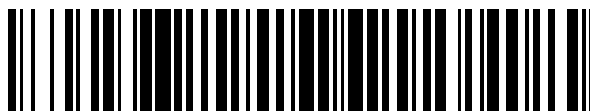


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 776**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2013 PCT/EP2013/068188**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14033322**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2013 E 13756893 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2893000**

54 Título: **Generación de endodermo pancreático a partir de células madre pluripotentes mediante el uso de moléculas pequeñas**

30 Prioridad:

**03.09.2012 EP 12182747
07.09.2012 US 201261697970 P
21.12.2012 EP 12198820**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.11.2019

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (50.0%)
Novo Allé
2880 Bagsværd , DK y
TAKARA BIO EUROPE AB (50.0%)**

72 Inventor/es:

**EKBERG, JENNY;
HANSSON, MATTIAS;
DØHN, ULRİK;
HESS, KATJA y
FUNA, NINA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 729 776 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

Generación de endodermo pancreático a partir de células madre pluripotentes mediante el uso de moléculas pequeñas

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a métodos para producir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas donde al menos 5 % de las células coexpresan PDX1 y NKX6.1.

10 Antecedentes de la invención

El trasplante de células beta proporciona potencialmente la cura final para la diabetes tipo I. Sin embargo, la limitada disponibilidad de las células beta donantes limita el uso de este tratamiento como una terapia clínica. Las células madre pluripotentes pueden proliferar infinitamente y diferenciarse en muchos tipos celulares; por lo tanto, las células PS son una fuente prometedora de células beta. Sin embargo, antes de que las células PS puedan usarse para tratar la diabetes, necesitan diferenciarse de manera eficiente y reproducible en células pancreáticas.

15

Durante el desarrollo embrionario de vertebrado, una célula pluripotente da lugar a las tres capas germinales; ectodermo, mesodermo y endodermo. La inducción del endodermo definitivo (DE) es la primera etapa hacia la formación de los tejidos derivados del endodermo. La generación del endodermo pancreático (PE) a partir de células DE es necesaria para la generación de células beta productoras de insulina. Las células de PE con potencial de convertirse en progenitores endocrinos (EP) se caracterizan por la coexpresión de dos factores de transcripción importantes, PDX1 y NKX6.1.

20

Paso a paso *in vitro* se han establecido protocolos de diferenciación para generar células pancreáticas a partir de células PS. Estos protocolos generalmente mimetizan los eventos principales del desarrollo pancreático, que incluye varias etapas tales como la formación del DE que coexpresa SOX17 y FOXA2, el intestino primitivo, el intestino posterior, PE, EP y finalmente las células beta maduras. Hasta la fecha, se ha logrado una eficiente diferenciación DE de las células hES mediante el tratamiento con activina A. La siguiente etapa principal para generar las células beta pancreáticas es generar PE que coexpresa PDX1 y NKX6.1. Varios grupos han desarrollado protocolos *in vitro* que pueden diferenciar células PS en DE y PE, sin embargo sólo son capaces de generar una fracción modesta de células dobles positivas para NKX6.1/PDX1 (db +ve), y de manera importante, ninguna de ellas es capaz de generar células beta completamente maduras *in vitro* (Cai) y otros (2010); D'Amour y otros (2006); Kunisada y otros. (2012); Schulz y otros. (2012); Zhang y otros. (2009); Ameri y otros. (2010)).

25

30

35

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a un método para producir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas donde al menos 5 % de las células coexpresan PDX1 y NKX6.1, que comprenden exponer las células endodérmicas definitivas a una cantidad efectiva de al menos un compuesto de cada uno de los grupos siguientes:

40

- a. inhibidor de BMP, y
- b. Inhibidores de quinasas, y
- c. Agonistas del receptor de ácido retinoico

45

para diferenciar las células endodérmicas definitivas en células pancreáticas o precursores de células pancreáticas, en donde el inhibidor de quinasa es 1,9-pirazoloantrona (inhibidor de JNK II) que incluye isómeros o tautómeros de 1,9-pirazoloantrona con o sin N-alquilación y se combina con el agonista del receptor de ácido retinoico AM580.

50 La presente descripción se refiere a un método para producir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas donde al menos 5 % de las células coexpresan PDX1 y NKX6.1, que comprenden exponer las células endodérmicas definitivas (DE) a una cantidad efectiva de al menos un compuesto del grupo que consiste en:

- a. Inhibidor de BMP LDN-193189 (enumerado en la tabla 1)
- b. Inhibidores de quinasas (enumerados en las tablas 1 y 2)
- c. Agonistas del receptor de ácido retinoico (enumerados en la tabla 2)

55

para diferenciar las células DE humanas en células pancreáticas o precursores de las células pancreáticas.

60 La presente descripción se refiere además a un método para producir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas donde al menos 5 % de las células coexpresan PDX1 y NKX6.1, que comprende exponer las células DE a una cantidad efectiva de al menos un compuesto del grupo que consiste en:

- a. Inhibidor de BMP LDN-193189 (enumerado en la tabla 1)
- b. isómeros de 1,9-pirazoloantrona con o sin N-alquilación (enumerados en la tabla 1 y 2)
- c. Agonistas del receptor de ácido retinoico (enumerados en la tabla 2)

65

para diferenciar las células DE humanas en pancreáticas o precursores de células pancreáticas.

La presente descripción se refiere además a un método para producir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas donde al menos 5 % de las células coexpresan PDX1 y NKX6.1, que comprende exponer las células endodérmicas definitivas a una cantidad efectiva de al menos un compuesto del grupo que consiste en:

- a. inhibidor de BMP LDN-193189
- b. Inhibidor de JNK II
- c. AM580

para diferenciar las células DE humanas en pancreáticas o precursores de células pancreáticas.

La presente descripción se refiere además a un método para generar células pancreáticas o precursores de células pancreáticas donde al menos 5 % de las células coexpresan PDX1 y NKX6.1, que comprende exponer las células endodérmicas definitivas a una cantidad efectiva del inhibidor de BMP LDN-193189, para diferenciar las células DE humanas en precursores de células pancreáticas o pancreáticas.

La presente descripción se refiere además a un método para generar células pancreáticas o precursores de células pancreáticas donde al menos 5 % de las células coexpresan PDX1 y NKX6.1, que comprende exponer células DE a una cantidad efectiva del inhibidor de BMP LDN-193189, y la posterior exposición a una de las siguientes moléculas:

- a. Inhibidor de Wnt IWP2
- b. Inhibidor de Hedgehog Ciclopamina (Cyc)

para diferenciar las células DE humanas en precursores de células pancreáticas o pancreáticas.

La presente descripción se refiere además a un método para generar células pancreáticas o precursores de células pancreáticas donde al menos 5 % de las células coexpresan PDX1 y NKX6.1, que comprende exponer las células DE a una cantidad efectiva del inhibidor de BMP LDN-193189, y la posterior exposición a una combinación del inhibidor de JNK II, ácido retinoico o un derivado de ácido retinoico, bFGF y una de las siguientes moléculas:

- a. Inhibidor de Wnt IWP2
- b. Inhibidor de Hedgehog Ciclopamina

para diferenciar las células DE humanas en precursores de células pancreáticas o pancreáticas.

La presente descripción se refiere además a un método para generar células pancreáticas o precursores de células pancreáticas donde al menos 5 % de las células coexpresan PDX1 y NKX6.1, que comprende exponer las células DE a una cantidad efectiva del inhibidor de BMP LDN-193189, y la posterior exposición a una combinación del inhibidor de JNK II en combinación con ácido retinoico o un derivado de ácido retinoico, bFGF y LDN-193189 para diferenciar las células madre DE en precursores de células pancreáticas o pancreáticas.

En una modalidad de la presente invención, cualquiera de los agonistas del receptor de ácido retinoico o inhibidores de quinasas puede estar en combinación con bFGF.

La presente descripción se refiere además a células pancreáticas o precursores de células pancreáticas que pueden obtenerse mediante los métodos de la presente descripción.

La presente descripción se refiere a una célula pancreática o precursor de célula pancreática producido al exponer una célula madre pluripotente humana a al menos un compuesto enumerado en las tablas 1 y 2.

La presente descripción se refiere al uso de cualquiera de los compuestos de las tablas 1 y 2, para inducir las células pancreáticas o precursores de las células pancreáticas a partir de las células madre.

La presente descripción se refiere al uso de LDN-193189 para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de células madre.

La presente descripción se refiere al uso de LDN-193189 seguido por Ciclopamina o IWP2, para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de células madre.

La presente descripción toma un enfoque alternativo para mejorar la eficiencia de la diferenciación de células PS humanas hacia células beta maduras, al proporcionar un método para aumentar la fracción de células dobles positivas para NKX6.1/PDX1, una marca distintiva de las células PE comprometidas a un destino de célula endocrina.

