

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 445**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2009 PCT/US2009/061774**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2010 WO10051223**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2009 E 09752567 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2346988**

54 Título: **Diferenciación de las células madre embrionarias humanas con el linaje endocrino pancreático**

30 Prioridad:

31.10.2008 US 110287 P

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

27.09.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**REZANIA, ALIREZA y
FRYER, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 634 445 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 las células madre embrionarias humanas con el linaje endocrino pancreático

Descripción

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención proporciona métodos para promover la diferenciación de células madre pluripotentes. En particular, la presente invención proporciona un método para aumentar la expresión de MAFA en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.

10 **FONDO**

[0002] Los avances en la terapia de reemplazo celular para la diabetes mellitus de 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 las células, apropiadas para el injerto β. Un enfoque es la generación de células beta funcionales a partir de células madre pluripotentes, tales como, por ejemplo, células madre embrionarias.

[0003] En el desarrollo embrionario de los vertebrados, una célula pluripotente da lugar a un grupo de células que comprenden tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) en un proceso conocido como la gastrulación. Los tejidos tales como, por ejemplo, la tiroides, el timo, páncreas, 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. células endodermo definitivo expresan un número de marcadores, tales como, HNF-3 beta, GATA4, MIXL1, CXCR4 y SOX17.

[0004] La formación del páncreas surge de la diferenciación de endodermo definitivo en endodermo pancreático. Las células del endodermo pancreático expresan el gen homeobox pancreático-duodenal, PDX1. En ausencia de PDX1, el páncreas no logra desarrollarse más allá de la formación de yemas ventral y dorsal. Así, la expresión PDX1 marca un paso crítico en la organogénesis pancreática. El páncreas maduro contiene, entre otros tipos de células, tejido exocrino y tejido endocrino. Exocrinas y endocrinas tejidos surgen de la diferenciación de endodermo pancreático.

[0005] Las células que llevan las características de células de los islotes según se informa se han derivado a partir de células embrionarias de ratón. Por ejemplo, Lumelsky et al. (Science 292: 1389, 2001) informan de la diferenciación de células madre embrionarias de ratón a las estructuras secretoras de insulina similares a los islotes pancreáticos. Soria et al. (Diabetes 49: 157, 2000) informan de que las células secretoras de insulina derivadas de células madre embrionarias de ratón normalizan la glucemia en ratones diabéticos inducidos con estreptozotocina.

[0006] En un ejemplo, Hori et al. (PNAS 99: 16105, 2002) describen que el tratamiento de células madre embrionarias de ratón con inhibidores de células producidas por fosfoinosítido 3-quinasa (LY294002) que se parecían a células β.

[0007]. En otro ejemplo, Blyszczuk et al. (PNAS 100: 998, 2003) informan de la generación de células productoras de insulina a partir de células madre embrionarias de ratón que expresan constitutivamente Pax4.

[0008] Micallef et al. informan que el ácido retinoico puede regular el compromiso de las células madre embrionarias para formar Pdx1 endodermo pancreático positivo. El ácido retinoico es más eficaz en la inducción de la expresión de Pdx1 cuando se añade a los cultivos en el día 4 de la diferenciación de células madre embrionarias durante un período correspondiente al final de la gastrulación en el embrión (Diabetes 54: 301, 2005).

[0009] Miyazaki et al. informan de una línea de células madre embrionarias de ratón que sobreexpresan Pdx1. Sus resultados muestran que expresión de Pdx1 exógena mejora claramente la expresión de insulina, somatostatina, glucoquinasa, neurogenina 3, genes P48, Pax6, y HNF6 en las células diferenciadas resultantes (Diabetes 53: 1030, 2004).

[0010] Skoudy et al. informan de que la activina A (un miembro de la superfamilia de TGF-β) favorece la expresión de la expresión de genes de exocrinas pancreáticas (p48 y amilasa) y genes endocrinos (Pdx1, insulina y glucagón) en células madre embrionarias de ratón. Se observó el efecto máximo utilizando 1 nM de activina A. También observaron que el nivel de expresión de la insulina y ARNm Pdx1 no se vio afectada por el ácido retinoico; sin embargo, el tratamiento de 3 nM de FGF7 resultó en un aumento del nivel de la transcripción para Pdx1 (Biochem J. 379: 749, 2004).

[0011] Shiraki et al. estudiaron los efectos de los factores de crecimiento que mejoran específicamente la diferenciación de células madre embrionarias en células de Pdx1 positivas. Observaron que el TGF-β2 produjo reproduciblemente una mayor proporción de células positivas de Pdx1 (Genes Cells 2005 Jun; 10 (6): 503-16).

[0012] Gordon et al. demostraron la inducción de células del endodermo de brachyury⁺/HNF-3beta⁺ a partir de células madre embrionarias de ratón en ausencia de suero y en presencia de activina junto con un inhibidor de la

señalización de Wnt (US 2006/0003446A1).

[0013] Gordon et al. (PNAS, Vol 103, página 16806, 2006) afirman que "señalización Wnt y TGF-beta/nodal/activina simultáneamente se requirieron para la generación de la anterior línea primitiva".

[0014] Sin embargo, el modelo de ratón del desarrollo de células madre embrionarias no puede imitar exactamente el programa de desarrollo en los mamíferos superiores, tales como, por ejemplo, los seres humanos.

[0015] Thomson et al. aislaron células madre embrionarias de blastocistos humanos (Science 282: 114, 1998). Al mismo tiempo, Gearhart y compañeros derivaron líneas celulares humanas germinales embrionarias (HEG) de tejido gonadal fetal (Shambloott et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 95: 13 726, 1998). A diferencia de las células madre embrionarias de ratón, que pueden ser prevenidas de diferenciarse simplemente mediante el cultivo con Factor Inhibidor de Leucemia (LIF), las células madre embrionarias humanas se deben mantener en condiciones muy especiales (patente de EE.UU. No. 6.200.806; WO 99/20741; WO 01/51616).

[0016] D'Amour et al. describe la producción de cultivos enriquecidos de endodermo definitivo derivado de células humanas madre embrionarias en presencia de una alta concentración de la activina y de bajo suero (Nature Biotechnology 2005). El trasplante de estas células bajo la cápsula renal de ratones dio como resultado la diferenciación en células más maduras con características de algunos órganos endodérmicos. células del endodermo definitivo derivadas de células madre embrionarias humanas pueden diferenciarse adicionalmente en células Pdx1 positivas después de la adición de FGF-10 (US 2005/0266554A1).

[0017] D'Amour et al. (Nature Biotechnology-24, 1392-1401 (2006)) establece que: "Hemos desarrollado un proceso de diferenciación que convierte las células madre embrionarias humanas (hES) a células endocrinas capaces de sintetizar las hormonas pancreáticas insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático y grelina. Este proceso imita la organogénesis pancreática *in vivo* dirigiendo las células a través de las etapas que se asemejan a endodermo definitivo, endodermo de intestino, endodermo pancreático y endocrino precursor en la ruta a las células que expresan hormonas endocrinas".

[0018] En otro ejemplo, Fisk et al. informa de un sistema para la producción de células de los islotes pancreáticos de células madre embrionarias humanas (US2006/0040387A1). En este caso, la vía de diferenciación se dividió en tres etapas. Las células madre embrionarias se diferenciaron primero a endodermo usando una combinación de butirato de sodio y activina A. Las células se cultivaron a continuación con antagonistas de TGF- β como Noggin en combinación con EGF o betacelulina para generar células Pdx1 positivas. La diferenciación terminal se indujo mediante nicotinamida.

[0019] En un ejemplo, Benvenistry et al. establece que: "Concluimos que la sobreexpresión de expresión mejorada Pdx1 de genes enriquecidos pancreáticamente, la inducción de la expresión de insulina puede requerir señales adicionales que sólo están presentes *in vivo*" (Benvenistry et al, Stem Cells 2006; 24: 1923-1930).

[0020] Las ciclinas se han implicado en la función de las células beta. Por ejemplo, Lilja et al informan que Cdk5 está presente en la célula β pancreática secretora de insulina (J. Biol. Chem., Vol. 276, Issue 36, 34199-34205, 7 de Septiembre, 2001). Lilja et al establecen que "Cdk5 está presente en las células beta y actúa como un regulador positivo de la exocitosis de la insulina."

[0021] En otro ejemplo, Marzo establece que "ratones knockin Cdk4 han aumentado significativamente la masa de células beta y son fisiológicamente funcionales, lo que indica que Cdk4 es un objetivo potencial para la regeneración de la masa de células beta pancreáticas en la Diabetes de tipo 1" (Diabetologia, Vol. 47, Número 4, 686 a 694, 1 de abril de 2004.)

[0022] En otro ejemplo, Ubeda et al informe que la inhibición de la actividad de quinasa 5 dependiente de ciclina protege a las células beta pancreáticas de la glucotoxicidad (J. Biol. Chem., Vol. 281, No. 39, 28.858-28.864 29 de septiembre de 2006).

[0023] En otro ejemplo, Wei et al informan que regulación dependiente de Cdk5 de secreción de insulina estimulada por la glucosa (Nature Medicine 11, 1104-1108 (1 de octubre de 2005.)

[0024] En otro ejemplo, Vanderford et al establecen que "MAFA es un factor de transcripción de cremallera de leucina básica expresado dentro de las células beta del páncreas y se requiere para mantener la homeostasis normal de la glucosa, ya que está implicada en varios aspectos de la biología de las células beta. Se sabe que los niveles de proteína MAFA son conocidos por aumentarse en respuesta a glucosa alta a través de mecanismos que todavía tienen que ser completamente caracterizados. Hemos investigado si los eventos de señalización intracelulares discretos controlan la expresión de MAFA. Hemos encontrado que el inhibidor de la quinasa de estaurosporina general induce la expresión MAFA sin alterar la estabilidad de la proteína. La inhibición de JNK MAP-quinasa imita los efectos de la estaurosporina sobre la expresión de AFP. La quinasa de calmodulina y la señalización de calcio también son importantes en la estimulación de la expresión de AFP por la glucosa alta. Sin

embargo, estaurosporina, JNK, y quinasa de calmodulina tienen diferentes efectos sobre la inducción de la expresión de insulina. Estos datos revelan que los niveles de los AFP están estrechamente controlados por la acción coordinada de múltiples vías de quinasa." (Archives of Biochemistry and Biophysics (2008), doi: 10.1016/j.abb.2008.10.001).

5 Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad significativa para desarrollar métodos para la diferenciación de células madre pluripotentes en células endocrinas pancreáticas, hormona pancreática que expresan las células, o células secretoras de hormona pancreática. La presente invención proporciona métodos para aumentar la expresión de MAFA en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.

10 RESUMEN

[0025]

15 Un método para producir células productoras de hormona pancreática a partir de células madre pluripotentes, que comprende las etapas de:

a. el cultivo de células madre pluripotentes,

20 b. diferenciar las células madre pluripotentes en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo,

c. diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, y

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

en donde la expresión de MAFA en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se incrementa por un método que comprende las etapas de cultivar las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático en medio que comprende una cantidad suficiente de un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina para causar un aumento de la expresión de AFP.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 [0026]

Figura 1, panel A muestra el efecto de los compuestos de la biblioteca de inhibidor de la quinasa EMD Calbiochem de la proporción de insulina a la expresión de glucagón en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, según lo determinado por PCR en tiempo real. La etiqueta alfanumérica corresponde a la identidad de compuesto como se muestra en la Tabla 1. El panel B muestra el efecto de los compuestos de la biblioteca de inhibidor de la quinasa EMD Calbiochem de la relación de expresión de MAFA a ARX4 en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, según lo determinado por PCR en tiempo real. La etiqueta alfanumérica corresponde a la identidad de compuesto como se muestra en la Tabla 1.

Figura 2 A) muestra una micrografía 4x de las células tratadas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1, en el día 4 del tratamiento de etapa 6. B) muestra una micrografía 4x de células tratadas con 0,5 μM del compuesto PubChemID # 5330812 en el día 4 del tratamiento. C) muestra una micrografía 4x de las células tratadas con 1 μM del compuesto PubChemID # 5330812 en el día 4 del tratamiento. D) muestra una micrografía 20x de las células tratadas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1, en el día 6 del tratamiento de etapa 6. E) muestra una micrografía 20x de células tratadas con 0,5 μM del compuesto PubChemID # 5330812 en el día 6 del tratamiento. F) muestra una micrografía 20x de las células tratadas con 1 μM del compuesto PubChemID # 5330812 en el día 6 del tratamiento.

Figura 3 muestra la expresión de los 23 genes indicados, en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático siguiendo un tratamiento de cinco días de 0,5 μM (barras oscuras) o 1,0 μM (barras claras) del compuesto del PubChem ID # 5330812. Los niveles de expresión se determinaron a día 0, día 2 y día 5.

Figura 4 muestra el efecto del tratamiento de inhibidor CDK III en la expresión de marcadores característicos del linaje endocrino pancreático en células tratadas con la etapa 7 del protocolo de diferenciación descrito en el Ejemplo 4.

Figura 5 muestra el efecto del tratamiento de inhibidor CDK III en la tinción de ditazona de grupos de islotes similares.

Figura 6 muestra la expresión de insulina, sinaptofisina y glucagón en las células productoras de insulina producidas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 5. La expresión de las proteínas indicadas se determinó mediante FACS.

5 Figura 7 muestra la expresión de insulina, sinaptofisina y glucagón en las células productoras de insulina producidas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 5. La expresión de las proteínas indicadas se determinó mediante FACS.

10 Figura 8 muestra la expresión de MAFA (panel A) y la insulina (panel B), en células productoras de insulina, producidas por los métodos de la presente invención. Se tomaron muestras de células para el análisis de PCR en los días 1, 2, 3, y 4. Después de 4 días de tratamiento con el inhibidor de CDK, el inhibidor de CDK se retiró del cultivo y las células fueron cultivadas 4 días adicionales en DMEM-F12 + 1% B27 + 20 ng/ml de activina A. Al final de los cuatro días, se recogieron muestras por triplicado para el análisis de PCR.

15 Figura 9 muestra el efecto de los compuestos de la biblioteca de inhibidor de la quinasa EMD Calbiochem I sobre la expresión de MAFA en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, según lo determinado por PCR en tiempo real.

20 Figura 10 muestra el efecto de la genisteína sobre la expresión de ARNm de insulina, glucagón, somatostatina y MAFA en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, según lo determinado por PCR en tiempo real.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

25 **[0027]**

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

30

Definiciones

35 **[0028]** Las células madre son células no diferenciadas definidas por su capacidad en el nivel de células individuales para auto-renovarse y diferenciarse para producir células de la progenie, incluyendo progenitores de auto-renovación, progenitores de no-renovación, y células diferenciadas terminalmente. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de diversos linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, si no todos, los tejidos después de la inyección en blastocistos.

40

45 **[0029]** Las células madre se clasifican por su potencial de desarrollo como: (1) totipotentes, es decir, capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias; (2) pluripotentes, lo que significa capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias; (3) multipotentes, que significan capaces de dar lugar a un subconjunto de los linajes de células pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir una progenie que incluyen HSC (autorenovación), progenitores oligopotentes de glóbulos restringidos, y todos los tipos celulares y elementos (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre); (4) oligopotentes, lo que significa que son capaces de dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes de células que las células madre multipotentes; y (5) unipotentes, lo que significa que son capaces de dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre de espermatogénesis).

50

55 **[0030]** La diferenciación es el proceso por el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada de células adquiere las características de una célula especializada, tales como, por ejemplo, una célula nerviosa o una célula muscular. Una célula diferenciada o la diferenciación inducida es una que se ha llevado en una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término "comprometido", cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha procedido en la vía de diferenciación a un punto en el que, en circunstancias normales, continuará para diferenciarse en un tipo celular específico o un subconjunto de tipos de células, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o volver a un tipo de células menos diferenciadas. Desdiferenciación se refiere al proceso por el cual una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Tal como se usa en el presente documento, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir, las células de las que procedía y a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula coloca la célula dentro de un esquema hereditario del desarrollo y la diferenciación. Un marcador de linaje específico se refiere a una característica asociada específicamente con el fenotipo de las células de un linaje de interés y se puede utilizar para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida con el linaje de interés.

65

[0031] "Linaje de células β " se refiere a células con expresión génica positiva para el factor de transcripción PDX-1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: NgN3, NKX2.2, Nkx6.1, NeuroD, ISL1, HNF3 beta, MAFA, PAX4 o PAX6. Las células que expresan marcadores característicos del linaje de células β incluyen células P.

5 **[0032]** "Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo", 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 tipo 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 estría primitiva, células de estría primitiva, células de mesendodermo y células de endodermo definitivo.

10 **[0033]** "Células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático", como se usa en el presente documento, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: PDX1, beta HNF1, PTF1 alfa, HNF-, o HB9. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático incluyen células pancreáticas de endodermo, células tubulares de intestino primitivo, y las células del intestino anterior posterior.

15 **[0034]** "Células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático", como se usa en el presente documento, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: NgN3, NeuroD, ISL1, PDX1, Nkx6.1, PAX4, NgN3, o PTF1 alfa. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático incluyen células pancreáticas endocrinas, células que expresan la hormona pancreática, y células secretoras de la hormona pancreática, y células del linaje de células β .

20 **[0035]** "Endodermo definitivo", tal como se usa aquí, se refiere a células que llevan las características de las células derivadas del epiblasto durante la gastrulación y que forman el tracto gastrointestinal y sus derivados. Células de endodermo definitivo expresan los siguientes marcadores: beta HNF3, GATA4, SOX17, Cerberus, OTX2, gooseoid, C-Kit, CD99, o MIXL1.

25 **[0036]** "Endodermo extraembrionario", como se usa en el presente documento, se refiere a una población de células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: SOX7, AFP, o SPARC.

30 **[0037]** "Marcadores", como se usa en este documento, son moléculas de ácido nucleico o polipéptidos 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 ácido nucleico marcador 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.

35 **[0038]** "Célula de mesendodermo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: CD48, eomesodermina (Eomes), SOX 17, DKK4, HNF3 beta, GSC, FGF17, o GATA6.

40 **[0039]** "Célula pancreática endocrina", o "célula que expresa hormona pancreática", tal 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, o el polipéptido pancreático.

45 **[0040]** "Célula de endodermo pancreático", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula capaz de expresar al menos uno de los siguientes marcadores: NgN3, NeuroD, ISL1, PDX1, PAX4, o NKX2.2.

50 **[0041]** "Célula productora de hormona pancreática", tal como se usa aquí, se refiere a una célula capaz de producir al menos una de las siguientes hormonas: Insulina, glucagón, somatostatina, o polipéptido pancreático.

55 **[0042]** "Célula secretora de hormona pancreática", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula capaz de secretar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

60 **[0043]** "Célula posterior de intestino anterior", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula capaz de secretar al menos uno de los siguientes marcadores: PDX1, HNF1, PTF1 alfa, HNF6, HB9, o Prox1.

65 **[0044]** "Célula de estría pre-primitiva", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que expresa al menos uno de los siguientes marcadores: Nodal, o FGF8.

[0045] "Célula de tubo intestino primitivo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula capaz de secretar al menos uno de los siguientes marcadores: HNF1, o HNF4A.

[0046] "Célula de línea primitiva", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que expresa al

menos uno de los siguientes marcadores: Brachyury, proteína homeobox tipo mezclado, o FGF4.

