 65 El aumento de la expresión de NGN3 y NKX6.1 en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático puede conseguirse tratando las células que expresan marcadores que expresan

marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, wortmannina, SB-203580, SB-202190, tirfostina 25, tirfostina AG1478, tirfostina 46, GW 5074, kenpaulona, HNMPA, AG490, Y27632 y ML-7. Alternativamente, el aumento de la expresión de NGN3 y NKX6.1 en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se puede lograr tratando las células que expresan marcadores que expresan marcadores característicos del linaje endodermo pancreático con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, wortmannina, SB-203580, SB-202190, tirfostina 25, tirfostina AG1478, tirfostina 46, GW 5074, kenpaulona, HNMPA, AG490, Y27632 y ML-7.

5  
10 En el caso en el que las células que expresan marcadores que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se tratan con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en X, Y y Z, las células se tratan suplementando el medio usado para diferenciar las células en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, wortmannina, SB-203580, SB-202190, tirfostina 25, tirfostina AG1478, tirfostina 46, GW 5074, kenpaulona, HNMPA, AG490, Y27632 y ML-7.

20 En el caso en el que las células que expresan marcadores que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se tratan con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en X, Y y Z, las células se tratan suplementando el medio usado para diferenciar las células en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, wortmannina, SB-203580, SB-202190, tirfostina 25, tirfostina AG1478, tirfostina 46, GW 5074, kenpaulona, HNMPA, AG490, Y27632 y ML-7.

25 *Diferenciación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con una expresión aumentada de NGN3 y NKX6.1*

30 Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático por cualquier método en la técnica o por cualquier método propuesto en la presente invención.

35 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenidas de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, cultivando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene exendina 4, retirando a continuación el medio que contiene exendina 4 y cultivando posteriormente las células en medio que contiene exendina 1, IGF-1 y HGF. Un ejemplo de este método se describe en D'Amour et al, Nature Biotechnology, 2006.

40 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenidas de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, cultivando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene DAPT (Sigma-Aldrich, MO) y exendina 4. Un ejemplo de este método se divulga en D'Amour et al, Nature Biotechnology, 2006.

45 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenidas de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, cultivando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene exendina 4. Un ejemplo de este método se divulga en D'Amour et al, Nature Biotechnology, 2006.

50 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenidas de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la vía de señalización Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 11/736.908, cedida a LifeScan, Inc.

55 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenidas de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la vía de señalización Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 11/779.311, cedida a LifeScan, Inc.

60 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenidas de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la vía de señalización Notch, de acuerdo

65

con los métodos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 60/953.178, cedida a LifeScan, Inc.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático obtenidas de acuerdo con los métodos de la presente invención se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la vía de señalización Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 60/990.529, cedida a LifeScan, Inc.

Los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo que consiste en NGN3, 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 hormonas siguientes: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático. Es adecuada para su uso en la presente invención una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endocrino pancreático es una célula endocrina pancreática. La célula endocrina pancreática puede ser una célula que expresa la hormona pancreática. Como alternativa, la célula endocrina pancreática puede ser una célula que secreta hormona pancreática.

En un aspecto de la presente invención, la célula endocrina pancreática es una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células  $\beta$ . Una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células  $\beta$  expresa PDX1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN3, 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 de células  $\beta$  es una célula  $\beta$ .

La presente divulgación se refiere a métodos para aumentar la expresión de NGN3 y NKX6.1 en las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.

En una realización, el aumento de la expresión de NGN3 y NKX6.1 en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se puede conseguir tratando células que expresan marcadores que expresan marcadores característicos del linaje endodermo pancreático con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, wortmanina, SB-203580, SB-202190, tirfostina 25, tirfostina, AG1478, tirfostina 46, GW 5074, kenpaulona, HNMPA, AG490, Y27632 y ML-7.

En el caso en que las células que expresan marcadores que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se tratan con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, wortmannina, SB-203580, SB-202190, tirfostina 25, tirfostina AG1478, tirfostina 46, GW 5074, kenpaulona, HNMPA, AG490, Y27632 y ML-7, las células se tratan complementando el medio utilizado para diferenciar las células en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, wortmannina, SB-203580, SB-202190, tirfostina 25, tirfostina AG1478, tirfostina 46, GW 5074, kenpaulona, HNMPA, AG490, Y27632 y ML-7.

La presente invención se ilustra adicionalmente, aunque sin limitaciones, mediante los siguientes ejemplos.

## Ejemplos de referencia

### Ejemplo 1

#### Detección selectiva de análogos de molécula pequeña que participan en la expresión de NGN3

La expresión del factor de transcripción NGN3 se requiere durante la progresión de las células progenitoras hacia un destino celular endocrino. Mejorar la eficiencia de este proceso es un resultado deseable. Se realizó una detección selectiva de compuestos de molécula pequeña con la suposición de que los inhibidores enzimáticos pueden regular las señales celulares transmitidas durante la diferenciación y tener efectos directos o indirectos sobre la expresión génica de factores de transcripción, críticos tales como NGN3.

*Preparación de células para el ensayo:* Se mantuvieron cultivos maestros de células madre embrionarias humanas (línea de células madre embrionarias humanas H1) en un estado pluripotencial no diferenciado en placas revestidas con factor de crecimiento reducido MATRIGEL (BD Biosciences, n.º de cat. 35623 1) en medio acondicionado MEF con pases promedio cada cuatro días. El pase se realizó exponiendo los cultivos de células a una solución de 1 mg / ml de dispasa (Invitrogen, n.º de cat. 17105-041) durante de 5 a 7 minutos a 37 °C, seguido de lavado de la monocapa con medio de cultivo acondicionado MEF y raspado suave para recuperar los grupos de células. Los grupos se centrifugaron a velocidad baja para recoger un sedimento de células y eliminar la dispasa residual. Los grupos de células se dividieron en una proporción 1:3 o 1:4 para el cultivo de mantenimiento rutinario. Todas las líneas de células madre embrionarias humanas se mantuvieron en números de pase inferiores a 50 y se evaluaron rutinariamente para el cariotipo normal y ausencia de micoplasma. Para las detecciones selectivas en formato de

- ensayo miniaturizado, se recogieron grupos de células madre embrionarias humanas H1 del cultivo con tratamiento con dispasa, tal como se describe, y se sembraron con dispersión uniforme en una proporción de 1:2 (área de superficie) en placas de 96 pocillos (Packard ViewPlates; PerkinElmer; n.º de cat. 6005182) revestidas con factor de crecimiento reducido MATRIGEL (BD Biosciences; 356231) utilizando volúmenes de 100 µl / pocillo. Se permitió que las células se unieran y luego se recuperó el crecimiento de la fase logarítmica durante un periodo de tiempo de 1 a 3 días, alimentando diariamente con medio acondicionado MEF suplementado con 8 ng / ml de bFGF (R & D Systems; n.º de cat. 233-FB). Las placas se mantuvieron a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> en una caja humidificada a lo largo de la duración del ensayo.
- 10 *Preparación de los compuestos:* El detección selectiva se llevó a cabo utilizando dos bibliotecas comerciales de inhibidores de quinasa de molécula pequeña (BioMol Intl; n.º de cat 2832A (V2,2) y EMD Biosciences; n.º de cat. 539745). En la tabla 1 y la tabla 2 se describen los compuestos en estas bibliotecas de inhibidor de la quinasa BioMol y EMD quinasa, respectivamente. Los compuestos de estas bibliotecas se pusieron a disposición como reservas de 10 mM en un formato de placa de 96 pocillos, se solubilizaron en DMSO al 100 % y se almacenaron a -80 °C. Los compuestos de la biblioteca se diluyeron adicionalmente a una concentración intermedia de 2,5 mM en DMSO al 100 % (Sigma, n.º de cat. D2650), también almacenados a -80 °C hasta su uso. El día del ensayo, los compuestos se diluyeron a 1:12,5 en medio DMEM rico en glucosa, para producir una reserva de trabajo de 200 µM en DMSO al 8 % y, a continuación, se diluyeron a 1:80 en cada pocillo de ensayo para una concentración final de 2,5 µM del compuesto y DMSO al 0,1 %.
- 20 *Ensayo de diferenciación y detección selectiva:* La etapa 1 del protocolo de diferenciación se llevó a cabo durante tres días, alimentando diariamente aspirando el medio de cada pocillo y reemplazándolo con una alícuota fresca (100 µl). El primer día de ensayo, los pocillos se alimentaron usando medio RPMI-1640 (Invitrogen; n.º de cat. 22400) que contenía 2 % de fracción V de albúmina bovina, sin ácidos grasos (FAF BSA) (Proliant Inc.; N.º de cat.: SKU 68700), 100 ng/ml de activina A (PeproTech; N.º de cat.120–14), 20 ng/ml de Wnt3a (R&D Systems; N.º de cat. 1324–WN/CF) y 8 ng/ml bFGF (R&D Systems; N.º de cat. 233–FB). Al segundo y tercer día del ensayo, los pocillos se alimentaron con el mismo medio excepto que se retiró Wnt3a. Todos los pocillos se alimentaron y trataron de forma idéntica.
- 30 La etapa 2 del protocolo de diferenciación se llevó a cabo durante dos días. Las células se alimentaron diariamente aspirando el medio de cada pocillo y reemplazándolo con una alícuota fresca (100 µl) de medio DMEM: F12 (Invitrogen, N.º de cat.11330-032) que contenía 2 % de FAF BSA, 50 ng / ml de FGF7 (PeproTech; 100 - 19), y 250 nM de KAAD - ciclopamina (Calbiochem; N.º de cat. 239804). Todos los pocillos se alimentaron y trataron de forma idéntica.
- 35 La etapa 3 del protocolo de diferenciación se llevó a cabo durante cuatro días. Se alimentó a las células en días alternos por medio de aspiración del medio de cada pocillo y reemplazándolo con una alícuota fresca (200 µl) de DMEM rico en glucosa (Invitrogen, N.º de cat.10569) suplementado con Albumax al 0,1 % (Invitrogen; n.º de cat.: 11020–021), 0,5x de Insulina–Transferrina–Selenio (ITS–X; Invitrogen; n.º de cat. 51500056), 50 ng/ml de FGF7, 100 ng/ml de Noggin (R&D Systems; n.º de cat. 3344–NG), KAAD–ciclopamina 250 nM, ácido todo–trans retinoico 2 µM (RA) (Sigma–Aldrich; n.º de cat. R2625) y 30 ng/ml de activina A. Durante la etapa 3, se añadieron muestras de ensayo de inhibidores de quinasa a pocillos individuales en dos placas individuales (placas A y B); una tercera placa (placa C) se dejó sin tratar. En cada placa, se trató un total de 16 pocillos de control con una cantidad equivalente de DMSO al 0,1 % sin ningún compuesto de ensayo.
- 45 La etapa 4 del protocolo de diferenciación se llevó a cabo durante tres días. Se alimentó a las células los días 1 y 2, no el día 3, aspirando el medio de cada pocillo y reemplazándolo con una alícuota fresca (200 µl) de DMEM rico en glucosa suplementado con 0,1 % de Albumax, 0,5x de Insulina–Transferrina– Selenio, 100 ng / ml de Noggin y 1 µM de inhibidor de Alk 5 (Axxora; n.º de cat. ALX-270-445). Durante la etapa 4, se añadieron muestras de ensayo de inhibidores de quinasa a pocillos individuales en dos placas individuales (placas B y C); una tercera placa se dejó sin tratar (placa A). En cada placa, se trató un total de 16 pocillos de control con una cantidad equivalente de DMSO al 0,1 % sin ningún compuesto de ensayo.
- 50 *Análisis de alto contenido:* Al final de la etapa 4, se aspiró el medio de todas las placas de ensayo, seguido de fijación a temperatura ambiente durante 20 minutos con paraformaldehído al 4 % (Sigma–Aldrich; N.º de cat.158127) diluido en PBS sin cationes divalentes (Invitrogen; N.º de cat.14190), lavando después una vez con PBS. Los pocillos de muestra se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5 % (VWR n.º de cat. VW3929-2) durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS y se bloquearon con suero de burro al 5 % (Jackson ImmunoResearch; N.º de cat.017- 000-121) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (anti-NGN3 de oveja, R & D Systems, AF3444) se diluyó a 1:300 en suero de burro al 5% y se añadió a cada pocillo durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar dos veces en PBS, se diluyó a 1:100 el anticuerpo secundario anti-oveja de burro Alexa Fluor 647 (Invitrogen; n.º de cat. A21448) y se añadió a cada pocillo de muestra durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de dos lavados en PBS. Para la tinción de contraste de los núcleos, se añadieron 4 µg/ml de Hoechst 33342 (Invitrogen; n.º de cat. H3570) durante diez minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron una vez con PBS y se dejaron en 100 µl / pocillo de PBS para la obtención de imágenes.
- 65

