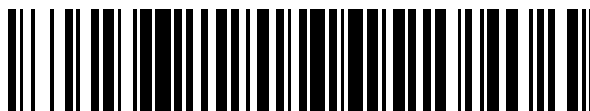


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 900**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)
C12Q 1/68 (2008.01)
C12N 5/0735 (2010.01)
C12N 5/02 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/50 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2011** **PCT/US2011/036043**
87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2011** **WO11143299**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2011** **E 11781200 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019** **EP 2569419**

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

30 Prioridad:

12.05.2010 US 333831 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
29.10.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

XU, JEAN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 728 900 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Diferenciación de células madre embrionarias humanas

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para promover la diferenciación de células madre pluripotentes en células productoras de insulina. En particular, la presente invención se refiere a un método para producir una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde más del 50% de las células de la población co-expresan PDX1 y NKX6.1.

ANTECEDENTES

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

En el desarrollo embrionario de vertebrados, una célula pluripotente da lugar a un grupo de células que comprende tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) en un proceso conocido como gastrulación. Los tejidos como, por ejemplo, la tiroides, el timo, el páncreas, el intestino y el hígado, se desarrollarán a partir del endodermo, a través de una etapa intermedia. La etapa intermedia en este proceso es la formación del endodermo definitivo. Las células del endodermo definitivas expresan una serie de marcadores, como HNF3 beta, GATA4, MIXL1, CXCR4 y SOX17.

La formación del páncreas surge de la diferenciación del endodermo definitivo en el endodermo pancreático. Las células del endodermo pancreático expresan el gen homeobox pancreático-duodenal, PDX1. En ausencia de PDX1, el páncreas no se desarrolla más allá de la formación de las yemas ventrales y dorsales. Por lo tanto, la expresión de PDX1 marca un paso crítico en la organogénesis pancreática. El páncreas maduro contiene, entre otros tipos de células, tejido exocrino y tejido endocrino. Los tejidos exocrino y endocrino surgen de la diferenciación del endodermo pancreático.

Se ha informado que las células que tienen las características de las células de los islotes se derivan de células embrionarias de ratón. Por ejemplo, Lumelsky et al. (Science 292:1389, 2001) informan la diferenciación de células madre embrionarias de ratón a estructuras secretoras de insulina similares a los islotes pancreáticos. Soria et al. (Diabetes 49:157, 2000) informan que las células secretoras de insulina derivadas de células madre embrionarias de ratón normalizan la glucemia en ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina.

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

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

Micallef *et al.* informa que el ácido retinoico puede regular el compromiso de las células madre embrionarias para formar el endodermo pancreático positivo para PDX1. El ácido retinoico es más eficaz para inducir la expresión de Pdx1 cuando se añade a 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).

Miyazaki *et al.* informa sobre una línea de células madre embrionarias de ratón que sobreexpresa Pdx1. Sus resultados muestran que la expresión exógena de Pdx1 mejoró claramente la expresión de los genes de insulina, somatostatina, glucocinasa, neurogenina3, p48, Pax6 y Hnf6 en las células diferenciadas resultantes (Diabetes 53: 1030, 2004).

Skoudy *et al.* informa que la activina A (un miembro de la superfamilia TGF- β) regula la expresión de los genes pancreáticos exocrinos (p48 y amilasa) y los genes endocrinos (Pdx1, insulina y glucagón) en células madre embrionarias de ratón. El efecto máximo se observó utilizando activina A1 nM. También observó que el nivel de expresión de ARNm de insulina y Pdx1 no se vio afectado por el ácido retinoico; sin embargo, el tratamiento con FGF7 3 nM dio como resultado un nivel aumentado de la transcripción para Pdx1 (Biochem. J. 379: 749, 2004).

Shiraki *et al.* estudió los efectos de los factores de crecimiento que mejoran específicamente la diferenciación de células madre embrionarias en células positivas para PDX1. Observaron que TGF- β 2 producía reproduciblemente una mayor proporción de células positivas para PDX1 (Genes Cells. Junio de 2005; 10(6): 503-16).

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

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

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

Thomson *et al.* aisló células madre embrionarias a partir de blastocistos humanos (Science 282: 114, 1998). Al mismo tiempo, Gearhart y sus colaboradores derivaron líneas celulares de germen embrionario humano (hEG) a partir de tejido gonadal fetal (Shamblott *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998). A diferencia de las células madre embrionarias de ratón, que se puede evitar que se diferencien simplemente mediante el cultivo con factor de inhibición de leucemia (LIF), las células madre embrionarias humanas deben mantenerse bajo condiciones muy especiales (Patente de Estados Unidos N° 6.200.806; WO 99/20741; WO 01/51616).

D'Amour *et al.* describe la producción de cultivos enriquecidos de endodermo definitivo derivado de células madre embrionarias humanas en presencia de una alta concentración de activina y suero bajo (Nature Biotechnology 2005). El trasplante de estas células debajo de la cápsula renal de ratones dio como resultado la diferenciación en células más maduras con características de algunos órganos endodérmicos. Las células del endodermo definitivo derivadas de células madre embrionarias humanas pueden diferenciarse adicionalmente en células positivas para PDX1 después de la adición de FGF-10 (US 2005/0266554A1).

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

En otro ejemplo, Fisk *et al.* informa de un sistema para producir células de islotes pancreáticos a partir de células madre embrionarias humanas (US2006/0040387A1). En este caso, la vía de diferenciación se dividió en tres etapas. Las células madre embrionarias humanas se diferenciaron primero en endodermo usando una combinación de butirato de sodio y activina A. Las células se cultivaron luego con antagonistas de TGF-β como Noggin en combinación con EGF o betacelulina para generar células positivas para PDX1. La diferenciación terminal se indujo por nicotinamida.

En un ejemplo, Benvenisty *et al.* afirma: "Llegamos a la conclusión de que la sobreexpresión de PDX1 mejoró la expresión de genes enriquecidos pancreáticos, la inducción de la expresión de insulina puede requerir señales adicionales que solo están presentes *in vivo*" (Benvenisty *et al.*, Stem Cells 2006; 24: 1923-1930).

En otro ejemplo, Grapin-Botton *et al.* afirma: "La activación temprana de Ngn3 indujo casi exclusivamente células glucagón + mientras agotaba el grupo de progenitores pancreáticos. A partir de E11.5, los progenitores de PDX-1 se volvieron competentes para diferenciarse en células de insulina [positiva] y PP [positiva]" (Johansson KA *et al.*, Developmental Cell 12, 457-465, marzo de 2007).

Por ejemplo, Diez *et al.* afirma "A las 9 y 10 semanas, la mayoría de las células positivas para glucagón coexpresaron insulina, aunque eran claramente detectables células de solo insulina inequívocas en estas etapas. Se observaron células que coexpresaban insulina y glucagón durante todo el período de estudios (de 9 a 21 semanas) pero representan simplemente una pequeña fracción del total de células que expresan glucagón y insulina". (J Histochem Cytochem. septiembre de 2009; 57(9):811-24. 2009 13 de abril).

En un ejemplo, Chen *et al.* afirma que "la (-)-indolactama V [(ILV)] activa la señalización de la proteína quinasa C y dirige la especificación pancreática de las hESC que ya se han comprometido con el linaje del endodermo... la función de ILV y el ácido retinoico a través de un mecanismo relacionado... ILV muestra una inducción más fuerte de las células que expresan PDX-1 (porcentaje de células que expresan PDX-1) que el ácido retinoico". (Nature Chemical Biology 5, 195-196 (abril de 2009) doi:10.1038/nchembio0409-195).

Lytle *et al.* afirma: "NKX6-1 co-localizó solo con células de insulina, lo que indica que NKX6-1 está implicado exclusivamente en el desarrollo de células beta humanas" (Diabetologia julio 2008; 51(7):1169-80, 2008).

Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad significativa de desarrollar métodos *in vitro* para generar una célula que exprese insulina funcional, que se parezca más a una célula β. La presente invención se refiere a un

enfoque alternativo para mejorar la eficacia de la diferenciación de células madre embrionarias humanas hacia células que expresan insulina, generando una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde más del 50% de las células en la población co-expresan PDX-1 y NKX6.1.

SUMARIO

La invención proporciona una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde más del 60% de las células de la población co-expresan PDX1 y NKX6.1.