En un aspecto, la descripción proporciona una población de células pancreáticas mejorada, es decir PE con fracción aumentada de células dobles positivas para NKX6.1/PDX1.

Además, la presente descripción proporciona una población de células pancreáticas más homogénea, que es importante para el desarrollo posterior de estas células hacia el linaje endocrino.

5 La presente descripción proporciona, además, una población pancreática más sincronizada para llegar a la siguiente etapa.

La presente descripción puede resolver, además, otros problemas que resultarán evidentes a partir de la descripción de las modalidades ilustrativas.

10 Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1 muestra el enfoque de selección de PE, denominado también como enfoque de selección de bibliotecas, mediante el uso de bibliotecas de moléculas pequeñas. Las células madre pluripotentes (PS) se diferenciaron en endodermo definitivo (DE) de acuerdo con el protocolo de DE (ver métodos generales) y se sembraron en placas de 96 pocillos para la selección. La selección de endodermo pancreático (PE) se dividió en una fase temprana y una tardía. En la fase temprana, los compuestos se añadieron según un protocolo basado en bFGF publicado (Ameri y otros, 2010, comparar también WO/2010/136583) durante los primeros siete días de la diferenciación de PE y luego se continuó durante otros seis días sin los compuestos. En la fase tardía, los compuestos se añadieron solamente según el protocolo basado en bFGF durante los últimos seis días.

20 La Figura 2 muestra los aciertos de la fase temprana para el enfoque de selección de biblioteca. Las células endodérmicas definitivas a partir de las células madre pluripotentes humanas inducidas (hiPSC) (negro) o hESC (blanco) se sembraron en placas ópticas de 96 pocillos y se diferenciaron en endodermo pancreático mediante el uso de un protocolo de 14 días basado en bFGF. Los compuestos se añadieron según el protocolo basado en bFGF durante los primeros siete de cada 14 días y se analizaron para determinar las células dobles positivas para NKX6.1/PDX1 con el uso del analizador InCell 2000 (GE Healthcare). El gráfico muestra el % de efecto la fracción de células dobles NKX6.1/PDX1 en comparación con el protocolo de referencia.

30 La Figura 3 muestra los aciertos de la fase tardía para el enfoque de selección de biblioteca. Las células endodérmicas definitivas de hiPSC (negro) o hESC (blanco) se sembraron en placas ópticas de 96 pocillos y se diferenciaron en endodermo pancreático mediante el uso de un protocolo de 14 días basado en bFGF. Los compuestos se añadieron según el protocolo basado en bFGF durante los seis últimos días y se analizaron para determinar las células dobles positivas para NKX6.1/PDX1 con el uso del analizador InCell 2000 (GE Healthcare). El gráfico muestra el % de efecto de la fracción de células dobles positivas para NKX6.1/PDX1 en comparación con el protocolo de referencia.

35 La Figura 4 muestra un segundo candidato basado en el enfoque de selección de PE. Las células madre pluripotentes (PS) se diferenciaron en endodermo definitivo de acuerdo con el protocolo de DE (ver métodos generales) y se sembraron en placas de 96 pocillos para la selección. La selección de endodermo pancreático se dividió en dos partes. En la selección 1, los compuestos se añadieron a un medio basal (RPMI1640+0.1% PEST+12% KOSR) los primeros ocho días de diferenciación de PE. Los compuestos se probaron en 4 periodos de tiempo diferentes que tienen incrementos de 2 días y después se dejó que las células continuaran la diferenciación durante otros seis días en el protocolo publicado basado en bFGF (Ameri y otros, 2010). En la selección 2, las células se diferenciaron primero durante 4 días con los compuestos de aciertos de la selección 1, luego los compuestos de selección se añadieron los últimos 10 días al medio basal.

45 La Figura 5 muestra los aciertos de los candidatos de la selección de 1 y 2 en comparación con las células diferenciadas de acuerdo con Ameri y otros, 2010 que se usó como un protocolo de referencia que corrió en paralelo con cada selección. En la selección 1, se identificó un compuesto coincidente (LDN-193189) y se descubrió que es más efectivo cuando se agrega durante los primeros 4 días seguido por 4 días de medio basal. Para la selección 2, se identificaron dos compuestos coincidentes (Ciclopamina e IWP-2) cuando las células se expusieron primero al compuesto coincidente de la selección 1 durante 4 días y se añadieron los compuestos coincidentes de la selección 2 durante los últimos 10 días de diferenciación. El gráfico muestra el % de efecto de la fracción de células dobles positivas para NKX6.1/PDX1 en comparación con el protocolo de referencia (barras para hiPSC en negro y hESC en blanco).

50 La Figura 6 muestra el efecto ventajoso sobre la cantidad de células dobles positivas para PDX1 / NKX6.1 por la combinación de los compuestos de acierto encontrados en las dos selecciones individuales (bibliotecas de moléculas pequeñas y enfoque de candidato) en comparación con el protocolo de referencia (Ameri y otros. (2010)). Barras para hiPSC en negro y hESC en blanco.

60 Lista de abreviaturas

+ve: positivo

65 bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) básico (conocido además como FGF2)

Cyc: Ciclopamina

db: doble positivo

5 DE: Endodermo definitivo

hBS: Tronco derivado de blastocisto humano

10 hBSC; Células madre derivadas de blastocistos humanos

ES: Tronco embrionario humano

hESC: Células madre embrionarias humanas

15 hiPSC: Células Madre Pluripotentes humanas inducidas

hPSC: Células Madre Pluripotentes Humanas

20 KOSR: Reemplazo de suero con desactivación

NKX6.1: NK6 caja homeo 1

PDX1: Caja homeo pancreática y duodenal 1

25 PEST: Penicilina/Estreptomina

PS: Tronco Pluripotente

30 Rockout: Inhibidor de quinasa Rho III

RT: Temperatura ambiente

Descripción

35 La presente invención se refiere a un método para producir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas donde al menos 5 % de las células coexpresan PDX1 y NKX6.1, que comprende exponer las células endodérmicas definitivas a una cantidad efectiva de al menos un compuesto de cada uno de los grupos siguientes:

- 40 d. Inhibidor de BMP, y
- e. Inhibidores de quinasas, y
- f. Agonistas del receptor de ácido retinoico

45 para diferenciar las células endodérmicas definitivas en células pancreáticas o precursores de células pancreáticas, en donde el inhibidor de quinasa es 1,9-pirazoloantrona (inhibidor de JNK II) que incluye isómeros o tautómeros de 1,9-pirazoloantrona con o sin N-alquilación y se combina con el agonista del receptor de ácido retinoico AM580.

En una modalidad preferida de la invención, dicho inhibidor de BMP es LDN-193189.

50 En una modalidad preferida de la invención, dichos inhibidores de quinasas y agonistas del receptor de ácido retinoico se combinan con bFGF, preferentemente con FGF7 o FGF10.

55 En una modalidad preferida, el método de la invención comprende una primera etapa que expone las células endodérmicas definitivas a una cantidad efectiva de LDN-193189, sin bFGF, y una segunda etapa de exposición al inhibidor de JNK II en combinación con AM580, en presencia de bFGF.

En una modalidad preferida de la invención, al menos 10 %, 10-30 %, 10-40 %, 5-70 %, 10-80 % o 5-100 % de las células coexpresan PDX1 y NKX6.1.

60 La presente descripción se refiere a métodos para generar endodermo pancreático a partir de células madre, tales como células endodérmicas definitivas humanas y células madre pluripotentes inducidas.

65 La presente invención toma un enfoque alternativo para mejorar la eficiencia de la diferenciación de células PS humanas hacia células beta maduras, al proporcionar un método para mejorar el porcentaje de células dobles positivas para NKX6.1/PDX1, que son marcadores para una población de células PE, una de las etapas celulares necesarias para lograr poblaciones de células endocrinas.

Además, la presente invención proporciona una población de células pancreáticas más homogénea y sincronizada, que es importante para el desarrollo posterior de estas células hacia el linaje endocrino.

5 La presente descripción puede resolver, además, otros problemas que resultarán evidentes a partir de la descripción de las modalidades ilustrativas.

10 En una modalidad, las células endocrinas pancreáticas que se pueden obtener por el método de acuerdo con la invención son células productoras de insulina, opcionalmente junto con células diferenciadas hacia células productoras de glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático, y/o ghrelina. Como se usa en la presente descripción, "células productoras de insulina" se refiere a células que producen y almacenan o secretan cantidades detectables de insulina. Las "células productoras de insulina" pueden ser células individuales o colecciones de células.