La obtención de imágenes se realizó utilizando un Analizador celular IN 1000 (GE Healthcare) utilizando el dicroico 51008bs para células teñidas con Hoechst 33342 y Alexa Flour 647. Los tiempos de exposición se optimizaron a partir de pocillos de control positivo teñidos con anticuerpo secundario solo. Se adquirieron imágenes de 15 campos por pocillo para compensar cualquier pérdida celular durante el bioensayo y los procedimientos de tinción posteriores. Las mediciones para el número total de células y la intensidad total de NGN3 se obtuvieron de cada pocillo utilizando el software Cell Developer Toolbox 1,7 (GE Healthcare). La segmentación de los núcleos se determinó en base a los niveles de escala de grises (rango de base 100-300) y el tamaño nuclear. La expresión total de la proteína NGN3 se informó como la intensidad total o la intensidad integrada, definida como la fluorescencia total de la célula multiplicada por el área de la célula. Se eliminó el fondo basándose en criterios de aceptación de rangos de escala de grises entre 200 y 3500. Los datos de intensidad total se normalizaron dividiendo las intensidades totales para cada pocillo por la intensidad total media para el control positivo.

Los resultados de la detección selectiva se muestran en la Tabla 3 a partir de la combinación de dos bibliotecas de inhibidores de quinasa usadas para tratar seis placas de ensayo en este único experimento. Los datos mostrados son una relación representativa de la intensidad de la tinción con NGN3 para pocillos tratados con el compuesto individual en relación con la tinción en pocillos con vehículo DMSO solo. Las relaciones de intensidad, así como las comparaciones de orden de rangos se muestran para compuestos individuales dosificados durante la etapa 3 sola o la etapa 4 sola o las etapas 3 y 4 combinadas. Los compuestos con una intensidad de relación > 1,4 con respecto a un vehículo control tratado se marcaron como testigos para confirmación y la evaluación adicional. De interés especial, tal como se resume en la Tabla 4, estos compuestos parecen tener como objetivo varias vías de señalización celular que pueden estar implicadas en el patrón óptimo de expresión de NGN3 durante la diferenciación endocrina.

## 25 Ejemplo 2

### **Detección selectiva de análogos de molécula pequeña que participan en la expresión de NKX6.1 y NGN3**

La expresión de NKX6.1 junto con NGN3 se requiere durante la progresión de las células progenitoras hacia un destino celular endocrino. Se llevó a cabo una detección selectiva de inhibidores de quinastas para determinar si cualquiera de ellos podría regular por aumento la expresión de uno o ambos marcadores durante la diferenciación. En este ejemplo, también se incluyó en el protocolo de diferenciación el inhibidor de HDAC Tricostatina A para modular la remodelación de la cromatina y, posiblemente, potenciar la transcripción génica.

*Preparación de células para el ensayo:* Se mantuvieron cultivos maestros de células madre embrionarias humanas (línea de células madre embrionarias humanas H1) en un estado pluripotencial no diferenciado en placas revestidas con factor de crecimiento reducido MATRIGEL (BD Biosciences, n.º de cat. 356231 1) en medio acondicionado MEF con pases promedio cada cuatro días. El pase se realizó exponiendo los cultivos de células a una solución de 1 mg / ml de dispasa (Invitrogen, n.º de cat. 17105-041) durante de 5 a 7 minutos a 37 °C, seguido de lavado de la monocapa con medio de cultivo acondicionado MEF y raspado suave para recuperar los grupos de células. Los grupos se centrifugaron a velocidad baja para recoger un sedimento de células y eliminar la dispasa residual. Los grupos de células se dividieron en una proporción 1:3 o 1:4 para el cultivo de mantenimiento rutinario. Todas las líneas de células madre embrionarias humanas se mantuvieron en números de pase inferiores a 50 y se evaluaron rutinariamente para el cariotipo normal y ausencia de micoplasma. Para las detecciones selectivas en formato de ensayo miniaturizado, se recogieron grupos de células madre embrionarias humanas H1 del cultivo con tratamiento con dispasa, tal como se describe, y se sembraron con dispersión uniforme en una proporción de 1:2 (área de superficie) en placas de 96 pocillos (Packard ViewPlates; PerkinElmer; n.º de cat 6005182) revestidas con factor de crecimiento reducido MATRIGEL (BD Biosciences; 356231) utilizando volúmenes de 100 µl / pocillo. Se permitió que las células se unieran y luego se recuperó el crecimiento de la fase logarítmica durante un periodo de tiempo de 1 a 3 días, alimentando diariamente con medio acondicionado MEF suplementado con 8 ng / ml de bFGF (R & D Systems; n.º de cat. 233-FB). Las placas se mantuvieron a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> en una caja humidificada a lo largo de la duración del ensayo.

*Preparación de los compuestos:* La detección selectiva se realizó utilizando una única biblioteca comercial de inhibidores de quinastas de molécula pequeña (BioMol Intl; N.º de cat. 2832A (V2,2) como se define en la Tabla 1. Los compuestos de esta biblioteca se pusieron a disposición como reservas de 10 mM en formato de placas 96 pocillos, solubilizados en DMSO al 100 % y almacenados a -80 °C. Los compuestos de la biblioteca se diluyeron adicionalmente a una concentración intermedia de 2,5 mM en DMSO al 100 % (Sigma, N.º de cat.D2650), también se almacenaron a -80 °C hasta su uso. El día del ensayo, los compuestos se diluyeron a 1:12,5 en medio DMEM rico en glucosa, para producir una reserva de trabajo de 200 µM en DMSO al 8 % y, a continuación, se diluyeron a 1:80 en cada pocillo de ensayo para una concentración final de 2,5 µM del compuesto y DMSO al 0,1 %.

*Ensayo de diferenciación y detección selectiva:* La etapa 1 del protocolo de diferenciación se llevó a cabo durante tres días, alimentando diariamente aspirando el medio de cada pocillo y reemplazándolo con una alícuota fresca (100 µl). El primer día de ensayo, los pocillos se alimentaron usando medio RPMI-1640 (Invitrogen; n.º de cat. 22400) que contenía 2 % de fracción V de albúmina bovina, sin ácidos grasos (FAF BSA) (Proliant Inc.; N.º de cat.:

SKU 68700), 100 ng/ml de activina A (PeproTech; N.º de cat.120–14), 20 ng/ml de Wnt3a (R&D Systems; N.º de cat. 1324–WN/CF) y 8 ng/ml bFGF (R&D Systems; N.º de cat. 233–FB). Al segundo y tercer día del ensayo, los pocillos se alimentaron con el mismo medio excepto que se retiró Wnt3a. Todos los pocillos se alimentaron y trataron de forma idéntica.

5 La etapa 2 del protocolo de diferenciación se llevó a cabo durante dos días. Las células se alimentaron diariamente aspirando el medio de cada pocillo y reemplazándolo con una alícuota fresca (100 µl) de medio DMEM: F12 (Invitrogen, N.º de cat.11330-032) que contenía 2 % de FAF BSA, 50 ng / ml de FGF7 (PeproTech; 100 - 19), y 250 nM de KAAD - ciclopamina (Calbiochem; N.º de cat. 239804). Todos los pocillos se alimentaron y trataron de forma idéntica.

15 La etapa 3 del protocolo de diferenciación se llevó a cabo durante cinco días. Se alimentó a las células en días alternos por medio de aspiración del medio de cada pocillo y reemplazándolo con una alícuota fresca (200 µl) de DMEM rico en glucosa (Invitrogen, N.º de cat.10569) suplementado con Albumax al 0,1 % (Invitrogen; n.º de cat.: 11020–021), 0,5x Insulina–Transferrina–Selenio (ITS–X; Invitrogen; n.º de cat. 51500056), 50 ng/ml de FGF7, 100 ng/ml de Noggin (R&D Systems; n.º de cat –NG), KAAD–ciclopamina 250 nM, ácido todo–trans retinoico 2 µM (RA) (Sigma–Aldrich; 2 µM R2625), 30 ng/ml de activina A y tricostatina A100 nM (TsA; Sigma; n.º de cat. T8552). Durante la etapa 3, se añadieron muestras de ensayo de inhibidores de quinasa a pocillos individuales los días 2 y 4. En cada placa, se trató un total de 16 pocillos de control con una cantidad equivalente de DMSO al 0,1 % sin ningún compuesto de ensayo.

25 La etapa 4 del protocolo de diferenciación se llevó a cabo durante tres días. Se alimentó diariamente a las células, aspirando el medio de cada pocillo y reemplazándolo con una alícuota fresca (200 µl) de DMEM rico en glucosa suplementado con 0,1 % de Albumax, 0,5x de Insulina-Transferrina- Selenio, 100 ng / ml de Noggin y 1 µM de inhibidor de Alk 5 (Axxora; N.º de cat.ALX-270-445) y 1 µg/ml de DAPT (Sigma; n.º de cat. D5942). Durante la etapa 4, se añadieron muestras de ensayo de inhibidores de quinasas a pocillos individuales el primer día junto con tricostatina A 100 nM, después se omitieron ambas muestras de ensayo de inhibidores de quinasas y TsA durante la alimentación los días 2 y 3. En cada placa, se trató un total de 16 pocillos de control con una cantidad equivalente DMSO al 0,1 % sin ningún compuesto de ensayo.