La invención también proporciona un método para generar una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde más del 50% de las células en la población co-expresan PDX1 y NKX6.1, que comprenden los pasos de:

- a. cultivar una población de células madre pluripotentes,
- b. diferenciar la población de células madre pluripotentes en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo,
- c. diferenciar la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en un medio suplementado con noggin y un activador de la proteína quinasa C seleccionado del grupo que consiste en (2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(trifluorometil)fenil)-2,4-pentadienilamino)benzotetrahidroindol-1-ol, indolactama V, forbol-12-miristato-13-acetato y forbol-12,13-dibutirato.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A y 1B muestran la expresión de PDX1, NKX6.1 e ISL-1 en la etapa 4 día 4 del protocolo de diferenciación descrito en el Ejemplo 1. La Figura 1A muestra la expresión de PDX1 y NKX6.1. La Figura 1B muestra la expresión de NKX6.1 e ISL-1.

Las Figuras 2A y 2B muestran el efecto del tratamiento con activador de PKC en el porcentaje de células que expresan PDX1, NKX6.1 y CDX2, analizadas a través del IN Cell Analyzer 1000 (Figura 2A), y la comparación de varios activadores de PKC y sus efectos en el porcentaje de células que expresan PDX1 y NKX6.1, a través del analizador de células IN (Figura 2B).

Las Figuras 3A, 3B y 3C muestran el péptido C circulante en ratones beige SCID que recibieron las células de la presente invención debajo de la cápsula renal (Figura 3A), en un dispositivo Theracyte que se implantó por vía subcutánea (Figura 3B). Los niveles de péptido C se detectaron en los tiempos indicados. La Figura 3C muestra una comparación de los niveles de péptido C observados entre el grupo que recibe las células debajo de la cápsula renal y el grupo que recibe las células en el dispositivo Theracyte por vía subcutánea, a las 12 semanas después del trasplante.

Las Figuras 4A, 4B, 4C y 4D muestran el efecto del tratamiento con activador de PKC en la expresión de PDX1, NKX6.1, NGN3 y PTF1 alfa en células tratadas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 3.

Las Figuras 5A, 5B, 5C y 5D muestran el efecto de FGF7 en la expresión de NKX6.1, PDX1, PTF1 alfa y CDX2 en las células tratadas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Para mayor claridad de la divulgación, 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.

Definiciones

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

Las células madre se clasifican según su potencial de desarrollo como: (1) totipotentes, lo que significa 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, lo que significa capaces de dar lugar a un subconjunto de linajes celulares, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir progenie que incluyen HSC (auto-renovación), progenitores oligopotentes restringidos a las células sanguíneas, y todos los tipos y elementos celulares (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 celulares que las células madre multipotentes; y (5) unipotentes, lo que significa que pueden dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

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

"Células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo", o "células de Etapa 1", o "Etapa 1", como se usan en la presente, se refieren a las células que expresan por lo 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 u OTX2. Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo incluyen células precursoras de la línea primitiva, células de la línea primitiva, células del mesendodermo y células del endodermo definitivo.

"Células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático", como se usa en la presente, se refiere a células que expresan por lo menos uno de los siguientes marcadores: PDX1, NKX6.1, HNF1 beta, PTF1 alfa, HNF6, HNF4 alfa, SOX9, HB9 o PROX1. Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático incluyen células del endodermo pancreático, células primitivas del tubo digestivo y células del intestino anterior posterior.

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

"Marcadores", como se usan en la presente, son moléculas de ácidos nucleicos o polipéptidos que se expresan diferencialmente en una célula de interés. En este contexto, expresión diferencial significa un nivel aumentado para un marcador positivo y un nivel disminuido para un marcador negativo. El nivel detectable del ácido nucleico o polipéptido marcador 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 usando cualquiera de los varios métodos conocidos en la técnica.

"Célula endocrina pancreática" o "célula que expresa la hormona pancreática" o "células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático" como se usa en la presente, se refiere a una célula capaz de expresar por lo menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina, y polipéptido pancreático.

Aislamiento, Expansión y Cultivo de Células Madre Pluripotentes

Caracterización de células madre pluripotentes

Las células madre pluripotentes pueden expresar uno o más de los antígenos embrionarios específicos para la etapa (SSEA) 3 y 4, y los 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 *in vitro* da como resultado la pérdida de la expresión de SSEA-4, Tra 1-60 y Tra 1-81 (si están presente) y la expresión aumentada de SSEA-1. Las células madre pluripotentes indiferenciadas tienen típicamente actividad de fosfatasa alcalina, que puede detectarse fijando las células con paraformaldehído al 4% y luego desarrollándolas con Vector Red como un

sustrato, como se describe por el fabricante (Vector Laboratories, Burlingame, California). Las células madre pluripotentes indiferenciadas también expresan típicamente OCT4 y TERT, según se detecta por RT-PCR.

Otro fenotipo deseable de células madre pluripotentes propagadas es un potencial para diferenciarse en células de las tres capas germinales: tejidos del endodermo, mesodermo y ectodermo. La pluripotencia de las células madre pluripotentes puede confirmarse, por ejemplo, inyectando células en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID), fijando los teratomas que forman usando paraformaldehído al 4% y luego examinándolos histológicamente en busca de evidencia de tipos celulares de las tres capas germinales. Alternativamente, la pluripotencia puede determinarse mediante la creación de cuerpos embrioides y evaluando los cuerpos embrioides para detectar la presencia de marcadores asociados con las tres capas germinales.

Las líneas de células madre pluripotentes propagadas se pueden cariotipar usando una técnica de bandedo G estándar y compararse con cariotipos publicados de las especies de primates correspondientes. Es deseable obtener células que tengan un "cariotipo normal", lo que significa que las células son euploides, en donde todos los cromosomas humanos están presentes y no están notablemente alterados.

Fuentes de células madre pluripotentes

Los tipos de células madre pluripotentes divulgadas por referencia incluyen líneas establecidas de células pluripotentes derivadas del tejido formado después de la gestación, incluyendo el tejido preembrionario (como, por ejemplo, un blastocisto), tejido embrionario o tejido fetal tomado en cualquier momento durante la gestación, típicamente, pero no necesariamente, antes de aproximadamente 10 a 12 semanas de gestación. Los ejemplos no limitativos divulgados por referencia son líneas establecidas de células madre embrionarias humanas o células germinales embrionarias humanas como, por ejemplo, las líneas de células madre embrionarias humanas H1, H7 y H9 (WiCell). También se divulga por referencia el uso de las composiciones de esta divulgación durante el establecimiento inicial o la estabilización de tales células, en cuyo caso las células de origen serían células pluripotentes primarias tomadas directamente de los tejidos de origen. También se divulga por referencia células tomadas de una población de células madre pluripotentes ya cultivadas en ausencia de células alimentadoras. También se divulgan por referencia líneas de células madre embrionarias humanas mutantes como, por ejemplo, BG01v (BresaGen, Athens, GA).

Las células madre embrionarias humanas divulgadas por referencia se preparan como se describe por Thomson *et al.* (Patente de Estados Unidos N° 5.843.780 ; Science 282:1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998; Proc. Natl Acad Sci. USA 92:7844, 1995).

Cultivo de células madre pluripotentes

En una realización, las células madre pluripotentes se cultivan en una capa de células alimentadoras que soportan las células madre pluripotentes de varias maneras. Alternativamente, las células madre pluripotentes se cultivan en un sistema de cultivo que está esencialmente libre de células alimentadoras pero, no obstante, soporta la proliferación de células madre pluripotentes sin experimentar una diferenciación sustancial. El crecimiento de células madre pluripotentes en un cultivo libre de alimentadoras sin diferenciación se soporta usando un medio condicionado cultivando previamente con otro tipo de célula. Alternativamente, el crecimiento de células madre pluripotentes en un cultivo libre de alimentadoras sin diferenciación se soporta usando un medio definido químicamente.

En una realización, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en una capa de células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón de acuerdo con los métodos divulgados en Reubinoff *et al.* (Nature Biotechnology 18: 399 - 404 (2000)). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en una capa de células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón de acuerdo con los métodos descritos en Thompson *et al.* (Science 6 de noviembre 1998: Vol. 282. N° 5391, pp. 1145 - 1147). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en cualquiera de las capas de células alimentadoras divulgadas en Richards *et al.* (Stem Cells 21: 546-556, 2003).

En una realización, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en una capa de células alimentadoras humanas de acuerdo con los métodos divulgados en Wang *et al.* (Stem Cells 23: 1221-1227, 2005). En una realización alternativa, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en la capa de células alimentadoras humanas divulgada en Stojkovic *et al.* (Stem Cells 2005 23: 306-314, 2005). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en la capa de células alimentadoras humanas divulgadas en Miyamoto *et al.* (Stem Cells 22: 433-440, 2004). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en la capa de células alimentadoras humanas divulgada en Amit *et al.* (Biol. Reprod 68: 2150-2156, 2003). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en la capa de células alimentadoras humanas divulgada en Inzunza *et al.* (Stem Cells 23: 544-549, 2005).