15 En otra modalidad, la población celular que comprende las células pancreáticas se obtiene a partir de una población de células somáticas. En algunos aspectos, la población de células somáticas se ha inducido para desdiferenciarse en una célula madre tipo embrionaria (ES, por ejemplo, una pluripotente). Tales células desdiferenciadas se denominan, además, células madre pluripotentes inducidas (iPSC).

20 En otra modalidad, la población celular que comprende células pancreáticas se obtiene de células madre embrionarias (ES, por ejemplo, pluripotentes). En algunos aspectos la población celular que comprende células pancreáticas son células pluripotentes tales como células tipo ES.

25 En otra modalidad, la población celular que comprende células pancreáticas son células madre diferenciadas embrionarias (ES o pluripotentes). La diferenciación tiene lugar en cuerpos embrionarios y/o en cultivos celulares en monocapa o una combinación de estos.

En otra modalidad, la población celular es una población de células madre. En algunos aspectos la población celular es una población de células madre diferenciadas al linaje endocrino pancreático.

30 Las células madre son células no diferenciadas definidas por su capacidad al nivel de célula única tanto de autorrenovarse como de diferenciarse para producir células de la progenie, que incluyen progenitores autorrenovables, progenitores no renovables y células diferenciadas de manera terminal. 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 también para dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, sino a todos, de los tejidos después de la inyección en blastocistos.

35 Las células madre se clasifican por su potencial de desarrollo como: (1) totipotente, que significa ser capaz de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias; (2) pluripotentes, que significa ser capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias; (3) multipotentes, que significa ser capaz de dar lugar a un subconjunto de linajes celulares, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir la progenie que incluye HSC (autorrenovables), progenitores restringidos a las células de la sangre y todos los tipos y elementos celulares (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre); (4) oligopotentes, que significa ser capaz de dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes celulares que las células madre multipotentes; y (5) unipotente, que significa ser capaz de dar lugar a un linaje de células único (por ejemplo, células madre espermatozógenas).

Un protocolo para obtener células pancreáticas a partir de células madre se ejemplifica por, pero no se limita a, los protocolos descritos en D'Amour, K. A. y *otros*. (2006); Jiang, J. y *otros*. (2007); Kroon, E. y *otros*. (2008).

50 Un protocolo para obtener células pancreáticas a partir de células somáticas o células somáticas inducidas para desdiferenciarse en células pluripotentes tales como células tipo ES se ejemplifica por, pero no se limita a, los protocolos descritos en Aoi, T. y *otros*. (2008); D. Amour, K. A. y *otros*. (2006); Jiang, J. y *otros*. (2007); Kroon, E. y *otros*. (2008); Takahashi, K. y *otros*. (2007); Takahashi, K., y Yamanaka, S. (2006) y Wernig, M. y *otros*. (2007).

55 Como se usa en la presente descripción, "diferenciar" o "diferenciación" se refiere a un proceso donde las células progresan de un estado no diferenciado a un estado diferenciado, de un estado inmaduro a un estado menos inmaduro o de un estado inmaduro a un estado maduro. Por ejemplo, las células pancreáticas embrionarias tempranas no diferenciadas son capaces de proliferar y expresar marcadores característicos, como PDX1, NKX6.1, y PTF1a. Las células pancreáticas maduras o diferenciadas no proliferan y sí secretan altos niveles de hormonas endocrinas pancreáticas o enzimas digestivas. Por ejemplo, las células beta completamente diferenciadas secretan insulina a altos niveles en respuesta a la glucosa. Los cambios en la interacción celular y la maduración se producen a medida que las células pierden marcadores de células no diferenciadas o ganan marcadores de células diferenciadas. La pérdida o ganancia de un marcador único puede indicar que una célula "maduró o se diferenció completamente." El término "factor de diferenciación" se refiere a un compuesto añadido a las células pancreáticas para potenciar su diferenciación a células endocrinas maduras que también contienen células beta productoras de insulina. Los factores de diferenciación ilustrativos incluyen factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento de queratinocitos,

exendina-4, factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento similar a insulina 1, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, y péptido similar a glucagón 1. En algunos aspectos la diferenciación de las células comprende cultivar las células en un medio que comprende uno o más factores de diferenciación.

5 Como se usa en la presente descripción, "células madre pluripotentes humanas" (hPSC) se refiere a células que pueden derivarse de cualquier fuente y que son capaces, en condiciones apropiadas, de producir progenie humana de diferentes tipos de células que son derivadas de las 3 capas germinales (endodermo, mesodermo, y ectodermo). hPSC puede tener la capacidad de formar un teratoma en ratones SCID de 8-12 semanas de edad y/o la capacidad para formar células identificables de las tres capas germinales en cultivo de tejidos. Se incluye en la definición de células madre pluripotentes humanas células embrionarias de diversos tipos así como también células madre pluripotentes inducidas (ver, por ejemplo, Yu y *otros*. (2007); Takahashi y *otros*. (2007)). Los diversos métodos y otras modalidades descritas en la presente descripción pueden requerir o utilizar hPSC a partir de una variedad de fuentes. Adicional o alternativamente, las hPSC adecuadas pueden obtenerse a partir de líneas celulares establecidas y/o células madre pluripotentes humanas inducidas (hiPS).

Como se usa en la presente descripción, "hiPSC" se refiere a células madre pluripotentes humanas inducidas.

20 Las líneas celulares ES también pueden derivarse de blastómeros simples sin la destrucción de embriones *ex útero* y sin afectar el resultado clínico (Chung y *otros* (2006) y Klimanskaya y *otros*. (2006)).

25 Las células madre pluripotentes usadas en la presente invención pueden ser, por lo tanto, líneas celulares disponibles comercialmente. Sin embargo, se concibe además que cualquier célula madre pluripotente humana puede usarse en la presente invención, que incluye células adultas diferenciadas que se reprograman a células pluripotentes por ejemplo, el tratamiento de células de adultos con determinados factores de transcripción, tales como OCT4, SOX2, NANOG, y LIN28 como se describe en Yu, y *otros*. (2007); Takahashi y *otros*. (2007) y Yu y *otros* (2009).

30 Tal como se usa en la presente descripción, el inhibidor de JNK II incluye isómeros o tautómeros de 1,9-pirazoloantrona con o sin N-alkilación. Donde 1,9-pirazoloantrona puede definirse como "SMILES: c1ccc2c(c1)-c3c4c(cccc[4nH]n3)C2=O" o "1,6-dihidrodibenzo[cd,g]indazol-6-ona".

El medio DEF o el medio/sistema DEF-CS es un medio de cultivo equilibrado definido para el establecimiento y propagación de las células madre pluripotentes humanas, medio/sistema DEF-CS.

35 Modalidades de la descripción:

1. Un método para producir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas donde al menos 5 % de las células coexpresan PDX1 y NKX6.1, que comprende exponer las células madre embrionarias a una cantidad efectiva de al menos un compuesto del grupo que consiste en:

- 40
- a. Inhibidores de BMP
 - b. inhibidores de quinasa
 - c. agonistas del receptor de ácido retinoico

45 para diferenciar las células madre embrionarias humanas en células pancreáticas o precursores de células pancreáticas.

2. El método de la modalidad 1, en donde dichos compuestos se enumeran en las tablas 1 o 2.

50 3. El método de las modalidades 1 o 2, en donde el inhibidor de quinasa es un isómero de 1,9-pirazoloantrona con o sin N-alkilación.

4. El método de las modalidades 1-3, en donde dicho inhibidor de quinasa es el inhibidor de JNK II.

55 5. El método de las modalidades 1-2, en donde dicho agonista del receptor de ácido retinoico es AM580.

6. El método de las modalidades 1-5, en donde dicho inhibidor de JNK II está en combinación con AM580.

7. El método de las modalidades 3-6, en donde está presente bFGF.

60 8. El método de la modalidad 7, en donde dicho bFGF es FGF2, FGF7 o FGF10.

9. El método de la modalidad 8, en donde dicho bFGF es FGF7.

65 10. El método de la modalidad 1, en donde dicho inhibidor de BMP es LDN-193189.