30 *Análisis de alto contenido:* Al final de la etapa 4, se aspiró el medio de todos los pocillos, seguido de fijación a temperatura ambiente durante 20 minutos con paraformaldehído al 4 % (Sigma-Aldrich; N.º de cat.158127) diluido en PBS sin cationes divalentes (Invitrogen; N.º de cat.14190), lavando después una vez con PBS. Los pocillos de muestra se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5 % (VWR n.º de cat. VW3929-2) durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS y se bloquearon con suero de burro al 5 % (Jackson ImmunoResearch; N.º de cat.017- 000-121) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios (anti-NGN3 de oveja, R & D Systems, AF3444 o anti-NKX6.1 de ratón, Universidad de Iowa, N.º de cat. F55A12) se diluyeron (1:300 para anti-NGN3, 1:500 para anti-NKX6.1) en 5 % de suero de burro y se añadió a cada pocillo durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar dos veces en PBS, se diluyó a 1:100 el anticuerpo secundario anti-oveja de burro Alexa Fluor 647 (Invitrogen; n.º de cat. A21448) y el anticuerpo secundario de burro anti-ratón Alexa Fluor 488 (Invitrogen; n.º de cat. A21202) (ambos anticuerpos secundarios) se añadieron a cada pocillo de muestra durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de dos lavados en PBS. Para la tinción de contraste de los núcleos, se añadieron 4 µg/ml de Hoechst 33342 (Invitrogen; N.º de cat. H3570) durante diez minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron una vez con PBS y se dejaron en 100 µl / pocillo de PBS para la obtención de imágenes.

50 La obtención de imágenes se realizó utilizando un Analizador celular IN 1000 (GE Healthcare) utilizando el dicroico 51008bs para células teñidas con Hoechst 33342 y Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 647. Los tiempos de exposición se optimizaron a partir de pocillos de control positivo teñidos con cada anticuerpo secundario individual. Se adquirieron imágenes de 15 campos por pocillo para compensar cualquier pérdida celular durante el bioensayo y los procedimientos de tinción posteriores. Las mediciones para el número total de células y la intensidad total de NGN3 o NKX6.1 se obtuvieron de cada pocillo utilizando el software Cell Developer Toolbox 1,7 (GE Healthcare). La segmentación de los núcleos se determinó en base a los niveles de escala de grises (rango de base 100-300) y el tamaño nuclear. La expresión total de la proteína NGN3 o NKX6.1 se informó como la intensidad total o la intensidad integrada, definida como la fluorescencia total de la célula multiplicada por el área de la célula. Se eliminó el fondo basándose en criterios de aceptación de rangos de escala de grises entre 200 y 3500. Los datos de intensidad total se normalizaron dividiendo las intensidades totales para cada pocillo por la intensidad total media para el control positivo.

60 Los resultados de esta detección selectiva se resumen en la Tabla 5, la Tabla 6 y la Tabla 7. Los datos de la Tabla 5 representan una relación representativa de la tinción de NGN3 y NKX6.1 para cada pocillo tratado con un compuesto individual con respecto a la tinción promedio en pocillos con DMSO solo. Además, también se muestra el orden de rangos para el efecto de cada compuesto sobre la expresión de proteínas para NGN3 o NKX6.1. En la Tabla 6 se enumeran los rangos ordenados para los 16 primeros resultados que tienen un efecto positivo en la expresión de NGN3 y / o NKX6.1. En la Tabla 7 se resumen los objetivos y vías de transducción de señal que corresponden a estos resultados principales. Las vías con múltiples resultados de esta detección selectiva parecen tener mayor

validez por tener un impacto en la expresión de estos dos factores de transcripción críticos para la determinación del destino endocrino.

### Ejemplo 3

5

#### Confirmaciones para los análogos de molécula pequeña que participan en la expresión de NGN3 y NKX6.1

La expresión de NKX6.1 junto con NGN3 se requiere durante la progresión de las células progenitoras hacia un destino celular endocrino. Se repitió una detección selectiva de inhibidores de quinasas para determinar si cualquier compuesto de molécula pequeña podría regular por aumento la expresión de uno o ambos marcadores durante la diferenciación. En este ejemplo, también se incluyó en el protocolo de diferenciación el inhibidor de HDAC Tricostatina A para modular la remodelación de la cromatina y, posiblemente, potenciar la transcripción génica.

*Preparación de células para el ensayo:* Se mantuvieron cultivos maestros de células madre embrionarias humanas (línea de células madre embrionarias humanas H1) en un estado pluripotencial no diferenciado en placas revestidas con factor de crecimiento reducido MATRIGEL (BD Biosciences, n.º de cat. 356231 1) en medio acondicionado MEF con pases promedio cada cuatro días. El pase se realizó exponiendo los cultivos de células a una solución de 1 mg / ml de dispasa (Invitrogen, n.º de cat. 17105-041) durante de 5 a 7 minutos a 37 °C, seguido de lavado de la monocapa con medio de cultivo acondicionado MEF y raspado suave para recuperar los grupos de células. Los grupos se centrifugaron a velocidad baja para recoger un sedimento de células y eliminar la dispasa residual. Los grupos de células se dividieron en una proporción 1:3 o 1:4 para el cultivo de mantenimiento rutinario. Todas las líneas de células madre embrionarias humanas se mantuvieron en números de pase inferiores a 50 y se evaluaron rutinariamente para el cariotipo normal y ausencia de micoplasma. Para las detecciones selectivas en formato de ensayo miniaturizado, se recogieron grupos de células madre embrionarias humanas H1 del cultivo con tratamiento con dispasa, tal como se describe, y se sembraron con dispersión uniforme en una proporción de 1:2 (área de superficie) en placas de 96 pocillos (Packard ViewPlates; PerkinElmer; n.º de cat 6005182) revestidas con factor de crecimiento reducido MATRIGEL (BD Biosciences; 356231) utilizando volúmenes de 100 µl / pocillo. Se permitió que las células se unieran y luego se recuperó el crecimiento de la fase logarítmica durante un periodo de tiempo de 1 a 3 días, alimentando diariamente con medio acondicionado MEF suplementado con 8 ng / ml de bFGF (R & D Systems; n.º de cat. 233-FB). Las placas se mantuvieron a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> en una caja humidificada a lo largo de la duración del ensayo.

*Preparación de los compuestos:* La detección selectiva de confirmación se realizó utilizando una única biblioteca comercial de inhibidores de quinasas de molécula pequeña (BioMol Intl; N.º de cat. 2832A (V2,2) como se define en la Tabla 1. Los resultados de compuestos de esta biblioteca se pusieron a disposición como reservas de 10 mM en formato de placas 96 pocillos, solubilizados en DMSO al 100 % y almacenados a -80 °C. Los compuestos individuales de interés de la biblioteca se diluyeron adicionalmente a una concentración intermedia de 2,5 mM en DMSO al 100 % (Sigma, N.º de cat.D2650), también se almacenaron a -80 °C hasta su uso. El día del ensayo, estos compuestos individuales de interés se diluyeron a 1:12,5 en medio DMEM rico en glucosa, para producir una reserva de trabajo de 200 µM en DMSO al 8 % y, a continuación, se diluyeron a 1:80 en cada pocillo de ensayo para una concentración final de 2,5 µM del compuesto y DMSO al 0,1 %.

*Ensayo de diferenciación y detección selectiva:* La etapa 1 del protocolo de diferenciación se llevó a cabo durante tres días, alimentando diariamente aspirando el medio de cada pocillo y reemplazándolo con una alícuota fresca (100 µl). El primer día de ensayo, los pocillos se alimentaron usando medio RPMI-1640 (Invitrogen; n.º de cat. 22400) que contenía 2 % de fracción V de albúmina bovina, sin ácidos grasos (FAF BSA) (Proliant Inc.; N.º de cat.: SKU 68700), 100 ng/ml de activina A (PeproTech; N.º de cat.120-14), 20 ng/ml de Wnt3a (R&D Systems; N.º de cat. 1324-WN/CF) y 8 ng/ml bFGF (R&D Systems; N.º de cat. 233-FB). Al segundo y tercer día del ensayo, los pocillos se alimentaron con el mismo medio excepto que se retiró Wnt3a. Todos los pocillos se alimentaron y trataron de forma idéntica.

La etapa 2 del protocolo de diferenciación se llevó a cabo durante dos días. Las células se alimentaron diariamente aspirando el medio de cada pocillo y reemplazándolo con una alícuota fresca (100 µl) de medio DMEM: F12 (Invitrogen, N.º de cat.11330-032) que contenía 2 % de FAF BSA, 50 ng / ml de FGF7 (PeproTech; 100 - 19), y 250 nM de KAAD - ciclopamina (Calbiochem; N.º de cat. 239804). Todos los pocillos se alimentaron y trataron de forma idéntica.

La etapa 3 del protocolo de diferenciación se llevó a cabo durante cuatro días. Se alimentó a las células en días alternos por medio de aspiración del medio de cada pocillo y reemplazándolo con una alícuota fresca (200 µl) de DMEM rico en glucosa (Invitrogen, N.º de cat.10569) suplementado con Albumax al 0,1 % (Invitrogen; n.º de cat.: 11020-021), 0,5x de Insulina-Transferrina-Selenio (ITS-X; Invitrogen; n.º de cat. 51500056), 50 ng/ml de FGF7, 100 ng/ml de Noggin (R&D Systems; n.º de cat. 3344-NG), KAAD-ciclopamina 250 nM, ácido todo-trans retinoico 2 µM (RA) (Sigma-Aldrich; n.º de cat. R2625) y 20 ng/ml de activina A. Durante la etapa 3, se añadieron muestras de ensayo por triplicado de inhibidores de quinasa en el momento de la alimentación los días 1 y 3. En cada placa se trató un total de 16 pocillos control con una cantidad equivalente de DMSO al 0,1 % sin ningún compuesto de ensayo.

La etapa 4 del protocolo de diferenciación se llevó a cabo durante cuatro días. Se alimentó a las células en días alternos, aspirando el medio de cada pocillo y reemplazándolo con una alícuota fresca (200 µl) de DMEM rico en glucosa suplementado con 0,1 % de Albumax, 0,5x de Insulina-Transferrina- Selenio, 100 ng / ml de Noggin y 1 µM de inhibidor de Alk 5 (Axxora; N.º de cat.ALX-270-445). Durante la etapa 4, las muestras de ensayo por triplicado de inhibidores de quinasa se añadieron a los pocillos en el momento de la alimentación los días 1 y 3. En cada placa, se trató un total de 16 pocillos de control con una cantidad equivalente de DMSO al 0,1 % sin ningún compuesto de ensayo.