Aislamiento, expansión y cultivo de células madre pluripotentes

5 *Caracterización de células madre pluripotentes*

10 [0047] Las células madre pluripotentes 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 células madre pluripotentes en los resultados *in vitro* en la pérdida de expresión de SSEA-4, Trabasso 1-60 y Tra-1-81 (si está presente) y aumento de la expresión de SSEA-1. Células madre pluripotentes no diferenciadas tienen típicamente actividad de la fosfatasa alcalina, que se puede detectar mediante la fijación de las células con paraformaldehído al 4%, y luego en desarrollo con Vector Red como sustrato, como se describe por el fabricante (Vector Laboratories, Burlingame Calif.) Células madre pluripotentes no diferenciadas también suelen expresar Oct-4 y de TERT, según lo detectado mediante RT-PCR.

15 [0048] Otro fenotipo deseable de células madre pluripotentes propagadas es un potencial de diferenciarse en células de las tres capas germinales: tejidos de endodermo, mesodermo y ectodermo. Pluripotencia de las células madre pluripotentes puede confirmarse, por ejemplo, mediante la inyección de células en ratones de inmunodeficiencia combinada severa (SCID), fijando los teratomas que se forman usando 4% de paraformaldehído, y después de examinarlos histológicamente para la evidencia de tipos de células de las tres capas germinales. Alternativamente, la pluripotencia se puede determinar mediante la creación de cuerpos embrioides y la evaluación de los cuerpos embrioides para la presencia de marcadores asociados con las tres capas germinales.

20 [0049] Líneas de células madre pluripotentes propagadas pueden ser cariotipadas utilizando una técnica de bandedo G estándar y se compararon con 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 donde todos los cromosomas humanos están presentes y no notablemente alterados.

25 *Cultivo de células madre pluripotentes*

30 [0050] En una realización, las células madre pluripotentes típicamente se cultivan sobre una capa de células alimentadoras que soportan las células madre pluripotentes de diversos modos. Alternativamente, las células madre pluripotentes se cultivan en un sistema de cultivo que está esencialmente libre de células alimentadoras, pero no obstante apoya la proliferación de células madre pluripotentes sin sufrir diferenciación sustancial. El crecimiento de las células madre pluripotentes en cultivo libre de alimentador sin diferenciación se admite el uso de un medio acondicionado mediante el cultivo previamente con otro tipo de célula. Alternativamente, el crecimiento de las células madre pluripotentes en cultivo libre de alimentadores sin diferenciación se apoya mediante el uso de un medio químicamente definido.

35 [0051] Por ejemplo, Reubinoff et al (Nature Biotechnology 18: 399-404 (2000)) y Thompson et al (Science 6 Noviembre de 1998: Vol 282. no 5391, pp 1145-1147) dan a conocer el cultivo de líneas de células madre pluripotentes a partir de blastocistos humanos usando una capa de células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón.

40 [0052] Richards et al, (Stem Cells 21: 546-556, 2003) evaluaron un panel de 11 capas de células alimentadoras humanas adultas, fetales y neonatales diferentes por su capacidad para apoyar el cultivo de células madre pluripotentes. Richards et al, afirma que: "líneas de células madre embrionarias humanas cultivadas en alimentadores de fibroblastos de la piel del adulto retienen la morfología de células madre embrionarias humanas y permanecen pluripotentes".

45 [0053] US20020072117 da a conocer líneas celulares que producen medios que apoyan el crecimiento de células madre pluripotentes de primates en cultivo libre de alimentador. Las líneas celulares empleadas son líneas de células mesenquimáticas y similares a fibroblastos obtenidos a partir de tejido embrionario o diferenciadas de células madre embrionarias. US20020072117 describe también el uso de líneas celulares como una capa de células de alimentación primaria.

50 [0054] En otro ejemplo, Wang et al (Stem Cells 23: 1221-1227, 2005), describe métodos para el crecimiento a largo plazo de células madre pluripotentes humanas sobre capas de células de alimentación derivadas de células madre embrionarias humanas.

55 [0055] En otro ejemplo, Stojkovic et al (Stem Cells 2005 23: 306-314, 2005) dan a conocer un sistema de células de alimentación derivadas de la diferenciación espontánea de células madre embrionarias humanas.

60 [0056] En un ejemplo adicional, Miyamoto et al (Stem Cells 22: 433-440, 2004) describen una fuente de células alimentadoras obtenida a partir de placenta humana.

[0057] (Biol. Reprod 68: 2150-2156, 2003) Amit et al, describe una capa de células de alimentación derivadas de prepucio humano.

5 [0058] En otro ejemplo, Inzunza et al (Stem Cells 23: 544-549, 2005) describen una capa de células de alimentación de fibroblastos de prepucio humano postnatal.

10 [0059] US6642048 da a conocer medios que soportan el crecimiento de células madre pluripotentes de primates (PPS) en cultivo libre de alimentador, y líneas celulares útiles para la producción de tales medios. US6642048 afirma que: "La presente invención incluye líneas de células mesenquimáticas y similares a fibroblastos obtenidos a partir de tejido embrionario o diferenciadas de células madre embrionarias. Métodos para derivar dichas líneas celulares, medios de procesamiento, y cultivo de células madre usando el medio condicionado se describen y se ilustran en esta descripción."

15 [0060] En otro ejemplo, WO2005014799 da a conocer un medio acondicionado para el mantenimiento, la proliferación y la diferenciación de células de mamíferos. WO2005014799 afirma que: "El medio de cultivo producido de acuerdo con la presente invención está condicionado por la actividad de secreción celular de las células murinas, en particular, los hepatocitos transgénicos diferenciados e inmortalizados, llamados MMH (Met Murine Hepatocyte)."

20 [0061] En otro ejemplo, Xu et al (Stem Cells 22: 972-980, 2004) da a conocer un medio acondicionado obtenido a partir de derivados de células madre embrionarias humanas que han sido modificadas genéticamente para sobreexpresar la transcriptasa inversa de telomerasa humana.

25 [0062] En otro ejemplo, US20070010011 da a conocer un medio de cultivo químicamente definido para el mantenimiento de células madre pluripotentes.

30 [0063] Un sistema de cultivo alternativo emplea un medio libre de suero suplementado con factores de crecimiento capaces de promover la proliferación de células madre embrionarias. Por ejemplo, Cheon et al (BioReprod DOI: 10.1095/biolreprod 105,046870, 19 de octubre, 2005) describen un sistema de cultivo libre de alimentador, libre de suero en el que se mantienen las células madre embrionarias en sustitución de medio de suero condicionado (SR) suplementado con diferentes factores de crecimiento capaces de desencadenar auto-renovación embrionaria de células madre.

35 [0064] En otro ejemplo, Levenstein et al (Stem Cells 24: 568-574, 2006) describen métodos para el cultivo a largo plazo de las células madre embrionarias humanas en ausencia de fibroblastos o medio acondicionado, utilizando medios suplementados con bFGF.

40 [0065]. En otro ejemplo, US20050148070 da a conocer un método de cultivo de células madre embrionarias humanas en medio definido sin suero y sin células alimentadoras de fibroblastos, comprendiendo el método: el cultivo de las células madre en un medio de cultivo que contiene albúmina, aminoácidos, vitaminas, minerales, al menos una 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 capaces de activar un factor de crecimiento de fibroblastos receptor de señalización, en el que el factor de crecimiento es suministrado desde una fuente distinta de sólo una capa alimentadora de fibroblastos, el medio apoyó la proliferación de células madre en un estado indiferenciado sin células alimentadoras o medio condicionado.

45 [0066] En otro ejemplo, US20050233446 da a conocer un medio definido útil en el cultivo de células madre, incluyendo células madre de primates primordiales no diferenciadas. En solución, los medios son sustancialmente isotónicos en comparación con las células madre que se cultiven. En un cultivo dado, el medio particular comprende un medio base y una cantidad de cada uno de bFGF, insulina y ácido ascórbico necesario para apoyar el crecimiento sustancialmente no diferenciado de las células madre primordiales.

50 [0067] En otro ejemplo, US6800480 afirma que "En una realización, se proporciona un medio de cultivo celular para el cultivo de células madre primordiales de primates derivado en un estado sustancialmente no diferenciado que incluye una presión osmótica baja, medio básico de baja endotoxina que es eficaz para apoyar el crecimiento de las células madre primordiales derivadas de primates. El medio básico se combina con un suero de nutrientes eficaz para apoyar el crecimiento de células madre primordiales derivadas de primates y un sustrato seleccionado del grupo que consiste de células de alimentación y un componente de la matriz extracelular derivada 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."

55 [0068] En otro ejemplo, US20050244962 establece que: "En un aspecto la invención proporciona un método de cultivo de células madre embrionarias de primates. Se cultiva las células madre en un cultivo esencialmente libre de suero fetal de mamífero (preferiblemente también esencialmente libre de cualquier suero animal) y en presencia del factor de crecimiento de fibroblastos que se suministra desde una fuente distinta de sólo una capa alimentadora de fibroblastos. En una forma preferida, la capa alimentadora de fibroblastos, la cual se requiere previamente para

sostener un cultivo de células madre, se hace innecesaria por la adición de suficiente factor de crecimiento de fibroblastos."

5 **[0069]** En un ejemplo adicional, WO2005065354 da a conocer un medio de cultivo definido isotónico que es esencialmente libre de alimentador y libre de suero, que comprende: a. un medio basal; b una cantidad de bFGF suficiente para apoyar el crecimiento de las células madre de mamíferos sustancialmente no diferenciadas; c una cantidad de insulina suficiente para apoyar el crecimiento de las células madre de mamíferos sustancialmente no diferenciadas; y d una cantidad de ácido ascórbico suficiente para apoyar el crecimiento de las células madre de mamíferos sustancialmente no diferenciadas.

10 **[0070]** En otro ejemplo, WO2005086845 describe un método para el mantenimiento de una célula madre no diferenciada, comprendiendo dicho método la exposición de una célula madre a una familia de proteínas (TGF- β) beta de factor de crecimiento transformante, un miembro de la familia de proteínas de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), o nicotinamida (NIC) en una cantidad suficiente para mantener la célula en un estado no diferenciado durante una cantidad de tiempo suficiente para conseguir un resultado deseado.

15 **[0071]** Las células madre pluripotentes se pueden sembrar sobre un sustrato de cultivo adecuado. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es un componente de la matriz extracelular, tal como, por ejemplo, aquellos derivados de membrana basal o que puede formar parte de acoplamiento de receptor-ligando de moléculas de adhesión. En una realización, un sustrato del cultivo adecuado es MATRIGEL® (Becton Dickenson). MATRIGEL® es una preparación soluble a partir de células tumorales Engelbreth-Holm Swarm que los geles a temperatura ambiente para formar una membrana basal reconstituida.

20 **[0072]** Otros componentes de la matriz extracelular y mezclas de componentes son adecuados como una alternativa. dependiendo del tipo de célula que se está proliferando, esto puede incluir la laminina, fibronectina, proteoglicanos, entactina, heparán sulfato, y similares, solos o en varias combinaciones. Las células madre pluripotentes se pueden sembrar en el sustrato en una distribución adecuada y en presencia de un medio que promueve la supervivencia celular, propagación, y la retención de las características deseables. Todas estas características se benefician de una cuidadosa atención a la distribución de la siembra y se pueden determinar fácilmente por un experto en la técnica.

25 Medios de cultivo adecuados pueden estar hechos de los siguientes componentes, tales como, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Gibco # 11965-092; medio de Knockout Dulbecco modificado de Eagle (KO DMEM), Gibco # 10829-018; F12 de Ham/50% de medio basal DMEM; 200 μ M de L-glutamina, Gibco # 15039-027; solución de aminoácidos no esencial, Gibco 11140-050; β -mercaptoetanol, Sigma # M7522; factor básico recombinante humano de crecimiento de fibroblastos (bFGF), Gibco # 13256-029.

Formación de células productoras de hormonas pancreáticas de las células madre pluripotentes

30 **[0073]** En una realización, la presente descripción describe un método para la producción de células productoras de hormona pancreáticas a partir de células madre pluripotentes, que comprende las etapas de:

- 35 a. Cultivo de células madre pluripotentes,
 b. Diferenciación de las células madre pluripotentes en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo,
 40 c. Diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, y
 45 d. Diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.

50 Las células adecuadas para su uso en la presente invención incluyen células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores característicos de células pluripotentes: ABCG2, cripto, CD9, Foxd3, Connexin43, Connexin45, Oct4, Sox2, NANOG, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA3, SSEA4, Tra1-60, o Tra1-81.

55 **[0074]** 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 tipo mezclado, FGF4 CD48, eomesodermina (Eomes), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-kit, CD99, y OTX2. Adecuada para uso en la presente invención es 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 de estría primitiva. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una célula de mesendodermo. En un aspecto alternativo, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo es una célula de endodermo definitivo.

60 **[0075]** Los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se seleccionan del grupo que consiste en PDX1, beta HNF1, PTF1 alfa, HNF6, HB9 y PROX1. Adecuada para uso en la presente invención es 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 de endodermo pancreático.

[0076] Los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo que consiste en NgN3, NeuroD, ISL1, PDX1, Nkx6.1, PAX4, NgN3, y PTF1 alfa. En una realización, una célula endocrina pancreática es capaz de expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático. Adecuada para uso en la presente invención es una célula que expresa al menos uno de los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endocrino pancreático es una célula endocrina pancreática. La célula endocrina pancreática puede ser una célula que expresa hormona pancreática. Alternativamente, la célula endocrina pancreática puede ser una célula secretora de hormona pancreática.

En un aspecto de la presente invención, la célula endocrina pancreática es una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células β . Una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células β expresa Pdx1 y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: NgN3, NKX2.2, Nkx6.1, NeuroD, ISL1, HNF3 beta, MAFA, PAX4, o PAX6. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células β es una célula β .

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

[0077] Las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo por cualquier método en la técnica o mediante cualquier procedimiento propuesto en esta descripción.

[0078] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los procedimientos revelados en D'Amour et al, Nature Biotechnology 23, 1534-1541 (2005).

[0079] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos descritos en Shinozaki et al, Desarrollo 131, 1651-1662 (2004).

[0080] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos descritos en McLean et al, Stem Cells 25, 29-38 (2007).

[0081] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los procedimientos revelados en D'Amour et al, Nature Biotechnology 24, 1392 -1401 (2006).

[0082] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en medio que contiene activina A en ausencia de suero, a continuación, el cultivo de las células con activina A y suero, y después el cultivo de 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).

[0083] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el cultivo de células madre pluripotentes en medio que contiene activina A en ausencia de suero, a continuación, el cultivo de las células con activina A con suero de otra concentración. Un ejemplo de este método se describe en D' Amour et al, Nature Biotechnology, 2005.

[0084] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en medio que contiene activina A y un ligando Wnt en ausencia de suero, a continuación, retirar el ligando Wnt y cultivar las células con activina A con suero. Un ejemplo de este método se describe en Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006).

[0085] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU.. No. 11/736.908, asignada a LifeScan, Inc.

[0086] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU.. N° 11/779.311, asignada a LifeScan, Inc.

[0087] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU.. No. 60/990.529.

[0088] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. No. 61/076.889.

5 [0089] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. No. 61/076.900.

10 [0090] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. No. 61/076.908.

15 [0091] Por ejemplo, las células madre pluripotentes se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. No. 61/076.915.

Diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo

20 [0092] Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se puede determinar mediante pruebas de la presencia de los marcadores antes y después de seguir un protocolo particular. Las células madre pluripotentes normalmente no expresan tales marcadores. Por lo tanto, la diferenciación de células pluripotentes se detecta cuando las células comienzan a expresarlas.

25 [0093] La eficacia de la diferenciación se puede determinar mediante la exposición de una población celular tratada con un agente (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador proteico expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.

30 [0094] Los métodos para evaluar la expresión de proteínas y marcadores de ácido nucleico en células cultivadas o aisladas son estándar en la técnica. Éstas incluyen la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR), transferencias Northern, hibridación *in situ* (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 2001 suplemento)), e inmunoensayos tales como el análisis inmunohistoquímico de material seccionado, transferencia Western, y para los marcadores que son accesibles en células intactas, el flujo del análisis de citometría (FACS) (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

35 [0095] Características de las células madre pluripotentes son bien conocidas para los expertos en la técnica, y las características adicionales de las células madre pluripotentes continúan identificándose. marcadores de células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, la expresión de uno o más de los siguientes: ABCG2, cripto, Foxd3, Connexin43, Connexin45, Oct4, Sox2, NANOG, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA3, SSEA4, Tra1-60, o Tra1-81.
40 Después de tratar las células madre pluripotentes con los métodos de la presente invención, las células diferenciadas se pueden purificar mediante la exposición de una población celular tratada con un agente (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteína, tal como CXCR4, expresado por las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo.

45 **Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endodérmico**

[0096] Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático mediante cualquier método en la técnica o mediante cualquier procedimiento propuesto en esta descripción.

50 [0097] Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático de acuerdo con los métodos descritos en D'Amour et al, Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006).

55 [0098] Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se diferencian además 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 vía de señalización de hedgehog KAAD-ciclopamina, retirando a continuación el medio que contiene el factor de crecimiento fibroblástico y KAAD-ciclopamina y, posteriormente,
60 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 [0099] En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se diferencian además 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 una factor de crecimiento fibroblástico durante un período de tiempo, de

acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 11/736.908, asignada a LifeScan, Inc.

5 [0100] En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se diferencian además 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 una factor de crecimiento fibroblástico durante un período de tiempo, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° de Ser. 11/779.311, asignada a LifeScan, Inc.

10 [0101] En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se diferencian además en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo según los métodos descritos en US la solicitud de patente N° de Ser. 60/990.529.

15 *Detección de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endodermo*

20 [0102] Los marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático son bien conocidos para los expertos en la técnica, y los marcadores adicionales característicos del linaje endodérmico pancreático continúan identificándose. Estos marcadores se pueden usar para confirmar que las células tratadas de acuerdo con la presente invención se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje endodérmico pancreático. Marcadores específicos de linaje endodérmico pancreático incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción tales como, por ejemplo, HLXB9, PTF1 alfa, PDX1, HNF6, o beta HNF1.

25 [0103] La eficiencia de la diferenciación se puede determinar mediante la exposición de una población celular tratada con un agente (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador proteico expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático.

30 [0104] Los métodos para evaluar la expresión de proteínas y marcadores de ácido nucleico en células cultivadas o aisladas son estándar en la técnica. Incluyen la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR), transferencias Northern, hibridación *in situ* (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., Eds. 2001 suplemento)), e inmunoensayos tales como inmunohistoquímica El análisis de material seccionado, transferencia de Western, y para los marcadores que son accesibles en células intactas, análisis de citometría de flujo (FACS) (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies: a Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

35 **Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático**

40 [0105] Las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático mediante cualquier método en la técnica o por cualquier método dado a conocer en esta descripción.

45 [0106] Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se pueden diferenciar en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático de acuerdo con los métodos descritos en D'Amour et al, Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006).

50 [0107] Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el cultivo de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene DAPT y exendina 4, retirando el medio que contiene DAPT y exendina 4 y, posteriormente, el cultivo de las células en medio que contiene exendina 1, IGF-1 y HGF. Un ejemplo de este método se describe en Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006).

55 [0108] Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencia adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el cultivo de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene exendina 4, retirando el medio que contiene exendina 4 y, posteriormente, cultivando 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.

60 [0109] Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian adicionalmente en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el cultivo de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene DAPT y exendina 4. Un ejemplo de este método se describe en D' Amour et al, Nature Biotechnology, 2006.

65

[0110] Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian además en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, mediante el cultivo de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en medio que contiene exendina 4. Un ejemplo de este método se describe en D' Amour et al, Nature Biotechnology, 2006.

[0111] En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian además 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 de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° de Ser. 11/736.908, asignada a LifeScan, Inc.

[0112] En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian además 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 de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° de Ser. 11/779.311, asignada a LifeScan, Inc.

[0113] En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian además 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 de Notch, de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° de Ser. 60/953.178, asignada a LifeScan, Inc.