En una realización, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en medios de cultivo derivados de acuerdo con los métodos divulgados en la US20020072117. Alternativamente, las células madre pluripotentes

pueden cultivarse en medios de cultivo derivados de acuerdo con los métodos divulgados en la US6642048. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en medios de cultivo derivados de acuerdo con los métodos divulgados en la WO2005014799. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en medios de cultivo derivados de acuerdo con los métodos divulgados en Xu et al (Stem Cells 22: 972-980, 2004).
 5 Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en medios de cultivo derivados de acuerdo con los métodos divulgados en la US20070010011. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en medios de cultivo derivados de acuerdo con los métodos divulgados en la US20050233446. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en medios de cultivo derivados de acuerdo con los métodos divulgados en laUS6800480. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse en medios de
 10 cultivo derivados de acuerdo con los métodos divulgados en la WO2005065354.

En una realización, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos divulgados en Cheon et al. (BioReprod DOI: 10.1095/biolreprod.105.046870, 19 de octubre de 2005). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos divulgados en Levenstein et al (Stem Cells 24: 568-574, 2006). Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos divulgados en la US20050148070. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos divulgados en la US20050244962. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden cultivarse de acuerdo con los métodos divulgados en la WO2005086845.

Las células madre pluripotentes pueden colocarse en placas sobre un sustrato de cultivo adecuado. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es un componente de la matriz extracelular como, por ejemplo, los derivados de la membrana basal o que pueden formar parte de acoplamiento de receptor-ligando de moléculas de adhesión. En una realización, el sustrato de cultivo adecuado es MATRIGEL® (Becton Dickenson). El MATRIGEL® es una preparación soluble de células tumorales de Engelbreth-Holm Swarm que gelifican a temperatura ambiente para formar una membrana basal reconstituida.

Otros componentes de la matriz extracelular y mezclas de componentes son adecuados como alternativa. Dependiendo del tipo de célula que se está proliferando, esto puede incluir laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, sulfato de heparano y similares, solos o en varias combinaciones.

Las células madre pluripotentes pueden colocarse en placas sobre el sustrato en una distribución adecuada y en presencia de un medio que promueva la supervivencia celular, la propagación y la retención de las características deseables. Todas estas características se benefician de una atención cuidadosa a la distribución de la siembra y pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica.

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

Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático a partir de células madre pluripotentes

La presente invención proporciona un método para generar una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático a partir de células madre pluripotentes, en donde más del 50% de las células en la población co-expresan PDX1 y NKX6.1, que comprenden los pasos de:

- a. Cultivar una población de células madre pluripotentes,
- b. Diferenciar la población de células madre pluripotentes en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo.
- c. Diferenciar la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en un medio suplementado con noggin y un activador de la proteína quinasa C seleccionado del grupo que consiste de (2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(trifluorometil)fenil)-2,4-pentadienilamino)benzotetrahidropiridin-2(1H)-ona, Indolactama V, forbol-12-miristato-13-acetato y forbol-12,13-dibutirato.

En un aspecto, la presente invención proporciona una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde más del 60% de la población co-expresa PDX-1 y NKX6.1. En una realización alternativa, la presente invención proporciona una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde más del 70% de la población co-expresa PDX-1 y NKX6.1. En una realización alternativa, la presente invención proporciona una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde más del 80% de la población

co-expresa PDX-1 y NKX6.1. En una realización alternativa, la presente invención proporciona una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde más del 90% de la población co-expresa PDX-1 y NKX6.1.

En un aspecto de la divulgación, la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático puede tratarse adicionalmente para formar una población de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático.

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

Los métodos para evaluar la expresión de marcadores de proteínas y ácidos nucleicos en células cultivadas o aisladas son estándares en la técnica. Estos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR), transferencias Northern, hibridación *in situ* (ver, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., Eds. 2001 suplemento)) e inmunoensayos como el análisis inmunohistoquímico de material seccionado, transferencia Western, y para marcadores que son accesibles en células intactas, análisis de citometría de flujo (FACS) (ver, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

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

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

Las células madre pluripotentes divulgadas por referencia incluyen, por ejemplo, la línea de células madre embrionarias humanas H9 (código NIH: WA09), la línea de células madre embrionarias humanas H1 (código NIH: WA01), la línea de células madre embrionarias humanas H7 (código NIH: WA07), y la línea de células madre embrionarias humanas SA002 (Cellartis, Suecia). Se divulgan células que expresan por lo menos uno de los siguientes marcadores característicos de las células pluripotentes: ABCG2, CRIPTO, CD9, FOXD3, CONNEXIN43, CONNEXIN45, OCT4, SOX2, NANOG, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, y Tra 1-81.

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

Los marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se seleccionan del grupo que consiste de PDX1, NKX6.1, HNF1 beta, PTF1 alfa, HNF6, HNF4 alfa, SOX9, HB9 y PROX1. Adecuada para su uso es una célula que expresa por lo menos uno de los marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático. En un aspecto, una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático es una célula del endodermo pancreático.

Los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo que consiste de NGN3, NEUROD, NKX2.2, PDX1, NKX6.1, PAX4 y PAX6. En una realización, una célula endocrina pancreática es capaz de expresar por lo menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático. Adecuada para su uso en la presente divulgación es una célula que expresa por lo menos uno de los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. En un aspecto de la presente divulgación, 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 divulgación, 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 por lo menos uno de los siguientes factores de transcripción: NGN3, NKX2.2, NKX6.1,

NEUROD, ISL1, HNF3 beta, MAFA, PAX4 y PAX6. En un aspecto de la presente divulgación, una célula que expresa marcadores característicos del linaje de células β es una célula β .

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

La formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se puede determinar probando la presencia de los marcadores antes y después de seguir un protocolo particular. Las células madre pluripotentes típicamente no expresan tales marcadores. Por tanto, la diferenciación de las células pluripotentes se detecta cuando las células comienzan a expresarlas.

Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo mediante cualquier método en la técnica o mediante el método propuesto en esta invención.

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

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

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

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

Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo tratando las células madre pluripotentes de acuerdo con los métodos divulgados en la Solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 11/736.908.

Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo tratando las células madre pluripotentes de acuerdo con los métodos divulgados en la Solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 11/779.311.

Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo tratando las células madre pluripotentes de acuerdo con los métodos divulgados en la Solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 60/990.529.

Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo tratando las células madre pluripotentes de acuerdo con los métodos divulgados en la Solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 61/076.889.

Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo tratando las células madre pluripotentes de acuerdo con los métodos divulgados en la Solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 61/076.900.

Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo tratando las células madre pluripotentes de acuerdo con los métodos divulgados en la Solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 61/076.908.

Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo tratando las células madre pluripotentes de acuerdo con los métodos divulgados en la Solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 61/076.915.

Diferenciación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático

La presente invención proporciona un método para generar una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático a partir de células madre pluripotentes, en donde más del 50% de la población co-expresa PDX-1 y NKX6.1, que comprende los pasos de:

a. Cultivar una población de células madre pluripotentes,

b. Diferenciar la población de células madre pluripotentes en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo.

c. Diferenciar la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en un medio suplementado con noggin y un activador de la proteína quinasa C seleccionado del grupo que consiste de (2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(trifluorometil)fenil)-2,4-pentadiemoilamino)benzolactama, indolactama V, forbol-12-miristato-13-acetato y forbol-12,13 -dibutirato.

En un aspecto, la presente invención proporciona una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde más del 60% de la población co-expresa PDX-1 y NKX6.1. En una realización alternativa, la presente invención proporciona una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde más del 70% de la población co-expresa PDX-1 y NKX6.1. En una realización alternativa, la presente invención proporciona una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde más del 80% de la población co-expresa PDX-1 y NKX6.1. En una realización alternativa, la presente invención proporciona una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde más del 90% de la población co-expresa PDX-1 y NKX6.1.

El activador de la proteína quinasa C se selecciona del grupo que consiste de (2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(trifluorometil)fenil)-2,4-pentadiemoilamino)benzolactama, indolactama V (ILV)), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) y forbol-12,13-dibutirato (PDBu). Alternativamente, el activador de la proteína quinasa C es (2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(trifluorometil)fenil)-2,4-pentadiemoilamino)benzolactama. Puede usarse (2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(Trifluorometil)fenil)-2,4-pentadiemoilamino)benzolactama a una concentración de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 500 nM. La (2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(trifluorometil)fenil)-2,4-pentadiemoilamino)benzolactama es referida en la presente como "TPB".

En una realización, el medio suplementado con noggin y un activador de la proteína quinasa C se suplementa adicionalmente con por lo menos un factor seleccionado del grupo que consiste de un inhibidor de la señalización del receptor de TGF β y un factor de crecimiento de fibroblastos.