10 *Análisis de alto contenido:* Al final de la etapa 4, se aspiró el medio de todos los pocillos, seguido de fijación a temperatura ambiente durante 20 minutos con paraformaldehído al 4 % (Sigma-Aldrich; N.º de cat.158127) diluido en PBS sin cationes divalentes (Invitrogen; N.º de cat.14190), lavando después una vez con PBS. Los pocillos de muestra se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5 % (VWR n.º de cat. VW3929-2) durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS y se bloquearon con suero de burro al 5 % (Jackson ImmunoResearch; N.º de cat.017- 000-121) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios (anti-NGN3 de oveja, R & D Systems, AF3444 o anti-NKX6.1 de ratón, Universidad de Iowa, N.º de cat. F55A12) se diluyeron (1:300 para anti-NGN3, 1:500 para anti-NKX6.1) en 5 % de suero de burro y se añadió a cada pocillo durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar dos veces en PBS, se diluyó a 1:100 el anticuerpo secundario anti-oveja de burro Alexa Fluor 647 (Invitrogen; n.º de cat. A21448) y el anticuerpo secundario de burro anti-ratón Alexa Fluor 488 (Invitrogen; n.1 de cat. A21202) (ambos anticuerpos secundarios) se añadieron a cada pocillo de muestra durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de dos lavados en PBS. Para la tinción de contraste de los núcleos, se añadieron 4 µg/ml de Hoechst 33342 (Invitrogen; N.º de cat. H3570) durante diez minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron una vez con PBS y se dejaron en 100 µl / pocillo de PBS para la obtención de imágenes.

25 La obtención de imágenes se realizó utilizando un Analizador celular IN 1000 (GE Healthcare) utilizando el dicroico 51008bs para células teñidas con Hoechst 33342 y Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 647. Los tiempos de exposición se optimizaron a partir de pocillos de control positivo teñidos con cada anticuerpo secundario individual. Se adquirieron imágenes de 15 campos por pocillo para compensar cualquier pérdida celular durante el bioensayo y los procedimientos de tinción posteriores. Las mediciones para el número total de células y la intensidad total de NGN3 o NKX6.1 se obtuvieron de cada pocillo utilizando el software Cell Developer Toolbox 1,7 (GE Healthcare). La segmentación de los núcleos se determinó en base a los niveles de escala de grises (rango de base 100-300) y el tamaño nuclear. La expresión total de la proteína NGN3 o NKX6.1 se informó como la intensidad total o la intensidad integrada, definida como la fluorescencia total de la célula multiplicada por el área de la célula. Se eliminó el fondo basándose en criterios de aceptación de rangos de escala de grises entre 200 y 3500. Los datos de intensidad total se normalizaron dividiendo las intensidades totales para cada pocillo por la intensidad total media para el control positivo.

40 Los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla 8. Dos compuestos (kenpaulona y BML-259) no se confirmaron y no tienen efectos potenciadores sobre la expresión de NGN3 o NKX6.1 en relación con un tratamiento de control. Los compuestos restantes en este ensayo muestran un impacto positivo en uno o ambos factores de transcripción, confirmando resultados anteriores y subrayando la importancia de estas vías de señalización asociadas.

45

50

55

60

65

Tabla 1: BIBLIOTECA DEL INHIBIDOR DE LA QUINASA BioMol (n.º de cat. 2832, v2.2)

LOCALIZACIÓN DE LA PLACA	N.º CAS	NOMBRE DEL COMPUESTO O NÚMERO ID.	P.M.	DIANA
B1	167869-21-8	PD-98059	267,3	MEK
B2	109511-58-2	U-0126	380,5	MEK
B3	152121-47-6	SB-203580	377,4	p38 MAPK
B4	84477-87-2	H-7	364,3	PKA, PKG, MLCK, and PKC.
B5	84468-17-7	H-9	324,3	PKA, PKG, MLCK, and PKC.
B6	62996-74-1	Estaurosporina	466,5	Específico de Pan
B7	133550-35-5	AG-494	280,3	EGFRK, PDGFRK
B8		AG-825	397,5	HER1-2
B9	125697-92-9	Lavendustina A	381,4	EGFRK
B10	136831-49-7	RG-14620	274,1	EGFRK
B11	118409-57-7	Tirfostina 23	186,1	EGFRK
B12	118409-58-8	Tirfostina 25	202,1	EGFRK
C1	122520-85-8	Tirfostina 46	204,2	EGFRK, PDGFRK
C2	122520-86-9	Tirfostina 47	220,2	EGFRK
C3	122520-90-5	Tirfostina 51	268,2	EGFRK
C4	2826-26-8	Tirfostina 1	184,2	Control negativo para los inhibidores de tirosina quinasa
C5	116313-73-6	Tirfostina AG 1288	231,2	Tirosina quinasa
C6	63177-57-1	Tirfostina AG 1478	315,8	EGFRK
C7	71897-07-9	Tirfostina AG 1295	234,3	Tirosina quinasa
C8	10537-47-0	Tirfostina 9	282,4	PDGFRK
C9		HNMPA (ácido hidroxí-2-naftalenilmetilfosfórico)	238,2	IRK
C10	120685-11-2	PKC-412	570,6	Inhibidor de PKC
C11	10083-24-6	Piceatannol	244,3	Syk
C12	172889-26-8	PP1	281,4	Familia Src
D1	133550-35-3	AG-490	294,3	JAK-2
D2		AG-126	215,2	IRAK
D3		AG-370	259,3	PDGFRK
D4		AG-879	316,5	NGFRK
D5	154447-36-6	LY 294002	307,4	PI 3-K
D6	19545-26-7	Wortmannina	428,4	PI 3-K
D7	133052-90-1	GF 109203X	412,5	PKC
D8	548-04-9	Hipericina	504,4	PKC
D9	138489-18-6	Ro 31-8220	553,7	PKC
D10	123-78-4	Esfingosina	299,5	PKC
D11	127243-85-0	H-89	519,2	PKA
D12	84478-11-5	H-8	338,3	PKA, PKG
E1	91742-10-8	HA-1004	329,8	PKA, PKG

ES 2 633 648 T3

LOCALIZACIÓN DE LA PLACA	N.º CAS	NOMBRE DEL COMPUESTO O NÚMERO ID.	P.M.	DIANA
E2	103745-39-7	HA-1077	327,8	PKA, PKG
E3		HDBA (ácido 2-hidroxi-5-(2,5-dihidroxibencilamino)benzoico)	275,3	EGFRK, CaMK II
E4	127191-97-3	KN-62	721,9	CaMK II
E5		KN-93	501	CaMK II
E6	109376-83-2	ML-7	452,7	MLCK
E7	105637-50-1	ML-9	361,3	MLCK
E8	452-06-2	2-Aminopurina	135,1	p58 PITSLRE beta1
E9	158982-15-1	N9-Isopropil-olomoucina	326,4	CDK
E10	101622-51-9	Olomoucina	298,3	CDK
E11	101622-50-8	iso-Olomoucina	298,4	Control negativo para olomoucina.
E12	186692-46-6	Roscovitina	354,5	CDK
F1	24386-93-4	5-Iodotubercidina	392,2	ERK2, adenosina quinasa, CK1, CK2,
F2	62004-35-7	LFM-A13	360	BTK
F3	152121-30-7	SB-202190	331,3	p38 MAPK
F4	172889-27-9	PP2	301,8	Familia Src
F5	208260-29-1	ZM 336372	389,4	cRAF
F6	5812-07-7	SU 4312	264,3	FK1
F7	146535-11-7	AG-1296	266,3	PDGFRK
F8	220904-83-6	GW 5074	520,9	cRAF
F9	6865-14-1	Palmitoil-DL-carnitina Cl	436,1	PKC
F10	82-08-6	Rotlerina	516,6	PKC delta
F11	446-72-0	Genisteína	270,2	Tirosina quinasa
F12	486-66-8	Daidzeína	254,2	Control negativo para genisteína
G1	63177-57-1	Análogo de erbstatina	194	EGFRK
G2	6151-25-3	Quercetina dihidrato	338,3	PI3-K
G3		SU1498	390,5	FK1
G4	4452-06-6	ZM 449829	182,2	JAK-3
G5	195462-67-7	BAY 11-7082	207,3	Vía de IKK
G6	53-85-0	DRB (5,6-dicloro-1-b-D-ribofuranosilbenzimidazol)	319,1	CK II
G7		HBDDE (éter dimetílico de 2,2',3,3',4,4'-Hexahidroxi-1,1'-bifenil-6,6'-dimetanol)	338,4	PKC alfa, PKC gamma
G8	129-56-6	SP600125	220,2	JNK
G9	479-41-4	Indirubina	262	GSK-3beta, CDK5
G10	160807-49-8	Indirubin-3'-monoxima	277,3	GSK-3beta
G11	146986-50-7	Y-27632	338,3	ROCK
G12	142273-20-9	Kenpaulona	327,2	GSK-3beta
H1	121-40-4	Ácido terreico	154,1	BTK

ES 2 633 648 T3

<b>LOCALIZACIÓN DE LA PLACA</b>	<b>N.º CAS</b>	<b>NOMBRE DEL COMPUESTO O NÚMERO ID.</b>	<b>P.M.</b>	<b>DIANA</b>
H2	35943-35-2	Triciribina	320,3	Vía de señalización de Akt
H3		BML-257	326,4	Akt
H4		s.c.-514	224,3	IKK2
H5		BML-259	260,4	Cdk5/p25
H6	520-36-5	Apigenina	270,2	CK-II
H7		BML-265 (análogo de erlotinib)	305,4	EGFRK
H8	53123-88-9	Rapamicina	914,2	mTOR

ES 2 633 648 T3

Tabla 2: BIBLIOTECA DEL INHIBICOR DE QUINASA EMD Calbiochem (n.º de cat. 539745)

LOCALIZACIÓN DE LA PLACA	N.º CAS	NOMBRE DEL COMPUESTO O NÚMERO ID.	P.M.
A2	127191-97-3	KN-62	721,9
A3	587871-26-9	Inhibidor de quinasa ATM	395,5
A4	905973-89-9	Inhibidor de quinasa ATM/ATR	555,8
A5	237430-03-4	Alsterpaulona	293,3
A6	852527-97-0	Alsterpaulona, 2-Cianoetilo	346,3
A7	496864-16-5	Aloisina A, RP107	267,3
A8	496864-15-4	Aloisina, RP106	281,4
A9	220792-57-4	Aminopurvalanol A	403,9
A10	866405-64-3	Inhibidor de AMPK, compuesto C	399,5
A11	879127-16-9	Inhibidor de la Aurora quinasa III	413,4
B2	443797-96-4	Inhibidor de Aurora quinasa/Cdk	435,4
B3	160807-49-8	Indirubin-3'-monoxima	277,3
B4	19542-67-7	BAY 11-7082	207,2
B5	189232-42-6	Bohemina	340,4
B6	220749-41-7	Inhibidor de Cdk1	294,7
B7	190654-01-4	Inhibidor de Cdk1, CGP74514A	385,9
B8	443798-55-8	Inhibidor III de Cdk1/2	425,4
B9	40254-90-8	Inhibidor de Cdk1/5	185,2
B10	301836-43-1	Inhibidor I de la caseína quinasa, D4476	398,4
B11	934358-00-6	Inhibidor III de caseína quinasa III, TBCA	463,8
C2	546102-60-7	Inhibidor de Cdk4	404,2
C3	141992-47-4	Inhibidor II de Cdk4, NSC 625987	271,3
C4	265312-55-8	Inhibidor III de Cdk4	284,3
C5	300801-52-9	Inhibidor de quinasa similar a Cdc2, TG003	249,3
C6	516480-79-8	Inhibidor II de Chk2	363,8
C7	212779-48-1	Compuesto 52	346,8
C8	199986-75-9	Inhibidor III de Cdk2	400,5
C9	444723-13-1	Inhibidor IV de Cdk2, NU6140	422,5
C10	784211-09-2	Inhibidor de Cdk/Crk	473,4
C11		Inhibidor III de ERK	318,3
D2	146986-50-7	Inhibidor de ROCK, Y-27632	338,3
D3	865362-74-9	Inhibidor II de ERK, FR180204	327,3
D4		Inhibidor II de ERK, control negativo	328,3
D5		Fascaplisina, sintético	306,8
D6		Inhibidor I de GSK-3b	222,3
D7	478482-75-6	Inhibidor II de GSK-3b	395,2
D8	487021-52-3	Inhibidor VIII de GSK-3b	308,3
D9	667463-62-9	Inhibidor IX de GSK-3	356,2
D10		Inhibidor X de GSK-3	398,2
D11	626604-39-5	Inhibidor XI de GSK-3b	349,3