[0114] En un aspecto de la presente invención, las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático se diferencian además en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° de Ser. 60/990.529.

En un aspecto, la presente descripción describe un método para aumentar la expresión de marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático que comprende tratar las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con medio que comprende una cantidad suficiente de un agonista del receptor de TGF- β para causar un aumento en la expresión de marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° de Ser. 61/110.278.

Detección de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático

[0115] Marcadores característicos de las células del linaje endocrino pancreático son bien conocidos para los expertos en la técnica, y los marcadores adicionales característicos del linaje endocrino pancreático continúan identificándose. Estos marcadores se pueden usar para confirmar que las células tratadas de acuerdo con la presente invención se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje endocrino pancreático. Marcadores específicos de linaje pancreático endocrino incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción tales como, por ejemplo, NgN3, NeuroD, o ISL1.

[0116] Marcadores característicos de las células del linaje de células β son bien conocidos para los expertos en la técnica, y los marcadores adicionales característicos del linaje de células β continúan identificándose. Estos marcadores se pueden usar para confirmar que las células tratadas de acuerdo con la presente invención se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje de células β . Características específicas de linaje celular β incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción tales como, por ejemplo, PDX1, NKX2.2, Nkx6.1, ISL1, PAX6, PAX4, NeuroD, HNF1 beta, HNF6, HNF3 beta, o MAFA, entre otros. Estos factores de transcripción están bien establecidos en la técnica para la identificación de células endocrinas. Véase, por ejemplo, Edlund (Nature Reviews Genetics 3: 524-632 (2002)).

[0117] La eficiencia de la diferenciación se puede determinar mediante la exposición de una población celular tratada con un agente (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador proteico expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. Alternativamente, la eficacia de la diferenciación se puede determinar mediante la exposición de una población celular tratada con un agente (tal como un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador proteico expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje de células β .

[0118] Los métodos para evaluar la expresión de proteínas y marcadores de ácido nucleico en células cultivadas o aisladas son estándar en la técnica. Estos incluyen la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR), transferencias Northern, hibridación *in situ* (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., Eds. 2001 suplemento)), e inmunoensayos tales como inmunohistoquímica El análisis de material seccionado, transferencia de Western, y para los marcadores que son accesibles en células intactas, análisis de citometría de flujo (FACS) (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies: a Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

[0119] En un aspecto de la presente invención, la eficiencia de diferenciación se determina midiendo el porcentaje de células positivas a la insulina en un cultivo de células dado después del tratamiento. En una realización, los métodos de la presente invención producen aproximadamente células positivas de insulina al 100% en un cultivo dado. En una realización alternativa, los métodos de la presente invención producen células positivas aproximadamente al 90% de insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los métodos de la presente invención producen células positivas aproximadamente al 80% de insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los métodos de la presente invención producen células positivas aproximadamente al 70% de insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los métodos de la presente invención producen células positivas aproximadamente al 60% de insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los métodos de la presente invención producen células positivas aproximadamente al 50% de insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los métodos de la presente invención producen células positivas aproximadamente al 40% de insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los métodos de la presente invención producen células positivas aproximadamente al 30% de insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los métodos de la presente invención producen células positivas aproximadamente al 20% de insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los métodos de la presente invención producen células positivas aproximadamente al 10% de insulina en un cultivo dado. En una realización alternativa, los métodos de la presente invención producen células positivas aproximadamente al 5% de insulina en un cultivo dado.

[0120] En un aspecto de la presente invención, la eficiencia de diferenciación se determina mediante la medición de secreción de insulina de glucosa estimulada, tal como se detecta mediante la medición de la cantidad de C-péptido liberado por las células. En una realización, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 1000 ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 900ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 800 ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 700ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 600 ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 500 ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 400 ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 500 ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 400 ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 300 ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 200 ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 100 ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 90ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 80ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 70ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 60 ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 50 ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 40 ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 30 ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 20 ng de ADN de péptido C/pg. En una realización alternativa, las células producidas mediante los procedimientos de la presente invención producen aproximadamente 10 ng de ADN de péptido C/pg.

Expresión creciente de MAFA en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático

[0121] En una realización, la presente descripción describe un método para aumentar la expresión de MAFA en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático que comprende las etapas de cultivar las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático en medio que comprende una cantidad suficiente de un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina para causar un aumento en la expresión de MAFA.

[0122] El inhibidor de quinasa dependiente de ciclina puede inhibir la quinasa dependiente de ciclina 1. Alternativamente, el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina puede inhibir la quinasa dependiente de ciclina 2. Alternativamente, el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina puede inhibir la quinasa dependiente de ciclina 4. Alternativamente, la ciclina inhibidor de la quinasa dependiente de puede inhibir la quinasa dependiente de ciclina 5.

Alternativamente, el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina puede inhibir la quinasa dependiente de ciclina 9. Alternativamente, el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina puede inhibir múltiples isoformas de quinasa dependiente de ciclina, en cualquier combinación de los mismos.

5 **[0123]** El inhibidor de quinasa dependiente de ciclina puede ser una proteína. Alternativamente, el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina puede ser un péptido. Alternativamente, el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina puede ser una molécula pequeña. En una realización, el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina de molécula pequeña se selecciona del grupo que consta de 7-n-butilo-6-(4-hidroxifenilo)[5H]pirrolo[2,3-b]pirazina, 9-Nitro-7,12-dihidroindolo[3,2-d][1]benzazepina-6 (5H)-ona, 3-(6-oxo-9-nitro-5,6,7,12- tetrahidroindolo [3,2- d] [1] benzazepina-2-ilo)propionitrilo, (2R)-2-((6-((3-amino-5-clorofenilo)amino)-9-(1-metiloetilo)-9H-purina-2-ilo)amino)-3- metilo-1-butanol, Arciriaflavina A, [6-bencilamino-2-(3-hidroxiopropiloamino)-9-isopropilopurina, butirólactona I, (Z)-1-(3-etilo-5-metoxi-2,3-dihidrobencotiazol-2-iliden) propan-2-ona, 2-(3-hidroxiopropiloamino)-6-(o-hidroxibencilamino)-9-isopropilopurina, 1-(2,6-diclorofenilo)-1,5 dihidro-6-((4-(2-hidroxi-etoxi)fenilo)metilo)-3-(1-metiloetilo) 4H-pirazolo [3,4-d] pirimidina-4-ona, inhibidor de péptido Cdk/ciclina III, 3-(2-cloro-3-indolilmetileno)-1,3-dihidroindol-2-ona, etilo-(6- hidroxí-4-fenilbenzo [4,5] furo [2,3-b]) piridina-3-carboxilato de etilo, RO-3306, N-(cis-2-aminociclohexilo)-N-(3-clorofenilo)-9-etilo-9H-purina-2,6-diamina, 6-ciclohexilometoxi-2-(4'-sulfamoilanolino)purina, 5-Amino-3-((4- (aminosulfonilo)fenilo)amino)-N-(2,6-difluorofenilo)-1H-1,2,4-triazol-1-carbotioamida, 3-amino-1H-pirazolo [3,4-b] quinoxalina, inhibidor Cdk2 I, Inhibitor Cdk2 II, 2(bis- (hidroxietilo)amino)-6-(4-metoxibencilamino)-9-isopropilopurina, 4-(6-ciclohexilometoxi-9H-purina-2-ilamino)-N, N-dietilobenzamida, N4-(6-Aminopirimidina-4-ilo)-sulfanilamida, (4-(2-amino-4-metilotiazol-5-ilo) pirimidina-2-ilo)-(3-nitrofenilo)amina, 2-Bromo-12,13-dihidro- 5H-indolo [2,3-a] pirrolo [3,4-c] carbazol-5,7 (6H)-diona, 1,4-dimetoxiacridina-9 (10H)tiona, 5-(N-(4-metilfenilo)amino)-2-metilo-4,7-dioxobenzotiazol, 4-(3,5-diamino-1Hpirazol-4-ilazo) fenol, 2-(2-hidroxi-etiloamino)-6-(3-cloroanilino)-9-isopropilopurina, Fascaplisina, indirubina-3'-monoxima, indirubina-3'-monoxima, 5-yodo-, indirubina-3'-monoxima-5- ácido sulfónico, isogranulatimida, 2-(2-hidroxi-etiloamino)-6-bencilamino-9-metilopurina, 6-(2-hidroxibencilamino)-2- ((1R)-(hidroximetilo)propilo)amino)-9-isopropilopurina, 5-bromo-3-(2-(4-fluorofenilo)-2-oxoetilo)idina)-1,3-dihidroindol- 2-ona, N6,N6-Dimetiloadenina, 2-(1R-isopropilo-2-hidroxi-etiloamino)-6-(3-cloroanilino)-9-isopropilo-purina, rapamicina, 2-(R)-(1-etilo-2-hidroxi-etiloamino)-6-bencilamino-9-isopropilopurina, escitonemina, 3-[1-(3H-imidazol-4-ilo)-met-(Z)-ilideno]-5-metoxi-1,3-dihidroindol-2-ona, y 4-(3'-hidroxifenilo)amino-6,7-dimetoxiquinazolina.

30 **[0124]** En una realización, la quinasa dependiente de ciclina es etilo-(6-hidroxi-4-fenilbenzo [4,5] furo [2,3-b]) piridina-3- carboxilato de metilo. En una realización, etilo-(6-hidroxi-4-fenilbenzo [4,5] furo [2,3-b]) piridina-3- carboxilato de metilo se añade a las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino a una concentración de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 10 μM durante aproximadamente uno a siete días.

35 **[0125]** En una realización, las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino se tratan con etilo-(6-hidroxi-4-fenilbenzo [4,5] furo [2,3-b]) piridina-3-carboxilato de aproximadamente uno a aproximadamente siete días.

40 **[0126]** La presente invención se ilustra adicionalmente, pero no limitada por los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo de referencia 1

45 **Diferenciación de las células madre embrionarias humanas de la línea celular H1 para células pancreáticas endocrinas en ausencia de suero bovino fetal**

50 **[0127]** Células de las líneas de células madre embrionarias humanas H1 en el paso 52 se cultivaron en placas recubiertas de MATRIGEL® (1:30 dilución) y expuestas al siguiente protocolo de diferenciación, a fin de diferenciar los marcadores de expresión de células a células característicos del linaje endocrino pancreático.

a. Medio RPMI suplementado con 2% de BSA (Catálogo # 152401, MP Biomedical, Ohio), y 100 ng/ml de activina A (R & D Systems, MN) más 20 ng/ml de WNT-3a (Catálogo # 1324-WN-002, R & D Systems, MN) más 8 ng/ml de bFGF (catálogo # 100-18B, PeproTech, NJ), durante un día seguido por tratamiento con medio RPMI suplementado con 2% de BSA y 100 ng/ml de activina A más 8 ng/ml de bFGF durante dos días adicionales (etapa 1), entonces

b. DMEM/F12 + 2% BSA + 50 ng/ml FGF7 + 0,25 μM con ciclopamina KAAD (# 239804, Calbiochem, CA) durante dos días (etapa 2), luego

c. DMEM/F12 + 1% B27 (Invitrogen, CA) + 50 ng/ml FGF7 + 0,25 μM con ciclopamina KAAD + 2 μM de ácido retinoico (RA) (Sigma, MO) + 100 ng/ml de Noggin (R & D Systems, MN) durante cuatro días (Etapa 3), entonces

d. DMEM/F12 + 1% B27 (Invitrogen, CA) + 100 ng/ml de Noggin + 1 μM de DAPT (un inhibidor de gamma-secretasa) (Catálogo # 565784, Calbiochem, CA) + 1 μM de inhibidor ALK5 II (Catálogo # 616452, Calbiochem, Ca) + 100 ng/ml de netrina 4 (R & D Systems, MN) durante tres días (Etapa 4), entonces

e. DMEM/F12 + 1% B27 (Invitrogen, CA) + 1 μ M inhibidor de ALK5 II (Calbiochem, Ca) durante siete días (Etapas 5).

5 **[0128]** El medio se cambió diariamente. En cada etapa se calculó el número de células utilizando un hemocitómetro y ARN se recogió para el análisis de PCR. Todas las muestras se recogieron por triplicado.

Ejemplo de Referencia 2

10 **Examen de los efectos de compuestos de la Biblioteca de Inhibidor de Quinasa EMD II sobre las células que han sido tratadas de acuerdo con el protocolo de diferenciación indicado en el ejemplo de referencia 1**

15 **[0129]** Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en el paso 44 se sembraron en placas de 24 pocillos recubiertas Matrigel™ (1:30 dilución), y se diferenciaron de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo de Referencia 1 hasta la etapa 5. Después de esto, las células se trataron durante cuatro días en DMEM/F12 + 1% B27 que contienen un compuesto a partir de una biblioteca de compuestos EMD Calbiochem (Catálogo # 539745, Calbiochem, San Diego, Ca) a una concentración final de 1 μ M. Los pocillos que contenían el vehículo se incluyeron como un control. A lo largo del protocolo, los medios se cambiaron diariamente. Todas las muestras se trataron por duplicado. A la finalización de este tratamiento, ARN se recogió para el análisis de PCR. Las muestras se analizaron por PCR en tiempo real para la expresión de insulina, glucagón, MAFA, y Arx4. Los resultados se expresan como una relación insulina/glucagón (Figura 1, panel A), o MAFA frente a ARX4 (Figura 1, panel b) de las muestras tratadas con respecto al control no tratado, como se mide por PCR en tiempo real. El correspondiente Compuesto #ID PubChem para cada # de pocillo aparece en la Tabla 1.

25 **[0130]** El tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con compuestos A6, B7, B8, o C2 a una concentración de 1 μ M dio como resultado una relación de expresión de insulina/glucagón de aproximadamente 3,0 o superior (véase la Figura 1, panel a).

30 **[0131]** Examinamos el efecto de estos compuestos sobre la relación de MAFA/ARX4, y se observó que el tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con varios de los compuestos dio lugar a un cambio mucho mayor en la proporción de MAFA a ARX4 de otros compuestos probados en la biblioteca: las células tratadas con compuesto C2 mostraron una proporción de MAFA/ARX4 de aproximadamente 1.000.

35 El tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con el compuesto C2 resultó en una relación MAFA/ARX4 de aproximadamente 100. (Véase la Figura 1, panel b).

Ejemplo de Referencia 3

40 **Los efectos de tratamiento con inhibidor de quinasa dependiente de ciclina sobre la insulina y la expresión MAFA en las células que han sido tratadas de acuerdo con el protocolo de diferenciación indicado en el ejemplo de referencia 1**

45 **[0132]** Varios de los compuestos que aumentaron la proporción de insulina a la expresión de glucagón, o expresión AFP a ARX4 en el Ejemplo de Referencia 2 eran inhibidores de quinasa dependientes de ciclina. Uno de estos compuestos era PubChem Compuesto ID# 5330797 (5-Amino-3-((4-(aminosulfonilo)fenilo)amino)-N-(2,6-difluorofenilo)-1H-1,2,4-triazol-1-carbotioamida) (Catálogo # 217714; Calbiochem, San Diego, CA). Para confirmar estas observaciones, las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en el paso 42 se cultivaron en 10 cm² de placas recubiertas de MATRIGEL® y tratadas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1 hasta la etapa 5. Después de la etapa 5, se trataron las células con DMEM/F12 que contenía 1% de B27 que contiene 1 μ M PubChem Compuesto ID# 5330797 durante seis días. El medio se cambió cada dos días. Se tomaron muestras de células para la PCR en tiempo real antes del tratamiento con el compuesto, y al día dos y cinco de tratamiento con compuesto.

55 **[0133]** micrografías características de las células en el día 4 o el día 6 de tratamiento con compuesto frente a los controles no tratados mostrados en la Figura 2. Las células no tratadas están muy llenas (Figura 3, paneles A y D) y es difícil distinguir las células individuales. Sin embargo, después del tratamiento con 0,5 μ M o 1 μ M de PubChem Compuesto ID# 5330797 durante seis días, los núcleos individuales se hicieron visibles (Figuras 2, paneles E y F) en comparación con el control sin tratar (Figura 2, panel d), indicando que no hubo diferenciación en la población celular. Ésta también fue acompañada por cierta muerte celular, que puede ser vista por huecos en la capa de células como se muestra en la Figura 2, paneles b y c.

60 **[0134]** El tratamiento de células con PubChem Compuesto ID# 5330797 resultó en el aumento de la expresión de insulina, glucagón, MAFA, MAFB y la somatostatina, aunque en diferentes grados. La inducción relativa de la expresión génica por tratamiento en comparación con cultivos del día 0 (pretratamiento) se muestra en las figuras 3, paneles a-v. Las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático que fueron tratadas con 1 μ M PubChem Compuesto ID# 5330797 resultaron en un aumento de aproximadamente 1,5 veces en

la expresión de glucagón a las 48 horas de tratamiento. Esta expresión se redujo por debajo de los niveles previos al tratamiento después de 5 días de tratamiento. No se observó ningún aumento en la expresión de glucagón con el tratamiento de 0,5 μ M PubChem Compuesto ID# 5330797 (Véase la Figura 3, panel a)

5 **[0135]** Las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático que fueron tratadas con 1 μ M PubChem Compuesto ID # 5330797 durante cinco días dio lugar a un aumento de aproximadamente 1,5 veces en la expresión de insulina. (Véase la Figura 3, panel b).

10 **[0136]** Las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático que fueron tratadas con 1 μ M de PubChem Compuesto ID # 5330797 durante cinco días dio lugar a un aumento de aproximadamente 200 veces en la expresión MAFA. (Véase la Figura 3, panel d).

15 **[0137]** Las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático que fueron tratados con 0,5 μ M PubChem Compuesto ID # 5330797 durante cinco días dio lugar a un aumento de aproximadamente 1,5 veces en la expresión de MAFB. (Véase la Figura 3, panel c). Se observó un aumento dependiente de la dosis en la expresión de la somatostatina (Figura 3, panel E).

20 **[0138]** No se observó ningún cambio en la expresión de la amilasa en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático que fueron tratados con PubChem Compuesto ID # 5330797 durante cinco días. (Véase la Figura 3, panel F). Sin embargo, se observaron las disminuciones en el nivel de expresión de PAX4 (Figura 3, panel h), Nkx6.1 (Figura 3, panel k), PDX1 (Figura 3, panel l), NeuroD (Figura 3, panel o), y BRN4 (Figura 3, panel q).

25 **Ejemplo de Referencia 4**

El tratamiento de inhibidor de quinasa dependiente de ciclina aumentó la expresión de AFP en racimos de tipo de tipo islote islote.

30 **[0139]** Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en el paso 52 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL® (1:30 dilución) y se diferenciaron de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo de Referencia 1. Una etapa adicional (etapa 6) se añadió, con el fin de madurar adicionalmente las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. La etapa 6 en este ejemplo consistió en un tratamiento de siete días en DMEM/F12 + 1% B27 (Invitrogen, CA). El medio se cambió diariamente.

35 **[0140]** Después de la etapa 6, se trataron las células durante 5 minutos a temperatura ambiente con 1X acutasa (Sigma, MO). La acutasa se eliminó, y DMEM/12 + 1% B27 se añadió a las células. Las células unidas se eliminaron utilizando un rascador celular y suavemente se resuspendieron y se pasaron a través de un filtro de células de 40 μ M. Las células retenidas en el tamiz se eliminaron mediante lavado en medios basales y se cultivaron en suspensión en placas de cultivo ultra bajas (Catálogo # 3471, Corning, MA). Las células se trataron a continuación como sigue: Las células se cultivaron en DMEM/F12 + 1% B27, que contiene 20 ng/ml de activina A (AA), 1 μ M de inhibidor de CDK III (Catálogo # 217714, Calbiochem, CA) durante 10 días (Etapa 7). Las células tratadas con vehículo se incluyeron como controles. Las muestras se recogieron en los días 7 a 10 para el análisis de PCR y tinción de ditazona. Las células cultivadas en suspensión de acuerdo con los métodos descritos en este ejemplo supone una morfología similar a las agrupaciones de los islotes pancreáticos. El tratamiento con inhibidor CDK III no parece afectar a la morfología de los islotes como racimos.

