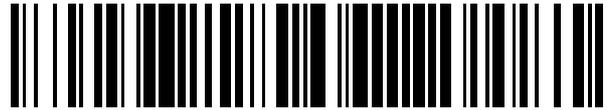


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 967**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/073 (2010.01)
C12P 21/02 (2006.01)
A61K 35/39 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2013 PCT/CA2013/000432**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO13163739**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2013 E 13784648 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2844739**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para generar progenitores pancreáticos y células beta funcionales a partir de hPSC**

30 Prioridad:

30.04.2012 US 201261640366 P

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

12.03.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITY HEALTH NETWORK (100.0%)
101 College Street Suite 150
Toronto, Ontario M5G 1L7, CA**

72 Inventor/es:

**KELLER, GORDON;
NOSTRO, MARIA CRISTINA;
HOLTZINGER, AUDREY y
SARANGI, FARIDA**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 747 967 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

Procedimientos y composiciones para generar progenitores pancreáticos y células beta funcionales a partir de hPSC

Campo de la descripción

La divulgación se refiere a procedimientos y composiciones para producir células progenitoras pancreáticas positivas NKX6-1 y células beta pancreáticas funcionales.

Antecedentes de la invención

La capacidad de generar células progenitoras pancreáticas a partir de células madre pluripotentes humanas (hPSC; incluidas las células madre embrionarias; hESC y células madre pluripotentes inducidas; hiPSC) puede proporcionar una fuente de células endocrinas, exocrinas y ductales humanas para: 1) toxicología predictiva de fármacos y descubrimiento de fármacos, 2) trasplante para el tratamiento de la diabetes y 3) modelar el desarrollo pancreático normal y el desarrollo de diabetes *in vitro*. Darse cuenta de esto requiere la capacidad de generar de manera reproducible poblaciones altamente enriquecidas de células progenitoras pancreáticas de diferentes líneas celulares hESC e hiPSC y poder promover su maduración a células beta productoras de insulina *in vitro* e *in vivo*. Publicaciones anteriores han informado que es posible generar células productoras de insulina a partir de hPSC, sin embargo, las células generadas eran poli hormonales. Los análisis de estas células productoras de insulina indican que no expresan NKX6-1, un factor clave de transcripción esencial para el desarrollo de células beta funcionales. Un estudio demostró la generación de células progenitoras NKX6-1+ a partir de hESC y demostró que después del trasplante a un receptor inmunocomprometido, pueden diferenciarse en células beta funcionales (Kelly et al., 2011). Sin embargo, los datos en este estudio se basan en dos líneas de hESC que tienen una propensión a diferenciarse del linaje pancreático. Cuando esto fue aplicado a otras líneas, el protocolo descrito en el estudio no promovió el desarrollo eficiente de los progenitores NKX6-1+ (Kelly et al., 2011).

Sumario de la invención

Un aspecto de la presente divulgación describe un procedimiento para producir células progenitoras pancreáticas NKX6-1+ a partir de una población de células endodérmicas, en el que el procedimiento comprende poner en contacto a la población de células endodérmicas con un componente de EGF, un componente de nicotinamida y/o un componente de nogina. Un aspecto del procedimiento de acuerdo con la presente invención proporciona un procedimiento para producir células progenitoras pancreáticas NKX6-1+ a partir de una población de células endodérmicas, en el que el procedimiento comprende poner en contacto a la población de células endodérmicas con una combinación de 1) al menos un componente de EGF seleccionado a partir de EGF, un conjugado activo de EGF y un fragmento activo de EGF; y 2) nicotinamida o una sal de la misma, en una cantidad suficiente para inducir la diferenciación de al menos una porción de la población de células endodérmicas en células progenitoras pancreáticas NKX6-1+.

En una realización, el componente EGF comprende EGF y/o conjugados activos y/o fragmentos de los mismos; Anfiregulina (AR) y/o conjugados activos y/o fragmentos de los mismos; Factor de crecimiento transformante (TGF) y/o conjugado activo y/o fragmentos del mismo; Betacelulina (BTC) y/o variantes activas y/o fragmentos de la misma; Epiregulina (EPR) Y/O variantes activas y/o fragmentos de la misma; Neuregulinas (que incluyen, por ejemplo, NRG1, NRG2, 3 NRG4) y/o variantes activas y/o fragmentos de las mismas; y/o combinaciones de dos o más de los mismos. En una realización, el componente de nicotinamida comprende nicotinamida (también conocida como niacinamida y amida de ácido nicotínico), sales, solvatos y conjugados de los mismos; Inhibidores de la poli-(ADP-ribosa) sintetasa, como, por ejemplo, benzamida y/o 3-aminobenzamida (Otonkoski et al., 1993). Los inhibidores de Sir-2, como, por ejemplo, sirtinol, M15, splitomicina (Bitterman et al., 2002); otros inhibidores de HDAC, como, por ejemplo, AN-9, CI-994, FK228, LAQ-824, MS275, SAHA, ácido valproico, TSA, butirato de sodio (Bitterman et al., 2002), y/o combinaciones de dos o más de los mismos.

En una realización, el componente de nogina comprende una o más noginas y/o conjugados activos y/o fragmentos de los mismos; BMPR1A y/o conjugados activos y/o fragmentos de los mismos; BMPR1B y/o conjugados activos y/o fragmentos de los mismos; dorsomorfina y/o sales o solvatos de los mismos; LDN 193189 también conocido como "DM-3189" y/o sales y/o solvatos de los mismos; cordina y/o conjugados activos y/o fragmentos de los mismos; y/o cualquier combinación de dos o más de los mismos.

En una realización, la combinación comprende al menos un componente de nogina; al menos un componente de EGF y al menos un componente de nicotinamida.

En una realización, la combinación de al menos un componente de nogina; al menos un componente de EGF y al menos un componente de nicotinamida comprende nogina, EGF y nicotinamida (por ejemplo, NENA).

En una realización, el procedimiento comprende además poner en contacto las mencionadas células con un componente de Exendina-4.

En una realización, el procedimiento induce a la diferenciación de al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50% o al menos el 55% de la población de células endodérmicas en células progenitoras pancreáticas NKX6-1+

En una realización, el procedimiento comprende primero la producción de una población de células endodérmicas.