ES 2 633 648 T3

LOCALIZACIÓN DE LA PLACA	N.º CAS	NOMBRE DEL COMPUESTO O NÚMERO ID.	P.M.
E2	330161-87-0	SU6656	371,5
E3	404828-08-6	Inhibidor XIII de GSK-3	301,4
E4	244148-46-7	Isogranulatimida	276,3
E5	186611-52-9	IC261	311,3
E6	507475-17-4	Inhibidor IV de IKK-2	279,3
E7		Derivado de indirubina E804	365,4
E8	129-56-6	Inhibidor II de JNK	220,2
E9		Inhibidor de JNK, control negativo	234,2
E10	345987-15-7	Inhibidor V de JNK	372,5
E11	312917-14-9	Inhibidor IX de JNK	350,4
F2	41179-33-3	Inhibidor de MK2a	349,4
F3	894804-07-0	Inhibidor VIII de JNK	356,4
F4	97161-97-2	K-252a, Nocardiosis sp.	467,5
F5	142273-20-9	Kenpaulona	327,2
F6	139298-40-1	KN-93	501,0
F7		Inhibidor I de MEK	374,5
F8	623163-52-0	Inhibidor II de MEK	289,7
F9	305350-87-2	Inhibidor de MEK1/2	335,4
F10	522629-08-9	Inhibidor de MNK1	244,2
F11	545380-34-5	Inhibidor de la activación de NF-κB	356,4
G2	581098-48-8	Inhibidor III de la p38 MAP quinasa	404,5
G3	219138-24-6	Inhibidor de la p38 MAP quinasa	365,8
G4	167869-21-8	PD 98059	267,3
G5	152121-53-4	PD 169316	360,3
G6	165806-53-1	SB220025	338,4
G7	212844-53-6	Purvalanol A	388,9
G8		Inhibidor XII de GSK3b, TWS119	318,3
G9	127243-85-0	H-89, Dihidrocloruro	519,3
G10		SB 202474, Control negativo para los estudios de inhibición de p38 MAPK	279,3
G11	152121-30-7	SB202190	331,3
H2	152121-47-6	SB 203580	377,4
H3	103745-39-7	HA 1077, Fasudil diclorhidrato	364,3
H4	135897-06-2	SB 218078	393,4
H5	318480-82-9	s.c.-68376	236,3
H6	72873-74-6	SKF-86002	297,4
H7		Inhibidor de la esfingosina quinasa	339,2
H8	62996-74-1	Estauosporina, Streptomyces sp.	466,5
H9	52029-86-4	STO-609	374,4
H10	666837-93-0	SU9516	241,3
H11	871307-18-5	Inhibidor de Tpl2 quinasa	404,8

Tabla 3: Bibliotecas del inhibidor de quinasa EMDII y BioMol

					Intensidad de NGN3							
BIBLIOTECA		POCILLO	DIANA	INHIBIDOR	Etapa de dosis 3		Etapa de dosis 4		Etapa de dosis 3 y 4			
					RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN		
BioMol INH	Kin F - 4		Familia Src	PP2	8	1,81	2	2,50	1	2,49		
BioMol INH	Kin D - 5		PI 3-K	LY 294002	7	1,82	9	1,63	2	2,46		
BioMol INH	Kin B - 3		p38 MAPK	SB -203580	3	2,23	7	1,88	3	2,34		
EMDII INH	Kin H - 2		p38	SB 203580	19	1,53	52	1,08	4	2,22		
EMDII INH	Kin H - 5		p38	s.c.-68376	29	1,41	121	0,69	5	2,12		
BioMol INH	Kin B - 4		PKA, PKG, MLCK y PKC.	H-7	5	1,93	5	2,18	6	2,08		
EMDII INH	Kin G-10		NO un inh. de p38	SB 202474, control neg. para p38 MAPK	116	0,88	62	1,03	7	2,02		
EMDII INH	Kin A - 7		(CDK1/2/5)(GSK3i)	Aloisina A, RP107	58	1,25	55	1,06	8	1,97		
EMDII INH	Kin H - 3		ROCK	HA 1077, Fasudil	47	1,32	20	1,40	9	1,93		
BioMol INH	Kin F - 3		p38 MAPK	SB -202190	11	1,72	58	1,05	10	1,83		
EMDII INH	Kin A - 2		CAMKII	KN-62	110	0,93	107	0,81	11	1,82		
BioMol INH	Kin G - 11		ROCK	Y-27632	120	0,84	1	2,67	12	1,78		
BioMol INH	Kin D - 11		PKA	H-89	2	2,57	4	2,23	13	1,75		

BIBLIOTECA		Intensidad de NGN3									
		POCILLO		DIANA	INHIBIDOR	Etapa de dosis 3		Etapa de dosis 4		Etapa de dosis 3 y 4	
		Kin	C - 6			RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN
BioMol INH	Kin	C - 6	EGFRK		Tirfostina AG 1478	15	1,62	10	1,57	14	1,74
EMDII INH	Kin	A - 3	ATM		Inhibidor de quinasa ATM	54	1,28	88	0,91	15	1,70
BioMol INH	Kin	C - 12	Familia Src		PP1	4	2,05	12	1,48	16	1,67
BioMol INH	Kin	E - 1	PKA, PKG		HA-1004	6	1,82	3	2,30	17	1,63
EMDII INH	Kin	B - 9	CDK1/5		Inhibidor de Cdk1/5	83	1,12	100	0,85	18	1,61
EMDII INH	Kin	C - 7	CDC28		Compuesto 52	67	1,22	122	0,68	19	1,61
EMDII INH	Kin	F - 9	MEK1/2		Inhibidor de MEK1/2	94	1,03	110	0,77	20	1,60
BioMol INH	Kin	H - 7	EGFRK		BML-265 (análogo de erlotinib)	16	1,58	30	1,25	21	1,59
EMDII INH	Kin	G - 4	MEK1/2		PD 98059	71	1,21	78	0,96	22	1,57
EMDII INH	Kin	F - 2	MK2a		Inhibidor de MK2a	107	0,95	80	0,95	23	1,54
EMDII INH	Kin	H - 6	p38		SKF-86002	46	1,32	92	0,89	24	1,49
BioMol INH	Kin	C - 9	IRK		HNMPA	93	1,06	39	1,19	25	1,38
BioMol INH	Kin	B - 5	PKA, PKG, MLCK, and PKC.		H-9	1	2,62	6	1,97	26	1,36

Intensidad de NGN3										
BIBLIOTECA		POCILLO	DIANA	INHIBIDOR	Etapa de dosis 3		Etapa de dosis 4		Etapa de dosis 3 y 4	
BioMol	Kin	H - 6	CK-II	Apigenina	RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN
INH					38	1,35	120	0,70	27	1,32
BioMol	Kin	E - 2	PKA, PKG	HA-1077	12	1,69	35	1,21	28	1,30
INH										
BioMol	Kin	D - 12	PKA, PKG	H-8	28	1,43	16	1,45	29	1,30
INH										
BioMol	Kin	E - 10	CDK	Olomoucina	25	1,46	41	1,17	30	1,30
INH										
EMDII	Kin	F - 8	MEK	Inhibidor II de MEK	105	0,96	96	0,88	31	1,28
INH										
EMDII	Kin	H - 4	CHK1	SB 218078	61	1,23	29	1,25	32	1,27
INH										
BioMol	Kin	C - 7	Tirosina quinasas	Tirfostina AG 1295	90	1,07	48	1,12	33	1,24
INH										
BioMol	Kin	F - 7	PDGFRK	AG-1296	43	1,33	82	0,94	34	1,24
INH										
BioMol	Kin	C - 3	EGFRK	Tirfostina 51	79	1,16	28	1,26	35	1,22
INH										
BioMol	Kin	F - 5	cRAF	ZM 336372	23	1,48	114	0,76	36	1,19
INH										
BioMol	Kin	C - 2	EGFRK	Tirfostina 47	40	1,35	47	1,12	37	1,18
INH										
BioMol	Kin	F - 6	Fik1	SU 4312	37	1,35	65	1,01	38	1,13
INH										
BioMol	Kin	H - 4	IKK2	SC-514	20	1,52	64	1,01	39	1,13
INH										

Intensidad de NGN3									
BIBLIOTECA	POCILLO	DIANA	INHIBIDOR	Etapa de dosis 3		Etapa de dosis 4		Etapa de dosis 3 y 4	
				RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN
EMDII INH	Kin D - 11	GSK3	Inhibidor XI de GSK-3b	132	0,62	44	1,15	40	1,13
EMDII INH	Kin C - 6	CHK2	Inhibidor II de Chk2	63	1,23	66	1,00	41	1,11
EMDII INH	Kin D - 3	ERK	Inhibidor II de ERK, FR180204	55	1,27	33	1,22	42	1,11
EMDII INH	Kin A - 10	AMPK	Inhibidor de AMPK, compuesto C	32	1,38	87	0,92	43	1,08
EMDII INH	Kin E - 8	JNK	Inhibidor II de JNK	48	1,31	115	0,75	44	1,08
BioMol INH	Kin B - 8	HER1-2	AG-825	106	0,96	37	1,20	45	1,06
EMDII INH	Kin B - 10	CK1/ALK/p38	Inhibidor I de la caseína quinasa, D4476	100	0,99	45	1,13	46	1,05
BioMol INH	Kin B - 11	EGFRK	Tirfostina 23	36	1,36	13	1,47	47	1,05
BioMol INH	Kin H - 1	BTk	Ácido terreico	10	1,78	15	1,46	48	1,05
EMDII INH	Kin F - 11	NF-kappa B	Inhibidor de la activación de NF-kB	121	0,84	125	0,65	49	1,04
EMDII INH	Kin E - 5	CHK1	IC261	118	0,87	131	0,55	50	1,04
BioMol INH	Kin D - 7	PKC	GF 109203X	101	0,99	26	1,29	51	1,04
EMDII INH	Kin A - 11	Aurora/LCK/BMX/IGF1R/SYK	Inhibidor de la Aurora quinasa III	87	1,10	67	1,00	52	1,03