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

En una realización, el inhibidor de la señalización del receptor de TGF β es un inhibidor de ALK5. En una realización, el inhibidor de ALK5 es el inhibidor II de ALK5. El inhibidor II de ALK5 puede usarse a una concentración de aproximadamente 0,1 μ M a aproximadamente 10 μ M. En una realización, el inhibidor II de ALK5 se usa a una concentración de 1 μ M.

En una realización, el factor de crecimiento de fibroblastos es FGF7. En una realización alternativa, el factor de crecimiento de fibroblastos es FGF10.

En una realización, el factor de crecimiento de fibroblastos puede usarse a una concentración de aproximadamente 50 pg/ml a aproximadamente 50 μ g/ml. En una realización, el factor de crecimiento de fibroblastos se usa a una concentración de 50 ng/ml.

Diferenciación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en células que expresan marcadores del linaje endocrino pancreático

En un aspecto de la divulgación, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se diferencian adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático por cualquier método en la técnica.

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

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

característicos del linaje del endodermo pancreático de acuerdo con los métodos divulgados D en D'Amour et al, Nature Biotechnology, 2006.

Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático de acuerdo con los métodos divulgados en la Solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 11/736.908.

Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático de acuerdo con los métodos divulgados en la Solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 11/779.311.

Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático de acuerdo con los métodos divulgados en la Solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 60/953.178.

Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático de acuerdo con los métodos divulgados en la Solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 60/990.529.

Por ejemplo, las poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden diferenciarse adicionalmente en poblaciones de células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático de acuerdo con los métodos divulgados en la Solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 61/289.671.

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero no está limitada por los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo de referencia 1

Formación de la población de células de la presente invención

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 se cultivaron en MATRIGEL® (dilución 1:30) (BD Biosciences; N° de catálogo 356231) - platos recubiertos con medio RPMI (Invitrogen; N° de catálogo: 22400) + FBS al 0,2% + 100 ng/ml de activina A (PeproTech; N° de catálogo 120-14) + 20 ng/ml de WNT-3a (R&D Systems; N° de catálogo 1324-WN/CF) durante un día, seguido de tratamiento con medio RPMI suplementado con FBS al 0,5% + 100 ng/ml de activina A durante dos días adicionales (Etapa 1), luego,

a. DMEM/F12 + FBS al 2% + 50 ng/ml de FGF7 durante tres días (Etapa 2), luego

b. DMEM-Glucosa alta + B27 al 1% + 0.25 µM de Ciclopamina-KAAD + 2 µM de ácido retinoico (RA) + 100 ng/ml de Noggin durante cuatro días (Etapa 3), luego

c. Tratamiento 1: DMEM-Glucosa alta + B27 al 1% durante cuatro días (etapa 4-medio basal- BM), o

d. Tratamiento 2: DMEM-Glucosa alta + B27 al 1% + 100 ng/ml de Noggin + 1 µM de inhibidor II de ALK5 durante cuatro días (etapa 4), o

e. Tratamiento 3: DMEM-Glucosa alta + B27 al 1% + 100 ng/ml Noggin + 1 µM de inhibidor II de ALK5 + 20 nM de Forbol-12,13-dibutirato (PDBu) (Calbiochem, N° de catálogo 524390) durante cuatro días (Etapa 4).

Los cultivos se muestrearon por duplicado en la etapa 4, día 4, y la obtención de imágenes se realizó usando un IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare). Se adquirieron imágenes de 100 campos por pocillo para compensar cualquier pérdida de células durante el bioensayo y los procedimientos de tinción posteriores. Las mediciones para el número total de células, células que expresan PDX1 totales, células que expresan NKX6.1 totales y células que expresan CDX-2 totales se obtuvieron de cada pocillo usando el software IN Cell Developer

Toolbox 1.7 (GE Healthcare). Las medias y las desviaciones estándar se calcularon para cada conjunto de datos replicado. Las células que expresan PDX1, NKX6.1 y CDX-2 totales se informaron como un porcentaje de la población celular total.

Como se muestra en la Figura 2A, en todas las poblaciones experimentales al final de la etapa 4, día 4, aproximadamente el $92\% \pm 4\%$ de las células en la población expresaban PDX1. Sin embargo, el tratamiento con PDBu (un activador de la proteína quinasa C) provocó un aumento significativo en el porcentaje de células que expresaban NKX6.1 en la población que expresaba PDX1 (Figura 2A), cuando se compara con las poblaciones de células tratadas con medio basal (Tratamiento 1), o con el inhibidor II de ALK5 más Noggin (Tratamiento 2). En el grupo tratado con PDBu, el $88\% \pm 4,2\%$ de la población total expresaba NKX6.1, mientras que el $62\% \pm 8\%$ de las células que recibieron el tratamiento 2 expresaron NKX6.1, y el $46,7 \pm 0,2\%$ de las células que recibieron el tratamiento 1 expresaron NKX6.1. La mayoría de las células que expresaban NKX6.1 en la etapa 4 también expresaron PDX1. Estas observaciones se confirmaron superponiendo las imágenes de la expresión de PDX1 y la expresión de NKX6.1 obtenidas de una población celular dada (Figura 1A). Estos datos indican que el tratamiento de las células con medio suplementado con un activador de la proteína quinasa C aumentó el porcentaje de células que co-expresan PDX1 y NKX6.1 en una población de células que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático.

En la población de células que recibieron el tratamiento 1, el 10% de las células expresaron CDX2 (un marcador intestinal) (Figura 2A). Menos del 5% de las células expresaron CDX2 en poblaciones de células que recibieron tratamiento 2 o 3. En cualquier caso, la mayoría de las células que expresaron CDX2 no co-expresaron PDX1 y NKX6.1.

Las poblaciones paralelas de células de la Etapa 3 también se trataron con los siguientes activadores de la proteína quinasa C - forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) a una concentración de 20 nM (Calbiochem N° 524400), o [(2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(trifluorometil)fenil)-2,4-pentadienoilamino)benzolactama] (TPB) a una concentración de 50 nM (Calbiochem N° 565740), sustituida por PDBu en el tratamiento 3 anterior. Al final de la etapa 4, día 4, el 91% de las células de la población tratada con PMA y el 90% de las células de la población tratada con TPB expresaron NKX6.1. No se observó una diferencia significativa en el total de células que expresaban PDX1 entre todos los tratamientos. Ver la Figura 2B.

Este ejemplo demuestra que los activadores de la proteína quinasa C pueden usarse a una concentración relativamente baja para facilitar la regulación por incremento de la expresión de NKX6.1 y aumentar el porcentaje de células que co-expresan PDX1 y NKX6.1 dentro de una población de células que expresan marcadores característicos Del linaje del endodermo pancreático.

Ejemplo de referencia 2

Implantación de las células de la presente invención en ratones beige (Bg) - inmunodeficientes combinados graves (SCID)

Se cultivaron células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en MATRIGEL® (dilución 1:30) - platos con medio RPMI + FBS al 0,2% + 100 ng/ml de activina A + 20 ng/ml de WNT-3a durante un día seguido de tratamiento con medio RPMI + FBS al 0,5% + 100 ng/ml de activina A durante dos días adicionales (Etapa 1), luego,

a. DMEM/F12 + FBS al 2% + 50 ng/ml de FGF7 durante tres días (Etapa 2), luego

b. DMEM-Glucosa alta + B27 al 1% + 0.25 μ M de Ciclopamina-KAAD + 2 μ M de ácido retinoico (RA) + 100 ng/ml de Noggin durante cuatro días (Etapa 3), luego

c. DMEM-Glucosa alta + B27 al 1% + 100 ng/ml de Noggin + 1 μ M de inhibidor II de ALK5 + 50nM TPB durante cuatro días (Etapa 4).

Se compraron ratones scid-beige macho de cinco a seis semanas de edad (*C.B-Igh-1b/GbmsTac-Prkdc^{scid}-Lyst^{tgN7}*) de Taconic Farms. Los ratones se alojaron en jaulas microaislantes con acceso libre a alimentos y agua esterilizados. En la preparación para la cirugía, los ratones se identificaron mediante marcaje de orejas y se midió su peso corporal y su glucosa en sangre se determinó mediante un glucómetro de mano (One Touch, LifeScan).

Los ratones se anestesiaron con una mezcla de isoflurano y oxígeno y el sitio quirúrgico se afeitó con cortadoras de pelo para animales pequeñas. A los ratones se les administró 0,1 mg.kg de Buprenex por vía subcutánea preoperatoriamente. El sitio quirúrgico se preparó con lavados sucesivos de alcohol isopropílico al 70% y yoduro de povidona al 10%.