50 **[0141]** Figura 4, paneles a-i muestra el efecto del tratamiento de inhibidor CDK III en el perfil de expresión génica de los grupos de células. El tratamiento con inhibidor de CDK III aumentó la expresión de marcadores asociados con el linaje endocrino pancreático y, en particular, aumento de la expresión del factor de transcripción de pro-insulina, MAFA.

55 **[0142]** Figura 5, paneles a-b muestra el efecto de inhibidor de CDK III en tinción de ditazona (DTZ) de las agrupaciones. Grupos de células tratadas con inhibidor de CDK y teñidas con DTZ, mostraron un patrón de tinción más rojizo en comparación con los grupos no tratados con el inhibidor de CDK III.

60 **Ejemplo de Referencia 5**

Análisis de FACS de células productoras de insulina producidas por los métodos de la presente invención.

60 **[0143]** Las células de la H1 línea de células madre embrionarias humanas en el paso 42 se cultivaron en placas recubiertas de MATRIGEL®, y diferenciarse en células productoras de insulina utilizando el siguiente protocolo:

65 a. medio RPMI suplementado con 2% de BSA (Catálogo # 152401, MP Biomedical, Ohio), y 100 ng/ml de activina A (R & D Systems, MN) más 20 ng/ml de WNT-3a (Catálogo # 1324-WN-002, R & D Systems, MN) más 8 ng/ml de bFGF (catálogo # 100-18B, PeproTech, NJ), durante un día seguido por tratamiento con medio RPMI suplementado con 2% de BSA y 100 ng/ml activina A más 8 ng/ml de bFGF durante dos días adicionales (etapa

1),

b. DMEM/F12 + 2% BSA + 50 ng/ml FGF7 + 0,25 μ M con ciclopamina KAAD (# 239804, Calbiochem, CA) durante dos días (etapa 2),

c. DMEM/F 12 + 1% B27 (Invitrogen, CA) + 50 ng/ml FGF7+ 0,25 μ M Ciclopamina KAAD + 2 μ M de ácido retinoico (RA) (Sigma, MO) + 100 ng/ml de Noggin (R & D, MN) durante cuatro días (Etapa 3),

d. DMEM/F12 + 1% B27 (Invitrogen, CA) + 100 ng/ml de Noggin + DAPT 1 μ M (un inhibidor de gamma-secretasa) (Catálogo # 565784, Calbiochem, CA) + 1 μ M de inhibidor ALK5 II (Catálogo # 616452, Calbiochem, Ca) + 100 ng/ml de netrina 4 (R & D Systems, MN) durante tres días (Etapa 4),

e. DMEM/F12 + 1% B27 (Invitrogen, CA) + 1 inhibidor de ALK5 μ M II (Calbiochem, Ca) durante siete días (Etapa 5),

f. DMEM/F12 + 1% B27 durante siete días (Etapa 6),

g. El tratamiento con acutasa durante 5 minutos, seguido por raspado para eliminar cualesquiera células unidas restantes. La suspensión celular se pasó por un filtro de células de 40 μ M. Las células retenidas en el tamiz se eliminaron mediante lavado en medios basales y se cultivaron en suspensión en placas de cultivo ultra bajas en DMEM de alta glucosa (catálogo # 11995-073, Invitrogen, Ca) + 1% B27 + 20 ng/ml de activina a (AA) 1 μ M de inhibidor de CDK III (Catálogo # 217714, Calbiochem, Ca) durante 5 días (Etapa 7).

[0144] Racimos de tipo islote se dispersaron en células individuales utilizando TrypLE Express (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se lavaron en PBS frío. Para la fijación, las células se resuspendieron en 200-300 μ l de tampón de Cytotfix/Cytoperm (BD 554722, BD, Ca) y se incubaron durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces en 1 ml de solución de tampón/lavado Perm (BD 554723) y se resucitaron adjuntas en 100 μ l de solución de tinción/bloqueo que contiene 2% de suero normal de cabra en tampón Perm/Wash. Para el análisis de citometría de flujo, las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos primarios: anti-insulina (mAb de conejo, Señalización Celular No. C27C9; 1: 100 dilución); Anti-Glucagón (mAb de ratón, Sigma No. G2654, 1: 100); Anti-sinaptofisina (anticuerpo policlonal de conejo, DakoCytomation A0010 No, 1:50). Las células se incubaron durante 30 min a 4°C seguido de dos lavados en tampón de Perm/Wash y otros 30 minutos de incubación en los anticuerpos secundarios apropiados como sigue: Alexa 647 anti-conejo de cabra (Invitrogen N° A21246) o 647 anti-ratón de cabra (Invitrogen N° A21235); R-PE anti-conejo de cabra (BioSource No. ALI4407). Todos los anticuerpos secundarios se usaron a una dilución de 1: 200. Las células se lavaron al menos una vez en tampón de Perm/Wash y se analizaron usando BD FACSAarray. Al menos 10.000 acontecimientos se adquirieron para el análisis. Los controles incluyeron células H1 no diferenciadas y línea celular β -TC (CRL-11506™ ATCC, VA).

[0145] La figura 6, los paneles ac muestran la insulina porcentaje positivo, synapthophysin positivo, y las células glucagón positivos en las células después del tratamiento con la etapa 7, en medio que contenía vehículo. Figura 7, paneles ac muestra la insulina porcentaje positivo, synapthophysin positivo, y las células positivas de glucagón después del tratamiento con la Etapa 7 en medio que contiene 1 μ M de CDK inhibidor III durante 5 días. El número de células positivas de insulina hormonal individual se aumentó de 3% a 8% después del tratamiento con el inhibidor de CDK. Además, el porcentaje de células poli hormonal (positivas para insulina y glucagón) se disminuyó después del tratamiento con el inhibidor de CDK.

Ejemplo de Referencia 6

Cinética de Expresión MAFA inducida por inhibidor de CDK.

[0146] Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en el paso 42 se cultivaron en Placas recubiertas de MATRIGEL®, y se diferenciaron en células productoras de insulina utilizando el siguiente protocolo:

a. Medio RPMI suplementado con 2% de BSA (Catálogo # 152401, MP Biomedical, Ohio), y 100 ng/ml de activina A (R & D Systems, MN) más 20 ng/ml de WNT-3a (Catálogo # 1324-WN-002, R & D Systems, MN) más 8 ng/ml de bFGF (catálogo # 100-18B, PeproTech, NJ), durante un día seguido por tratamiento con medio RPMI suplementado con 2% de BSA y 100 ng/ml activina A más 8 ng/ml de bFGF durante dos días adicionales (etapa 1),

b. DMEM/F 12 + 2% BSA + 50 ng/ml FGF7 + 0,25 μ M con ciclopamina KAAD (# 239804, Calbiochem, CA) durante dos días (etapa 2),

c. DMEM/F12 + 1% B27 (Invitrogen, CA) + 50 ng/ml FGF7 + 0,25 μ M con ciclopamina KAAD + 2 μ M de ácido retinoico (RA) (Sigma, MO) + 100 ng/ml de Noggin (R & D Systems, MN) durante cuatro días (Etapa 3),

d. DMEM/F12 + 1% B27 (Invitrogen, CA) + 100 ng/ml Noggin + 1 μ M de DAPT (un inhibidor de gamma-

secretasa) (Catálogo # 565784, Calbiochem, CA) + 1 μM ALK5 inhibidor II (Catálogo # 616452, Calbiochem, Ca) + 100 ng/ml de netrina-4 (R & D Systems, MN) durante tres días (Etapa 4),

e. DMEM/F12 + 1% B27 (Invitrogen, CA) + 1 inhibidor de ALK5 μM II (Calbiochem, Ca) durante siete días (Etapa 5),

f. DMEM/F12 + 1% B27 durante siete días (Etapa 6),

g. El tratamiento con acutasa durante 5 minutos, seguido por raspado para eliminar cualesquiera células unidas restantes. La suspensión celular se pasó por un filtro de células de 40 μM . Las células retenidas en el tamiz se eliminaron mediante lavado en medios basales y se cultivaron en suspensión en placas de cultivo ultra bajas en DMEM de alta glucosa (catálogo # 11995-073, Invitrogen, Ca) + 1% de B27 + 20 ng/ml de activina A (AA) 2 μM de inhibidor de CDK III (Catálogo # 217714, Calbiochem, Ca) durante 1-8 días (Etapa 7).

[0147] Se recogieron muestras para el análisis de PCR en los días 1, 2, 3, y 4. Después de 4 días de tratamiento con el inhibidor de CDK, el inhibidor de CDK se eliminó de cultivo y las células fueron cultivadas 4 días adicionales en DMEM-F12 + 1% B27 + 20 ng/ml de activina A. Al final de los cuatro días, se recogieron muestras por triplicado para el análisis de PCR.

[0148] Figura 8, paneles a-b muestran patrón de expresión de MAFA y la insulina en varios puntos de tiempo de la etapa 7. El tratamiento inhibidor de CDK resultó en aumento significativo en MAFA y la expresión de insulina que aumentó como una función del tiempo. Sin embargo, la eliminación de inhibidor de CDK resultó en una caída significativa tanto a MAFA y la expresión de insulina, en las muestras obtenidas cuatro días después de la eliminación del compuesto.

Ejemplo de Referencia 7

Examen de los efectos de compuestos de la biblioteca de inhibidores de quinasa BIOMOL™ en células que han sido tratadas de acuerdo con el protocolo de diferenciación indicado en el ejemplo de referencia 1.

[0149] Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en el paso 51 se sembraron en placas recubiertas con MATRIGEL® de 24 pocillos (1:30 dilución), y se diferenciaron de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo de Referencia 1 hasta la etapa 5. Después de esto, se cultivaron las células durante un día en DMEM/F12 + 1% B27 y después se trataron durante seis días en DMEM/F12 + 1% B27 que contienen un compuesto a partir de una biblioteca de compuestos BIOMOL™ (Catálogo # 2832, BIOMOL, Plymouth Meeting, Pa) a una concentración final de 4 μM . Los pocillos que contenían vehículo se incluyeron como un control. A lo largo del protocolo de tratamiento, medios que contienen vehículo o compuesto se cambiaron cada dos días. Todas las muestras se trataron por duplicado. A la finalización de este tratamiento de ARN se recogió para el análisis de PCR. Las muestras se analizaron por PCR en tiempo real para la expresión de insulina, glucagón, MAFA, y ARX4. Los resultados se expresan como una relación insulina/glucagón (Tabla 2), o MAFA frente a Arx4 (Tabla 2) de las muestras tratadas con respecto al control no tratado, tal como se mide por PCR en tiempo real. El # de catálogo correspondiente, CAS #, y el nombre de compuesto o número de identificación para cada pocillo alfanumérico # aparece en la Tabla 3.

[0150] El tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con compuestos C8 o F1 a una concentración 4 μM dio lugar a una relación de la expresión de insulina/glucagón de aproximadamente 10,0 o superior. Las células tratadas con D9 tenían una relación de la expresión de insulina/glucagón de aproximadamente 1840,0 (Tabla 2).

[0151] A continuación examinamos el efecto de estos compuestos sobre la relación de MAFA/ARX4, y se observó que el tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con varios de los compuestos dio lugar a un cambio mucho mayor en la proporción de MAFA a ARX4 de otros compuestos probados en la biblioteca: células tratadas con compuesto B6 o F1 mostraron una proporción de MAFA/ARX4 de aproximadamente mayor que 10. El tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con el compuesto C8 dio lugar a una relación de MAFA/ARX4 de aproximadamente 84, mientras que las células tratadas con D9 tenían una relación MAFA/ARX4 de aproximadamente 212. (Tabla 2).

Ejemplo de Referencia 8

El efecto de inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina de insulina y la expresión MAFA en las células tratadas de acuerdo con el protocolo de diferenciación indicado en el ejemplo de referencia 1.

[0152] Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en el paso 51 se sembraron en placas de 24 pocillos recubiertas de MATRIGEL™ (1:30 dilución), y se diferenciaron de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo de Referencia 1 hasta la etapa 5. Después de esto, las células se cultivaron durante ocho días en DMEM/F12 + 1% B27 y después se trató durante cuatro días en DMEM/F12 + 1% B27 que contienen un inhibidor de

quinasa dependiente de ciclina a una concentración final de 0,6125, 1,25, o 5,0 μM . Examinamos 6 inhibidores: PubChem ID # 5330812 (EMD cat # 217714), PubChem ID # 4566 (EMD cat # 217713), PubChem ID # 5330797 (EMD cat # 219476), PubChem ID # 73292 (EMD cat # 341251), PubChem ID # 4592 (EMD cat # 495620), y el ID # 160355 PubChem (EMD cat # 557360). Los pocillos que contenían vehículo se incluyeron como un control. A lo largo del protocolo de tratamiento, medios que contienen vehículo o compuesto se cambiaron cada dos días. Todas las muestras se trataron por duplicado. A la finalización de este tratamiento, ARN se recogió para el análisis de PCR. Las muestras se analizaron por PCR en tiempo real para la expresión de insulina, glucagón, MAFA, y ARX4. Los resultados se expresan como el cambio en relación con el control tratado con vehículo, medido por PCR en tiempo real.

[0153] Hemos observado que los compuestos PubChem ID # 5330812, PubChem ID # 4566, PubChem ID # 5330797, y PubChem ID # 73292 estimularon la expresión MAFA a las concentraciones ensayadas (Tabla 4). PubChem ID # 4592 y PubChem ID # 160355 no estimularon la MAFA a las concentraciones ensayadas (Tabla 4). Los compuestos PubChem ID # 5330812, PubChem ID # 4566, PubChem ID # 5330797, PubChem ID # 4592 y PubChem ID # 160355 parecieron estimular la expresión de insulina (Tabla 4). El compuesto de PubChem ID # 5330797 redujo la expresión tanto de glucagón como de Arx4 (Tabla 4), mientras que se estimula la expresión MAFA.

Ejemplo de Referencia 9

La diferenciación de las células madre embrionarias humanas de la línea celular de H1 para células pancreáticas endocrinas con DMEM que contenían 25 μM de glucosa (DMEM-HG), que carece de suero bovino fetal

[0154] Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 fueron cultivadas en placas recubiertas de MATRIGEL® (1:30 dilución) y se diferenciaron en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático usando el siguiente protocolo:

a. Medio RPMI suplementado con 2% de BSA (Catálogo # 152401, MP Biomedical, Ohio), y 100 ng/ml de activina A (R & D Systems, MN) más 20 ng/ml de WNT-3a (Catálogo # 1324-WN-002, R & D Systems, MN) más 8 ng/ml de bFGF (catálogo # 100-18B, PeproTech, NJ), durante un día seguido por tratamiento con medio RPMI suplementado con 2% de BSA y 100 ng/ml de activina A más 8 ng/ml de bFGF durante dos días adicionales (etapa 1),

b. Medio RPMI suplementado con 2% BSA FGF7 + 50 ng/ml + 0,25 μM con ciclopamina KAAD (# 239804, Calbiochem, CA) durante dos días (etapa 2),

c. DMEM-HG + 1% B27 (Invitrogen, CA) + 50 ng/ml FGF7 + 0,25 μM Ciclopamina- KAAD + 2 μM ácido retinoico (RA) (Sigma, MO) + 100 ng/ml de Noggin (R & D Systems, MN) durante seis días (etapa 3),

d. DMEM-HG + 1% B27 (Invitrogen, CA) + 100 ng/ml Noggin + 1 μM de inhibidor de ALK5 II (Catálogo # 616452, Calbiochem, CA) durante tres días (Etapa 4),

e. DMEM-HG + 1% B27 (Invitrogen, CA) + 1 μM inhibidor de ALK5 II (Calbiochem, Ca) durante siete días (Etapa 5).

[0155] El medio se cambió diariamente. En cada etapa se calculó el número de células utilizando un hemocitómetro y ARN se recogió para el análisis de PCR. Todas las muestras se recogieron por triplicado.

Ejemplo de Referencia 10

Examen de los efectos de compuestos de la biblioteca de inhibidores de quinasa EMD I en células tratadas de acuerdo con el protocolo de diferenciación indicado en el ejemplo de referencia 9

[0156] Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en el paso 45 se sembraron en placas recubiertas con MATRIGEL® de 24 pocillos (1:30 dilución), y se diferenciaron de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo de Referencia 9 hasta la etapa 5. Después de esto, se alimentaron las células y se trataron en el día 1, 3 y 5 de la etapa 5 con medios que comprende DMEM-HG, 1% B27 (Invitrogen, CA), 1 μM de inhibidor de ALK5 II (Calbiochem, CA) y un compuesto a partir de una biblioteca de compuestos EMD Calbiochem 1 solubilizado en DMSO (Catálogo # 539744, Calbiochem, San Diego, Ca) y se trató a una concentración final de 2,5 μM . Los pocillos que contenían vehículo se incluyeron como un control. A lo largo de los medios de protocolo se cambian todos los días, excepto en la etapa 5, cuando se cambió el medio cada dos días. Todas las muestras se trataron por duplicado.

[0157] A la finalización de este tratamiento de ARN se recogió para el análisis de PCR. Las muestras se analizaron por PCR en tiempo real para la expresión de MAFA. Los resultados se expresan como el aumento de veces en la

expresión de MAFA frente a las células humanas madre embrionarias H1 no tratadas (Tabla 5), como se mide por PCR en tiempo real.

[0158] El tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con compuestos A4 (Cat # 124001, Inhibidor Akt IV), E8 (Cat # 527450, inhibidor PKR), y F9 (Cat # 539648, estaurosporina, N-benzoil-) a una concentración de 2,5 μ M dio como resultado un aumento en la expresión de MAFA al menos 4 veces mayor que los controles tratados con vehículo (Tabla 5). El tratamiento con el compuesto E6 (Cat # 521233, PDGF inhibidor de quinasa de tirosina de receptor IV) en una concentración de 2,5 μ M resultó en un aumento en expresión de MAFA de al menos 2,5 veces mayor que los controles tratados con vehículo (Tabla 5).

Ejemplo de Referencia 11

Examen de los efectos de compuestos de la biblioteca de inhibidor de quinasa de EMD II en las células tratadas de acuerdo con el protocolo de diferenciación indicado en el ejemplo de referencia 9

[0159] Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en el paso 46 se sembraron en Placas recubiertas con MATRIGEL® de 24 pocillos (1:30 dilución), y se diferenciaron de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo de Referencia 9 hasta la etapa 5. Después de esto, se alimentaron las células y se trataron en el día 1, 3 y 5 de la etapa 5 con medios que comprenden DMEM-HG, 1% B27 (Invitrogen, CA), 1 μ M de inhibidor ALK5 II (Calbiochem, Ca) (Etapa 5) y un compuesto a partir de una biblioteca de compuestos EMD Calbiochem II solubilizados en DMSO (Tablas 1 y 6, Calbiochem, San Diego, CA) y se trató con una concentración final de 2,5 μ M. Los pocillos que contenían vehículo se incluyeron como un control. A lo largo de los medios de protocolo se cambian todos los días, excepto en la etapa 5, cuando se cambió el medio cada dos días. Todas las muestras se trataron por duplicado.

[0160] A la finalización de este tratamiento, ARN se recogió para el análisis de PCR. Las muestras se analizaron por PCR en tiempo real para la expresión de MAFA. Resultados para compuestos que estimularon la expresión de MAFA se muestran y se expresan como el aumento de veces en la expresión de MAFA frente a las muestras de control (Figura 9), medidos por PCR en tiempo real.