11. El método de la modalidad 10, en donde dicho LDN-193189 es seguido por la exposición a un inhibidor de Wnt o un inhibidor de Hedgehog.
- 5 12. El método de la modalidad 11, en donde dicho inhibidor de Wnt es IWP2.
13. El método de la modalidad 12, en donde dicho inhibidor de Hedgehog es ciclopamina.
14. El método de las modalidades 1-13, en donde dichas células pancreáticas o precursores de células pancreáticas son 10-20 %, 10-30 %, 10-40 %, 5-20 %, 5-30 %, 5-40 %, 5-50 %, 5-60 % o 5-70 %, 5-80 %, 40-80 % o 5-90 % dobles positivas para PDX1/NKX6.1.
- 10 15. El método de cualquiera de las modalidades 14, en donde dichas células pancreáticas o precursores de células pancreáticas son 5-50 % dobles positivas para PDX1/NKX6.1.
- 15 16. El método de cualquiera de las modalidades 1-9, en donde dichas células pancreáticas o precursores de células pancreáticas son 40-80 % dobles positivas para PDX1/NKX6.1.
17. Un precursor de células pancreáticas o células pancreáticas que se obtiene mediante los métodos de las modalidades 1-16.
- 20 18. Una célula pancreática o precursor de células pancreáticas producido al exponer una célula madre pluripotente humana a al menos un compuesto enumerado en las Tablas 1 o 2.
- 25 19. La célula pancreática o precursor de células pancreáticas de la modalidad 18, donde dicho compuesto es LDN-193189.
20. La célula pancreática o precursor de células pancreáticas de la modalidad 18, donde dicho compuesto es el inhibidor de JNK II.
- 30 21. La célula pancreática o precursor de células pancreáticas de la modalidad 18, donde dicho compuesto es AM580.
22. La célula pancreática o precursor de células pancreáticas de la modalidad 18, donde la célula pancreática o precursor de células pancreáticas se produce al exponer la célula madre a al menos un compuesto en combinación con al menos un agente adicional.
- 35 23. La célula pancreática o precursor de células pancreáticas de la modalidad 22, donde dicho LDN-193189 se combina con el inhibidor de JNK II y AM580.
- 40 24. La célula pancreática o precursor de células pancreáticas de la modalidad 22, donde dicho LDN-193189 se sigue por la exposición a la ciclopamina.
25. La célula pancreática o precursor de células pancreáticas de la modalidad 22, donde dicho LDN-193189 es seguido por la exposición a IWP2.
- 45 26. La célula pancreática o precursor de células pancreáticas de la modalidad 22, donde dicho compuesto es el inhibidor de JNK II en combinación con un agonista del receptor de ácido retinoico que se enumera en la Tabla 2.
27. La célula pancreática o precursor de células pancreáticas de la modalidad 22, donde el inhibidor de JNK II se encuentra en combinación con AM580.
- 50 28. La célula pancreática o precursor de células pancreáticas de la modalidad 22, donde el inhibidor de JNK II se encuentra en combinación con AM580 y bFGF.
29. La célula pancreática o precursor de células pancreáticas de la modalidad 28, en donde bFGF es FGF2, FGF7 o FGF10.
- 55 30. La célula pancreática o precursor de células pancreáticas de la modalidad 29, donde bFGF es FGF7.
31. Uso de un compuesto de las Tablas 1 o 2 para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de células madre.
- 60 32. Uso del inhibidor de JNK II para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de células madre.
- 65 33. Uso del inhibidor de JNK II en combinación con un agonista del receptor de ácido retinoico para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de células madre.

34. Uso del inhibidor de JNK II en combinación con AM580 para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de células madre.
- 5 35. Uso de LDN-193189 para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de células madre.
36. Uso de LDN-193189 seguido por Ciclopamina o IWP2 para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de células madre.
- 10 37. Uso de LDN-193189 seguido por ciclopamina para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de células madre.
38. Uso de LDN-193189 seguido por IWP2 para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de células madre.
- 15 39. Uso de LDN-193189 seguido por la combinación con el inhibidor de JNK II, AM580 y bFGF para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de células madre.
- 20 40. Uso de LDN-193189 seguido por una combinación de inhibidor de JNK II, AM580, LDN-193189 y bFGF para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de células madre.
41. Uso de LDN-193189 seguido por una combinación de inhibidor de JNK II, AM580, LDN-193189, bFGF y Ciclopamina o IWP2 para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de células madre.
- 25 42. Uso de LDN-193189 seguido por una combinación de inhibidor de JNK II, AM580, LDN-193189, bFGF y Ciclopamina para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de células madre.
43. Uso de LDN-193189 seguido por una combinación de inhibidor de JNK II, AM580, LDN-193189, bFGF e IWP2 para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de células madre.
- 30 44. Un método para producir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas que expresan al menos 5 % dobles positivos para PDX1/NKX6.1, que comprende exponer células endodérmicas definitivas a una cantidad efectiva de al menos uno de los compuestos de cada uno de los grupos siguientes:
- 35 a. inhibidor de BMP, y
b. Inhibidores de quinasas, y
c. Agonistas del receptor de ácido retinoico
- para diferenciar las células endodérmicas definitivas en precursores de las células pancreáticas o células pancreáticas.
- 40 45. El método de la modalidad 44 en donde el inhibidor de BMP es LDN-193189.
46. El método de la modalidad 44 en donde el agonista del receptor de ácido retinoico es AM580.
- 45 47. El método de la modalidad 44 en donde el agonista del receptor de ácido retinoico es un derivado de ácido retinoico.
48. El método de la modalidad 44 en donde el inhibidor de quinasa es un isómero de 1,9-pirazoloantrona con o sin N-alkilación.
- 50 49. El método de la modalidad 44 en donde el inhibidor de quinasa es el inhibidor de JNK II y está en combinación con AM580.
50. El método de la modalidad 44 en donde dichos inhibidores de quinasas y agonistas del receptor de ácido retinoico se combinan en con bFGF.
- 55 51. El método de la modalidad 44 en donde dichos inhibidores de quinasas y agonistas del receptor de ácido retinoico se combinan con FGF7 o FGF10.
- 60 52. El método de las modalidades 44-46, que comprende una primera etapa de exposición de las células endodérmicas definitivas a una cantidad efectiva de LDN-193189, sin bFGF, y una segunda etapa de exposición al inhibidor de JNK II en combinación con AM580, en presencia de bFGF.
- 65 53. El método de las modalidades 44-46, que comprende exponer las células endodérmicas definitivas a una cantidad efectiva de LDN-193189, seguido de la exposición a al menos un compuesto del grupo que consiste en:

un inhibidor de wnt, tal como IWP2, y/o
un inhibidor de Hedgehog, tal como ciclopamina

5 54. El método de cualquiera de las modalidades 44-53, en donde dichas células pancreáticas o precursores de células pancreáticas son al menos 5%, al menos 10%, 10-30%, 10-40%, 5-70%, 10-80% o 5-100% dobles positivas para PDX1/NKX6.1.

10 55. Una célula pancreática o precursor de células pancreáticas que puede obtenerse por el uso *in vitro* de los métodos de las modalidades 44-54.

56. Una célula pancreática o precursor de células pancreáticas producida por la exposición *in vitro* de las células endodérmicas definitivas a un inhibidor de quinasa dirigido a JNK1, 2 o 3, o Src o GSK-3 o P38 MAPK o P38 quinasa o Rho quinasa o MEK o Chk2 o VEGFR1, 2 o 3 o PDGFRb o KDR/Fik-1.

15 57. Una célula pancreática o precursor de células pancreáticas producida por el método de la modalidad 56 donde el inhibidor de quinasa es el inhibidor de JNK II y en donde las células endodérmicas definitivas también se exponen a al menos uno de los siguientes compuestos:

20 LDN-193189,
un inhibidor de Wnt,
un inhibidor de Hedgehog,
un agonista del receptor de ácido retinoico.

25 58. La célula pancreática o precursor de células pancreáticas de la modalidad 56 en donde las células endodérmicas definitivas se exponen al inhibidor de JNK II en combinación con un agonista del receptor de ácido retinoico enumerado en la Tabla 2.

30 59. Uso de un compuesto inhibidor de quinasa de la Tabla 1 o 2 para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de un precursor de endodermo pancreático.

60. Uso del inhibidor de JNK II y LDN-193189 en combinación para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de un precursor de endodermo pancreático.

35 61. Uso del inhibidor de JNK II en combinación con un agonista del receptor de ácido retinoico para inducir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas a partir de un precursor de endodermo pancreático.

Métodos generales

Cultivo in vitro de células madre pluripotentes

40 Las células madre embrionarias humanas (hES) de la línea celular de referencia SA121 y las células madre pluripotentes humanas inducidas (hiPSC) chIPS4 (Collectis) se cultivaron en medio de cultivo DEF-CS (Collectis) en frascos de cultivo T75. Las células se pasaron de célula única con 5 µM de inhibidor de Rock Y-27632 (Sigma #Y0503) y se sembraron a una densidad de 40 000 células/cm² para los experimentos. Las células se cultivaron a 37 °C y 5 %
45 de CO₂ en una incubadora humidificada (ThermoScientific Modelo 371).