En una realización, el procedimiento para producir la población de células endodérmicas comprende uno o más de los pasos (o subpasos) a, b y c; y el paso d, los pasos comprenden:

a) Poner en contacto una población de células madre pluripotentes con una combinación de:

I) un agonista nodal, opcionalmente ActA y un agonista de señalización wnt, opcionalmente, Wnt3a o CHIR 99021;

II) un agonista nodal, opcionalmente ActA, un agonista de FGF, opcionalmente bFGF y opcionalmente un agonista de señalización wnt, opcionalmente Wnt3a CHIR 99021; y

III) un agonista nodal, opcionalmente ActA y un agonista de FGF, opcionalmente bFGF;

para producir células diferenciadas en la Etapa 1;

b) Poner en contacto las células diferenciadas en la Etapa 1 con un agonista de FGF, opcionalmente FGF10, y opcionalmente un agonista de señalización de Wnt, opcionalmente Wnt3a y/o un componente de nogina, opcionalmente dorsomorfin, para producir células diferenciadas en la Etapa 2;

c) Poner en contacto a las células diferenciadas en la Etapa 2 con un componente de nogina, opcionalmente nogina, ácido retinoico (RA) o análogo de RA, y opcionalmente ciclopamina-KAAD (Cyc), un agonista de FGF, opcionalmente FGF10 y/o un componente de Exendina-4, opcionalmente Exendina-4 para proporcionar una población de células endodérmicas; y

d) Poner en contacto a la población de células endodérmicas con un componente de EGF, un componente de nicotinamida y/o un componente de nogina, opcionalmente una combinación que comprende al menos un componente de EGF y al menos un componente de nicotinamida en una cantidad suficiente para inducir la diferenciación de al menos una porción de la población de células endodérmicas en células progenitoras pancreáticas NKX6-1+.

En una realización, la combinación para producir las células progenitoras pancreáticas NKX6-1 comprende además al menos un componente de nogina.

Otro aspecto descrito en el presente documento incluye un procedimiento para generar células productoras de insulina NKX6-1+ que comprende:

a) La producción de una población de células que comprende células progenitoras pancreáticas positivas para NKX6-1 de acuerdo con un procedimiento descrito en este documento; y

b) La introducción de la población de células, o una población enriquecida o aislada NKX6-1 en un sujeto.

Otro aspecto descrito en el presente documento incluye un procedimiento para generar células productoras de insulina que comprende:

a) Generar una población de células que comprenden células progenitoras pancreáticas positivas NKX6-1;

b) Co-cultivar las células progenitoras pancreáticas positivas NKX6-1 con células endoteliales CD34+ durante un período de tiempo suficiente para obtener células productoras de insulina, opcionalmente células productoras de insulina positivas NKX6-1.

En una realización de la presente invención, el procedimiento comprende además enriquecer o aislar una población de células positivas NKX6-1.

En otra realización de la presente invención, el paso de enriquecimiento o aislamiento comprende poner en contacto a la población de células con un anticuerpo de detección de epítipo HPx y aislar o purificar parcialmente la subpoblación ligada de células HPx1 y / o HPx2.

Otro aspecto incluye una población celular positiva NKX6-1 enriquecida y/o aislada producida de acuerdo con el procedimiento descrito en este documento y un diluyente adecuado.

En una realización, la población de células positivas NKX6-1 enriquecida o aislada comprende al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o hasta aproximadamente el 95% de células positivas NKX6-1.

Otro aspecto más descrito incluye una composición de suplemento de medio de cultivo que comprende un componente de EGF, un componente de Nicotinamida y/o un componente de nogina y opcionalmente un componente de Exendina-4.

También se proporciona en otro aspecto descrito una composición de medio de cultivo que comprende un medio base y un suplemento de medio de cultivo descrito en este documento.

Una realización descrita adicionalmente incluye un kit que comprende:

a) un componente de EGF,

b) un componente de nicotinamida; y/o

c) un componente de nogina.

También se describen composiciones que comprenden y usos de la población de células para toxicología predictiva de drogas y detección de drogas, trasplante, tratamiento de diabetes, ingeniería de tejidos y/o modelos de enfermedades.

Otras características y ventajas de la presente divulgación se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferentes de la divulgación solo se dan a modo de ilustración.

Breve descripción de los dibujos

Ahora se describirá una realización de la presente divulgación en relación con los dibujos en los que:

Figura 1 es un esquema de un ejemplo de un protocolo de diferenciación pancreática;

Figura 2 es un gráfico que demuestra el porcentaje de células NKX6-1:GFP+ inducidas a partir de células derivadas de hESC después del tratamiento con nogina, EGF, Nicotinamida (NENA) y Exendina-4;

Figura 3 es una serie de gráficos que demuestran los niveles de expresión de ARNm de NKX6-1, PDX1, PTF1A y SOX9 en un estudio de muestra;

Figura 4A es un gráfico que demuestra que al usar la línea NKX6-1^{GFP/w} HESC, el porcentaje de células NKX6-1:GFP+ es más alto cuando las células endodérmicas se cultivan en presencia de Nogina, EGF, Nicotinamida (con o sin Exendina-4), en comparación con ningún tratamiento o varias combinaciones de los compuestos anteriores.

Figura 4B es un gráfico que demuestra que al usar la línea H1 (WA01) HESC, el porcentaje de células NKX6-1+ es más alto cuando las células endodérmicas se cultivan en presencia de Nogina, EGF, Nicotinamida (con o sin Exendina-4), en comparación con ningún tratamiento o varias combinaciones de los compuestos anteriores.

Figura 5 es una serie de imágenes que muestran que las células NKX6-1 generadas al usar el "tratamiento NENA" tienen el potencial de generar células productoras de insulina. Análisis inmunohistoquímico de NKX6-1 e INSULINA en la bolsa de grasa mamaria cosechada 6 semanas después del trasplante de células diferenciadas H1 (WA01) d14 (A). Análisis inmunohistoquímico de Péptido C y GLUCAGON (GCG) en la bolsa de grasa mamaria cosechada 6 semanas después del trasplante de células diferenciadas H1 (WA01) d14 (B).

Figura 6 es una serie de perfiles de citometría de flujo que muestran que HPx puede usarse para enriquecer las células que expresan NKX6-1. Análisis de citometría de flujo para NKX6-1:GFP solo (A), versus hPx (B) y versus CD142 (C) en el día 13 de la diferenciación de la línea NKX6-1^{GFP/w} hESC cultivada en presencia o en ausencia del tratamiento triple (Nogina, EGF y nicotinamida).

Figura 7A es un gráfico que demuestra que aislar las células HPx2+ al usar la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) enriquece una población que expresa niveles más altos de ARNm de NKX6-1 en comparación con las células no clasificadas (PS = preclasificación), de manera similar a los niveles encontrados en la población CD142 enriquecida (CD142+).

Figura 7B es un gráfico que demuestra que aislar las células positivas dobles HPx2+CD142+ al usar la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) enriquece una población que expresa niveles más altos de RNAm de NKX6-1 en comparación con las células no clasificadas (PS = preclasificación),

Figura 8A es una serie de perfiles de citometría de flujo del mesodermo del día 6;

Figura 8B es una imagen de fase de células CD34+.