[0161] El tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con: alsterpaulona, 2-cianoetilo; SU9516; alsterpaulona; Inhibidor de Cdk1/2 III; Inhibidor de quinasa de caseína I, D4476; o inhibidor de MEK1/2 a una concentración de 2,5 μ M dio como resultado un aumento de 4,5 veces en la expresión de MAFA frente a los controles no tratados (Tabla 7).

Ejemplo 12

La inhibición de progresión de ciclo celular en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático con inhibidores de moléculas pequeñas promueve expresión de MAFA en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático

[0162] El crecimiento celular resultante de la progresión del ciclo celular puede ser activado y mantenido por estimulación de las células con factores de crecimiento extracelulares. Los factores de crecimiento se unen a los dominios extracelulares de receptores de factores de crecimiento, induciendo un cambio conformacional en el dominio intracelular del receptor. Este cambio inicia la dimerización del receptor y la activación de quinasas de tirosina situadas en el dominio intracelular del receptor que conduce a la fosforilación y la activación de serina múltiple/quinasas de treonina aguas abajo, en última instancia resulta en la progresión del ciclo celular y la proliferación celular.

[0163] En condiciones fisiológicas normales, células beta maduras pancreáticas, caracterizadas por la expresión de la insulina y el factor de transcripción MAFA, son quiescentes y tienden a permanecer en G0 del ciclo celular. Sin embargo, a fin de generar suficientes células para formar un órgano funcional y satisfacer las necesidades de un animal maduro, las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático de la presente invención deben ser el ciclo celular. En consecuencia, en algún momento en el desarrollo embrionario, las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático de la presente invención se diferencian para las células beta y la transición de una célula activamente en proliferación de ciclo de células, a una célula quiescente.

[0164] Nuestros datos indican que mediante la inhibición de la progresión del ciclo celular mediante el bloqueo de las cascadas de señalización con pequeños inhibidores de quinasa de molécula, podemos inducir a las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático para expresar MAFA, un marcador de las células beta pancreáticas maduras. Inhibidores de quinasa dirigidos a un receptor de factor de crecimiento, (inhibidor de quinasa de receptor de tirosina PDGF IV), o inhibidores que interrumpen quinasas aguas abajo de los receptores de quinasa de tirosina (Inhibidor MEK1/2, inhibidor PKR o Inhibidor Akt IV) perturban el factor de crecimiento proliferativo/señalización basada en quinasa lo que resulta en la detención del ciclo celular y la inducción de la expresión MAFA. El uso de un inhibidor de amplio espectro como estaurosporina, puede inducir eficazmente MAFA, sin embargo también es citotóxico a concentraciones eficaces. Los compuestos más dirigidos como inhibidores de la

quinasa dependiente de ciclina (Alsterpaulona, 2-cianoetilo; SU9516; alsterpaulona; o Inhibidor Cdk1/2 III) inducen MAFA con menos toxicidad que un inhibidor de amplio espectro como estaurosporina.

Con el fin de determinar si un inhibidor de quinasa de amplio espectro podría inducir la expresión de MAFA y un fenotipo más maduro en las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático de la presente invención se diferenciaron células ES humanas H1 de acuerdo con los métodos descritos en el ejemplo 9, y se trataron en los días 1, 3 y 5 de la etapa 5 con el inhibidor de proteína quinasa de tirosina, la genisteína, que se ha demostrado que induce la detención en la fase G2 en líneas de células humanas y murinas e inhibe múltiples quinastas. A dosis de 10 y 30 ng/ml las hormonas endocrinas insulina, somatostatina y el factor de transcripción MAFA, manifestaron expresión incrementada frente a los controles no tratados, mientras que a 10 ng/ml la hormona glucagón endocrino tenía una expresión incrementada (Figura 10). Hemos observado toxicidad significativa a una dosis de 100 ng/ml de genisteína que se correlacionó con la pérdida de la insulina, glucagón, y la expresión de somatostatina.

Estos datos indican que mediante la inhibición de la progresión del ciclo celular mediante el bloqueo de las cascadas de señalización con pequeños inhibidores de quinasa de molécula dirigidos a inhibir la transducción de señal de un factor de crecimiento de quinasa de tirosina del receptor a través de quinastas de señalización intracelular a las quinastas dependientes de núcleo y de ciclina, podemos inducir a las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático de la presente invención para expresar MAFA, un marcador de las células beta pancreáticas maduras. Aunque los diversos aspectos de la invención se han ilustrado anteriormente por referencia a los ejemplos y realizaciones preferidas, se apreciará que el alcance de la invención se define no por la descripción anterior sino por las siguientes reivindicaciones adecuadamente interpretadas bajo los principios de la ley de patentes.

Tabla 1. Etiqueta de pocillo alfanumérica y el correspondiente #ID PubChem para la biblioteca de compuestos de inhibidor de quinasa Calbiochem EMD II

Pocillo	PubChemID#	Pocillo	PubChemID#	Pocillo	PubChemID#	Pocillo	PubChemID#
A2	16760529	B2	16760303	C2	5330797	D2	9797929
A3	5278396	B3	5326739	C3	3004085	D3	11493598
A4	6605258	B4	5353431	C4	481747	D4	16760417
A5	5005498	B5	2422	C5	1893668	D5	73292
A6	16760286	B6	5472558	C6	9969021	D6	4124851
A7	5326843	B7	2794188	C7	2856	D7	6539732
A8	3641059	B8	5330812	C8	6918386	D8	448014
A9	6604931	B9	438981	C9	10202471	D9	5287844
A10	11524144	B10	6419753	C10	9549301	D10	6538818
A11	9549303	B11	16760346	C11	5339183	D11	10020713
E2	5312137	F2	11382492	G2	6419739	H2	176155
E3	6419766	F3	11624601	G3	4665	H3	16219471
E4	6419741	F4	490561	G4	4713	H4	3387354
E5	3674	F5	3820	G5	4712	H5	5174
E6	9903786	F6	5312122	G6	5164	H6	5228
E7	6419764	F7	9951490	G7	4987	H7	16760659
E8	8515	F8	389898	G8	9549289	H8	451705
E9	11665831	F9	9549284	G9	5702541	H9	16760660
E10	11422035	F10	11644425	G10	5162	H10	5289419
E11	16760525	F11	509554	G11	5353940	H11	9549300

Tabla 2. El efecto de los compuestos de la biblioteca de compuestos de inhibidor BIOMOL de la relación de insulina/glucagón y la expresión de MAFA/Arx4 según lo determinado por PCR en tiempo real en células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino. El #pocillo alfanumérico corresponde a la identidad de compuesto en la Tabla 3.

ES 2 634 445 T3

	# Pooillo	Relación vs. Control Insulina a glucagon	MAFA a Arx4
5	B1	1.6	0.9
	B2	2.4	1.3
	B3	2.9	2.9
	B4	1.1	2.0
	B5	1.3	1.3
10	B6	1.6	16.3
	B7	1.3	0.5
	B8	1.6	0.5
	B9	1.1	1.5
	B10	1.2	1.5
15	B11	1.1	2.1
	B12	1.0	2.0
	C1	0.7	0.8
	C2	0.9	1.0
	C3	1.3	0.9
20	C4	1.2	1.7
	C5	1.0	1.1
	C6	1.6	1.2
	C7	4.3	0.2
	C8	40.2	84.3
25	C9	0.8	0.5
	C10	2.3	1.9
	C11	1.1	0.4
	C12	1.0	0.4
	D1	2.7	1.2
30	D2	3.4	1.3
	D3	1.7	2.1
	D4	5.8	6.4
	D5	1.4	1.1
	D6	1.8	3.9
35	D7	1.7	0.6
	D8	2.8	5.1
	D9	1842.5	212.6
	D10	0.9	1.3
	D11	1.0	0.7
40	D12	1.1	2.5
	E1	1.1	0.9
	E2	0.8	0.8
	E3	1.2	1.0
	E4	2.1	1.3
45	E5	1.3	1.1
	E6	2.0	1.5
	E7	4.8	0.2
	E8	3.7	0.0
	E9	1.0	0.8
50	E10	0.6	0.2
	E11	1.0	0.3
	E12	0.8	0.2
	F1	10.3	9.5
	F2	2.9	1.9
55	F3	2.6	2.5
	F4	1.5	2.7
	F5	1.9	1.4
	F6	1.6	1.2
	F7	1.9	0.6
60	F8	1.5	0.6
	F9	1.0	1.4
	F10	5.4	3.4
	F11	0.8	1.9
	F12	1.0	1.4
65			

	# Pocillo	Relación vs. Control Insulina a glucagon	MAFA a Arx4
5	G1	0.8	1.2
	G2	0.6	1.1
	G3	2.0	1.6
	G4	1.3	1.6
10	G5	1.7	1.5
	G6	1.5	1.3
	G7	4.6	0.2
	G8	3.9	0.4
	G9	1.0	0.7
15	G10	1.3	0.7
	G11	1.9	0.6
	G12	1.4	0.8
	H1	3.1	0.6
20	H2	1.8	3.5
	H3	1.8	3.9
	H4	1.2	4.0
	H5	1.8	2.0
25	H6	1.4	2.9
	H7	1.5	0.6
	H8	2.1	0.8
	Control de vehículo	1.0	1.0

30 **Tabla 3. Etiqueta de pocillo alfanumérica y el correspondiente catálogo#, CAS#, y el nombre de compuesto o número de identificación para la biblioteca de compuestos de inhibidor de quinasa BIOMOL**

	UBICACIÓN DE PLACA	CATÁLOGO #	CAS #	NÚMERO DE COMPUESTO O N° ID
35	B1	EI-360	167869-21-8	PD-98059
	B2	EI-282	109611-58-2	U 0126
	B3	EI-286	152121-47-6	SB-203580
40	B4	EI-148	84477-87-2	H-7
	B5	EI-195	84468-17-7	H-9
	B6	EI-156	62996-74-1	Stauroespina
	B7	EI-228	133650-35-5	AG 494
45	B8	EI-267		AG-825
	B9	EI-185	125697-92-9	Lavendustina A
	B10	EI-253	136631-49-7	RG-14620
	B11	EI-191	118409-57-7	Tirfostina 23
50	B12	EI-187	118409-58-8	Tirfostina 25
	C1	EI-257	122520-85-8	Tirfostina 46
	C2	EI-188	122520-86-9	Tirfostina 47
	C3	EI-189	122520-90-5	Tirfostina 51
55	C4	EI-190	2826-26-8	Tirfostina 1
	C5	EI-335	116313-73-6	Tirfostina AG 1288
	C6	EI-277	63177-57-1	Tirfostina AG 1478
	C7	AC-1133	71897-07-9	Tirfostina AG 1295
60	C8	EI-215	10537-47-0	Tirfostina 9
	C9	EI-247		HNMPA (Hidroxi-2-ácido naftalenilmetilfosfónico)

65

5	C10	EI-370	120685-11-2	PKC-412
	C11	EI-271	10083-24-6	Piceatannol
	C12	EI-275	172889-26-8	PP1
	D1	EI-272	133550-35-3	AG-490
	D2	EI-263		AG-126
10	D3	EI-229		AG-370
	D4	EI-258		AG-879
	D5	ST-420	154447-36-6	LY 294002
	D6	ST-415	19545-26-7	Wortmanina
15	D7	EI-246	133052-90-1	GF 109203X
	D8	EI-226	548-04-9	Hipericina
	D9	EI-283	138489-18-6	Ro 31-8220
	D10	EI-155	123-78-4	Sfingosina
20	D11	EI-196	127243-85-0	H-89
	D12	EI-158	84478-11-5	H-8
	E1	EI-184	91742-10-8	HA-1004
	E2	EI-23	103745-39-7	HA-1077
25	E3	EI-232		HDBA (2-Hidroxi-5-(2,5-dihidroxibencilamino)ácido benzoico)
	E4	EI-230	127191-97-3	KN-62
	E5	EI-268		KN-93
30	E6	EI-197	109376-83-2	ML-7
	E7	EI-153	105637-50-1	ML-9
	E8	CC-100	452-06-2	2-Aminopurina
	E9	CC-202	158982-15-1	N9-Isopropilo-olomucina
35	E10	CC-200	101622-51-9	Olomucina
	E11	CC-201	101622-50-8	iso- Olomucina
	E12	CC-205	186692-46-6	Roscovitina
	F1	EI-293	24386-93-4	5-Yodotubercidina
40	F2	EI-295	62004-35-7	LFM-A13
	F3	EI-294	152121-30-7	SB-202190
	F4	EI-297	172889-27-9	PP2
	F5	EI-298	208260-29-1	ZM 336372
45	F6	EI-306	5812-07-7	SU 4312
	F7	EI-303	146535-11-7	AG-1296
	F8	EI-307	220904-83-6	GW 5074
	F9	AC-1121	6865-14-1	Palmitoilo-DL-carnitina Cl
50	F10	EI-270	82-08-6	Rotlerina
	F11	EI-147	446-72-0	Genisteina
	F12	ST-110	486-66-8	Daidzein
	G1	EI-146	63177-57-1	Análogo de erbatina
55	G2	AC-1142	6151-25-3	Dihidrato de quercetina
	G3	AC-1293		SU1498
	G4	EI-357	4452-06-6	ZM 449829
	G5	EI-278	195462-67-7	BAY 11-7082
60	G6	EI-231	53-85-0	DRB (5,6-Dicloro-1-β-D-ribofuranosilbencimidazol)
	G7	EI-273		HBDDE (2,2',3,3',4,4'-Hexahidroxi-1,1'-bifenilo-6,6'-éter de dimetilo dimetanol)
65				

5	G8	EI-305	129-56-6	SP 600125
	G9	CC-206	479-41-4	Indirubina
	G10	CC-207	160807-49-8	Indirubina-3'-monoxima
	G11	EI-299	146986-50-7	Y-27632
10	G12	EI-310	142273-20-9	Kenpaulona
	H1	EI-328	121-40-4	Ácido terreico
	H2	EI-332	35943-35-2	Triciribina
	H3	EI-336		BML-257
15	H4	EI-343		SC-514
	H5	EI-344		BML-259
	H6	EI-345	520-36-5	Apigenina
	H7	EI-346		BML-265 (análogo erlotinib)
20	H8	A-275	53123-88-9	Rapamicina

Tabla 4. El efecto de los compuestos de la biblioteca de compuestos de inhibidor BIOMOL sobre la expresión de insulina, glucagón, MAFA y Arx4 en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático

Concentración y PubChem					
	ID#	MAFA	Insulina	Glucagon	Arx4
30	0.61 μ M 5330812	46.3	0.9	0.26	0.68
	1.25 μ M 5330812	209.2	1.3	0.31	0.66
	5.0 μ M 5330812	2909.9	66.3	4.71	0.92
	0.61 μ M 4566	1.0	1.0	0.77	0.78
	1.25 μ M 4566	0.8	1.1	0.90	0.78
35	5.0 μ M 4566	1.0	1.1	0.96	0.69
	0.61 μ M 5330797	0.7	0.6	0.34	0.36
	1.25 μ M 5330797	1.5	0.8	0.25	0.37
	5.0 μ M 5330797	6.3	1.3	0.04	0.16
40	0.61 μ M 73292	0.7	0.7	0.29	0.38
	1.25 μ M 73292	1.3	1.0	0.25	0.42
	5.0 μ M 73292	3.1	0.8	0.13	0.33
	0.61 μ M 4592	0.9	0.9	0.81	0.61
45	1.25 μ M 4592	1.0	1.0	0.70	0.54
	5.0 μ M 4592	0.6	1.3	1.08	0.77
	0.61 μ M 160355	0.9	0.9	0.76	0.77
	1.25 μ M 160355	0.7	1.0	0.61	0.65
50	5.0 μ M 160355	0.8	1.1	0.59	0.86
	Vehículo tratado	1.0	1.0	1.00	1.00

Tabla 5. Etiqueta de pocillo alfanumérico y el correspondiente catálogo#, y nombre de compuesto o número de ID para la biblioteca de compuestos de inhibidor de quinasa calbiochem EMD I

Ubicación de placa	Catálogo#	Nombre de compuesto	Inducción génica vs. H1: MAFA	
60	A10	197221	Inhibidor Bcr-abl	1.5
	A11	203290	Bisindolilmaleimida I	0.8
	A12	DMSO	Control	1.5
	A2	121767	AG 1024	0.8
	A3	121790	AGL 2043	0.8

ES 2 634 445 T3

	A4	124011	Inhibidor Akt IV	45.7
	A5	124012	Inhibidor Akt V, Triciribina	0.9
	A6	124018	Inhibidor Akt VIII, Isozima- Selectiva, Akti-1/2	1.6
5	A7	124020	Inhibidor Akt X	1.4
	A8	521275	PDK1/Akt/Fit Inhibidor de vía dual	2.1
10	A9	189404	Inhibidor de quinasa aurora II	1.3
	B10	317200	CMBI	1.9
	B11	324673	Inhibidor EGFR/ErbB-2	2.4
	B12	DMSO	Control	1.9
15	B2	203297	Bisindolilmaleimida IV	1.9
	B3	203696	BPIQ-I	1.6
	B4	220285	Cloruro de queleritina	2.3
	B5	234505	Compuesto 56i	1.8
20	B6	260961	Inhibidor ADN-PK II	2.0
	B7	260962	Inhibidor ADN-PK III	2.2
	B8	528100	PI-103	1.9
25	B9	266788	Inhibidor de quinasa de diacilglicerol II	1.5
	C10	375670	Herbimicina A, Streptomyces sp.	1.3
30	C11	343022	Inhibidor Ft-3 III	1.1
	C12	DMSO	Control	1.1
	C2	324674	Inhibidor	3.5
	C3	324840	EGFR/ErbB-2/ErbB-4 Inhibidor	0.9
35	C4	343020	Inhibidor Ft-3	0.6
	C5	343021	Inhibidor Ft-3 II	0.5
	C6	344036	Inhibidor de quinasa de tirosina de receptor cFMS	2.2
40	C7	365250	G8 6976	1.9
	C8	365251	G8 6983	1.0
	C9	371806	CTP-14564	0.7
45	D10	440203	LY 303511	1.7
	D11	448101	Inhibidor de quinasa met	2.1
	D12	BLANK		1.7
50	D2	407248	Inhibidor IGF-1R II	1.6
	D3	407601	Inhibidor IRAK-1/4	2.2
	D4	420099	Inhibidor JAK I	1.4
	D5	420104	Inhibidor JAK3 II	2.0
55	D6	420121	Inhibidor JAK3 IV	1.7
	D7	420126	Inhibidor JAK3 VI	1.9
	D8	428205	Inhibidor Lck	1.9
	D9	440202	LY 294002	2.3
60	E10	528106	Inhibidor PI 3-K α	1.6
	E11	528108	Inhibidor PI 3-K β II	1.4
	E12	BLANK		1.6
65	E2	513035	PD 158780	0.8