Intensidad de NGN3										
BIBLIOTECA		POCILLO	DIANA	INHIBIDOR	Etapa de dosis 3		Etapa de dosis 4		Etapa de dosis 3 y 4	
BioMol	Kin	G - 12	GSK-3beta	Kenpaulona	RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN
INH					14	1,66	23	1,32	53	1,03
EMDII	Kin	B - 4	NF-kappaB	BAY 11-7082	123	0,83	79	0,96	54	1,03
INH										
BioMol	Kin	C - 4	Control negativo para los inhibidores de tirosina quinasa	Tirfostina 1	131	0,66	49	1,12	55	1,02
INH										
BioMol	Kin	F - 12	Control negativo para genisteína	Daidzeína	62	1,23	19	1,41	56	1,01
INH										
BioMol	Kin	D - 10	PKC	Esfingosina	72	1,20	25	1,30	57	1,00
INH										
BioMol	Kin	E - 8	p58 PITSLRE beta1	2-Aminopurina	111	0,93	60	1,04	58	1,00
INH										
BioMol	Kin	G - 3	Flk1	SU1498	68	1,21	59	1,04	59	0,99
INH										
BioMol	Kin	B - 10	EGFRK	RG-14620	114	0,89	17	1,44	60	0,97
INH										
EMDII	Kin	H - 11	TPL2	Inhibidor de Tpl2 quinasa	99	0,99	76	0,97	61	0,96
INH										
BioMol	Kin	G - 8	JNK	SP600125	31	1,38	89	0,91	62	0,95
INH										
EMDII	Kin	G - 11	p38	SB 202190	50	1,30	38	1,20	63	0,94
INH										
BioMol	Kin	D - 3	PDGFRK	AG-370	70	1,21	70	0,98	64	0,94
INH										
BioMol	Kin	F - 8	cRAF	GW 5074	39	1,35	111	0,77	65	0,94
INH										

Intensidad de NGN3									
BIBLIOTECA		POCILLO	DIANA	INHIBIDOR	Etapa de dosis 3		Etapa de dosis 4		Etapa de dosis 3 y 4
					RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN	RANGO RELACIÓN
BioMol INH	Kin D - 6	PI 3-K		Wortmannina	9	1,80	50	1,10	66 0,93
EMDII INH	Kin D - 2	ROCK		Inhibidor de ROCK, Y-27632	122	0,83	14	1,46	67 0,93
BioMol INH	Kin D - 2	IRAK		AG-126	18	1,53	85	0,93	68 0,92
BioMol INH	Kin C - 5	Tirosina quinasas		Tirfostina AG 1288	104	0,98	34	1,22	69 0,91
EMDII INH	Kin F - 7	MEK		Inhibidor I de MEK	126	0,74	102	0,85	70 0,91
EMDII INH	Kin H - 10	CDK1/2/4		SU9516	89	1,09	132	0,54	71 0,91
BioMol INH	Kin G - 9	GSK-3beta, CDK5		Indirubina	115	0,88	124	0,66	72 0,91
EMDII INH	Kin A - 4	ATM/ATR		Inhibidor de quinasas ATM/ATR	82	1,14	43	1,15	73 0,89
EMDII INH	Kin G - 2	p38		Inhibidor III de la p38 MAP quinasas	22	1,51	18	1,43	74 0,89
EMDII INH	Kin G - 9	PKA		H-89, Dihidrocloruro	57	1,26	24	1,31	75 0,89
EMDII INH	Kin D - 6	GSK3		Inhibidor I de GSK-3b	96	1,03	75	0,97	76 0,89
EMDII INH	Kin G - 3	p38		Inhibidor de la p38 MAP quinasas	53	1,28	94	0,89	77 0,88
BioMol INH	Kin E - 11	Control negativo para olomoucina.		iso-Olomoucina	34	1,38	22	1,37	78 0,88

Intensidad de NGN3										
BIBLIOTECA		POCILLO	DIANA	INHIBIDOR	Etapa de dosis 3		Etapa de dosis 4		Etapa de dosis 3 y 4	
BioMol	Kin	E - 9	CDK		RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN
INH				N9-Isopropilolomoucina	73	1,19	93	0,89	79	0,87
BioMol	Kin	E - 12	CDK	Roscovitina	52	1,28	108	0,79	80	0,86
INH										
BioMol	Kin	H - 3	Akt	BML-257	33	1,38	51	1,09	81	0,86
INH										
BioMol	Kin	F - 11	Tirosina quinasas	Genisteína	<b>27</b>	<b>1,44</b>	<b>11</b>	<b>1,56</b>	<b>82</b>	<b>0,85</b>
INH										
BioMol	Kin	E - 3	EGFRK, CaMK II	HDBAd)	85	1,11	95	0,89	83	0,84
INH										
EMDII	Kin	C - 11	ERK	Inhibidor III de ERK	78	1,16	27	1,28	84	0,84
INH										
BioMol	Kin	C - 1	EGFRK, PDGFRK	Tirfosina 46	66	1,22	<b>21</b>	<b>1,40</b>	<b>85</b>	<b>0,84</b>
INH										
BioMol	Kin	F - 2	BTK	LFM-A13	51	1,29	105	0,83	86	0,83
INH										
EMDII	Kin	E - 3	GSK	Inhibidor XIII de GSK-3	<b>17</b>	<b>1,56</b>	98	0,87	87	0,82
INH										
BioMol	Kin	B - 7	EGFRK, PDGFRK	AG-494	84	1,12	63	1,03	88	0,82
INH										
BioMol	Kin	F - 9	PKC	Palmitoil-DL-carnitina Cl	92	1,06	74	0,97	89	0,82
INH										
BioMol	Kin	H - 5	Cdk5/p25	BML-259	41	1,34	77	0,96	90	0,80
INH										
BioMol	Kin	G - 10	GSK-3beta	Indirubin-3'-monoxima	86	1,10	53	1,08	91	0,80
INH										

Intensidad de NGN3										
BIBLIOTECA		POCILLO	DIANA	INHIBIDOR	Etapa de dosis 3		Etapa de dosis 4		Etapa de dosis 3 y 4	
EMDII	Kin	D - 7	GSK3	Inhibidor II de GSK-3b	RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN
INH					109	0,94	81	0,94	92	0,77
BioMol	Kin	G - 6	CK II	DRB	49	1,31	84	0,93	93	0,76
INH										
EMDII	Kin	C - 5	CDC2	Inhibidor de quinasa similar a Cdc2, TG003	44	1,33	61	1,04	94	0,75
INH										
BioMol	Kin	B - 2	MEK	U-0126	75	1,17	8	1,73	95	0,74
INH										
EMDII	Kin	D - 10	GSK3	Inhibidor X de GSK-3	136	0,44	56	1,05	96	0,71
INH										
BioMol	Kin	D - 1	JAK-2	AG-490	60	1,24	71	0,98	97	0,70
INH										
EMDII	Kin	B - 11		Inhibidor III de caseína quinasa III, TBCA	69	1,21	36	1,21	98	0,70
INH										
EMDII	Kin	H - 9		STO-609	91	1,06	126	0,62	99	0,69
INH										
BioMol	Kin	G - 4	JAK-3	ZM 449829	59	1,24	83	0,94	100	0,68
INH										
BioMol	Kin	C - 11	Syk	Piceatannol	65	1,22	69	0,98	101	0,65
INH										
EMDII	Kin	A - 5		Alsterpaulona	103	0,98	119	0,72	102	0,64
INH										
EMDII	Kin	F - 6	CAMKII	KN-93	108	0,94	113	0,76	103	0,61
INH										
EMDII	Kin	F - 3	JNK	Inhibidor VIII de JNK	42	1,34	46	1,12	104	0,60
INH										

Intensidad de NGN3										
BIBLIOTECA		POCILLO	DIANA	INHIBIDOR	Etapa de dosis 3		Etapa de dosis 4		Etapa de dosis 3 y 4	
					RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN
EMDII INH	Kin D - 8	GSK3		Inhibidor VIII de GSK-3b	77	1,17	103	0,85	105	0,60
BioMol INH	Kin G - 2	PI 3-K		Quercetina dihidrato	21	1,51	128	0,59	106	0,59
EMDII INH	Kin E - 9	No un inh. de JNK		Inhibidor de JNK, control negativo	74	1,18	72	0,98	107	0,59
EMDII INH	Kin E - 4			Isogranulatimida	76	1,17	99	0,86	108	0,59
EMDII INH	Kin B - 3			Indirubin-3'-monoxima	97	1,02	118	0,72	109	0,57
EMDII INH	Kin B - 7			Inhibidor de Cdk1, CGP74514A	119	0,86	123	0,67	110	0,55
BioMol INH	Kin B - 9	EGFRK		Lavendustina A	98	1,01	40	1,17	111	0,54
BioMol INH	Kin E - 5	CaMK II		KN-93	113	0,90	86	0,93	112	0,54
BioMol INH	Kin D - 4	NGFRK		AG-879	102	0,99	112	0,77	113	0,53
BioMol INH	Kin G - 1	EGFRK		Análogo de erbatatina	35	1,38	109	0,77	114	0,53
EMDII INH	Kin C - 3			Inhibidor II de Cdk4, NSC 625987	64	1,23	54	1,06	115	0,51
EMDII INH	Kin F - 5			Kenpaullona	124	0,80	106	0,82	116	0,46
BioMol INH	Kin F - 10	PKC delta		Rotterina	133	0,61	136	0,39	117	0,45

Intensidad de NGN3										
BIBLIOTECA		POCILLO	DIANA	INHIBIDOR	Etapa de dosis 3		Etapa de dosis 4		Etapa de dosis 3 y 4	
EMDII	Kin	B - 5	CDK1		RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN
INH				Bohemina	30	1,39	90	0,90	118	0,44
BioMol	Kin	E - 4	CaMK II	KN-62	125	0,80	32	1,23	119	0,44
INH										
BioMol	Kin	G - 7	PKC alfa, PKC gamma	HBDDE	88	1,09	134	0,48	120	0,43
INH										
BioMol	Kin	E - 7	MLCK	ML-9	134	0,61	73	0,97	121	0,40
INH										
EMDII	Kin	E - 10		Inhibidor V de JNK	130	0,66	101	0,85	122	0,39
INH										
EMDII	Kin	G - 6		SB220025	95	1,03	130	0,55	123	0,36
INH										
EMDII	Kin	A - 8		Aloisina, RP106	80	1,15	91	0,89	124	0,35
INH										
EMDII	Kin	E - 6	IKK2	Inhibidor IV de IKK-2	<b>26</b>	<b>1,44</b>	116	0,74	125	0,35
INH										
BioMol	Kin	E - 6	MLCK	ML-7	127	0,73	31	1,25	126	0,35
INH										
BioMol	Kin	C - 8	PDGFRK	Tirfostina 9	135	0,58	135	0,40	127	0,34
INH										
BioMol	Kin	G - 5	Vía de IKK	BAY 11-7082	128	0,71	127	0,60	128	0,34
INH										
BioMol	Kin	H - 2	Vía de señalización de Akt	Triciribina	<b>13</b>	<b>1,68</b>	129	0,57	129	0,34
INH										
EMDII	Kin	C - 8	CDK2	Inhibidor III de Cdk2	<b>24</b>	<b>1,46</b>	117	0,73	130	0,32
INH										