Diferenciación in vitro de células madre pluripotentes en endodermo definitivo

50 Los cultivos confluentes de células hES de la línea celular de referencia SA121 y hiPSC (chIPS4) se lavaron una vez en RPMI1640 (Gibco #61870) y se trataron con 3 µM de CHIR99021 (Axon#1386) en RPMI1640. Después de 24 horas las células se lavaron con RPMI1640 y se trataron con 100 ng/ml de Activina A (Peprotech #120-14E) en RPMI1640. 24 horas más tarde, se añadió 2 % de B27 (Invitrogen #17504-044) al medio de Activina A durante 2 días con cambio diario de medio. Las células se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ en una incubadora humidificada durante la diferenciación.
55

Siembra de endodermo definitivo derivado de células hES y hiPS₂

60 Las células DE derivadas de las células de la línea celular de referencia ES humana y las células DE derivadas de las células iPS humanas se lavaron en PBS-/- y se tripsinizaron durante 5 min. mediante el uso de Tryple Select (Invitrogen, 12563-029). Las células DE se suspendieron cuidadosamente en RPMI1640 y se lavaron una vez antes de que se resuspendieran en medio de siembra DE (Activina A 100 ng/ml, 2 % B27, RPMI1640, 0,1 % PEST (Gibco #15140)). Las células DE se sembraron a 200 000 cm² en placas ópticas de 96 pocillos (BD Bioscience), y la diferenciación de PE mediante el uso de compuestos de selección se inició al día siguiente.
65

Análisis

En el día 8 o 14 de la diferenciación de PE, los medios se aspiraron seguido por la fijación de las células a temperatura ambiente durante 30 min con paraformaldehído al 4 % (VWR, 97.131.000). Las células se lavaron con PBS y se permeabilizaron con 0,5 % de Triton X-100 (Sigma, 9002-93-1) durante 10 min, se lavaron y se bloquearon en amortiguador de TNB al 0,5 % (Perkin Elmer) durante 30 min a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios de ratón anti-NKX6.1 (Abcore#A55F12) y anti-PDX1 de cabra (Abcam#47383) se diluyeron 1:500 y 1:8000, respectivamente, en 0,1 % de Triton X-100 en PBS y se añadieron a cada pocillo para incubación durante toda la noche a 4 °C. Las células se lavaron tres veces con PBS. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Applichem, A4099.0010) y los anticuerpos secundarios, Alexa Fluor 488 de burro anti-cabra y Alexa Fluor 594 de burro anti-ratón (ambos Invitrogen) se diluyeron 1:1000 en 0,1 % de Triton X-100 en PBS y se añadieron a cada pocillo durante 45 min. Las células se lavaron cinco veces y se dejaron en 200 µl de PBS para la obtención de las imágenes. La obtención de imágenes se realizó mediante el uso del Analizador InCell 2000 (GE Healthcare). Se capturaron 4 campos por pocillo con objetivo de 10x. El número total de células basado en el conteo por tinción con DAPI y el número de células dobles positivas para NKX6.1/PDX1 se determinó mediante el uso de InCell Developer Toolbox 1.8 (GE Healthcare). La fracción de células dobles positivas para NKX6.1/PDX1 se normalizó con respecto a la referencia en cada placa y se calculó el % de efecto. Los valores por encima del 200 % de efecto se categorizaron como aciertos.

EJEMPLOS

El endodermo pancreático se caracteriza por la coexpresión de dos factores de transcripción, NKX6.1 y PDX1. Muchos de los protocolos publicados para obtener PE no son efectivos con un resultado bajo de células dobles para NKX6.1/PDX1. Mejorar la eficacia de los protocolos de PE es un resultado conveniente. Por lo tanto analizamos bibliotecas de moléculas pequeñas para identificar compuestos novedosos que mejorarían los protocolos de PE existentes. Esto se hizo suponiendo que los inhibidores, agonistas o antagonistas pueden regular las vías de señalización, o la accesibilidad cromosómica, lo que mejoraría la fracción de células dobles positivas para NKX6.1/PDX1.

Ejemplo 1 - Selección de moléculas pequeñas que inducen la coexpresión de NKX6.1/PDX1

Moléculas pequeñas

En la selección se incluyeron cuatro bibliotecas diferentes; una biblioteca de inhibidor de quinasas (Calbiochem #539743), una biblioteca de lípidos bioactivos (Enzo Life Sciences núm. BML-2800), una biblioteca de ligando del receptor nuclear (Enzo Life Sciences núm. BML-2802) y una biblioteca de inhibidor de fosfatasa (Enzo Life Sciences núm. BML-2834). Los compuestos dentro de la biblioteca bioactiva se probaron a 1 µM y 0,1 µM. Los compuestos de las otras bibliotecas se analizaron a 10 µM y 1 µM. En un segundo enfoque de selección basado en candidatos, se incluyeron moléculas pequeñas que se dirigen a las vías principales de señalización involucradas en el desarrollo del páncreas.

Selección de NKX6.1/PDX1

Los compuestos de la biblioteca se seleccionaron sobre una formulación de medio basada en bFGF para producir PE (Ameri y otros. 2010) (RPMI1640, Gibco#61870; 12% KOSR, Gibco#10828; 0.1% PEST, Gibco#15140; 64 ng/ml bFGF, Peprotech #100-18B).

El enfoque de selección de PE de la biblioteca se dividió en una fase temprana y una tardía (Figura 1).

En la fase temprana, los compuestos se probaron en la parte superior del medio de PE durante los primeros siete días de diferenciación de PE, y después la diferenciación continuó durante seis días adicionales mediante el uso de medios de PE sin compuestos.

En la fase tardía, las células DE se diferenciaron en el medio de PE durante los primeros siete días. En los siguientes seis días los compuestos se analizaron sobre el medio de PE. 12 pocillos de control positivo (medio PE) y 12 pocillos de control negativo (medio PE sin bFGF) se incluyeron en cada placa de 96 pocillos. El cambio de medio se realizó diariamente. Los aciertos identificados en la selección de fase temprana se ilustran en la Figura 2 y se enumeran en la Tabla 1. Los aciertos identificados en la selección de fase tardía se ilustran en la Figura 3 y se enumeran en la Tabla 2.

Los compuestos del enfoque de candidatos se seleccionaron en medio basal (RPMI1640, Gibco#61870; 12% KOSR, Gibco#10828; 0.1% PEST, Gibco#15140) sin la adición de bFGF. Esta selección de enfoque de candidatos se dividió en dos partes (Figura 4). En la primera parte, los compuestos se probaron en intervalos de tiempo con incrementos de 2 días durante los primeros ocho días de diferenciación de PE (exposición de 2 días a los compuestos seguido por 6 días de medio basal o exposición de 4 días a los compuestos seguido por 4 días de medio basal o exposición de 6 días a los compuestos seguido por 2 días de medio basal o exposición de 8 días a los compuestos).

Una placa se fijó después de estos 8 días y se analizó para determinar la expresión de PDX1 y NKX6.1. Una segunda placa se diferenció adicionalmente durante seis días más mediante el uso del protocolo de PE publicado (Ameri y otros. (2010)).

5 En la segunda parte, las células DE se diferenciaron de acuerdo con los compuestos de aciertos de la primera parte, los compuestos de los 6-10 días siguientes se probaron en medio basal.

El protocolo de referencia (Ameri y otros (2010)) sirvió como un control.

10 El cambio de medio se realizó diariamente en ambos experimentos de primera y segunda parte.

Los aciertos identificados en el enfoque de selección de candidatos se ilustran en la Figura 5 y también se incluyen en las Tablas 1 y 2.

15 Ejemplo 2 - Combinación de aciertos de moléculas pequeñas que inducen la coexpresión de NKX6.1/PDX1

Combinación de aciertos del enfoque de selección candidatos con los aciertos del enfoque de biblioteca

20 Las células DE se expusieron a 4 días de 50 nM de LDN-193189, seguido por 8 días de AM580 (AH Diagnostics, BML GF104 0025), inhibidor de JNK II (Calbiochem, 420119), 50 nM de LDN-193189 y 64 ng/ml de FGF2, o AM580, inhibidor de JNK II, 50 nM de LDN-193189, 64 ng/ml de FGF2 y IWP2, o AM580, inhibidor de JNK II, 50 nM de LDN-193189, 64 ng/ml de FGF2 y Ciclopamina (Figura 6). El cambio de medio se realizó diariamente.

25 Ejemplo 3 - Confirmación de moléculas pequeñas que inducen la coexpresión de NKX6.1/PDX1 en células madre pluripotentes inducidas humanas

Los compuestos de aciertos (Tablas 1 y 2) se seleccionaron sobre una formulación de medio basada en bFGF para producir PE (Ameri y otros. 2010) (RPMI1640, Gibco#61870; 12 % KOSR, Gibco#10828; 0,1% PEST, Gibco#15140; 64 ng/ml bFGF, Peprotech #100-18B).