ES 2 634 445 T3

	E3	513040	PD 174265	1.0
5	E4	521231	Tirosina de Receptor PDGF Inhibidor de quinasa II	0.8
	E5	521232	Inhibidor de quinasa Tirosina de Receptor PDGF III	1.7
10	E6	521233	Inhibidor de quinasa Tirosina de Receptor PDGF IV	5.5
	E7	521234	Inhibidor de PDGF RTK	1.9
	E8	527450	Inhibidor de PKR	24.6
15	E9	527455	Inhibidor de PKR, Control negativo	1.5
	F10	567805	Inhibidor quinasa Src I	2.3
	F11	572660	SU11652	1.7
20	F12	DMSO	Control	2.1
	F2	529574	PP3	1.3
	F3	529581	PP1 Análogo II, 1 NM-PP1	2.3
	F4	539652	Inhibidor de PKC β /EGFR	1.8
25	F5	539654	Inhibidor de PKC β	1.6
	F6	553210	Rapamicina	1.2
	F7	555553	Inhibidor de quinasa Rho III Rockout	1.7
30	F8	555554	Inhibidor de quinasa Rho IV	2.3
	F9	539648	Staurosporina, N-benzilo-	11.7
	G10	658550	AG 1295	1.4
	G11	658551	AG 1296	1.1
35	C12	DMSO	Control	1.2
	G2	574711	Inhibidor de Syk	1.2
	G3	574712	Inhibidor de Syk II	0.8
	G4	574713	Inhibidor de Syk III	1.1
40	G5	616451	Inhibidor de quinasa TGF- β RI	1.1
	G6	616453	Inhibidor de TGF- β RI III	1.6
	G7	658390	AG 9	1.5
	G8	658401	AG 490	1.4
45	G9	658440	AG 112	1.4
	H10	189405	Inhibidor de quinasa aurora III	2.0
	H11	569397	Staurosporina, Streptomyces sp.	0.0'
50	H12	DMSO	Control	1.5
	F-2	658552	AG 1473	2.7
	F-3	676480	Receptor VEGF 2 Inhibidor de quinasa I	1.7
55	F-4	676481	Receptor de VEGF Inhibidor de quinasa tirosina II	1.0
	F-5	676482	Receptor de VEGF Inhibidor de quinasa tirosina III, KRN633	1.6
60	F-6	676485	Receptor VEGF 2 Inhibidor de quinasa II	1.0
65	H7	676487	Receptor VEGF 2 Inhibidor de quinasa III	1.1

H8	676489	Receptor VEGF 2 Inhibidor de quinasa IV	2.1
H9	260964	Inhibidor ADN-PK V	1.5

Tabla 6. Etiqueta de pocillo alfanumérico, catálogo# correspondiente, y compuesto # para EMD Calbiochem® biblioteca de compuestos de inhibidor de quinasa II

Pocillo #	Catálogo #	Compuesto #
A1	DMSO	
A2	422706	KN-62
A3	118500	Inhibidor de cinasa ATM
A4	118501	Inhibidor de cinasa ATM/ATR
A5	126870	Alsterpaulona
A6	126871	Alsterpaulona, 2-Cianoetilo
A7	128125	Aloisina A, RP107
A8	128135	Aloisina, RP106
A9	164640	Aminopurvalanol A
A10	171260	Inhibidor de AMPK, Compuesto C
A11	189405	Inhibidor de quinasa aurora III
A12	BLANK	
B1	DMSO	
B2	189406	Inhibidor de quinasa de aurora/Cdk
B3	402085	Indirubina-3'-monóxima
B4	196870	BAY 11-7082
B5	203600	Bohemina
B6	217695	Inhibidor de Cdk1
B7	217696	Inhibidor Cdk1, GP74514A
B8	217714	Inhibidor Cdk1/2 III
B9	217720	Inhibitor Cdk1/5
B10	218696	Inhibidor de quinasa caseína I, D4476
B11	218710	Inhibidor de quinasa caseína II III, TBCA
B12	BLANK	
C1	DMSO	
C2	219476	Inhibidor de Cdk4
C3	219477	Inhibitor Cdk4 II, NSC 625987
C4	219478	Inhibidor de Cdk4
C5	219479	Inhibidor de quinasa de tipo Cdc2, TG003
C6	220486	Inhibidor de Chk2 II
C7	234503	Compuesto 52
C8	238803	Inhibidor Cdk2 III
C9	238804	Inhibidor Cdk2 IV, NU6140
C10	219491	Inhibidor Cdk/Crk
C11	328009	Inhibidor ERK III
C12	BLANK	
D1	DMSO	
D2	688000	Inhibidor de ROCK, Y-27632
D3	328007	Inhibidor de ERK II, FR180204

ES 2 634 445 T3

	D4	328008	Inhibidor ERK II,	Control negativo
	D5	341251	Fascaplisina, sintética	
5	D6	361540	Inhibidor de GSK-3b I	
	D7	361541	Inhibidor de GSK-3b II	
	D8	361549	Inhibidor de GSK-3b VIII	
	D9	361550	Inhibidor de GSK-3 IX	
10	D10	361551	Inhibidor de GSK-3 X	
	D11	361553	Inhibidor de GSK-3 XI	
	D12	BLANK		
	E1	DMSO		
	E2	572635	SU6656	
15	E3	361555	Inhibidor GSK-3 XIII	
	E4	371957	Isogranulatimida	
	E5	400090	IC261	
	E6	401481	Inhibidor IKK-2 IV	
	E7	402081	Derivado de indirubina E804	
20	E8	420119	Inhibidor JNK II	
	E9	420123	Inhibidor JNK,	Control negativo
	E10	420129	Inhibidor JNK V	
	E11	420136	Inhibidor JNK IX	
	E12	BLANK		
25	F1	DMSO		
	F2	475863	Inhibidor de MK2a	
	F3	420135	Inhibidor de JNK VIII	
30	F4	420298	K-252a, Nocardiosis sp.	
	F5	422000	Kenpaulona	
	F6	422708	KN-93	
	F7	444937	Inhibidor de MEK I	
	F8	444938	Inhibidor MEK II	
35	F9	444939	Inhibidor MEK1/2	
	F10	454861	Inhibidor de MNK1	
	F11	481406	Inhibidor de Activación NF- κ B	
	F12	BLANK		
	G1	DMSO		
40	G2	506121	Inhibidor de quinasa p38 MAP III	
	G3	506126	Inhibidor de quinasa p38 MAP	
	G4	513000	PD 98059	
	G5	513030	PD 169316	
45	G6	559396	SB220025	
	G7	540500	Purvalanol A	
	G8	361554	Inhibidor GSK3b XII, TWS119	
	G9	371963	H - 89, Dihidrocloruro	
50	G10	559387	SB 202474, Control negativo para estudios de inhibición de p38 MAPK	
	G11	559388	SB 202190	
	G12	BLANK		
	H1	DMSO		
55	H2	559389	SB 203580	
	H3	371970	HA 1077, Dihidrocloruro	Fasudil
	H4	559402	SB 218078	
60	H5	565625	SC-68376	
	H6	567305	SKF-86002	
	H7	567731	Inhibidor de quinasa de esfingosina	
	H8	569397	Staurosporina, Streptomyces sp.	
	H9	570250	STO-609	
65	H10	572650	SU9516	
	H11	616373	Inhibidor de quinasa Tpl2	
	H12	BLANK		

Tabla 7. Inducción de la expresión de MAFA por varios compuestos de la biblioteca de inhibidor de quinasa EMD II sobre las células tratadas de acuerdo con el protocolo de diferenciación indicado en el ejemplo 9

<u>pocillo#</u>	<u>múltiple vs. control</u>	<u>cat#</u>	<u>Nombre de fármaco</u>
A6	24,8	126871	Alsterpaulona, 2-cianoetilo
H10	18,0	572650	SU9516
A5	15,3	126870	Alsterpaulona
B8	8,2	217714	Inhibidor Cdk1/2 III
B10	5,7	218696	Inhibidor de quinasa caseína I, D4476
F9	4,92	444939	Inhibidor MEK1/2

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un método para producir células productoras de hormona pancreática a partir de células madre pluripotentes, que comprende las etapas de:

- a. cultivo de células madre pluripotentes,
- b. diferenciar las células madre pluripotentes en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo,
- c. diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, y
- d. diferenciar las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático,

en el que la expresión de MAFA en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se aumenta por un método que comprende las etapas de cultivar las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático en medio que comprende una cantidad suficiente de un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina para causar un aumento en la expresión de MAFA.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina inhibe:

- a. Quinasa dependiente de ciclina 1;
- b. Quinasa dependiente de ciclina 2;
- c. Quinasa dependiente de ciclina 4;
- d. Quinasa dependiente de ciclina 5; o
- e. Quinasa dependiente de ciclina 9.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina es una proteína, péptido o molécula pequeña.

4. El método de la reivindicación 3, en el que el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina de molécula pequeña se selecciona del grupo constituido por: 7-n-butilo-6-(4-hidroxifenilo)[5H]pirrolo[2,3-b]pirazina, 9-nitro-7,12-dihidroindolo[3,2-d][1]benzazepina-6 (5H)-ona, 3-(6-oxo-9-nitro-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-d][1]benzazepina-2-ilo)propionitrilo, (2R)-2-((6-((3-amino-5-clorofenilo)amino)-9-(1-metiloetilo)-9H-purina-2-ilo)amino)-3-metilo-1-butanol, Arciaflavina A, [6-bencilamino-2-(3-hidroxi-propiloamino)-9-isopropilopurina, butirólactona I, (Z)-1-(3-etilo-5-metoxi-2,3-dihidrobenzotiazol-2-ilideno)propan-2-ona, 2-(3-hidroxi-propiloamino)-6-(o-hidroxibencilamino)-9-isopropilopurina, 1-(2,6-diclorofenilo)-1,5-dihidro-6-((4-(2-hidroxietoxi)fenilo)-metilo)-3-(1-metiloetilo)-4H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4-ona, inhibidor de péptido Cdk/ciclina III, 3-(2-cloro-3-indolilmetiloeno)-1,3-dihidroindol-2-ona, etilo-(6-hidroxi-4-fenilobenzofuro[2,3-b])piridina-3-carboxilato de etilo, RO-3306, N-(cis-2-aminociclohexilo)-N-(3-clorofenilo)-9-etilo-9H-purina-2,6-diamina, 6-ciclohexilometoxi-2-(4'-sulfamoiilanilino)purina, 5-amino-3-((4-(aminosulfonilo)fenilo)amino)-N-(2,6-difluorofenilo)-1H-1,2,4-triazol-1-carbotioamida, 3-amino-1H-pirazolo [3,4-b]quinoxalina, Cdk2 inhibidor I, Inhibitor Cdk2 II, 2(bis-(hidroxietilo)amino)-6-(4-metoxibencilamino)-9-isopropilopurina, 4-(6-ciclohexilometoxi-9H-purina-2-ilamino)-N,N-dietilbenzamida, N4-(6-Aminopirimidina-4-ilo)-sulfanilamida, (4-(2-amino-4-metilotiazol-5-ilo)pirimidina-2-ilo)-(3-nitrofenilo)amina, 2-Bromo-12,13-dihidro-5H-indolo [2,3-a] pirrolo [3,4-c] carbazol-5,7-(6H)-diona, 1,4-dimetoxiacridina-9-(10H)-tiona, 5-(N-(4-metilofenilo)amino)-2-metilo-4,7-dioxobenzotiazol, 4-(3,5-diamino-4-ilazo-1Hpirazol) fenol, 2-(2-hidroxietiloamino)-6-(3-cloroanilino)-9-isopropilopurina, fascalpina, indirubina-3'-monoxima, indirubina-3'-monoxima, 5-yodo-, indirubina-3'-monoxima-5-sulfónico, isogranulatimida, 2-(2-hidroxietiloamino)-6-bencilamino-9-metilopurina, 6-(2-hidroxibencilamino)-2-((1R)-(hidroximetilo)propilo)amino)-9-isopropilopurina, 5-bromo-3-(2-(4-fluorofenilo)-2-oxoetiloidina)-1,3-dihidroindol-2-ona, N6,N6-Dimetiloadenina, 2-(1R-isopropilo-2-hidroxietiloamino)-6-(3-cloroanilino)-9-isopropilo-purina, rapamicina, ácido 2,(R)-(1-etilo-2 hidroxietiloamino)-6-bencilamino-9-isopropilopurina, escitonemina, 3-[1-(3H-imidazol-4-ilo)-met-(Z)-ilideno]-5-metoxi-1,3-dihidroindol-2-ona, y 4-(3'-hidroxifenilo)amino-6,7-dimetoxiquinazolina.

5. El método de la reivindicación 4, en el que la quinasa dependiente de ciclina es etilo-(6-hidroxi-4-fenilobenzofuro[2,3-b])piridina-3-carboxilato de metilo.

6. El método de la reivindicación 5, en el que el etilo-(6-hidroxi-4-fenilobenzofuro[2,3-b])piridina-3-carboxilato de metilo se añade a las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino en una concentración de aproximadamente 0,1 µM a aproximadamente 10 µM durante aproximadamente una a siete días.

7. El método de la reivindicación 5, en el que las células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino se tratan con etilo-(6-hidroxi-4-fenilobenzofuro[2,3-b])piridina-3-carboxilato de etilo durante aproximadamente uno a aproximadamente siete días