Intensidad de NGN3										
BIBLIOTECA		POCILLO	DIANA	INHIBIDOR	Etapa de dosis 3		Etapa de dosis 4		Etapa de dosis 3 y 4	
					RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN
EMDII INH	Kin G - 7			Purvalanol A	112	0,91	133	0,53	131	0,32
EMDII INH	Kin G - 5	p38		PD 169316	45	1,32	97	0,87	132	0,31
EMDII INH	Kin D - 4			Inhibidor II de ERK, control negativo	56	1,26	57	1,05	133	0,31
EMDII INH	Kin F - 10			Inhibidor de MNK1	81	1,15	42	1,16	134	0,31
EMDII INH	Kin C - 9			Inhibidor IV de Cdk2, NU6140	129	0,70	68	0,99	135	0,29
BioMol INH	Kin H - 8	mTOR		Rapamicina	117	0,87	104	0,84	136	0,25

Tabla 4:

Vía diana	Inhibidor	Etapa de dosis 3		Etapa de dosis 4		Etapa de dosis 3 y 4	
		RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN
Familia Src	PP2	<b>8</b>	<b>1,81</b>	<b>2</b>	<b>2,50</b>	<b>1</b>	<b>2,49</b>
PI 3-K	LY 294002	<b>7</b>	<b>1,82</b>	<b>9</b>	<b>1,63</b>	<b>2</b>	<b>2,46</b>
p38 MAPK	SB -203580	<b>3</b>	<b>2,23</b>	<b>7</b>	<b>1,88</b>	<b>3</b>	<b>2,34</b>
p38	SB 203580	<b>19</b>	<b>1,53</b>	52	1,08	<b>4</b>	<b>2,22</b>
p38	s.c.-68376	<b>29</b>	<b>1,41</b>	121	0,69	<b>5</b>	<b>2,12</b>
PKA, PKG, MLCK y PKC.	H-7	<b>5</b>	<b>1,93</b>	<b>5</b>	<b>2,18</b>	<b>6</b>	<b>2,08</b>
NO un inh. de p38	SB 202474, control neg. para p38 MAPK	116	0,88	62	1,03	<b>7</b>	<b>2,02</b>
(CDK1/2/5)(GSK3i)	Aloisina A, RP107	58	1,25	55	1,06	<b>8</b>	<b>1,97</b>
ROCK	HA 1077, Fasudil	47	1,32	<b>20</b>	<b>1,40</b>	<b>9</b>	<b>1,93</b>
p38 MAPK	SB -202190	<b>11</b>	<b>1,72</b>	58	1,05	<b>10</b>	<b>1,83</b>
CAMKII	KN-62	110	0,93	107	0,81	<b>11</b>	<b>1,82</b>
ROCK	Y-27632	120	0,84	<b>1</b>	<b>2,67</b>	<b>12</b>	<b>1,78</b>
PKA	H-89	<b>2</b>	<b>2,57</b>	<b>4</b>	<b>2,23</b>	<b>13</b>	<b>1,75</b>
EGFRK	Tirfostina AG 1478	<b>15</b>	<b>1,62</b>	<b>10</b>	<b>1,57</b>	<b>14</b>	<b>1,74</b>
ATM	Inhibidor de quinasa ATM	54	1,28	88	0,91	<b>15</b>	<b>1,70</b>
Familia Src	PP1	<b>4</b>	<b>2,05</b>	<b>12</b>	<b>1,48</b>	<b>16</b>	<b>1,67</b>
PKA, PKG	HA-1004	<b>6</b>	<b>1,82</b>	<b>3</b>	<b>2,30</b>	<b>17</b>	<b>1,63</b>
CDK1/5	Inhibidor de Cdk1/5	83	1,12	100	0,85	<b>18</b>	<b>1,61</b>
CDC28	Compuesto 52	67	1,22	122	0,68	<b>19</b>	<b>1,61</b>
MEK1/2	Inhibidor de MEK1/2	94	1,03	110	0,77	<b>20</b>	<b>1,60</b>
EGFRK	BML-265 (análogo de erlotinib)	<b>16</b>	<b>1,58</b>	30	1,25	<b>21</b>	<b>1,59</b>
MEK1/2	PD 98059	71	1,21	78	0,96	<b>22</b>	<b>1,57</b>
MK2a	Inhibidor de MK2a	107	0,95	80	0,95	<b>23</b>	<b>1,54</b>
p38	SKF-86002	46	1,32	92	0,89	<b>24</b>	<b>1,49</b>
PKA, PKG, MLCK y PKC.	H-9	<b>1</b>	<b>2,62</b>	<b>6</b>	<b>1,97</b>	26	1,36
PKA, PKG	HA-1077	<b>12</b>	<b>1,69</b>	35	1,21	28	1,30
PKA, PKG	H-8	<b>28</b>	<b>1,43</b>	<b>16</b>	<b>1,45</b>	29	1,30

		Etapa de dosis 3		Etapa de dosis 4		Etapa de dosis 3 y 4	
Vía diana	Inhibidor	RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN
CDK	Olomoucina	<b>25</b>	<b>1,46</b>	41	1,17	30	1,30
cRAF	ZM 336372	<b>23</b>	<b>1,48</b>	114	0,76	36	1,19
IKK2	s.c.-514	<b>20</b>	<b>1,52</b>	64	1,01	39	1,13
EGFRK	Tirfostina 23	36	1,36	<b>13</b>	<b>1,47</b>	47	1,05
BTK	Ácido terreico	<b>10</b>	<b>1,78</b>	<b>15</b>	<b>1,46</b>	48	1,05
GSK-3beta	Kenpaulona	<b>14</b>	<b>1,66</b>	23	1,32	53	1,03
Control negativo para genisteína	Daidzeína	62	1,23	<b>19</b>	<b>1,41</b>	56	1,01
EGFRK	RG-14620	114	0,89	<b>17</b>	<b>1,44</b>	60	0,97
PI 3-K	Wortmannina	<b>9</b>	<b>1,80</b>	50	1,10	66	0,93
ROCK	Inhibidor de ROCK, Y-27632	122	0,83	<b>14</b>	<b>1,46</b>	67	0,93
IRAK	AG-126	<b>18</b>	<b>1,53</b>	85	0,93	68	0,92
p38	Inhibidor III de la p38 MAP quinasa	<b>22</b>	<b>1,51</b>	<b>18</b>	<b>1,43</b>	74	0,89
Tirosina quinasas	Genisteína	<b>27</b>	<b>1,44</b>	<b>11</b>	<b>1,56</b>	82	0,85
EGFRK, PDGFRK	Tirfostina 46	66	1,22	<b>21</b>	<b>1,40</b>	85	0,84
GSK	Inhibidor XIII de GSK-3	<b>17</b>	<b>1,56</b>	98	0,87	87	0,82
MEK	U-0126	75	1,17	<b>8</b>	<b>1,73</b>	95	0,74
PI 3-K	Quercetina dehidrato	<b>21</b>	<b>1,51</b>	128	0,59	106	0,59
IKK2	Inhibidor IV de IKK-2	<b>26</b>	<b>1,44</b>	116	0,74	125	0,35
Vía de señalización de Akt	Triciribina	<b>13</b>	<b>1,68</b>	129	0,57	129	0,34
CDK2	Inhibidor III de Cdk2	<b>24</b>	<b>1,46</b>	117	0,73	130	0,32

Tabla 5:

POCILLO	Actividad diana	COMPUESTO	Núcleos totales	Intensidad de NKX6.1		Intensidad de NGN3	
				RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN	RANGO
B – 5	PKA, PKG, MLCK y PKC.	H-9	1,00	7,36	1	2,24	1
D – 8	PKC	Hipericina	1,07	2,15	18	2,22	2
D – 5	PI 3–K	LY 294002	1,08	6,84	2	2,18	3
D – 11	PKA	H-89	1,09	5,39	3	2,13	4
F – 4	Familia Src	PP2	1,01	4,07	7	2,09	5
B – 3	p38 MAPK	SB -203580	1,07	5,05	4	1,95	6
C – 6	EGFRK	Tirfostina AG 1478	1,10	2,41	14	1,89	7
F – 8	cRAF	GW 5074	1,06	3,48	10	1,78	8
D – 6	PI 3–K	Wortmannina	1,10	3,87	9	1,67	9
E – 1	PKA, PKG	HA-1004	1,08	3,88	8	1,55	10
D – 7	PKC	GF 109203X	1,05	4,54	6	1,53	11
C – 12	Familia Src	PP1	0,99	1,90	22	1,43	12
F – 3	p38 MAPK	SB -202190	1,08	1,90	23	1,40	13
G – 11	ROCK	Y–27632	1,08	1,31	40	1,40	14
G – 12	GSK–3beta	Kenpaulona	0,99	3,18	11	1,32	15
C – 9	IRK	HNMPA	1,01	2,31	15	1,32	16
B – 4	PKA, PKG, MLCK y PKC.	H-7	1,02	1,99	21	1,26	17
B – 7	EGFRK, PDGFRK	AG-494	1,10	1,57	30	1,26	18
C – 7	Tirosina quinasas	Tirfostina AG 1295	1,08	1,43	36	1,26	19
H – 7	EGFRK	BML–265 (análogo de erlotinib)	1,06	2,15	17	1,25	20
B – 12	EGFRK	Tirfostina 25	1,02	4,68	5	1,24	21
E – 2	PKA, PKG	HA–1077	1,02	1,46	34	1,20	22
F – 7	PDGFRK	AG–1296	1,09	1,74	25	1,18	23
E – 9	CDK	N9– Isopropilolomoucina	1,05	1,42	37	1,18	24
B – 11	EGFRK	Tirfostina 23	1,03	1,43	35	1,17	25
D – 12	PKA, PKG	H–8	0,99	1,21	45	1,16	26
C – 5	Tirosina quinasas	Tirfostina AG 1288	1,04	1,63	27	1,15	27
E – 11	Control negativo para olomoucina.	iso–Olomoucina	1,04	1,51	31	1,14	28
F – 6	Fik1	SU 4312	1,07	1,01	55	1,12	29
C – 11	Syk	Piceatannol	1,07	1,32	39	1,10	30
G – 8	JNK	SP600125	1,04	1,67	26	1,09	31
H – 11		DMSO	1,03	1,04	53	1,09	32
E – 5	CaMK II	KN-93	1,04	1,10	51	1,03	33
E – 12	CDK	Roscovitina	1,03	0,67	75	1,03	34
F – 11	Tirosina quinasas	Genisteína	1,03	1,10	52	1,02	35
B – 8	HER1–2	AG-825	1,05	1,12	50	1,00	36