Figuras 8C-D son imágenes de células que muestran la absorción de LDL acetilada;

Figura 8E es una imagen que muestra la inmunohistoquímica para vWF.

Figura 9A es una serie de gráficos panel superior: Análisis FACS para GFP en células vivas de cultivos del día 14 como monocapa de control (Ctrl), agregados en colágeno (Col) y co-cultivo con células endoteliales derivadas de ES (ES-E). Panel inferior: FACS intracelular para péptido c dentro de la población GFP+ de cada condición de cultivo.

Figura 9B es un gráfico que muestra el análisis QPCR en tiempo real para Insulina (INS) y Glucagón (GCG) en diferentes condiciones de cultivo. Los números son relativos a FOXA2.

Figura 10 es un gráfico que demuestra que aislar las células positivas dobles HPx1+ al usar la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) enriquece una población que expresa niveles más altos de NKX6-1, SOX9, y RNAm de NKX6-1 en comparación con las células HPx1-.

Figura 11 es un gráfico que demuestra que las células NKX6-1 generadas al usar el tratamiento "NENA" tienen el potencial de generar células productoras de insulina funcionales. La secreción de péptido C humano en respuesta a la tolerancia a la glucosa se midió por ELISA a las 6, 12 y 18 semanas después del trasplante de células diferenciadas H1 (WA01) d13 en ratones inmunocomprometidos.

Descripción detallada de la divulgación

En el presente documento se describe una plataforma robusta y confiable para la generación eficiente de células progenitoras pancreáticas NKX6-1+ a partir de células madre pluripotentes humanas (hPSC), al utilizar una combinación definida de factores que incluyen inhibidores de BMP (por ejemplo, nogina), nicotinamida y agonistas de la vía de señalización de EGF. Las células beta productoras de insulina monohormonal son positivas NKX6-1, similares a las células producidas de este modo. En el presente documento se demuestra que al usar experimentos de trasplante en ratones que las células producidas de acuerdo con los procedimientos descritos son monohormonales y funcionales.

En el presente documento también se demuestra que las células progenitoras endocrinas pancreáticas NKX6-1+ pueden diferenciarse de diferentes poblaciones de células madre pluripotentes humanas (hPSC).

Un aspecto de la presente descripción incluye un procedimiento para producir células progenitoras pancreáticas NKX6-1+ a partir de una población de células endodérmicas que comprende el procedimiento al poner en contacto la población de células endodérmicas con un componente de EGF, un componente de nicotinamida y/o un componente de nogina, opcionalmente una combinación que comprende al menos un componente de EGF y al menos un componente de nicotinamida para inducir la diferenciación de al menos una porción de la población de células endodérmicas en células progenitoras pancreáticas NKX6-1+. Un aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para producir células progenitoras pancreáticas NKX6-1+ a partir de una población de células endodérmicas, en el que el procedimiento comprende poner en contacto a la población de células endodérmicas con una combinación de 1) al menos un componente de EGF seleccionado a partir de EGF, un conjugado activo de EGF y un fragmento activo de EGF; y 2) nicotinamida o una sal de la misma para inducir la diferenciación de al menos una porción de la población de células endodérmicas en células progenitoras pancreáticas NKX6-1+.

En una realización, la combinación comprende además al menos un componente de nogina.

El término "poner en contacto" (por ejemplo, poner en contacto una población de células endodérmicas con un componente o componentes) pretende incluir la incubación *in vitro* del (de los) componente(s) y la célula juntos (por ejemplo, al añadir el compuesto a las células en cultivo) y el paso de poner en contacto puede llevarse a cabo de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, las células pueden tratarse en cultivo adherente, o en cultivo en suspensión, los componentes pueden añadirse temporalmente de manera sustancialmente simultánea (por ejemplo, juntos en una mezcla) o secuencialmente (por ejemplo, dentro de 1 hora desde la adición de un primer componente). Las células también pueden ponerse en contacto con otro agente tal como un factor de crecimiento u otro agente de diferenciación o entornos para estabilizar las células, o para diferenciar las células aún más e incluir el cultivo de las células en condiciones conocidas en este campo, por ejemplo, para cultivar el pluripotente (y/o población diferenciada), por ejemplo, como se describe adicionalmente en los ejemplos.

La "población de células endodérmicas" como se usa en el presente documento se refiere a una población de células que comprende al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% de las células endodermo correspondientes a la Etapa 3 de la Figura 1. Las células de endodermo corresponden, por ejemplo, a una población embrionaria de células de la sección posterior del intestino anterior que expresan al menos FOXA2, y pueden ser positivos o negativos para PDX1. También se pueden expresar otros factores. La población puede ser NKX6-1 negativa (NKX6-1-) o expresar niveles bajos de NKX6-1. La población de células endodérmicas puede identificarse, por ejemplo, por medio de análisis citométrico de flujo y análisis molecular para uno o más marcadores como FOXA2. La población de células endodérmicas puede estar, por ejemplo, en formato 2D (monocapa) o 3D (cuerpo embriode u otra forma de agregados).

El término "endodermo", como se usa en el presente documento, se refiere a una de las tres capas primarias de células germinales en el embrión en su fase primaria (las otras dos capas de células germinales son el mesodermo y el ectodermo). El endodermo es la más interna de las tres capas. Una célula del endodermo se diferencia para dar lugar primero al intestino embrionario y a continuación al recubrimiento del intestino (esófago, estómago, intestino, recto, colon), derivados del divertículo faríngeo (amígdalas, tiroides, timo, glándulas paratiroides), pulmón, hígado, vesícula biliar y páncreas.

El término "célula madre pluripotente", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula con la capacidad, en diferentes condiciones, de diferenciarse en más de un tipo de célula diferenciada y, por ejemplo, la capacidad de diferenciarse a los tipos de células característicos de las tres capas de células germinales, e incluye células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas. Las células pluripotentes se caracterizan por su capacidad de diferenciarse a más de un tipo de célula al usar, por ejemplo, un ensayo de formación de teratoma de ratón nude. La pluripotencia también se evidencia por la expresión del marcador de células madre embrionarias (ES).

El término "célula progenitora" se refiere a las células que tienen un fenotipo celular que se encuentra en un paso anterior a lo largo de una vía o progresión del desarrollo que una célula completamente diferenciada en relación con una célula a la que puede dar lugar por diferenciación. Las células progenitoras pueden dar lugar a múltiples tipos de células diferenciadas distintas o a un solo tipo de células diferenciadas, en función de la vía de desarrollo y del entorno en el que las células se desarrollan y diferencian.