FIG. 1A

Insulina/Glucagon

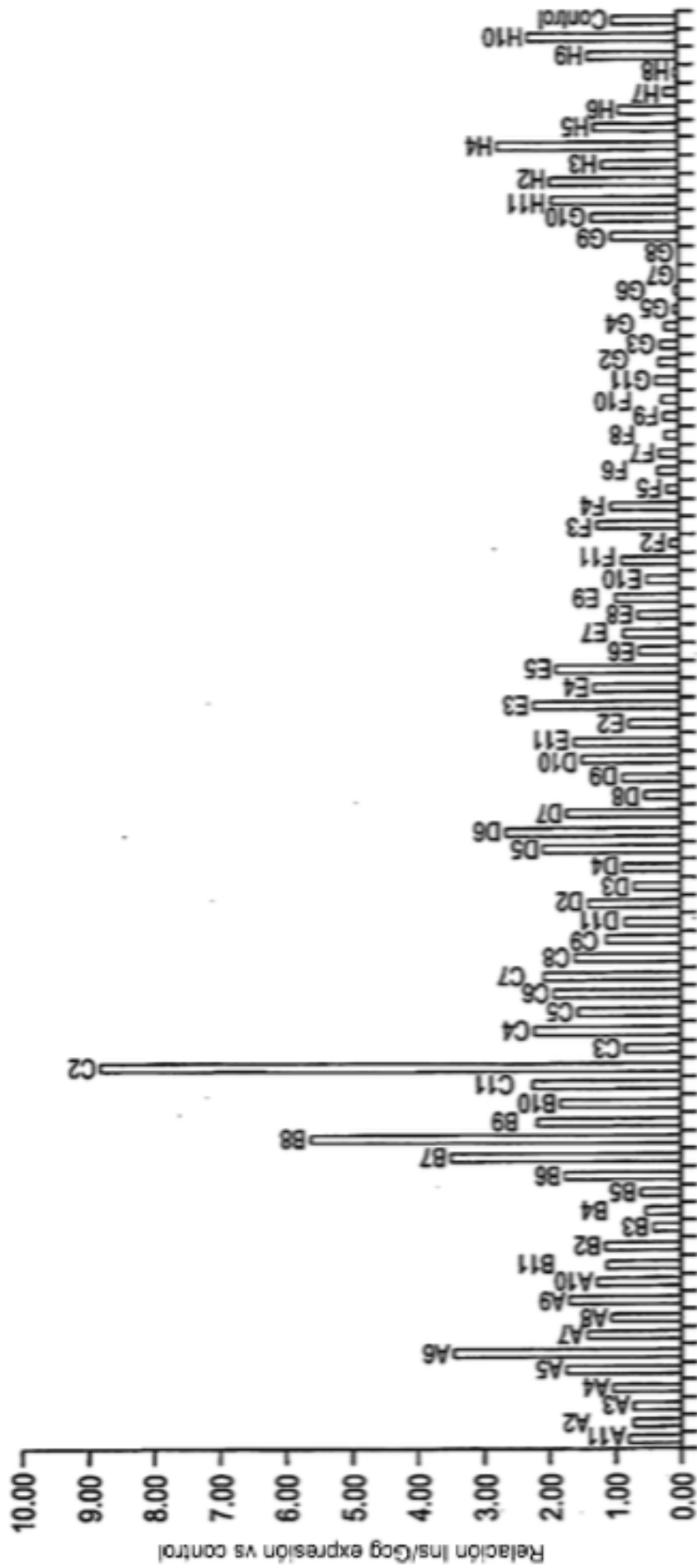


FIG. 1B
Maf/Arx

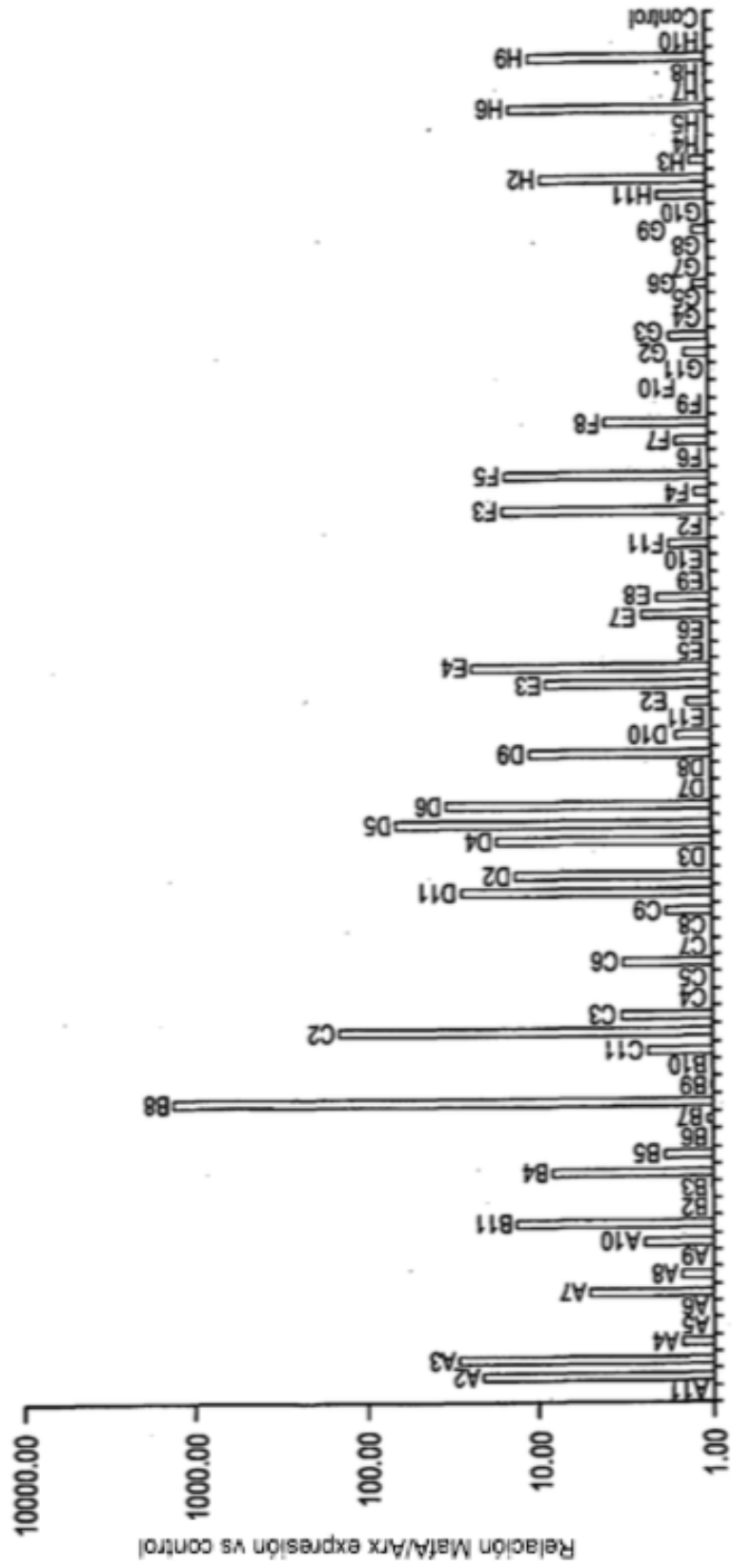


FIG. 2A

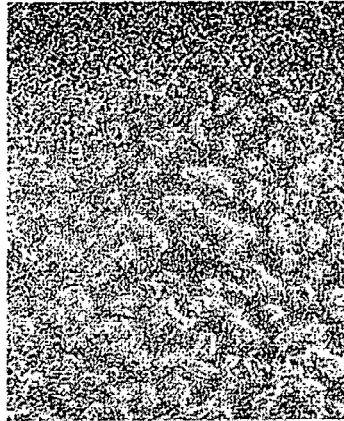


FIG. 2B

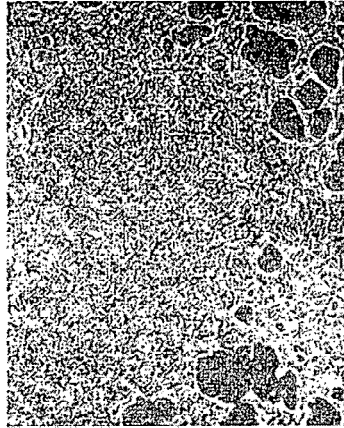


FIG. 2C

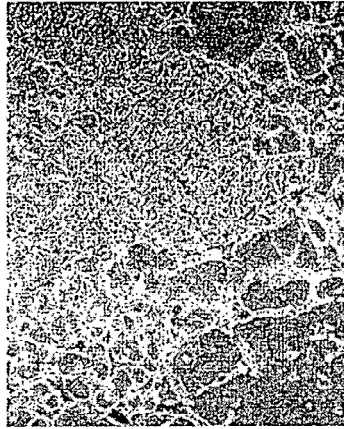


FIG. 2D

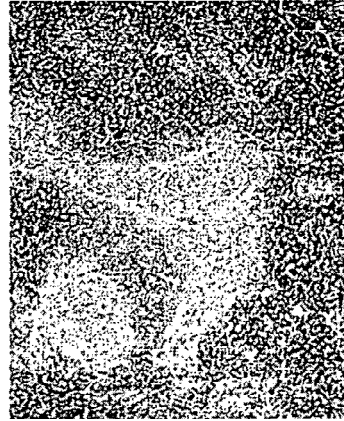


FIG. 2E

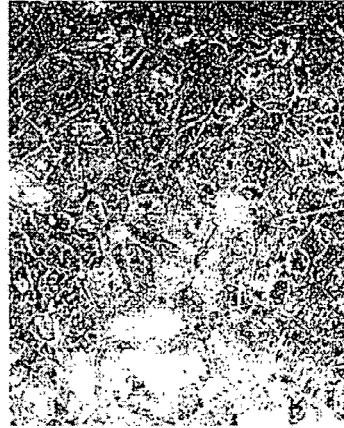


FIG. 2F

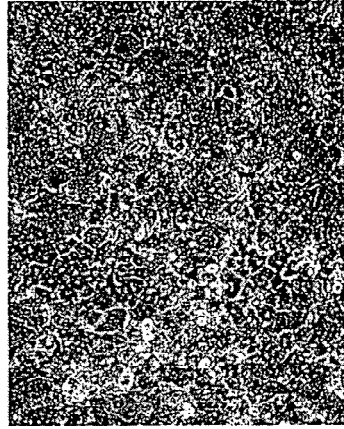


FIG. 3A

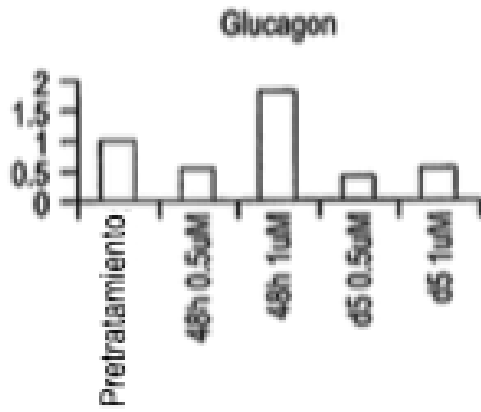


FIG. 3B

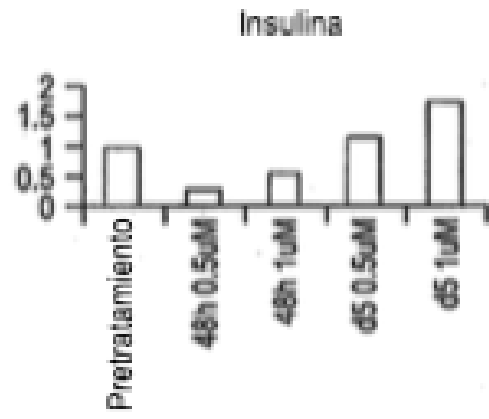


FIG. 3C

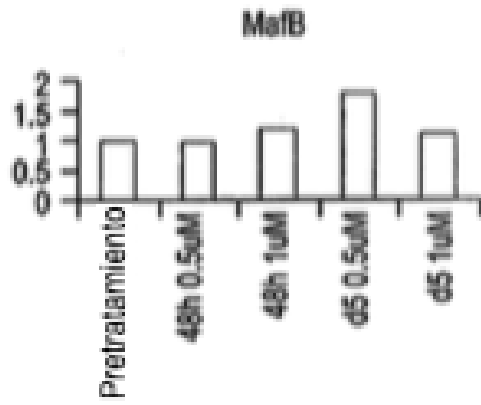


FIG. 3D

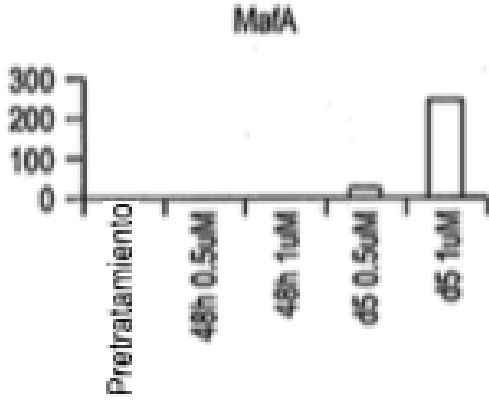


FIG. 3E

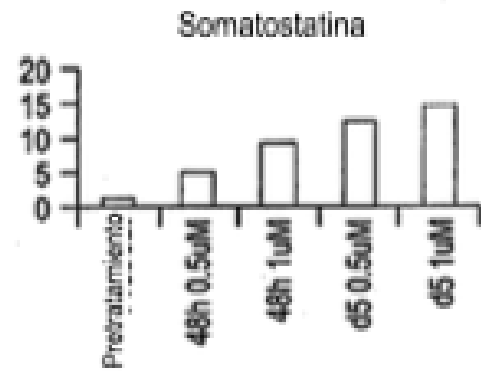


FIG. 3F

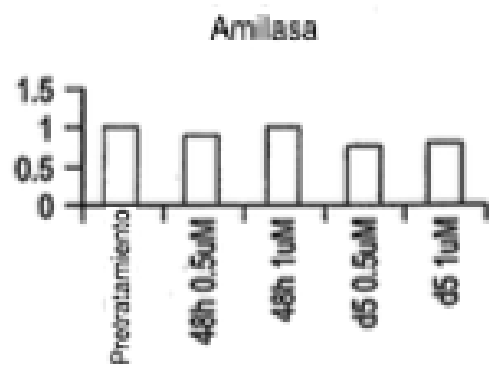


FIG. 3G

Nox2.5

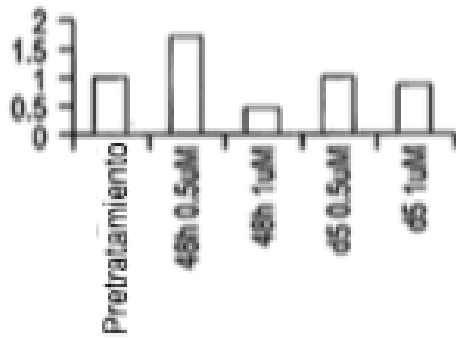


FIG. 3H

Pax4

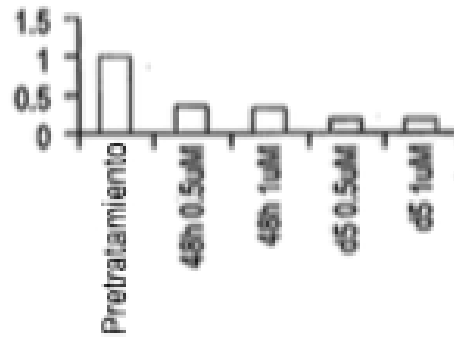


FIG. 3I

Nox2.2

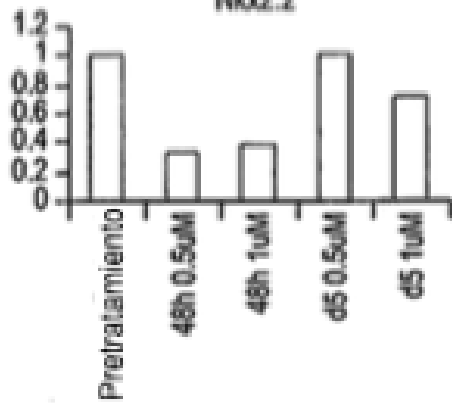


FIG. 3J

Pax6

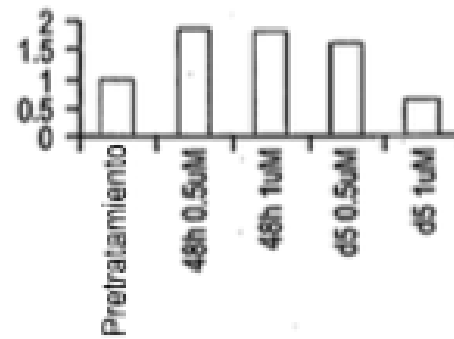


FIG. 3K

Nox6.1

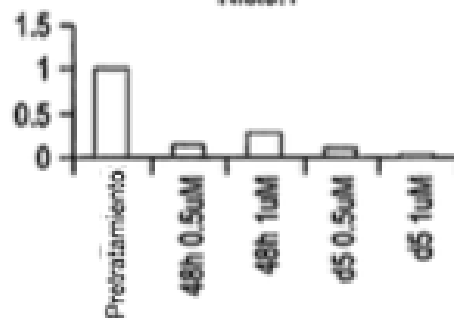


FIG. 3L

PDX1

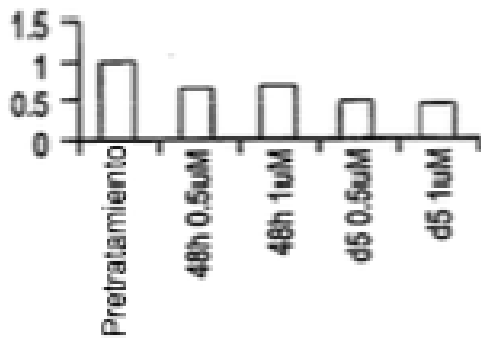


FIG. 3M

Ng2

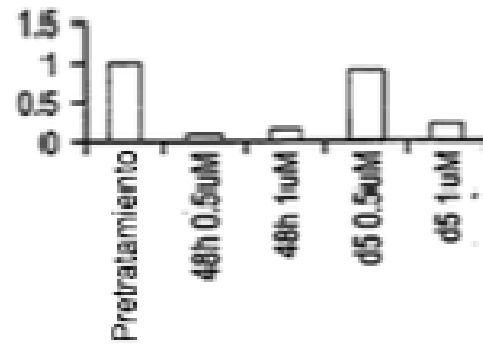


FIG. 3N

PTF1a

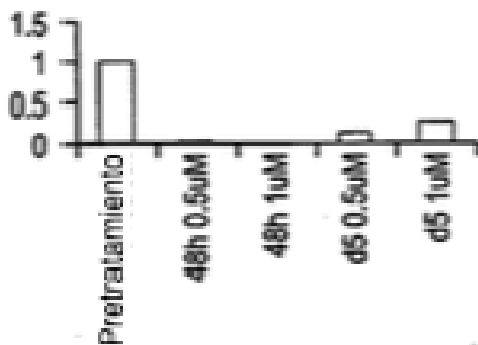


FIG. 3O

NeuroD

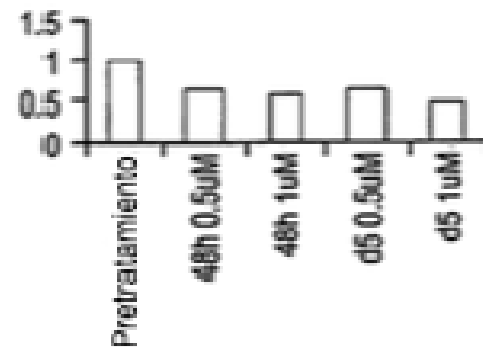


FIG. 3P

PECAM

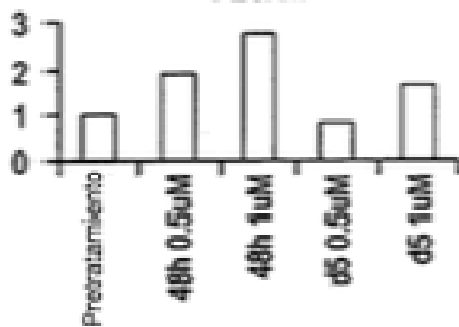


FIG. 3Q

BRN4

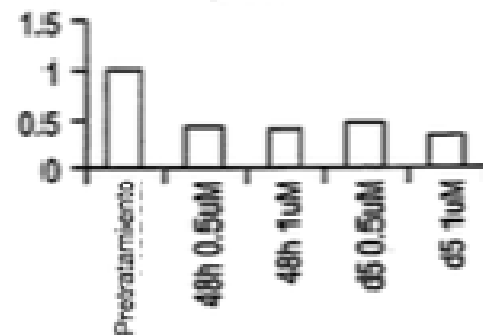


FIG. 3R

Albumina

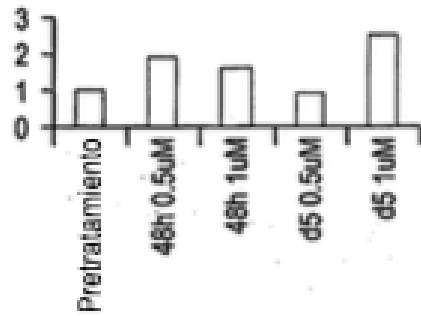


FIG. 3S

CDX2