Las células al final de la etapa cuatro se clasificaron mecánicamente usando una pipeta de vidrio de 1 ml y

se transfirieron posteriormente a placas no adherentes para cultivo durante la noche. Durante la preparación preoperatoria de los ratones, las células se centrifugaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se eliminó la mayor parte del sobrenadante, dejando solo lo suficiente para recoger el sedimento de las células. Las células se recogieron en una pipeta de desplazamiento positivo Rainin Pos-D y la pipeta se invirtió para permitir que las células se asentaran por gravedad. El exceso de medio se dispensó dejando una preparación de células empaquetadas para trasplante.

Para el trasplante, se usó un catéter de 24G x ¾" I.V. para penetrar la cápsula renal y se retiró la aguja. Luego se hizo avanzar el catéter debajo de la cápsula renal hasta el polo distal del riñón. La punta de la pipeta Pos-D se colocó firmemente en el centro del catéter y se dispensaron los 5 millones de células desde la pipeta a través del catéter debajo de la cápsula renal y se suministraron al polo distal del riñón. La cápsula renal se selló con un cauterio a baja temperatura y se devolvió la posición anatómica original al riñón. En paralelo, se cargaron agregados celulares que contenían 5 millones de células en el dispositivo de 50 µl usando una punta de pipeta Post-D. Los dispositivos de 50 µl se adquirieron de TheraCyte, Inc. (Irvine, CA). El dispositivo se selló mediante silicona adhesiva médica tipo A (Dow Corning, N° de catálogo 129109) después de la carga, y se implantó por vía subcutánea en ratones SICD/Bg (animales N° 3 y 4). El músculo se cerró con suturas continuas usando 5-0 vicryl y la piel se cerró con clips de herida. A los ratones se les dosificó con 1,0 mg/kg de Metacam por vía subcutánea postoperatoriamente. El ratón se retiró de la anestesia y se permitió que se recuperase completamente.

Después del trasplante, los ratones se pesaron una vez por semana y la glucosa en sangre se midió dos veces por semana. A varios intervalos después del trasplante, los ratones se dosificaron con 3 g/kg de glucosa IP y se extrajo sangre a través del seno retro-orbitario 60 minutos después de inyección de glucosa en tubos de microcentrífuga que contenían una pequeña cantidad de heparina. La sangre se centrifugó y el plasma se colocó en un segundo tubo de microcentrífuga y se congeló en hielo seco y luego se almacenó a -80° C hasta que se realizó el ensayo de péptido c humano. Los niveles de péptido c humano se determinaron usando el Mercodia/ALPCO Diagnostics Ultrasensitive C-peptide ELISA (N° de catálogo 80-CPTHU-E01, Alpco Diagnostics, NH) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El péptido C humano se detectó en suero animal tan pronto como en 4 a 6 semanas tanto en el grupo de la cápsula renal como en el grupo que recibió el dispositivo Theracyte después del trasplante y aumentó a lo largo del tiempo (Figuras 3A y 3B). Al final de los tres meses, pudimos detectar una cantidad significativa de péptido C humano circulante en respuesta a la administración de glucosa en el 100% de los animales tanto en la cápsula renal como en el grupo trasplantado con el dispositivo Theracyte. El nivel en suero estimulado por glucosa del péptido C humano en el grupo de la cápsula renal fue de $1,7 \pm 0,5$ ng/ml después de tres meses (n=4), y el péptido C humano en los ratones que recibieron el trasplante del dispositivo Theracyte fue de $1 \pm 0,5$ ng/ml (n=2) (Figura 3C).

Este ejemplo demuestra que la población celular que co-expresa PDX1 y NKX6.1 generada por los activadores de la proteína quinasa C tiene la capacidad de diferenciarse aún más en células secretoras de insulina *in vivo*. La potencia de una diferenciación adicional en células secretoras de insulina no depende del entorno local. Demostramos que las células que co-expresan PDX1 y NKX6.1 pueden diferenciarse adicionalmente en células que secretan insulina tanto en la cápsula renal como dentro del dispositivo inmunoprotector en el sitio subcutáneo.

Ejemplo de referencia 3

Un método alternativo para la formación de la población de células de la presente invención

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 se cultivaron en MATRIGEL® (dilución 1:30) (BD Biosciences; N° de catálogo 356231): platos recubiertos con medio RPMI (Invitrogen; N° de catálogo: 22400) + FBS al 0,2% + 100 ng/ml de activina A (PeproTech; N° de catálogo 120-14) + 20 ng/ml de WNT-3a (R&D Systems; N° de catálogo 1324-WN/CF) durante un día, seguido de un tratamiento con medio RPMI suplementado con FBS al 0,5% + 100 ng/ml de activina A durante dos días adicionales (Etapa 1), luego,

a. DMEM/F12 + FBS al 2% + 50 ng/ml de FGF7 durante tres días (Etapa 2), luego

b. DMEM-Glucosa alta + B27 al 1% + 0,25 µM de Ciclopamina-KAAD + 2 µM de ácido retinoico (RA) + 100 ng/ml de Noggin durante cuatro días (Etapa 3), luego

c. Tratamiento 4: DMEM-Glucosa alta + B27 al 1% + 20 nM de PDBu + 100 ng/ml Noggin durante cuatro días (Etapa 4), o

d. Tratamiento 5: DMEM-Glucosa alta + B27 al 1% + 100 ng/ml de Noggin + 1 µM de inhibidor II de ALK5 + 20nM de PDBu durante cuatro días (Etapa 4), o

e. Tratamiento 6: DMEM-Glucosa alta + B27 al 1% + 50 ng/ml de FGF10 + 20 nM de PDBu durante cuatro días (Etapa 4).

Se investigó el efecto de factores adicionales sobre el aumento mediado por el activador de la proteína quinasa C en el porcentaje de células que co-expresan PDX1 y NKX6.1. Los cultivos se muestrearon por duplicado en la etapa 4, día 4, y el análisis de imágenes se realizó como se describe en el Ejemplo 1 anterior. También se registro la expresión de ISL1 y NEUROD1.

En este estudio, la mayoría de la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático fueron positivas para la expresión de PDX1. La mayoría de las células que expresan PDX1 también fueron co-positivas para NKX6.1. Como se muestra en la Tabla 1, la adición del activador de PKC solo, facilitó la formación de células que expresan NKX6.1 en la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático (tratamiento 4). En el día 4 de la etapa 4, el 93% de la población total era positivo para NKX6.1, y casi todas las células que expresaban NKX6.1 eran positivas para la expresión de PDX1.

La adición del inhibidor II de ALK5 II medio suplementado con el activador de la proteína quinasa C (tratamiento 5) no tuvo ningún efecto sobre los aumentos en la expresión de NKX6.1 observados. El 57,1% de las células en la población expresaron NEUROD1 y el 52,4% de las células en la población expresaron ISL1, lo que sugiere un aumento en el porcentaje de células precursoras endocrinas en la población, después de este tratamiento. Ver Tabla 1.

El análisis de PCR en las muestras obtenidas de este ejemplo reveló que la expresión de PDX1, NKX6.1 y PTF1 alfa aumentó en las poblaciones de células que recibieron el tratamiento 4, en comparación con las células que recibieron el tratamiento 5. Ver las Figuras 4A-4D. Por otro lado, se observó un aumento significativo en la expresión de NGN3 en células que recibieron el inhibidor 2 de ALK5 y PDBu (tratamiento 5). Ver Figuras 4A-4D.

También se investigó el efecto de la adición de FGF10 al medio suplementado con el activador de la proteína quinasa C (tratamiento 6). La adición de FGF10 a una concentración de 50 ng/ml en combinación con PDBu (tratamiento 6) generó una población de células que expresaban marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en donde el 90% de las células en la población expresaron NKX6.1, sin embargo, un lote de células que expresaban NKX6.1 también fueron positivas para CDX2. Ver la Tabla 1. El nivel de ARNm para PDX1, NKX6.1 y PTF1 alfa no aumentó con respecto al observado en células tratadas con PDBu y Noggin. Ver Figuras 4A-4D.

Este ejemplo demuestra que se puede usar un activador de la proteína quinasa C a una concentración relativamente baja (aproximadamente 20 nM) en combinación con un inhibidor de BMP para generar una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde más del 90% de las células co-expresan PDX1 y NKX6.1.