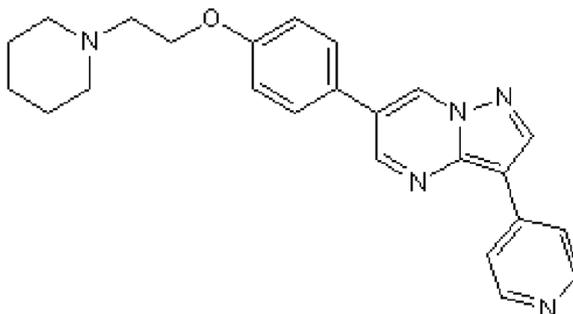
El término "célula progenitora pancreática" se refiere a una célula que es capaz de formar cualquiera de las: células endocrinas pancreáticas (como, por ejemplo, células alfa productoras de glucagón o células beta productoras de

- insulina), o células exocrinas pancreáticas (por ejemplo, amilasa + y/o tripsina + (células pancreáticas) o células del conducto pancreático. La formación o el desarrollo de una o más células endocrinas pancreáticas, células exocrinas pancreáticas o células del conducto pancreático pueden inducirse por medio de la adición de componentes tales como una combinación de un componente de EGF y un componente de nicotinamida y/o como resultado del entorno en el que se desarrolla la célula progenitora. Por ejemplo, una "célula progenitora pluripotente pancreática positiva NKX6-1" en condiciones que incluyen el contacto endotelial puede dar lugar a células beta funcionales. De manera similar, la inyección de células progenitoras pancreáticas NKX6-1 *in vivo* puede resultar en el desarrollo de este tipo de células. También se ha demostrado que las células progenitoras pancreáticas NKX6-1 dan lugar a células beta positivas NKX6-1 productoras de insulina y células ductales positivas CK-19 como se describe en los ejemplos.
- El término "célula beta funcional" como se usa en el presente documento significa un tipo de célula pancreática, que en el páncreas se encuentra en áreas denominadas islotes de Langerhans, que es NKX6-1 positivo y/o PDX1 positiva y produce y libera insulina.
- El término "célula madre", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula indiferenciada que es capaz de proliferar, autorrenovarse y dar lugar a más células progenitoras que tienen la capacidad de generar una gran cantidad de células madre que a su vez pueden dar lugar a células hijas diferenciadas o diferenciables. Las células hijas pueden, por ejemplo, ser inducidas a proliferar y producir progenie que posteriormente se diferencian en uno o más tipos de células maduras, mientras que también retienen una o más células con potencial de desarrollo parental.
- En el contexto de una célula, el término "diferenciada" o "diferenciar" es un término relativo y una "célula diferenciada" es una célula que ha progresado más abajo en la vía del desarrollo que la célula con la que se la compara. Por lo tanto, las células madre pueden diferenciarse en células precursoras de linaje restringido (como una célula progenitora endodérmica), que a su vez pueden diferenciarse en otros tipos de células precursoras más abajo en la vía y, a continuación, en una célula diferenciada en etapa terminal, que desempeña un papel característico en cierto tipo de tejido, y puede o no retener la capacidad de proliferar más.
- El término "célula madre embrionaria" se usa para referirse a las células madre pluripotentes que pueden obtenerse a partir de la masa celular interna del blastocisto embrionario (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5,843,780, 6,200,806). Estas células también se pueden obtenerse a partir de la masa celular interna de los blastocistos (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5,945,577, 5,994,619, 6,235,970). Las características distintivas de una célula madre embrionaria definen un fenotipo de células madre embrionarias. En consecuencia, una célula tiene el fenotipo de una célula madre embrionaria si posee una o más de las características únicas de una célula madre embrionaria, de modo que esa célula pueda distinguirse de otras células. Los ejemplos de características distintivas de células madre embrionarias incluyen, sin limitación, perfil es de expresión génica, capacidad de proliferación, capacidad de diferenciación, cariotipo, capacidad de respuesta a condiciones de cultivo particulares y similares.
- El término "expresión" se refiere a los procesos celulares implicados en la producción de ARN y proteínas y, según corresponda, secreción de proteínas, que incluye cuando sea aplicable, pero no de forma limitada, por ejemplo, transcripción, traslado, plegamiento, modificación y procesamiento. Los "productos de expresión" incluyen ARN transcrito a partir de un gen y polipéptidos obtenidos por traslado a partir de ARNm transcrito a partir de un gen.
- El término "célula progenitora pancreática positiva NKX6-1", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que se deriva, por ejemplo, de una célula de endodermo pancreático y que tiene la capacidad de diferenciarse al menos en células productoras de insulina, como, por ejemplo, células beta pancreáticas. Un progenitor pancreático positivo NKX6-1 expresa el marcador NKX6-1 y puede expresar, por ejemplo, niveles aumentados de PDX1, PTF1A y SOX9 en comparación con una célula madre pluripotente (PSC).
- El término "NKX6-1" como se usa en el presente documento se refiere al ARNm (y/u opcionalmente ADNc) o producto proteico del gen "NK6 homeobox 1" (ID del gen: 4825), las secuencias, que incluyen secuencias de proteínas y ARNm (y/u opcionalmente ADNc).
- Como se demuestra en este documento, el tratamiento con EGF y nicotinamina da lugar a células NKX6-1+ que se incrementan por medio de la adición de nogina (Figura 4).
- Por consiguiente, en una realización adicional, la combinación comprende además un componente de nogina.
- El término "componente de nogina", como se usa en el presente documento, significa cualquier polipéptido o compuesto antagonista de BMP que inhibe la transducción de señales de la familia TGF-beta/BMP, por ejemplo, por medio de la unión de un ligando de la familia TGF-beta, que incluye, pero no se limita a agentes proporcionados en el Ejemplo 10, que incluyen, por ejemplo. La nogina (NOG) como nogina humana que tiene número de identificación génica (**ID del gen: 9241**) así como conjugados y fragmentos activos de los mismos, incluidos conjugados y fragmentos activos de origen natural; receptor de proteína morfogenética ósea, tipo IA (BMPR1A), por ejemplo, BMPR1A humano que tiene, por ejemplo, número de identificación génica (**ID del gen: 657**) así como conjugados y fragmentos activos de los mismos, incluidos conjugados y fragmentos activos de origen natural; receptor de proteína morfogenética ósea, tipo IB (BMPR1B), por ejemplo, BMPR1B humano que tiene, por ejemplo, número de identificación génica (**ID del gen: 658**) así como conjugados y fragmentos activos de los mismos, incluidos conjugados y fragmentos activos de origen natural; dorsomorfin inhibidora química de molécula pequeña y sales, solvatos y combinaciones de los mismos; LDN 193189 inhibidor químico de molécula pequeña, también conocido como "DM-

3189" y/o sales y/o solvatos de los mismos; y CORDINA, por ejemplo, CORDINA humana (CHRD) que tiene, por ejemplo, un número de identificación de gen (**ID de gen: 8646**), así como conjugados y fragmentos activos de los mismos, incluidos conjugados y fragmentos activos de origen natural; y/o combinaciones de dos o más de los anteriores, incluidas, por ejemplo, combinaciones que comprenden nogina. Las secuencias, incluidas las secuencias de proteínas y ARNm, de cada una (por ejemplo, cada componente identificado por ID de gen) están abarcadas por el término.