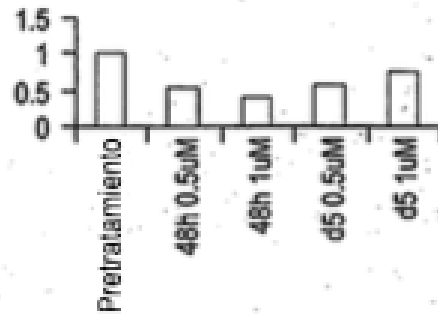


FIG. 3T

HNF4a

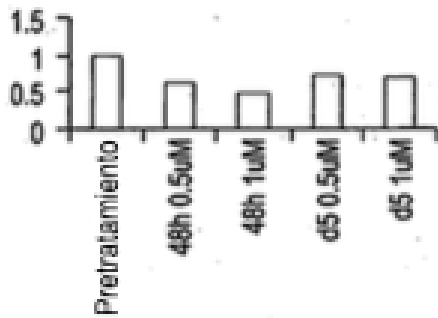


FIG. 3U

ISL1

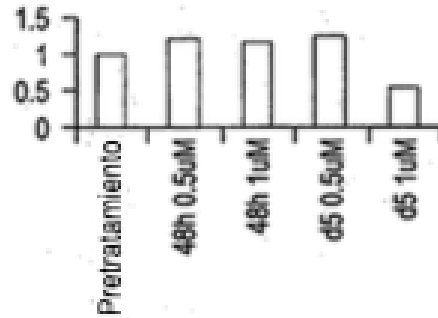


FIG. 3V

ZIC1

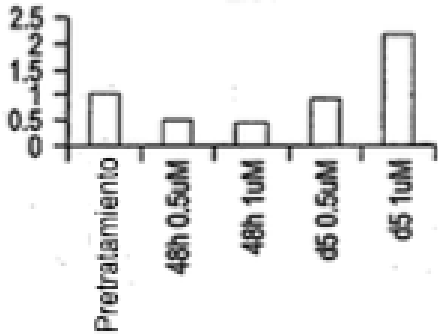


FIG. 3W

KRT19

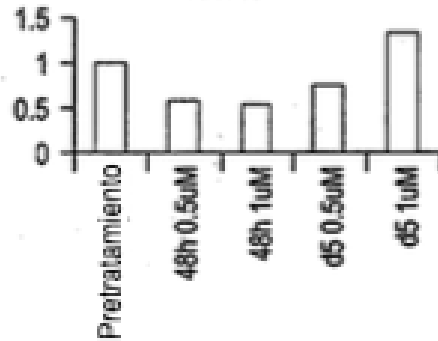


FIG. 4A

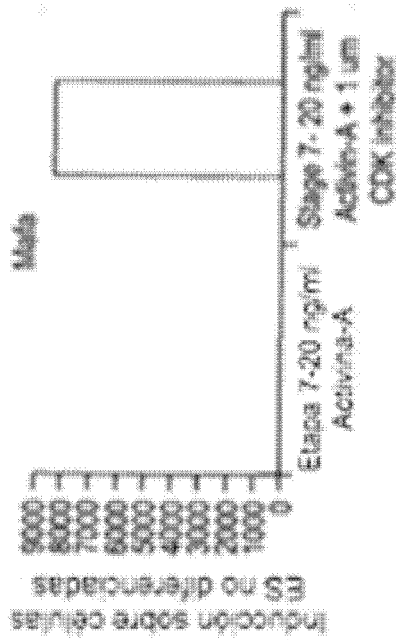


FIG. 4B

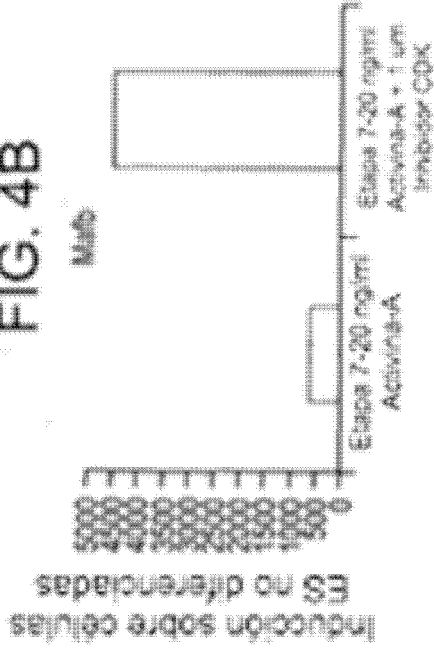


FIG. 4C

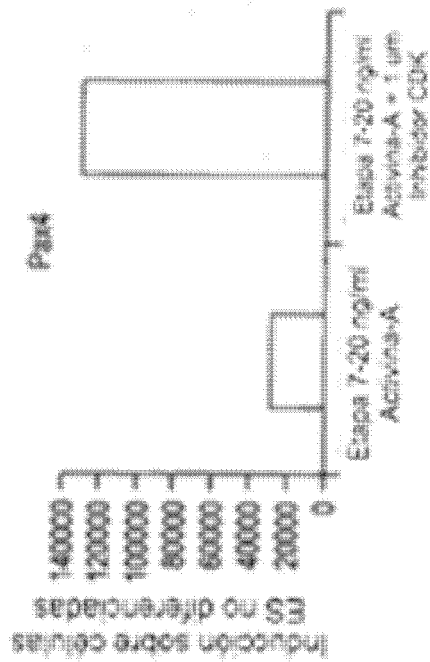


FIG. 4D

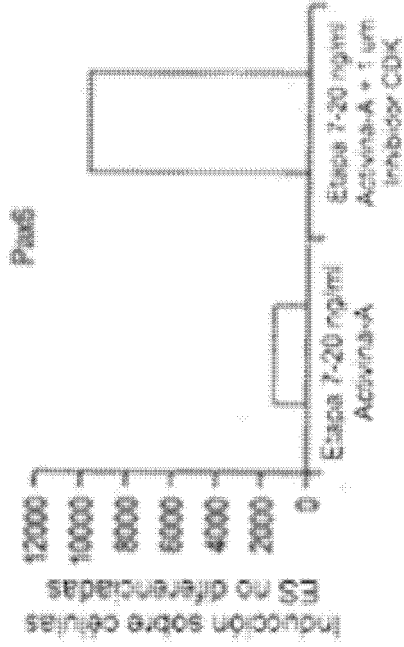


FIG. 4E

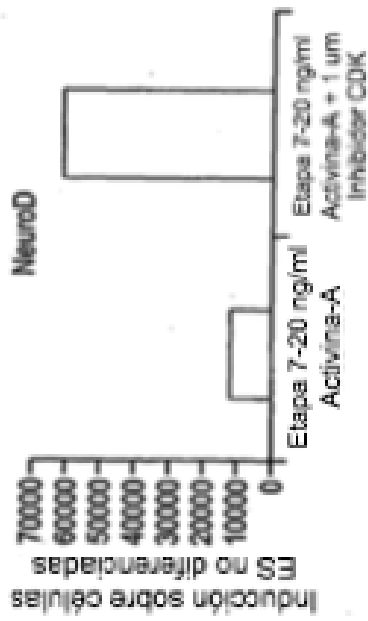


FIG. 4F

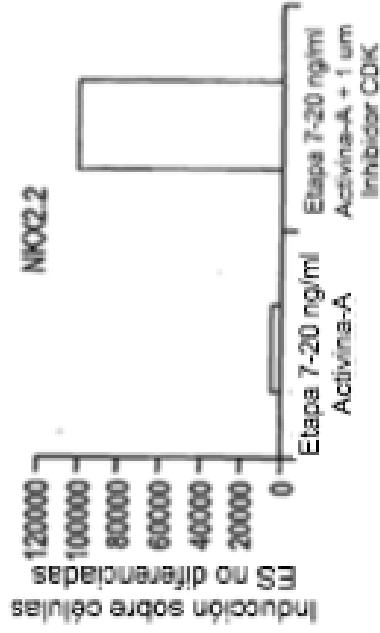


FIG. 4G

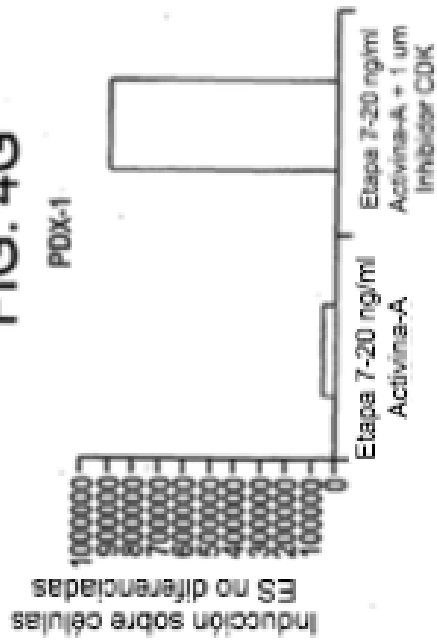


FIG. 4H

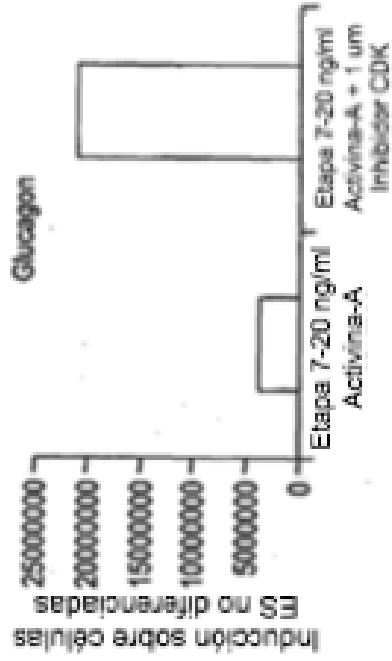


FIG. 4I

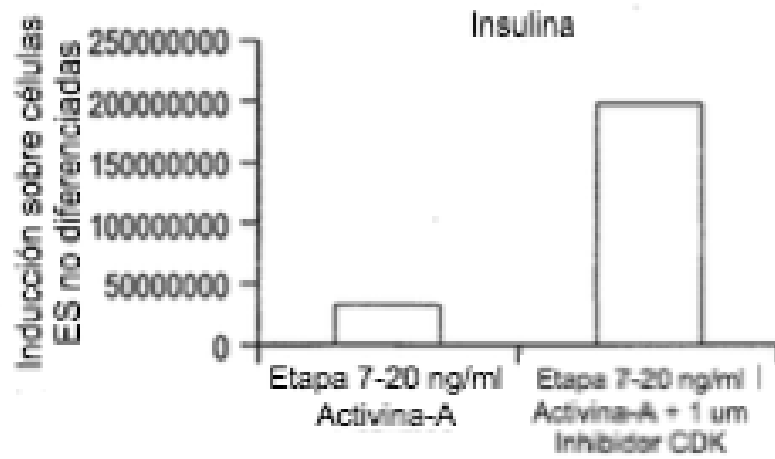


FIG. 5A

Control

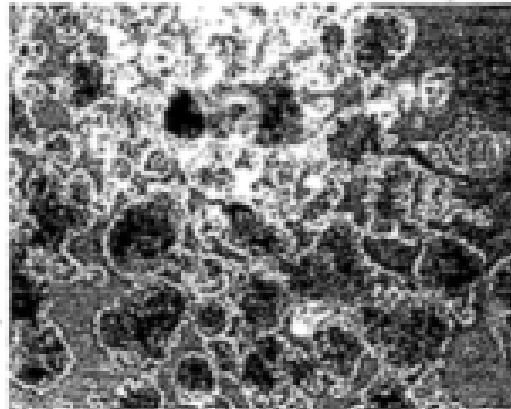


FIG. 5B

Inhibidor + CDK

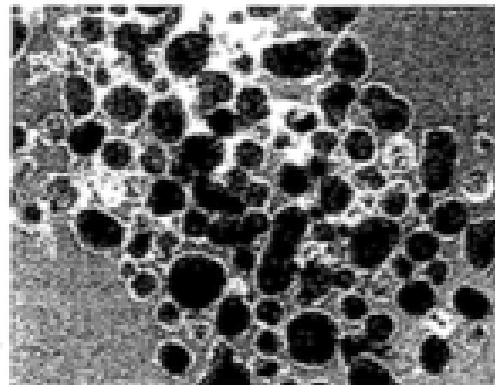


FIG. 6A

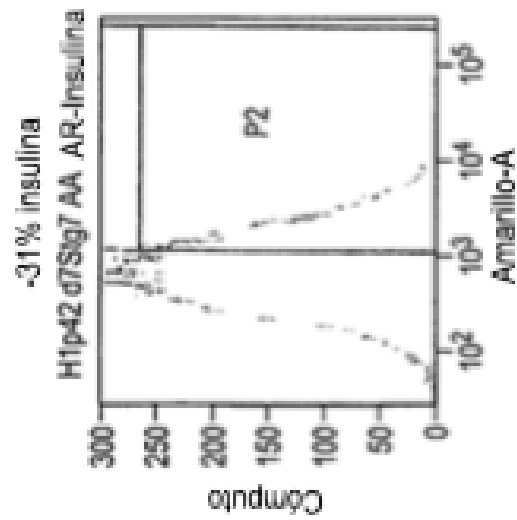


FIG. 6B

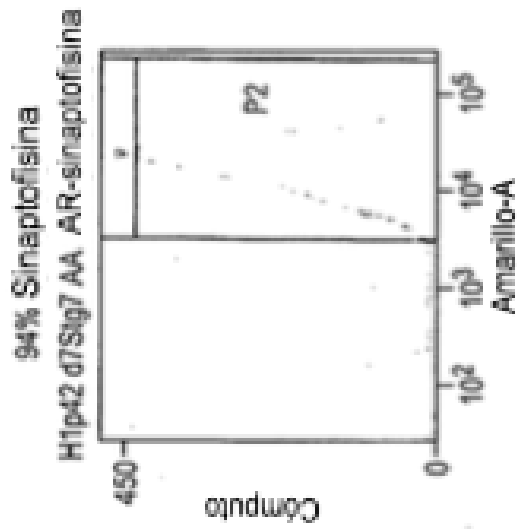


FIG. 6C

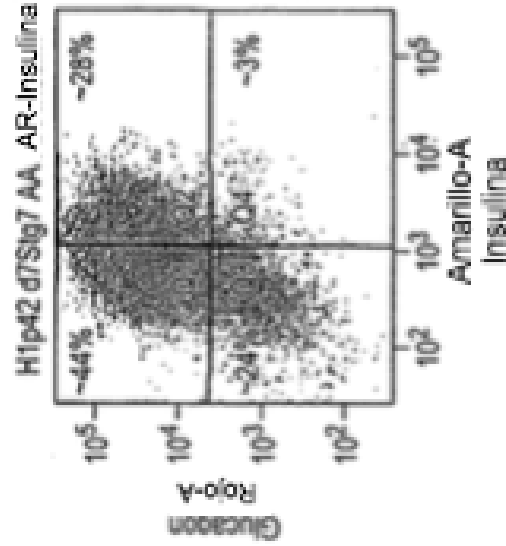


FIG. 7A

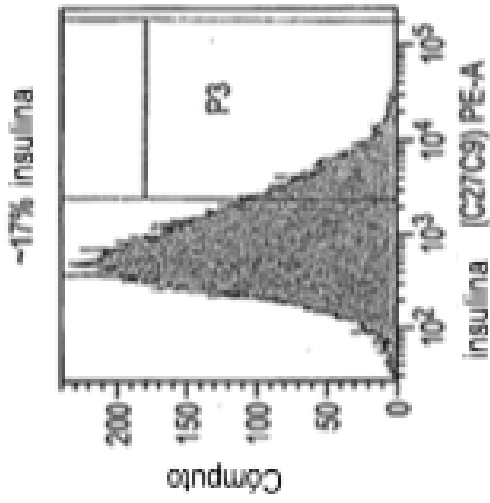


FIG. 7B

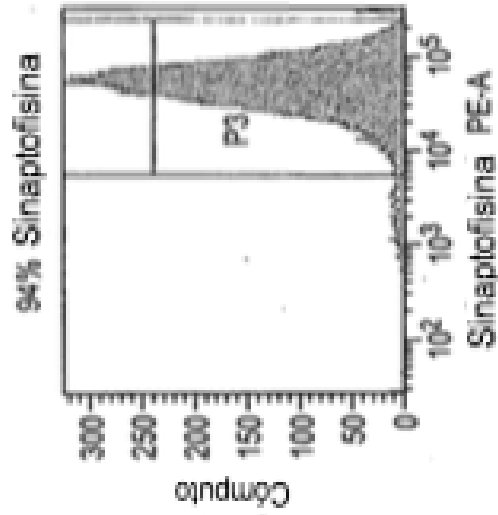


FIG. 7C

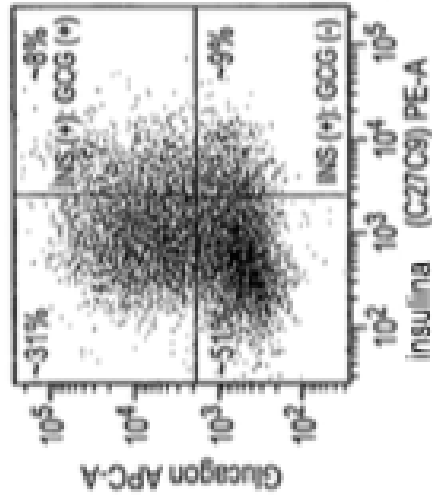


FIG. 8A

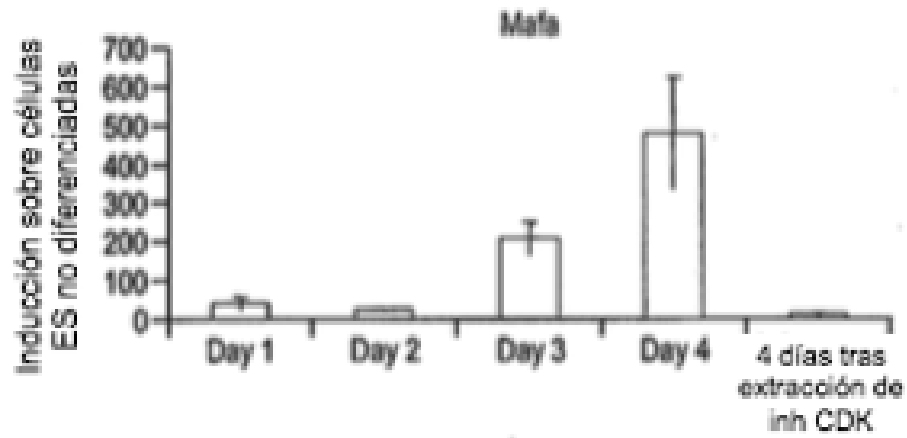


FIG. 8B

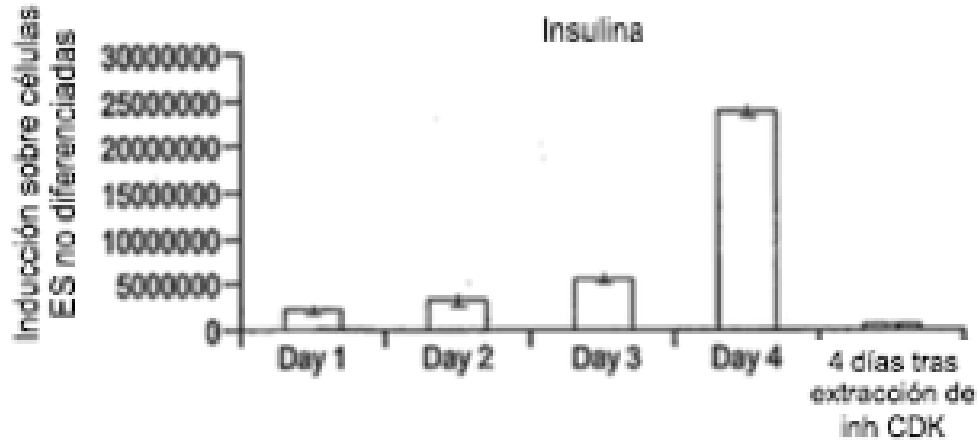


FIG. 9

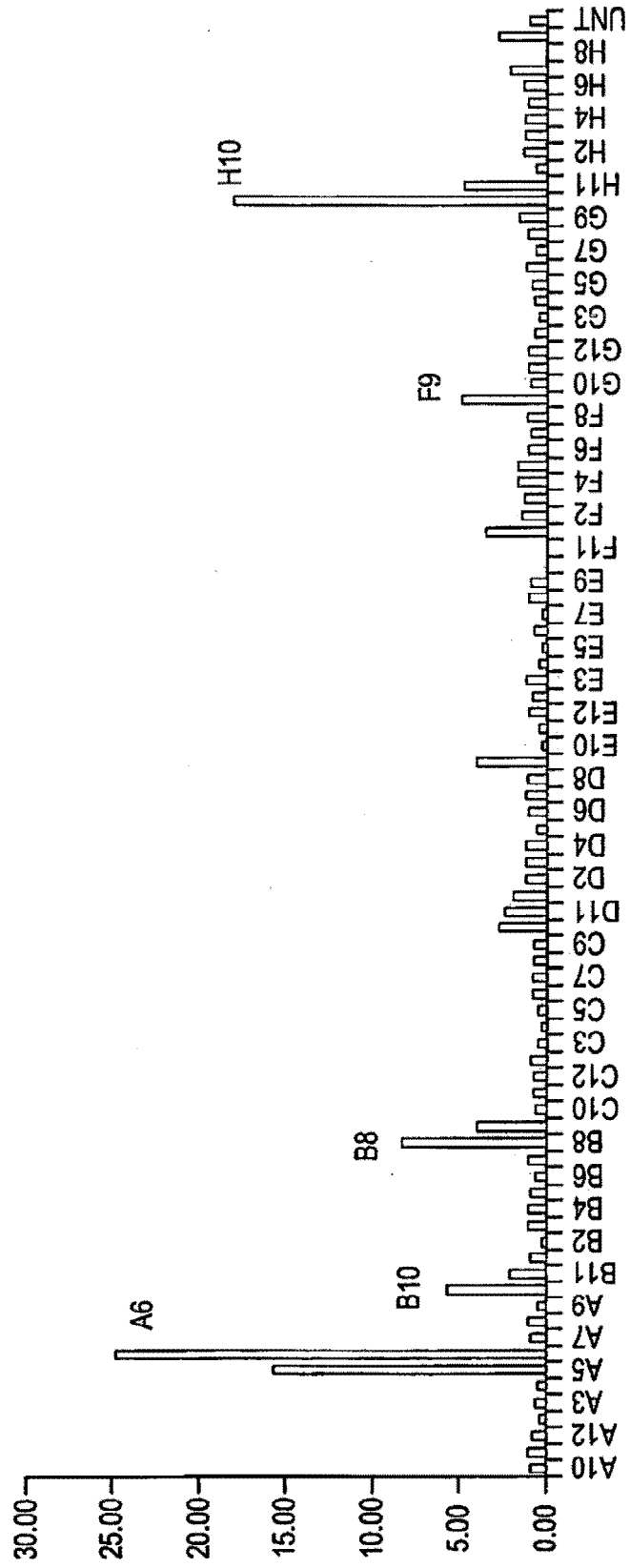


FIG. 10B

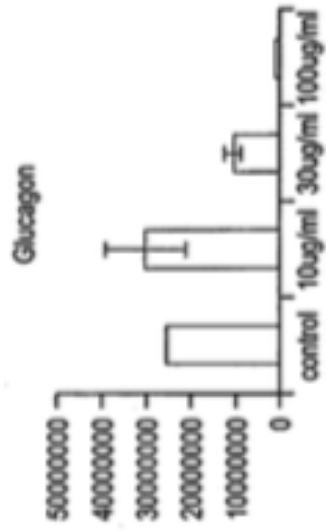


FIG. 10D

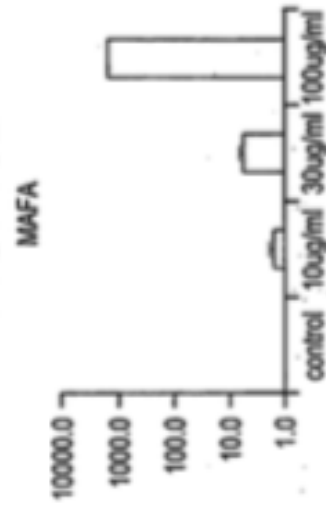


FIG. 10A

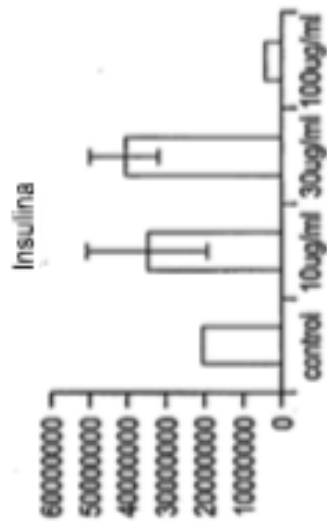


FIG. 10C