30 La selección se dividió en una fase temprana y una tardía (Figura 1). En la fase temprana, los compuestos se probaron sobre el medio de PE durante los primeros siete días de diferenciación de PE, y después se continuó durante seis días adicionales mediante el uso de medios de PE sin los compuestos. En la fase tardía, las células DE se diferenciaron en el medio de PE durante los primeros siete días. En los siguientes seis días los compuestos se probaron sobre el medio de PE. Se incluyeron doce pocillos de control positivo (medio PE) y 12 pocillos de control negativo (medio PE sin bFGF) en cada placa de 96 pocillos. El cambio de medio se realizó diariamente.

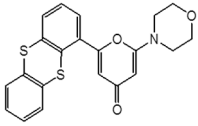
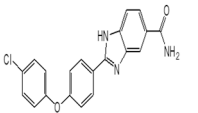
Los valores por encima del 200 % de efecto se categorizaron como un acierto (Figura 2 y Figura 3).

40 La Tabla 1 muestra los compuestos de acierto tempranos.

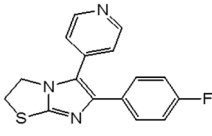
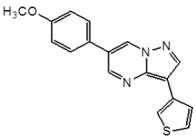
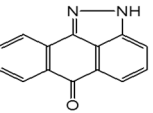
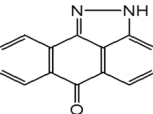
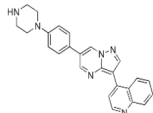
Los compuestos que potencian la fracción de células dobles positivas para NKX6.1/PDX1 más de 200 % comparados con el medio de PE. Se indica la biblioteca, la ubicación del compuesto dentro de la biblioteca, la diana, la estructura química, la concentración del acierto y el porcentaje de células dobles positivas para PDX1/NKX6.1.

45

Tabla 1. Coincidencias de la fase temprana.

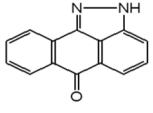
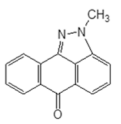
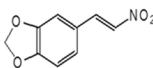
Biblioteca	Ubicación en la placa	Diana	Inhibidor	Estructura	Concentración
Inhibidor de quinasa	B3	ATM Quinasa	Inhibidor de ATM Quinasa		10 µM
Inhibidor de quinasa	D18	Chk2	Chk2 Inhibidor II		10 µM

65

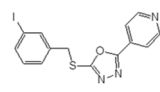
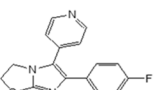
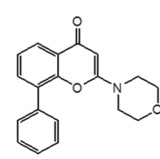
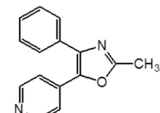
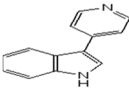
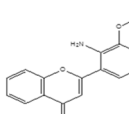
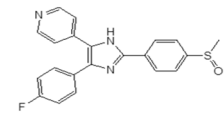
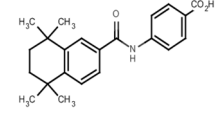
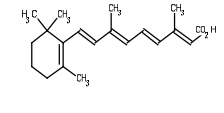
5	Inhibidor de quinasa	N15	P38 MAPK	SKF-86002		10 µM
10	Inhibidor de quinasa	P20	KDR/FIK-1, VEGFR-2, PDGFRb, VEGFR-1, VEGFR-3	VEGF Inhibidor IV de la Quinasa del Receptor 2		10 µM
15	Inhibidor de quinasa	H22	JNK1, JNK2, JNK3	Inhibidor de JNK II		10 µM
20	Inhibidor de quinasa	H22	JNK1, JNK2, JNK3	Inhibidor de JNK II		1 µM
30	Inhibidor de BMP Selección de Candidatos	Enfoque de candidatos	ALK2, ALK3, ALK6	LDN-193189		50 nM/100 nM

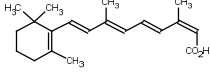
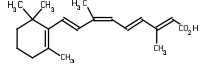
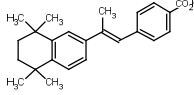
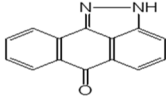
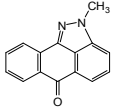
35 La Tabla 2 muestra compuestos de aciertos tardíos. Los compuestos que potencian la fracción de células dobles positivas para NKX6.1/PDX1 más de 200 % comparados con el medio de PE. Se indica la biblioteca, la ubicación del compuesto dentro de la biblioteca, la diana, la estructura química, la concentración del acierto y el porcentaje de células dobles positivas para PDX1/NKX6.1.

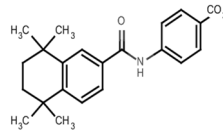
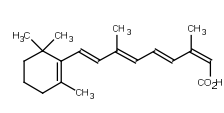
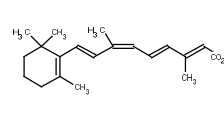
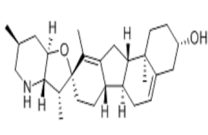
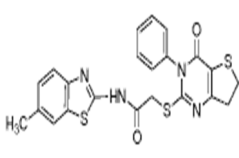
40 Tabla 2. Coincidencias de la fase tardía.

	Biblioteca	Ubicación en la placa	Diana	Inhibidor	Estructura	Concentración
45	Inhibidor de quinasa	H22	JNK1, JNK2, JNK3	Inhibidor de JNK II		10 µM
50	Inhibidor de quinasa	J4		Inhibidor de JNK, control negativo		10 µM
60	Inhibidor de quinasa	P5	syc, src	Inhibidor de Syk III		10 µM

65

5	Inhibidor de quinasa	F20	GSK-3	Inhibidor II de GSK-3b		10 µm
10	Inhibidor de quinasa	N15	P38 MAPK	SKF-86002		10 µm
15	Inhibidor de quinasa	J14	PI3-quinasa	LY 294002		10 µm
20	Inhibidor de quinasa	N14	P38 MAPK	SC-68376		10 µm
25	Inhibidor de quinasa	N6	Rho Quinasa	Inhibidor de Rho Quinasa III, Rockout		10 µm
30	Inhibidor de quinasa	L5	MEK	PD 98059		10 µm
35	Inhibidor de quinasa	N11	P38 MAPK	SB 203580		10 µm
40	Lípidos bioactivos	2-E09	RAR	AM-580		1 µM
45	Lípidos bioactivos	2-E05	RAR	ÁCIDO RETINOICO, TODO TRANS		1 µM

5	Lípidos bioactivos	2-E07	RAR/ RXR	13-CIS ÁCIDO RETINOICO		1 μM
10						
15	Lípidos bioactivos	2-E06	RAR/ RXR	9-CIS ÁCIDO RETINOICO		1 μM
20						
25	Lípidos bioactivos	2-E10	RAR	TTNPB		1 μM
30						
35						
40	Inhibidor de quinasa	H22	JNK1, JNK2, JNK3	Inhibidor de JNK II		1 μM
45						
50	Inhibidor de quinasa	J4		Inhibidor de JNK, control negativo		1 μM
55						
60						

5	Lípidos bioactivos	2-E09	RAR	AM-580		0,1 μM
10						
15	Lípidos bioactivos	2-E07	RAR/ RXR	13-CIS ÁCIDO RETINOICO		0,1 μM
20						
25	Lípidos bioactivos	2-E06	RAR/ RXR	9-CIS ÁCIDO RETINOICO		0,1 μM
30						
35						
40	Selección de candidatos Inhibidor de la vía de Hedgehog		Smoothened (SMO)	Ciclopamina		1 μM / 5 μM
45						
50	Selección de candidatos Inhibidor de la vía de Wnt		Porcupina O-aciltransferasa	IWP2		1 μM / 5 μM
55						
60						

Referencias

Ameri y otros. (2010) Stem Cells, 28:45-56

Cai J. y otros (2010). J Mol Cell Biol., febrero;2(1):50-60

- Chung Y. y otros (2006). *Nature*, 12 de enero de 439(7073):216-9
- D'Amour K. A. y otros. (2006). *Nat Biotechnol*, 24: 1392-401
- 5 Heins N. y otros. (2004). *Stem Cells*, 22(3):367-76
- Jiang J. y otros. (2007). *Stem Cells*, 25:1940-53
- Kroon E. y otros. (2008). *Nat Biotechnol*, 26:443-452
- 10 Klimanskaya I. y otros. (2006). *Nature*, 23 de noviembre;444(7118):481-5
- Kunisada Y. y otros. (2012). *Stem Cell Res*, 8(2):274-84
- 15 Schulz TC. y otros. (2012). *PLoS One*, 7(5):e37004
- Takahashi K. y otros. (2007). *Cell*, 131:861-72
- Takahashi K. y Yamanaka S. (2006). *Cell*, 126(4):663-76
- 20 Thomson JA. y otros (1998). *Science*, noviembre 6;282(5391):1145-7
- Wernig, M. y otros. (2007). *Nature*, 448:318-24
- 25 Zhang D. y otros (2009). *Cell Research*, 19:429-438