Tabla 1

	Porcentaje de la población total				
	PDX-1	NKX6.1	ISL-1	CDX-2	NeuroD1
PDBu + NG (Tratamiento 4)	94.2	91.5	32.2	8.9	22.3
Alk5i + NG + PDBu (Tratamiento 5)	90.7	80.3	52.4	15	57.1
FGF10 + PDBu (Tratamiento 6)	98.3	95	10.1	51.1	12.2

Ejemplo de referencia 4

Un método alternativo para la formación de la población de células de la presente invención

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 se cultivaron en MATRIGEL® (dilución 1:30) (BD Biosciences; N° de catálogo 356231): platos recubiertos con medio RPMI (Invitrogen; N° de catálogo: 22400) + FBS al 0,2% + 100 ng/ml de activina A (PeproTech; N° de catálogo 120-14) + 20 ng/ml de WNT-3a (R&D Systems; N° de catálogo 1324-WN/CF) durante un día, seguido de tratamiento con medio RPMI suplementado con FBS al 0,5% + 100 ng/ml de activina A durante dos días adicionales (Etapa 1), luego,

- DMEM/F12 + FBS al 2% + 50 ng/ml de FGF7 durante tres días (Etapa 2), luego cualquiera
- Tratamiento 7 (T7): DMEM-Glucosa alta + B27 al 1% + 0.25 μ M de Ciclopamina-KAAD + 2 μ M de ácido retinoico (RA) + 100 ng/ml de Noggin durante cuatro días (Etapa 3), o
- Tratamiento 8 (T8): DMEM-Glucosa alta + B27 al 1% + 0.25 μ M de Ciclopamina-KAAD + 2 μ M de Ácido

retinoico (RA) + 100 ng/ml de Noggin + FGF7 50 ng/ml durante cuatro días (Etapa 3), luego cualquiera

d. Tratamiento 9 (T9): DMEM-Glucosa alta + B27 al 1% + 100 ng/ml de Noggin + 1 μ M de inhibidor II de ALK5 + 20 nM PDBu durante cuatro días (Etapa 4), o

e. Tratamiento 10 (T10): DMEM-Glucosa alta + B27 al 1% + 50 ng/ml de FGF10 + 20 nM de PDBu durante cuatro días (Etapa 4), o

f. Tratamiento 11 (T11): DMEM-Glucosa alta + B27 al 1% + 20 nM de PDBu +100 ng/ml de Noggin durante cuatro días (Etapa 4).

Los cultivos se muestrearon por duplicado en la etapa 4, día 4, y la obtención de imágenes se realizó usando un IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare). Se adquirieron imágenes de 100 campos por pocillo para compensar cualquier pérdida de células durante el bioensayo y los procedimientos de tinción posteriores. Las mediciones para el número de células totales, las células que expresan PDX1 totales, las células que expresan NKX6.1 totales y las células que expresan CDX2 totales se obtuvieron de cada pocillo usando el software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). Se calcularon las medias y las desviaciones estándar para cada conjunto de datos replicados. Las células que expresaron PDX1, NKX6.1 y CDX-2 totales se informaron como un porcentaje de la población de células total.

En las poblaciones de células tratadas con T7 seguido de medio T9, aproximadamente el 80% de las células en la población expresaron NKX6.1. Ver la Tabla 2. En poblaciones de células tratadas con T7 seguido de medio T10, el 90% de las células expresaron NKX6.1, sin embargo, se observaron más células que expresaban CDX2 en este tratamiento. Ver la Tabla 2. El tratamiento de poblaciones de células con T7 seguido de medio T11 creó una población de células que expresaban marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde el 93% de las células en la población expresaron NKX6.1. La mayoría de las células que expresaron NKX6.1 en las poblaciones también expresaron PDX1.

Los cultivos tratados con T8 seguido de medio T9 crearon una población de células que expresaban marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde el 56,7% de las células en la población expresaron NKX6.1. Ver la Tabla 2. Los cultivos tratados con T8 seguido de medio T10 crearon una población de células que expresaban marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde el 63,5% de las células en la población expresaron NKX6.1, observamos más células que expresaban CDX2 después de este tratamiento. Ver la Tabla 2. Los cultivos tratados con T8 seguido de medio T11 crearon una población de células que expresaban marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde el 74% de las células en la población expresaron NKX6.1. Ver la Tabla 2. La mayoría de las células que expresaron NKX6.1 también expresaron PDX1.

El análisis de PCR también apoyó el análisis de células IN, en el que el tratamiento con ácido retinoico, ciclopamina y Noggin en la etapa tres, seguido de la adición de un activador de PKC en la etapa 4, dio como resultado un aumento en los niveles de ARNm de NKX6.1 y PTF1 alfa en la etapa cuatro día cuatro (Figuras 5A-5D).

Tabla 2

	Tratamiento 7 (RA+Noggin+Ciclopamina)			Tratamiento 8 (RA+Noggin+Ciclopamina+FGF7)		
	PDX-1	NKX6.1	CDX2	PDX-1	NKX6.1	CDX2
Tratamiento 9	95.6	80.5	3.1	93.6	56.7	3.2
Tratamiento 10	98.3	90.1	32	92.8	63.5	12
Tratamiento 11	96.6	93.1	12.9	94.2	74.6	5.5

REIVINDICACIONES

1. Una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde más del 60% de las células en la población co-expresan PDX1 y NKX6.1.

2. La población de células de la reivindicación 1, en donde más del 70%, 80% o 90% de las células en la población co-expresan PDX1 y NKX6.1.

3. Un método para generar una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en donde más del 50% de las células en la población co-expresan PDX1 y NKX6.1, que comprenden los pasos de:

- a. cultivar una población de células madre pluripotentes,
- b. diferenciar la población de células madre pluripotentes en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo,
- c. diferenciar la población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en una población de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en un medio suplementado con noggin y un activador de la proteína quinasa C seleccionado del grupo que consiste de (2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(trifluorometil)fenil)-2,4-pentadiemoilamino)benzolactama, indolactama V, forbol-12-miristato-13-acetato y forbol-12,13 -dibutirato.

4. El método de la reivindicación 3, en el que el activador de la proteína quinasa C es (2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(trifluorometil)fenil)-2,4-pentadiemoilamino)benzolactama.

5. El método de la reivindicación 4, en el que la (2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(trifluorometil)fenil)-2,4-pentadiemoilamino)benzolactama se usa a una concentración de 20 nM a 500 nM.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el medio suplementado con un activador de la proteína quinasa C se suplementa adicionalmente con por lo menos un factor del grupo que consiste de un inhibidor de la señalización del receptor de TGF β y un factor de crecimiento de fibroblastos.

7. El método de la reivindicación 3, en el que el noggin se usa a una concentración:

- a. del 50 ng/ml al 500 μ g/ml; o
- b. de 100ng/ml.

8. El método de la reivindicación 6, en el que el inhibidor de la señalización del receptor de TGF β es un inhibidor de ALK5.

9. El método de la reivindicación 8, en el que el inhibidor de ALK5 es el inhibidor II de ALK5.

10. El método de la reivindicación 9, en el que el inhibidor II de ALK5 se usa a una concentración:

- a. de 0,1 μ M a 10 μ M; o
- b. de 1 μ M.

11. El método de la reivindicación 6, en el que el factor de crecimiento de fibroblastos es FGF7.

12. El método de la reivindicación 6, en el que el factor de crecimiento de fibroblastos es FGF10.

13. El método de la reivindicación 6, en el que el factor de crecimiento de fibroblastos se puede usar a una concentración de 50 pg/ml a 50 μ g/ml.

FIG. 1A

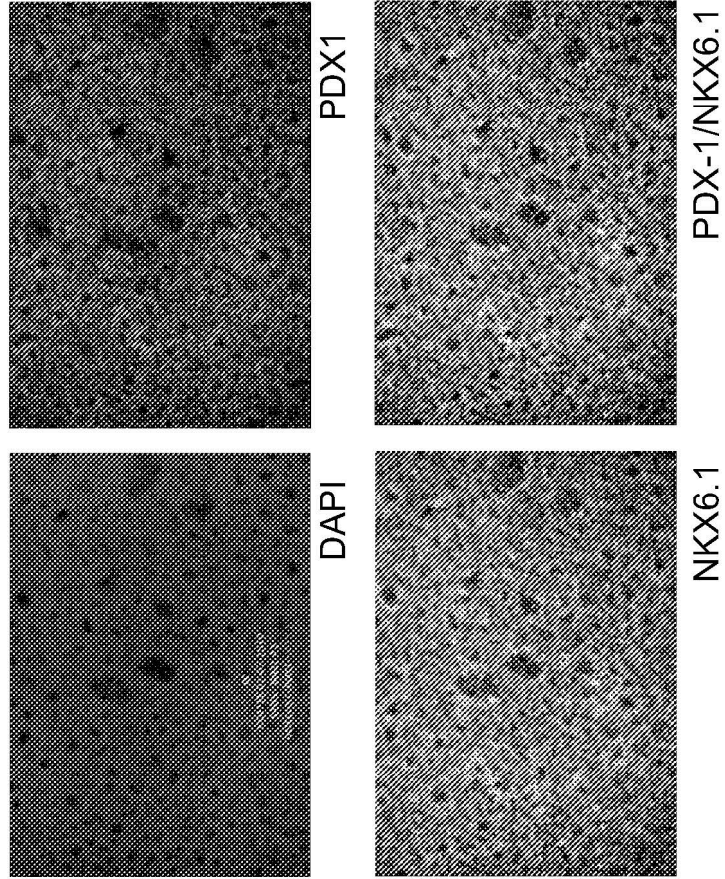
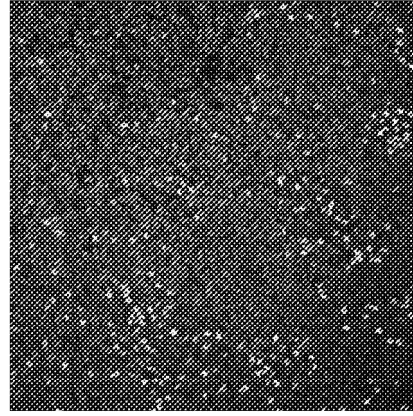