ES 2 633 648 T3

POCILLO	Actividad diana	COMPUESTO	Núcleos totales	Intensidad de NKX6.1		Intensidad de NGN3	
				RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN	RANGO
B – 10	EGFRK	RG-14620	1,02	1,26	41	1,00	37
F – 9	PKC	Palmitoil-DL- carnitina Cl	1,05	1,19	47	0,99	38
E – 10	CDK	Olomoucina	1,04	1,22	44	0,99	39
D – 10	PKC	Esfingosina	1,04	1,62	28	0,99	40
G – 6	CK II	DRB	1,01	1,50	32	0,98	41
C – 3	EGFRK	Tirfostina 51	1,04	1,46	33	0,97	42
F – 2	BTK	LFM-A13	0,97	1,82	24	0,96	43
E – 8	p58 PITSLRE beta 1	2-Aminopurina	1,07	0,93	61	0,93	44
B – 9	EGFRK	Lavendustina A	1,02	0,98	57	0,92	45
G – 7	PKC alfa, PKC gamma	HBDDE	1,07	0,92	63	0,91	46
D – 2	IRAK	AG-126	0,99	1,21	46	0,86	47
H – 12		DMSO	1,02	0,75	69	0,86	48
H – 6	CK-II	Apigenina	1,05	0,77	68	0,84	49
F – 5	cRAF	ZM 336372	1,06	1,36	38	0,83	50
F – 12	Control negativo para genisteína	Daidzeína	1,03	0,92	62	0,83	51
C – 1	EGFRK, PDGFRK	Tirfostina 46	1,05	2,54	13	0,82	52
H – 9		DMSO	1,03	0,95	60	0,81	53
B – 1	MEK	PD-98059	0,92	2,02	20	0,81	54
H – 1	BTK	Ácido terreico	1,02	1,24	42	0,81	55
H – 5	Cdk5/p25	BML-259	1,04	0,83	67	0,80	56
C – 2	EGFRK	Tirfostina 47	1,00	1,13	49	0,79	57
H – 2	Vía de señalización de Akt	Triciribina	0,73	2,06	19	0,78	58
D – 3	PDGFRK	AG-370	1,01	1,15	48	0,77	59
G – 10	GSK-3beta	Indirubin-3'- monoxima	0,96	0,92	64	0,74	60
C – 4	Control negativo para los inhibidores de tirosina quinasa	Tirfostina 1	1,00	0,95	59	0,73	61
G – 4	JAK-3	ZM 449829	1,01	1,23	43	0,73	62
D – 1	JAK-2	AG-490	1,04	2,26	16	0,72	63
D – 4	NGFRK	AG-879	1,03	0,39	80	0,72	64
G – 2	PI 3-K	Quercetina dihidrato	0,97	1,03	54	0,71	65
G – 5	Vía de IKK	BAY 11-7082	0,93	1,00	56	0,68	66
H – 10		DMSO	0,99	0,88	65	0,67	67
G – 9	GSK-3beta, CDK5	Indirubina	1,01	0,59	77	0,66	68
E – 6	MLCK	ML-7	0,98	2,84	12	0,65	69
B – 2	MEK	U-0126	0,87	0,68	73	0,65	70
G – 3	Fik1	SU1498	1,01	0,70	72	0,65	71
E – 3	EGFRK, CaMK II	HDBA	0,99	0,88	66	0,64	72

POCILLO	Actividad diana	COMPUESTO	Núcleos totales	Intensidad de NKX6.1		Intensidad de NGN3	
				RELACIÓN	RANGO	RELACIÓN	RANGO
H - 4	IKK2	s.c.-514	0,95	0,71	71	0,62	73
E - 7	MLCK	ML-9	1,06	1,60	29	0,59	74
F - 10	PKC delta	Rotlerina	0,24	0,96	58	0,56	75
E - 4	CaMK II	KN-62	0,96	0,71	70	0,56	76
H - 3	Akt	BML-257	0,98	0,68	74	0,55	77
H - 8	mTOR	Rapamicina	0,47	0,65	76	0,39	78
C - 10	Inhibidor de PKC	PKC-412	0,17	0,45	79	0,39	79
G - 1	EGFRK	Análogo de erbstatina	0,82	0,38	81	0,34	80
D - 9	PKC	Ro 31-8220	0,09	0,48	78	0,30	81
B - 6	Específico de Pan	Estaurosporina	0,13	0,17	83	0,30	82
C - 8	PDGFRK	Tirfostina 9	0,28	0,29	82	0,29	83
F - 1	ERK2, adenosina quinasa, CK1, CK2,	5-Iodotubercidina	0,08	0,13	84	0,27	84

Tabla 6:

RANGO	RANGO DE NKX6.1	RANGI DE NGN3
1	H-9	H-9
2	LY 294002	Hipericina
3	H-89	LY 294002
4	SB -203580	H-89
5	Tirfostina 25	PP2
6	GF 109203X	SB-203580
7	PP2	Tirfostina AG 1478
8	HA-1004	GW 5074
9	Wortmannina	Wortmannina
10	GW 5074	HA-1004
11	Kenpaulona	GF 109203X
12	ML-7	PP1
13	Tirfostina 46	SB-202190
14	Tirfostina AG 1478	Y-27632
15	HNMPA	Kenpaulona
16	AG-490	HNMPA

5

10

15

Tabla 7:

Vía	Compuestos
PKC/PKA/PKG	H-9, Hipericina, H-89, GF 109203X, HA-1004
SRC quinasa	PP2, PP1
PI3 quinasa	LY 294002, Wortmannina
P38 MAP quinasa	SB-203580, SB-202190
Quinasa del receptor de EGF	Tirfostina 25, Tirfostina AG1478, Tirfostina 46
cRAF	GW 5074
GSK3 beta	Kenpaulona
IRK	HNMPA
JAK2	AG490
ROCK	Y27632
MLCK	ML-7

5 Tabla 8:

		Núcleos totales	NKX6.1		NGN3	
Placa	Tratamiento [conc.]	Relación	Relación del recuento celular	Relación de la intensidad	Relación del recuento celular	Relación de la intensidad
Placa 1	PD-98059 [2,5 µM]	0,96	2,08	2,37	2,21	2,41
Placa 1	SB-203580 [2,5 µM]	1,05	2,93	2,58	5,26	4,74
Placa 1	H-7 [2,5 µM]	1,09	2,02	1,88	2,75	2,44
Placa 1	H-9 [2,5 µM]	1,13	1,93	1,76	2,85	2,47
Placa 1	AG-490 [2,5 µM]	0,99	3,78	4,20	2,48	2,35
Placa 1	LY 294002 [2,5 µM]	1,03	6,54	6,60	4,93	4,43
Placa 1	GF109203X [2,5 µM]	0,82	5,20	3,57	4,17	3,33
Placa 1	H-89 [2,5 µM]	1,08	2,41	2,30	4,00	3,74
Placa 1	KN-62 [1 µM]	1,02	0,69	0,61	0,81	0,77
Placa 1	KN-93 [1 µM]	1,05	0,59	0,55	0,84	0,79
Placa 1	Tratamiento control	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Placa 2	HA-1004 [2,5 µM]	1,08	2,83	2,66	2,77	2,49

		Núcleos totales	NKX6.1		NGN3	
Placa	Tratamiento [conc.]	Relación	Relación del recuento celular	Relación de la intensidad	Relación del recuento celular	Relación de la intensidad
Placa 2	HA-1077 [2,5 µM]	1,07	1,48	1,31	2,57	2,27
Placa 2	SB-202190 [2,5 µM]	1,08	2,12	1,90	4,53	3,91
Placa 2	PP2 [2,5 µM]	1,04	2,06	1,71	6,21	6,12
Placa 2	GW 5074 [2,5 µM]	1,11	2,77	2,32	3,15	2,79
Placa 2	Kenpaulona [2,5 µM]	1,02	0,53	0,45	1,52	1,40
Placa 2	BML-259 [2,5 µM]	0,99	1,08	1,02	1,21	1,23
Placa 2	BML-265 [2,5 µM]	0,97	6,12	6,34	4,50	4,65
Placa 2	KN-62 [1 µM]	1,03	0,71	0,67	0,72	0,71
Placa 2	KN-93 [1 µM]	1,04	0,75	0,76	0,93	0,93
Placa 2	Tratamiento control	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Aunque los diversos aspectos de la invención se han ilustrado anteriormente haciendo referencia a ejemplos y realizaciones preferentes, se apreciará que el alcance de la invención está definido no por la descripción anterior sino por las siguientes reivindicaciones correctamente interpretadas bajo la ley de patentes.

5

10

15

20

25

30

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* para aumentar la expresión de NGN3 y NKX6.1 en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, que comprende las etapas de:
- 5 a) cultivar las células madre pluripotenciales
  - b) diferenciar las células madre pluripotenciales en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en un medio que comprende activina A,
  - 10 c) diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, complementando el medio utilizado para diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, wortmannina, SB-203580, SB-202190, tirfostina 25, tirfostina AG1478, tirfostina 46, GW 5074, kenpaulona, HNMPA, AG490, Y27632, y ML-7, y
  - 15 d) diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático comprende tratar las células con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, wortmannina, SB-203580, SB-202190, Tirfostina 25, Tirfostina, AG1478, tirfostina 46, GW 5074, kenpaulona, HNMPA, AG490, Y27632 y ML-7.
- 20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el compuesto seleccionado del grupo que consiste en H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, wortmannina, SB-203580, SB-202190, tirfostina 25, tirfostina AG1478, tirfostina 46, GW 5074, kenpaulona, HNMPA, AG490, Y27632 y ML-7 se usa a una concentración final de aproximadamente 2,5  $\mu$ M.
- 25 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de diferenciar las células madre pluripotenciales en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo comprende cultivar las células madre pluripotenciales en medio que contiene activina A y un ligando Wnt en ausencia de suero, eliminar a continuación el ligando Wnt y cultivar las células con activina A y suero.
- 30 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático comprende además tratar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con un factor de crecimiento de fibroblastos y el inhibidor de la vía de señalización hedgehog KAAD-ciclopamina, eliminar después el medio que contiene el factor de crecimiento de fibroblastos y KAAD-ciclopamina y, posteriormente, cultivar las células en medio que contiene ácido retinoico, un factor de crecimiento de fibroblastos y KAAD-ciclopamina.
- 35 40 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático que comprende además tratar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con ácido retinoico y al menos un factor de crecimiento de fibroblastos.
- 45 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático comprende, además, cultivar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene exendina 4, retirar a continuación el medio que contiene exendina 4 y cultivar posteriormente las células en medio que contiene exendina 1, IGF-1 y HGF.
- 50 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, comprende, además, cultivar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene DAPT y exendina 4.
- 55 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, comprende, además, cultivar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene exendina 4.
- 60 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, comprende, además, tratar las células que expresan marcadores
- 65

característicos del linaje endodérmico pancreático con un factor que inhibe la vía de señalización de Notch.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células madre pluripotenciales expresan uno o más de los siguientes marcadores: ABCG2, cripto, FOXD3, CONNEXINA43, Connexina45, OCT4, SOX2, Nanog, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, Tra 1-81.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células características del linaje endodérmico definitivo expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX17, GATA4, HNF3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína homeobox similar a Mix, FGF4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 y OTX2.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células características del linaje endodérmico pancreático expresan al menos uno de los siguientes marcadores: PDX1, HNF1 beta, PTF1 alpha, HNF6, HB9 y PROX1.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células características del linaje endocrino pancreático expresan al menos uno de los siguientes marcadores: NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4, NGN3 y PTF-1 alfa.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65