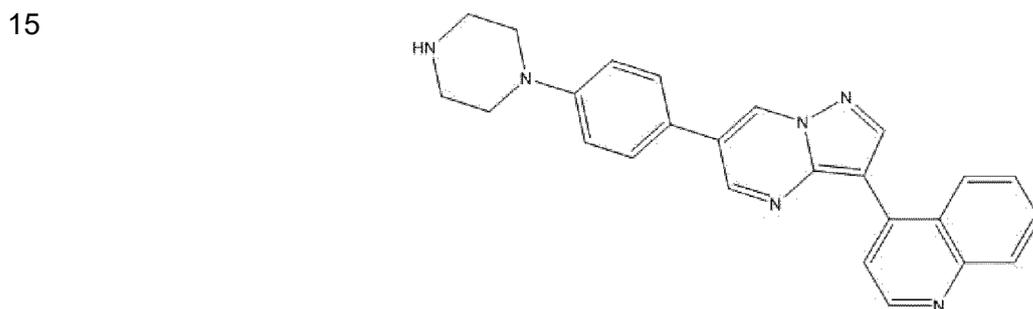
El término "nogina", como se usa en el presente documento, se refiere a un antagonista de la proteína morfogenética ósea que tiene un número de identificación génica (**ID del gen:9241**), las secuencias, incluidas las secuencias de proteínas y ARNm, están abarcadas por el término.

El compuesto "Dorsomorfin" incluye compuestos de fórmula:



sales, solvatos y/o combinaciones de los mismos.

El compuesto "LDN" se refiere a compuestos de fórmula:



sales, solvatos y/o combinaciones de los mismos.

En una realización, el componente de nogina es nogina. La concentración de nogina puede variar, por ejemplo, de alrededor de 1ng a alrededor de 500ng/ml, por ejemplo, de alrededor de 1ng a alrededor de 250ng/ml, de alrededor de 10ng a alrededor de 250ng/ml de alrededor de 10ng a alrededor de 100ng/ml. En otra realización, la concentración de nogina es de alrededor de 10ng/ml, alrededor de 20ng/ml, alrededor de 30ng/ml, alrededor de 40ng/ml, alrededor de 50ng/ml, alrededor de 60ng/ml, alrededor de 70ng/ml, alrededor de 80ng/ml, alrededor de 90ng/ml, alrededor de 100ng/ml, alrededor de 150ng/ml, alrededor de 200ng/ml, alrededor de 300ng/ml, alrededor de 400ng/ml o alrededor de 500ng/ml.

El término "componente de EGF", como se usa en el presente documento, significa cualquier polipéptido o molécula pequeña que activa cualquiera de los miembros de la familia del receptor de EGF (ErbB1/HER-1/EGFR, ID del gen: 1956, ErbB2/HER-2/neu, ID del gen: 2064 ErbB3/HER-3, ID del gen: 2065, y/o ErbB4/HER-4, ID del gen: 2066) que incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, agentes proporcionados en el Ejemplo 11, factor de crecimiento epidérmico (EGF), por ejemplo, EGF humano que tiene, por ejemplo, un número de identificación del gen (**ID del gen: 1950**) así como conjugados y fragmentos activos de los mismos, incluidos conjugados y fragmentos activos de origen natural; Anfiregulina (AR), por ejemplo, AR/AREG humano que tiene, por ejemplo, número de identificación génica (**ID del gen: 374**) así como conjugados y fragmentos activos de los mismos, incluidos conjugados y fragmentos activos de origen natural; Factor de crecimiento transformante (TGF), por ejemplo, TGF humano que tiene, por ejemplo, número de identificación génica (**ID del gen: 7039**) así como conjugados y fragmentos activos de los mismos, incluidos conjugados y fragmentos activos de origen natural; Betacelulina (BTC), por ejemplo, BTC humano que tiene, por ejemplo, número de identificación génica (**ID del gen: 685**) así como conjugados y fragmentos activos de los mismos, incluidos conjugados y fragmentos activos de origen natural; Factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina (HB-EGF) que tiene, por ejemplo, número de identificación génica (**ID del gen: 1839**), así como conjugados y fragmentos activos de los mismos, incluidos los conjugados y fragmentos activos de origen natural; Epiregulina (EREG/ER), por ejemplo, EREG humano que tiene, por ejemplo, un número de identificación del gen (**ID del gen: 2069**) así como conjugados y fragmentos activos de los mismos, incluidos conjugados y fragmentos activos de origen natural; Neuregulinas (que incluyen, por ejemplo, NRG1, NRG2, 3 NRG4), por ejemplo, NRGs humanos que tienen,

por ejemplo, un número de identificación génica (**ID del gen:3084, ID del gen: 9542, ID del gen:10718, ID del gen:145957**, respectivamente), así como variantes y fragmentos activos de las mismas, incluidas las variantes activas y fragmentos naturales y/o las combinaciones de dos o más de los anteriores, por ejemplo, una combinación que comprende EGF humano.

En una realización, el término "EGF", como se usa en el presente documento, se refiere al crecimiento epidérmico (EGF), por ejemplo, EGF humano que tiene, por ejemplo, número de identificación génica (**ID del gen: 1950**), así como conjugados y fragmentos activos de los mismos, incluidos los conjugados y fragmentos activos de origen natural.

En una realización, el componente de EGF es EGF. La concentración de EGF puede variar, por ejemplo, de alrededor de 1ng a alrededor de 500ng/ml, por ejemplo, de alrededor de 1ng a alrededor de 250ng/ml, de alrededor de 10ng a alrededor de 250ng/ml de alrededor de 10ng a alrededor de 100ng/ml. En otra realización, la concentración de EGF es de alrededor de 10ng/ml, de alrededor de 20ng/ml, de alrededor de 30ng/ml, de alrededor de 40ng/ml, de alrededor de 50ng/ml, de alrededor de 60ng/ml, de alrededor de 70ng/ml, de alrededor de 80ng/ml, de alrededor de 90ng/ml, de alrededor de 100ng/ml, de alrededor de 150ng/ml, de alrededor de 200ng/ml, de alrededor de 300ng/ml, de alrededor de 400ng/ml o de alrededor de 500ng/ml.