FIG. 1B



ISL-1 (G)/NKX6.1 (R)

FIG. 2A

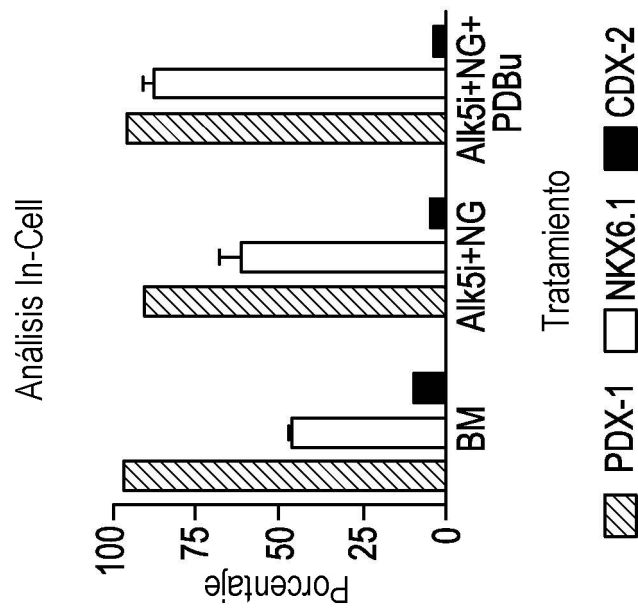


FIG. 2B

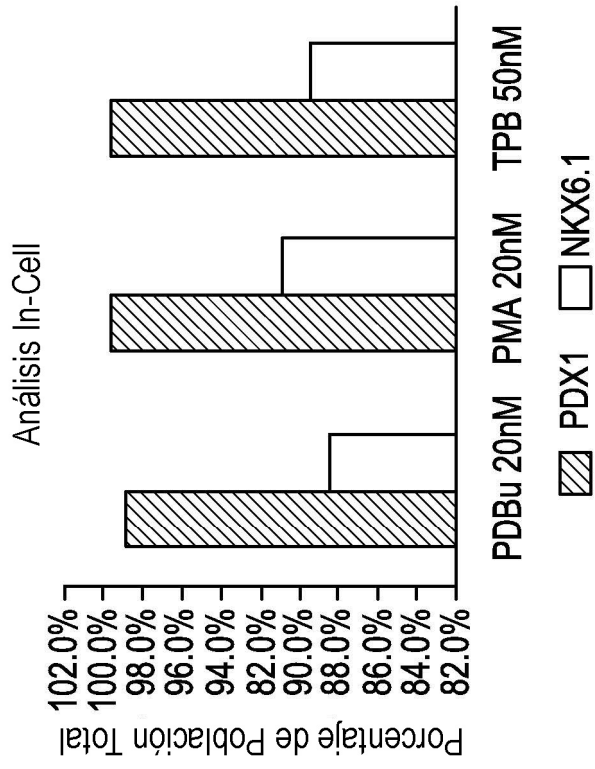


FIG. 3A

Secreción de péptido C Humano - Cápsula Renal

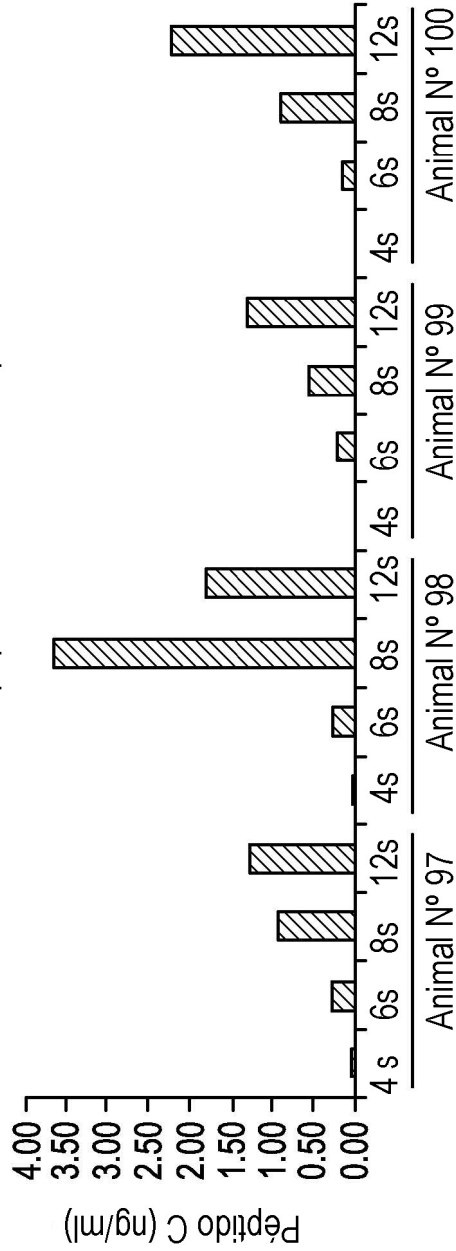


FIG. 3B

Secreción de péptido C Humano - Theracyte

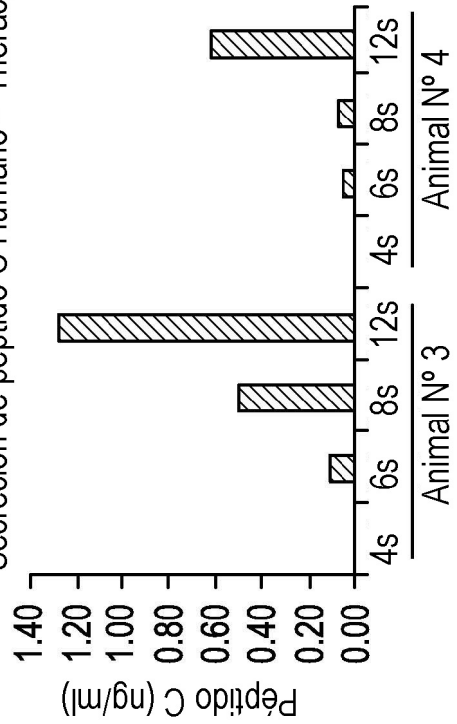


FIG. 3C

Secreción de péptido C Humano -
(12 semanas)

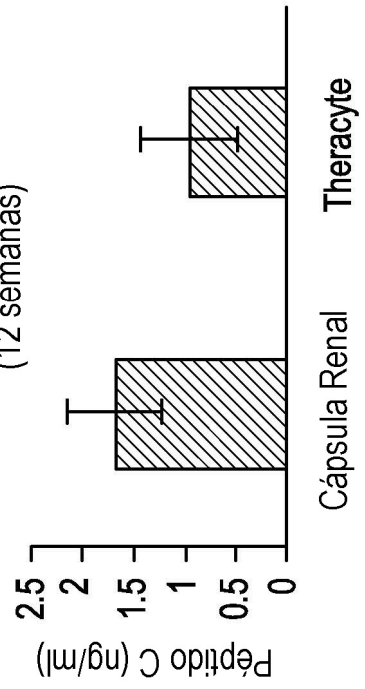


FIG. 4A

Expresión de Nkx6.1 (Etapa 4)