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir células pancreáticas o precursores de células pancreáticas donde al menos 5 % de las células coexpresan PDX1 y NKX6.1, que comprende exponer las células endodérmicas definitivas a una cantidad efectiva de al menos un compuesto de cada uno de los grupos siguientes:
- 10 a. inhibidor de BMP, y
b. Inhibidores de quinasas, y
c. Agonistas del receptor de ácido retinoico
- 15 para diferenciar las células endodérmicas definitivas en células pancreáticas o precursores de células pancreáticas, en donde el inhibidor de quinasa es 1,9-pirazoloantrona (inhibidor de JNK II) que incluye isómeros o tautómeros de 1,9-pirazoloantrona con o sin N-alquilación y se combina con el agonista del receptor de ácido retinoico AM580.
- 20 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el inhibidor de BMP es LDN-193189.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dichos inhibidores de quinasas y agonistas del receptor de ácido retinoico se combinan con bFGF.
- 25 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dichos inhibidores de quinasas y agonistas del receptor de ácido retinoico se combinan con FGF7 o FGF10.
5. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, que comprende una primera etapa de exposición de las células endodérmicas definitivas a una cantidad efectiva de LDN-193189, sin bFGF, y una segunda etapa de exposición al inhibidor de JNK II en combinación con AM580, en presencia de bFGF.
- 30 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde al menos 10 %, 10-30 %, 10-40 %, 5-70 %, 10-80 % o 5-100 % de las células coexpresan PDX1 y NKX6.1.