El término "componente de nicotinamida" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier inhibidor de sirtuina histona desacetilasas (HDAC), que incluye pero no se limita a nicotinamida (también conocida como niacinamida y amida de ácido nicotínico), sales, solvatos y conjugados de los mismos; Inhibidores de la poli-(ADP-ribosa) sintetasa como la benzamida y/o 3-aminobenzamida (Otonkoski et al., 1993), inhibidores de Sir-2 como el sirtinol, M15, splitomicina (Bitterman et al., 2002); otros inhibidores de HDAC como el AN-9, CI-994, FK228, LAQ-824, MS275, SAHA, ácido valproico, TSA, butirato de sodio (Bitterman et al., 2002), y/o combinaciones de dos o más de los mismos, para ejemplos de combinaciones que incluyen nicotinamida. Por ejemplo, Bitterman et al, 2002 y Otonkoski et al 1993 demuestran que sirtinol, M15, splitomicina benzamida y/o 3-aminobenzamida tienen un efecto similar o mejor que la nicotinamida.

El término "nicotinamida", como se usa en el presente documento, se refiere a una vitamina soluble en agua también conocida como niacinamida y amida de ácido nicotínico, así como sus sales, solvatos y conjugados, y es la amida de ácido nicotínico (vitamina B3/niacina).

En una realización, el componente de nicotinamida es nicotinamida y/o una sal, solvato y/o conjugado de los mismos. La concentración de nicotinamida puede variar, por ejemplo, de alrededor de 10µM a alrededor de 100mM, por ejemplo, de alrededor de 10µM a alrededor de 50mM, de alrededor de 1mM a alrededor de 100mM, o de alrededor de 1mM a alrededor de 50mM. En otra realización, la concentración de nicotinamida es de alrededor de 1mM, de alrededor de 2mM, de alrededor de 5mM, de alrededor de 10mM, de alrededor de 15mM, de alrededor de 20mM, de alrededor de 30mM, de alrededor de 40mM, de alrededor de 50mM, de alrededor de 60mM, de alrededor de 70mM, de alrededor de 80mM, de alrededor de 90mM o de alrededor de 100mM.

Se demuestra en este documento en el Ejemplo 13, por ejemplo, que el tratamiento de células con una combinación de nogina, EGF y Nicotinamida puede inducir a más del 10% de las células tratadas a expresar NKX6-1.

Por consiguiente, en una realización, la combinación de al menos un componente de nogina; al menos un componente de EGF y al menos un componente de nicotinamida comprende nogina, EGF y nicotinamida (por ejemplo, NENA).

Se ha demostrado que la nicotinamida es un potente inductor de la diferenciación endocrina en las células pancreáticas fetales humanas (Otonkoski et al., 1993). Sin embargo, antes de esta divulgación, no se había utilizado en combinación con inhibidores de BMP y/o agonistas de la vía EGF (EGF u otros factores de crecimiento relacionados con EGF) para promover específicamente el desarrollo de células progenitoras NKX6-1+ a partir del endodermo definitivo. La inclusión de nicotinamida, por ejemplo, mejora la producción reproducible y eficiente de los progenitores pancreáticos NKX6-1+ de diferentes líneas de hPSC.

La exendina-4 y los conjugados activos y fragmentos de los mismos también se pueden usar para inducir la diferenciación de progenitores pancreáticos. El ejemplo 13 también muestra que una combinación que comprende Exendina-4 induce la diferenciación en al menos el 30% de la población de células endodérmicas.

Por consiguiente, en una realización, la combinación de al menos un componente de nogina; al menos un componente de EGF y al menos un componente de nicotinamida comprende, además, un componente de Exendina-4.

El término "componente Exendina-4", como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos y compuestos que activan los receptores GLP-1 (péptido similar al glucagón-1) para aumentar el AMPc intracelular, que incluye, por ejemplo, pero no se limita a Exendina-4 (SIGMA 7144), y conjugados y fragmentos activos de los mismos, GLP-1 y conjugados y fragmentos activos de los mismos, tales como el péptido 1 similar al glucagón humano (SIGMA G3265) y el fragmento de amida del péptido similar al glucagón 7-36 humano (SIGMA G8147), así como conjugados y fragmentos activos de los mismos, incluidos conjugados y fragmentos activos de origen natural.

También se pueden usar variantes tales como variantes mutantes conservadoras y variantes mutantes activadoras para cada uno de los polipéptidos. Por ejemplo, también se pueden incluir mutantes activadores de GLP-1 como GLP-1 (7-37) A8G.

El término "Exendina-4" como se usa en el presente documento se refiere a un péptido de 39 aminoácidos y

conjugados y fragmentos activos del mismo que activan los receptores GLP-1 (péptido similar al glucagón-1) para aumentar el AMPc intracelular (SIGMA 7144).

El término "fragmentos activos", como se usa en el presente documento, es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un tamaño menor, pero sustancialmente homólogo al polipéptido del que es un fragmento, y donde el polipéptido del fragmento activo es de al menos 50%, o 60% o 70% o el 80% o 90% o 100% o mayor que 100%, por ejemplo, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces o más de 4 veces tan efectivo en términos de acción biológica como el polipéptido del que es un fragmento. Los ejemplos incluyen fragmentos de EGF que se unen y activan el receptor de EGF, y el fragmento de amida del péptido similar al glucagón humano 7-36 (GLP-1 7-36 amida) (SIGMA G8147) que es como GLP-1 7-37 también efectivo para estimular la insulina de la producción, pero no fragmentos inactivos como GLP-1 9-37.

En una realización, la combinación de al menos un componente de nogina; al menos un componente de EGF y al menos un componente de nicotinamida comprende además al menos un componente de Exendina-4, comprende nogina, EGF, nicotinamida y Exendina-4 (por ejemplo, NENAEx).

En una realización, la población de células endodérmicas se pone en contacto con la combinación de al menos un componente nogina, al menos un componente de EGF, al menos un componente de Nicotinamida y opcionalmente al menos un componente Exendina-4 durante al menos o alrededor de 3 días, al menos alrededor de 4 días, al menos alrededor de 5 días, al menos alrededor de 6 días, al menos alrededor de 7 días, al menos alrededor de 8 días, al menos alrededor de 9 días o al menos alrededor de 10 días. En otra realización, la población de células endodérmicas se pone en contacto con la combinación durante al menos alrededor de 11 días, al menos alrededor de 12 días, al menos alrededor de 13 días, al menos alrededor de 14 días o al menos alrededor de 15 días. Se encuentra que la positividad y/o capacidad de NKX6-1 para generar células productoras de insulina puede persistir, por ejemplo, al menos 30 días o más en células cultivadas.