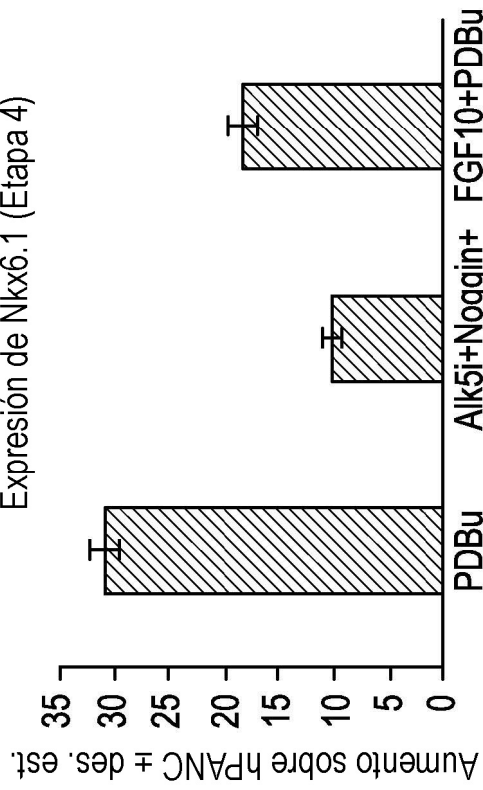


FIG. 4B

Expresión de Pdx1 (Etapa 4)

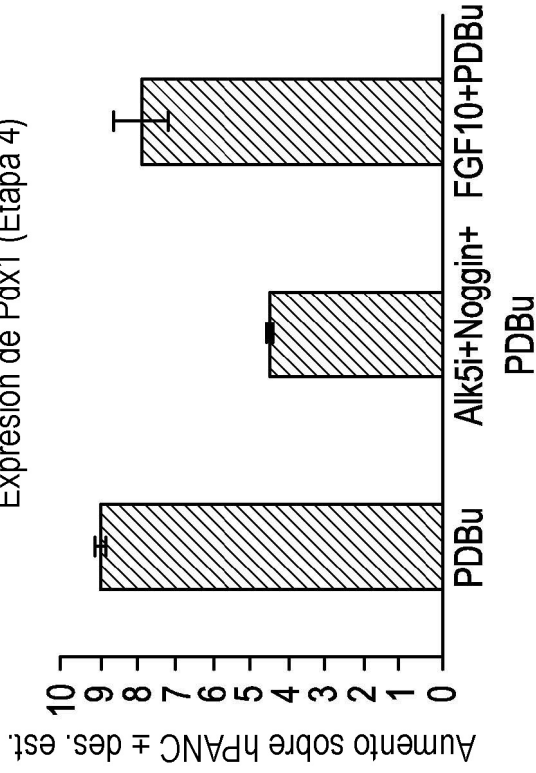


FIG. 4C

Expresión de PTF1a (Etapa 4)

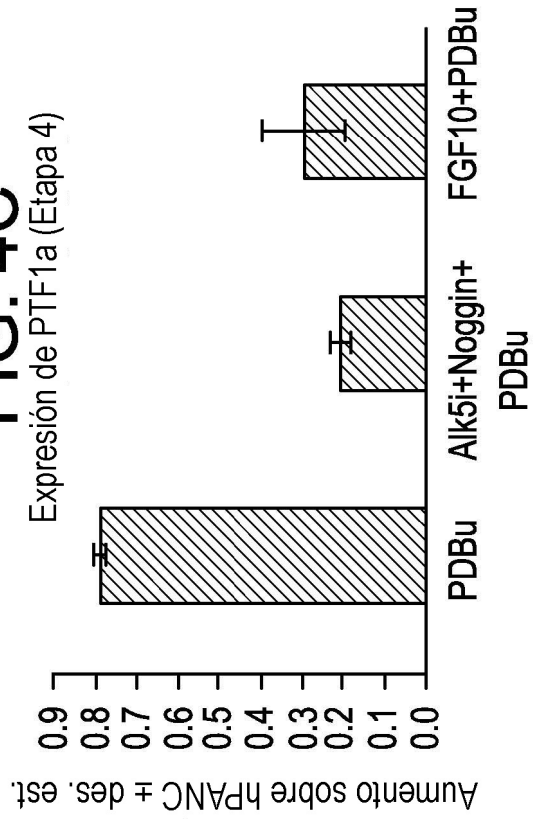


FIG. 4D

Expresión de Ngn3 (Etapa 4)

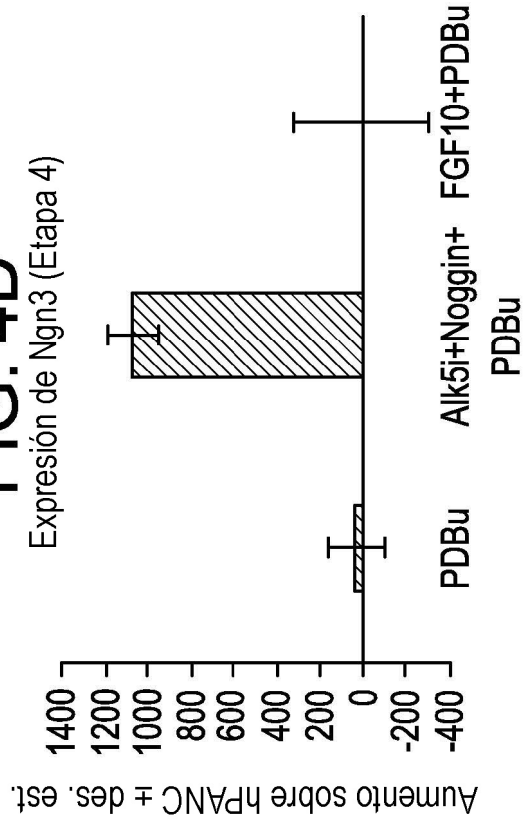


FIG. 5A

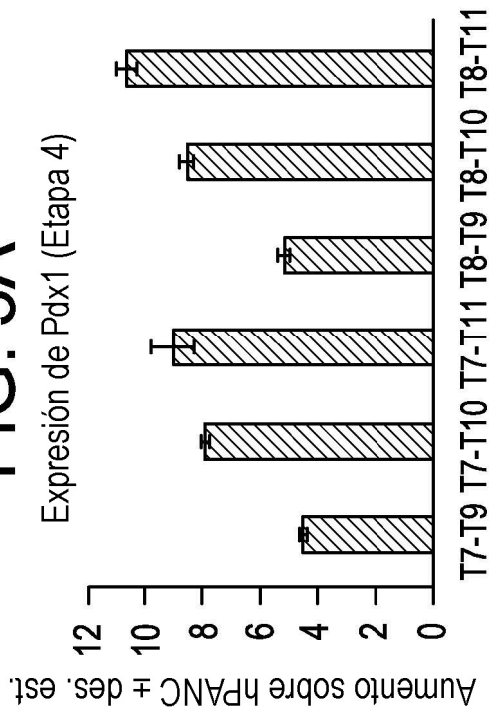


FIG. 5B

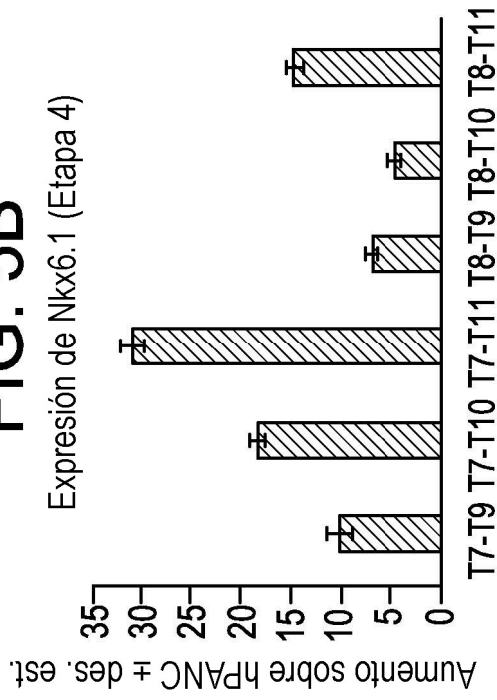


FIG. 5C

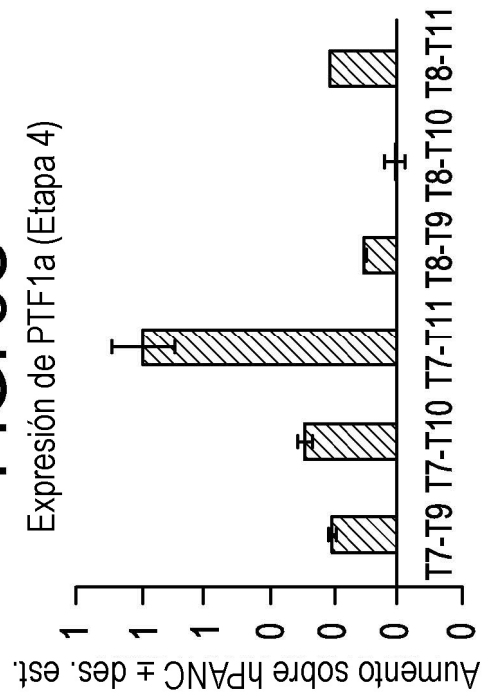


FIG. 5D