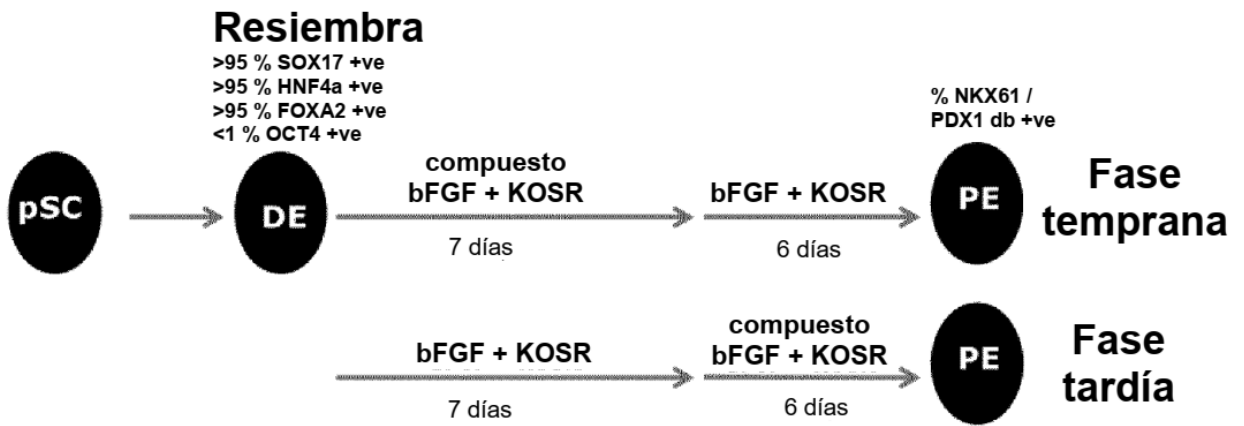


Figura 1/6

Aciertos de la fase temprana

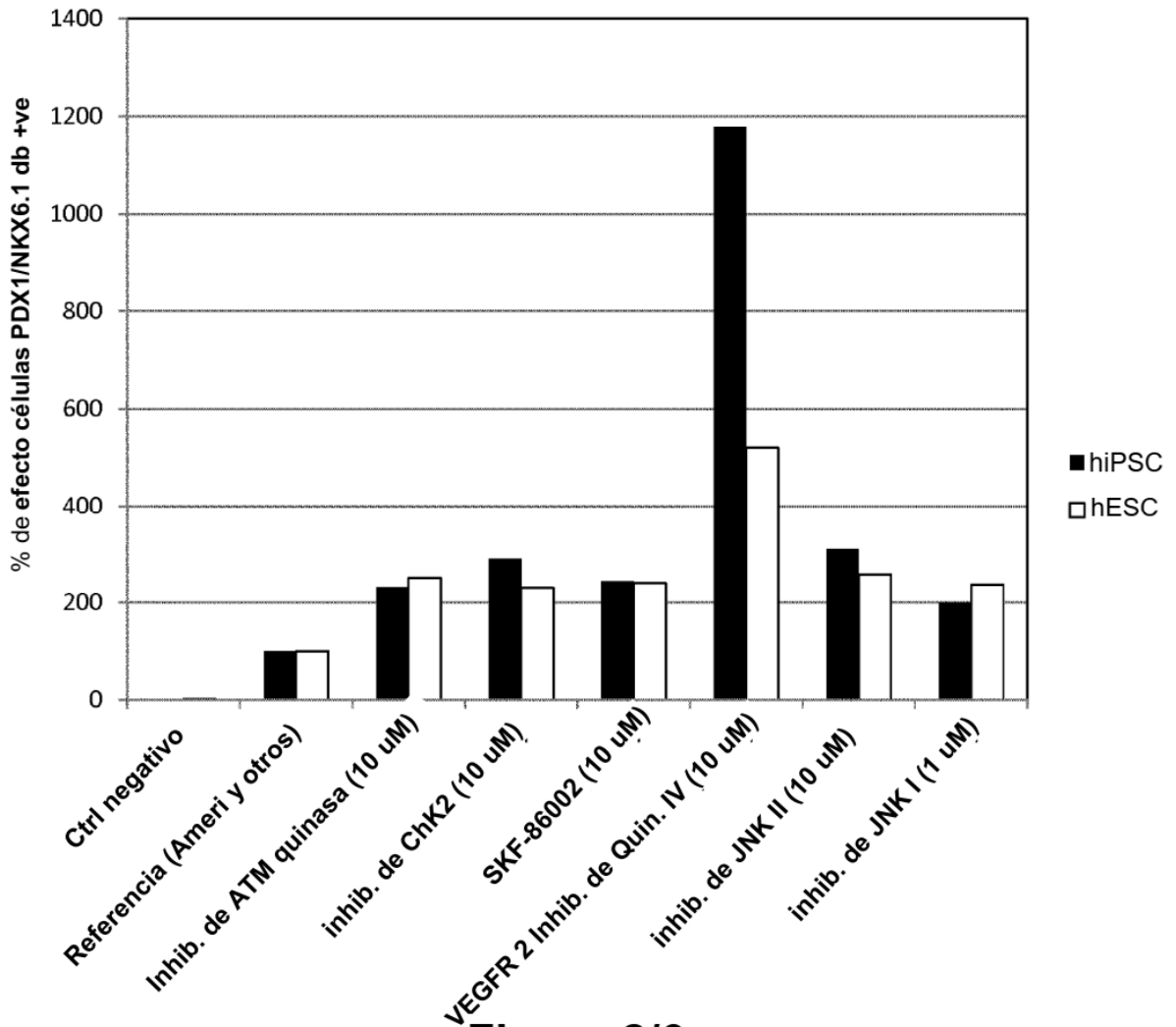


Figura 2/6

Aciertos de la fase tardía

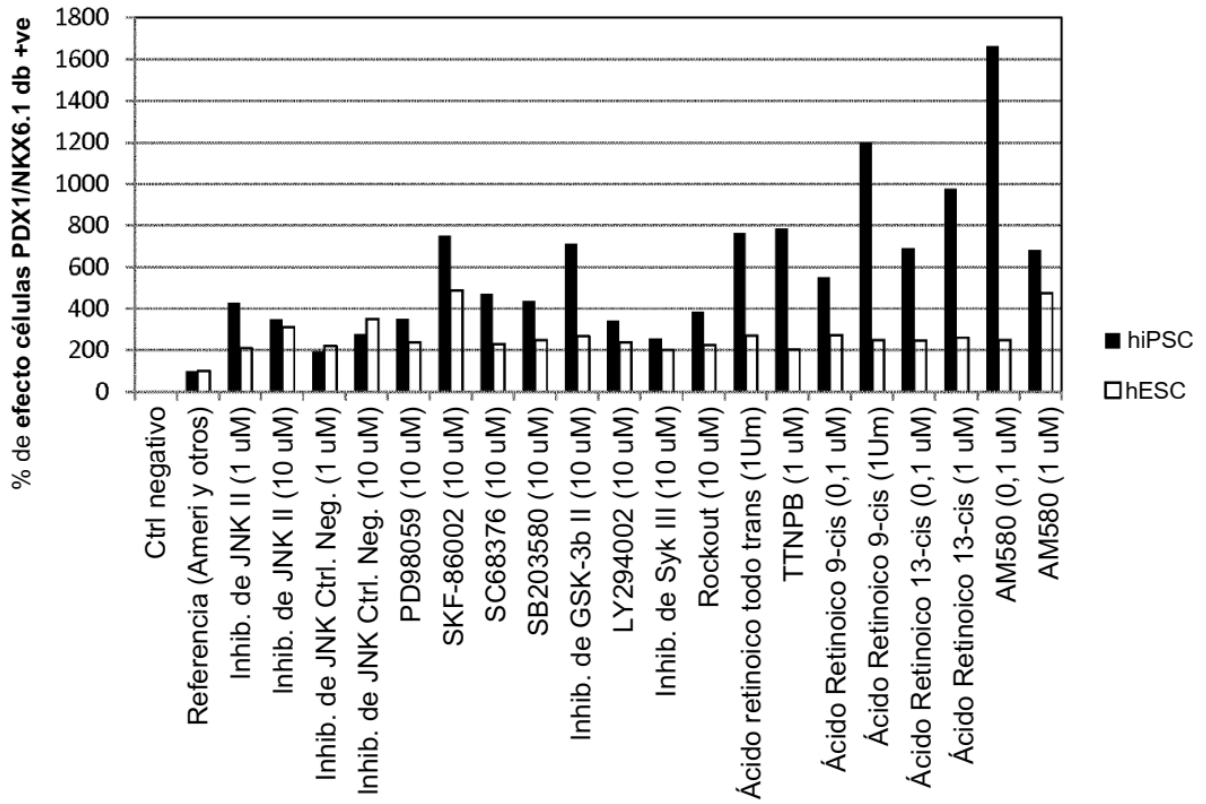


Figura 3/6

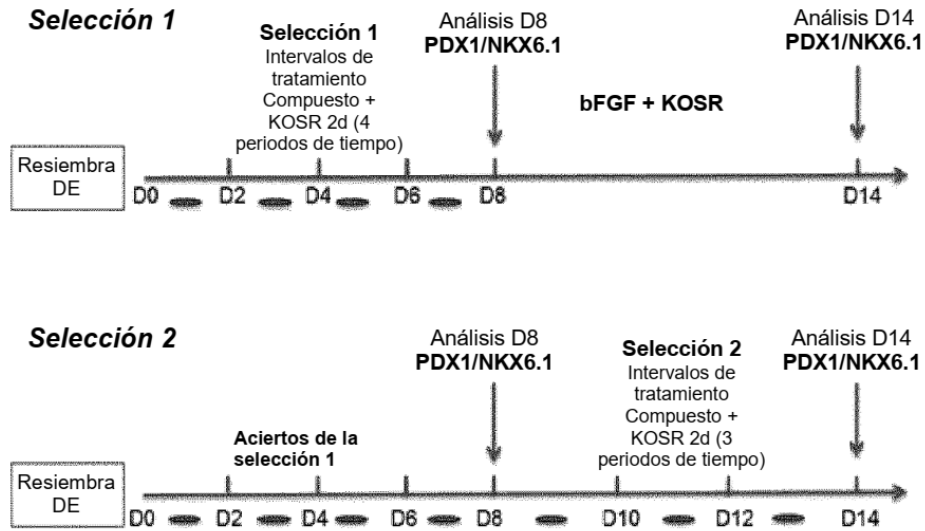


Figura 4/6

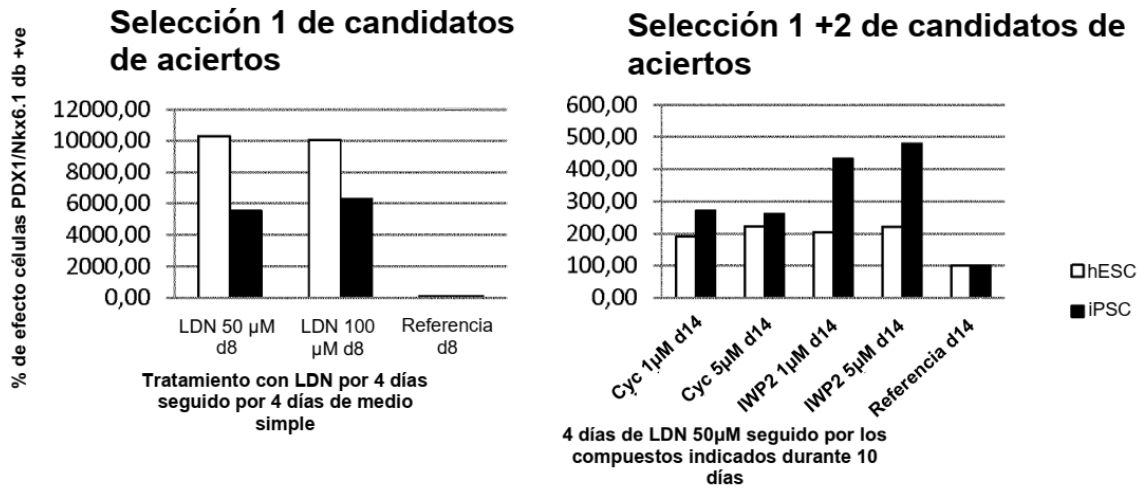


Figura 5/6

Combinación de aciertos tempranos y tardíos

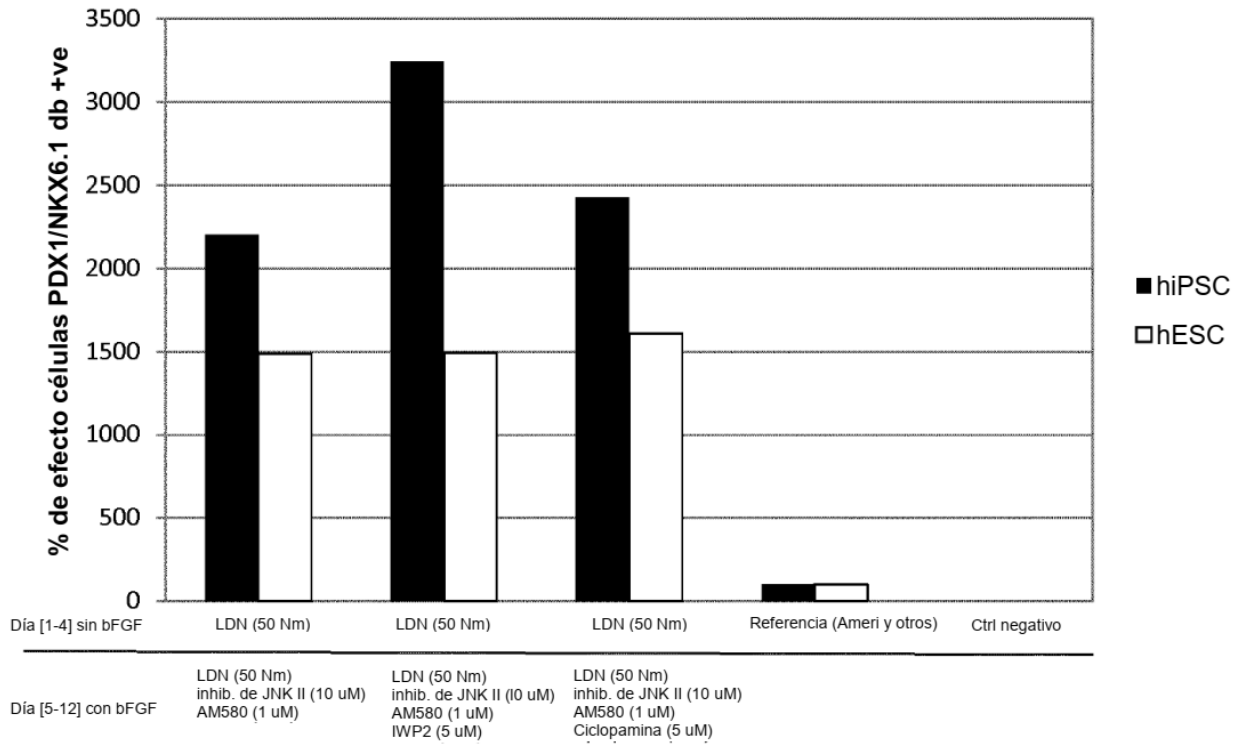


Figura 6/6