La diferenciación de al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45% o al menos el 50% o al menos el 60% o al menos el 70% o al menos el 80%, al menos el 90%, de la población de células endodérmicas se induce a diferenciarse en células progenitoras pancreáticas NKX6-1+.

La diferenciación puede detectarse al determinar el nivel de marcadores de progenitores pancreáticos. Por ejemplo, NKX6-1, PDX1, PTF1A y SOX9 son marcadores de progenitores pancreáticos cuya expresión de ARNm puede detectarse, por ejemplo, por medio de RT-PCR. La diferenciación también puede detectarse al usar anticuerpos que reconocen las células progenitoras pancreáticas. Como se describe en este documento, los anticuerpos anti-HPx1 y anti-HPx2 que se ha demostrado que reaccionan con los marcadores de la superficie celular de las células exocrinas pancreáticas humanas adultas, también pueden usarse para controlar el desarrollo de las células progenitoras pancreáticas NKX6-1+, de manera similar, por ejemplo, al anticuerpo anti-CD142 (Kelly et al., 2011).

En una realización, la población de células endodérmicas se diferencia de las células madre pluripotentes (PSC) como, por ejemplo, una célula madre embrionaria (ESC) o una célula madre pluripotente inducida (iPSC).

En una realización, la célula madre pluripotente es de un mamífero, como un ser humano. En una realización, la célula madre pluripotente es un ESC humano (hESC) o un iPSC humano (hiPSC).

Como se usa en el presente documento, los términos "iPSC" y "célula madre pluripotente inducida" se usan indistintamente y se refieren a una célula madre pluripotente derivada de forma artificial (por ejemplo, inducida o por inversión completa) de una célula no pluripotente, por lo general una célula somática adulta, por ejemplo, al inducir la expresión de uno o más genes (incluidos POU4F1 / OCT4 (ID del gen; 5460) en combinación, pero no restringido, con SOX2 (ID del gen; 6657), KLF4 (ID del gen; 9314), cMYC (ID del gen; 4609), NANOG (ID del gen; 79923), LIN28 / LIN28A (ID del gen; 79727)).

En una realización, el procedimiento comprende pasos para la obtención de la población de células endodérmicas. Por ejemplo, como se describe en el presente documento, la diferenciación de una célula madre pluripotente como un ESC o un iPSC a una célula endodérmica implica una serie de pasos que se caracterizan en la Figura 1 que comprenden las Etapas 1 a 3. La etapa 1 puede dividirse en subesferas, por ejemplo, tres subesferas que abarcan, por ejemplo, los días 0 a 5. La etapa 2 puede abarcar, por ejemplo, 2 a 3 días y la etapa 3 puede abarcar, por ejemplo, 1 a 4 días. Como se describe en Nostro et al 2011 y en este documento, la Etapa 1 puede comprender poner en contacto una población de células madre pluripotentes con ActA (u otro agonista nodal) y Wnt3a en el día 0, poner en contacto a la población con ActA, bFGF y opcionalmente Wnt3a en el día 1 y contactar a la población con ActA y bFGF en el día 2 para producir células diferenciadas en Etapa 1. La Etapa 2, por ejemplo, puede incluir el contacto de la población a diferenciar (por ejemplo, las células diferenciadas en la Etapa 1) con el Factor de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF10), opcionalmente un miembro de la familia del sitio de integración MMTV de tipo sin alas 3A (Wnt3a) y opcionalmente Dorsomorfinina para producir las células diferenciadas de la Etapa 2. La Etapa 3, por ejemplo, puede incluir el contacto de la población a diferenciar (por ejemplo, las células diferenciadas en la Etapa 2) con nogina, opcionalmente ciclopamina-KAAD (Cyc) (o cualquier otro inhibidor de señalización de hedgehog (HH)), ácido retinoico (RA), opcionalmente FGF10 y/u opcionalmente Exendina-4 para proporcionar una población de células endodérmicas. La dorsomorfinina puede sustituirse, por ejemplo, con otros componentes de nogina como la cordina LDN 193189 y BMPRs; ActA puede sustituirse con otros agonistas nodales y Wnt 3a puede sustituirse con otros agonistas de señalización de Wnt como agonistas de catenina wnt/beta como CHIR99021 u otros. De manera similar, bFGF y

FGF10 pueden sustituirse con otros FGF o compuestos que activan el mismo receptor que bFGF o FGF10 respectivamente. El ácido retinoico puede sustituirse, por ejemplo, por un análogo del ácido retinoico. El protocolo puede ser, por ejemplo, el protocolo descrito anteriormente (Nostro et al., 2011), y/o con modificaciones (por ejemplo, adición de Wnt3a en el día 1 y Exendina-4, Ex-4 desde el día 5 hasta el día 7). Las variaciones incluyen, por ejemplo, omitir FGF10 y/o Exendina-4 del protocolo y usar, por ejemplo, CHIR99021 (Stemgent 04-0004) como reemplazo de Wnt3a. Los protocolos para generar células de la Etapa 3 se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos 7,989,204, 7,993,916, 8,129,182 y 8,187,878. Los procedimientos descritos en este documento pueden usarse para obtener células de la Etapa 3 que se diferencian además usando cualquiera de los procedimientos de Etapa 4 descritos en este documento (por ejemplo, ENA, NENA, NExENA, etc.).

ActA es un agonista nodal. El término "agonista nodal" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier molécula que activa la transducción de señales nodales como "nodal" (por ejemplo, nodal humano como ID del gen: 4338) o "activina". El término "activina" o "ActA", como se usa en el presente documento, se refiere a "Activina A" (por ejemplo, ID del gen: 3624), por ejemplo, la activina humana, así como conjugados y fragmentos activos de los mismos, que incluyen opcionalmente conjugados y fragmentos activos que se producen naturalmente, que pueden, por ejemplo, activar la transducción de señales nodales, así como conjugados y fragmentos activos de los mismos, incluidos conjugados y fragmentos activos que se producen naturalmente.

Wnt3A es un agonista de señalización wnt. El término "un agonista de señalización de wnt" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier molécula que activa la señalización del receptor de wnt/beta-catenina en un hepatocito e incluye, por ejemplo, Wnt3a, así como también inhibidores selectivos de GSK3 tales como CHIR99021 (Stemolecule™ CHIR99021 Stemgent), 6- BromoIndirubina-3'-oxima (BIO) (Cayman Chemical (cat: 13123)), o Stemolecule™ BIO de Stemgent (cat: 04003). CHIR99021 es un inhibidor selectivo de GSK3. Los inhibidores selectivos de GSK3 contemplados son, por ejemplo, inhibidores selectivos para GSK-3 α/β en la ruta de señalización de Wnt.

FGF10 y bFGF son miembros de FGF que activan la señalización del receptor de FGF.

El término "agonista de FGF" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula tal como una citocina, que incluye, por ejemplo, FGF, o una molécula pequeña, que activa una vía de señalización de FGF, por ejemplo, se une y activa un receptor de FGF. El término "FGF", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier factor de crecimiento de fibroblastos, por ejemplo, FGF1 humano (ID del gen: 2246), FGF2 (también conocido como bFGF; ID del gen: 2247), FGF3 (ID del gen: 2248), FGF4 (ID del gen: 2249), FGF5 (ID del gen: 2250), FGF6 (ID del gen: 2251), FGF7 (ID del gen: 2252), FGF8 (ID del gen: 2253), FGF9 (ID del gen: 2254) y FGF10 (ID del gen: 2255) que incluyen opcionalmente conjugados y fragmentos activos de los mismos, incluidos los conjugados y fragmentos activos de origen natural. En ciertas realizaciones, FGF es bFGF, FGF10, FGF4 y/o FGF2.

Se proporcionan rangos ejemplares para componentes agregados para diferenciar células madre pluripotentes hasta la etapa 3 (por ejemplo, d7) como se describió previamente (Nostro et al., 2011), y/o citocinas y moléculas pequeñas pueden usarse en las siguientes concentraciones: Activina A (Act1: 10-1000ng/ml), Wnt3a (Etapa 1: 25ng/ml), CHIR99021 (Etapa 1: 0,1-3 μ M), bFGF (0,1-50ng/ml), FGF10 (5-500ng/ml), Wnt3a (Etapa 2: 3ng/ml), dorsomorfina (DM: 0,25-0,75 μ M), nogina (NOG: 1-500ng/ml), ciclopamina-KAAD (Cyc: 0,5-2.5 μ M), ácido retinoico (RA: 0,02-2 μ M) Exendina-4 (Ex-4: 5-500ng/ml) EGF (1-500ng/ml), nicotinamida (NA: 1-100mM).

También pueden usarse otros procedimientos para diferenciar células para obtener una población de células endodérmicas.

Por consiguiente, un aspecto adicional descrito en el presente documento incluye un procedimiento para producir células progenitoras pancreáticas NKX6-1+ a partir de una población de células madre pluripotentes, el procedimiento comprende uno o más de los pasos (o subpasos) a, b y c; y el paso d, los pasos comprenden:

a) Poner en contacto una población de células madre pluripotentes con una combinación de:

I) un agonista nodal, opcionalmente ActA y un agonista de señalización wnt, opcionalmente, Wnt3a o CHIR 99021;

II) un agonista nodal, opcionalmente ActA, un agonista de FGF, opcionalmente bFGF y opcionalmente un agonista de señalización wnt, opcionalmente Wnt3a CHIR 99021; y

III) un agonista nodal, opcionalmente ActA y un agonista de FGF, opcionalmente bFGF;

para producir células diferenciadas en la etapa 1;

b) Poner en contacto las células diferenciadas en la etapa I con un agonista de FGF, opcionalmente FGF10, y opcionalmente un agonista de señalización de wnt, opcionalmente Wnt3a y un componente de nogina, opcionalmente Dorsomorfina, para producir células diferenciadas en la etapa 2;

c) Poner en contacto a las células diferenciadas en la Etapa 2 con un componente de nogina, ácido retinoico (RA) o análogo de RA, y opcionalmente ciclopamina-KAAD (Cyc), un agonista de FGF, opcionalmente FGF10 y/o un componente de Exendina-4, opcionalmente Exendina-4 para proporcionar una población de células endodérmicas; y

d) Poner en contacto a la población de células endodérmicas con un componente de EGF, un componente de nicotinamida y/o un componente de nogina, opcionalmente una combinación que comprende al menos un componente de EGF y al menos un componente de nicotinamida en una cantidad suficiente para inducir la diferenciación de al menos una porción de la población de células endodérmicas en células progenitoras pancreáticas NKX6-1+.

5 En una realización, la Etapa 2 (opcionalmente en lugar de Dorsomorfina) y/o comprende además poner en contacto la población con al menos un componente de nogina.

10 En una realización, los pasos comprenden dos o más de los pasos a, b y c. Por ejemplo, una persona experta en la materia reconocería que el procedimiento que se aplicará a una célula de la Etapa 2 o equivalente de la misma incluiría los pasos c) y d). De manera similar, pueden llevarse a cabo y/o excluirse uno o más subpasos de a) dependiendo de la etapa de la población celular inicial.

15 Una "célula de la Etapa 1", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula de endodermo caracterizada al menos por la expresión de SRY-box que contiene el gen 17 (SOX17) (ID del gen: 64321) y el receptor 4 (CXCR4) de quimiocina (motivo CXC) (ID del gen: 7852) generado después de la diferenciación *in vitro* de células madre pluripotentes humanas (hESC y hiPSC) en formatos 2D o 3D, como se describe, por ejemplo, en Nostro et al., 2011.

20 Una "célula de la Etapa 2", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula de endodermo caracterizada al menos por la expresión de forkhead box A2 (FOXA2) (ID del gen: 3170) y por la expresión de HNF1 homeobox B (HNF1B) (ID del gen: 6928) generado después de la diferenciación *in vitro* de células madre pluripotentes humanas (hESC y hiPSC) en formatos 2D o 3D, como se describe, por ejemplo, en Nostro et al., 2011.

Una "célula de la Etapa 3", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula de endodermo caracterizada al menos por la expresión de forkhead box A2 (FOXA2) (ID del gen: 3170) generado después de la diferenciación *in vitro* de células madre pluripotentes humanas (hESC y hiPSC) en formatos 2D o 3D, como se describe, por ejemplo, en Nostro et al., 2011.

25 Una "célula de la Etapa 4", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula de endodermo caracterizada al menos por la expresión de NK6 homeobox 1 (NKX6-1) (ID del gen: 4825) y por la expresión de homeobox 1 pancreático y duodenal (PDX1) (ID del gen: 3651) generado después de la diferenciación *in vitro* de células madre pluripotentes humanas (hESC y hiPSC) como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 1.

30 Las células progenitoras positivas NKX6-1 pueden usarse, por ejemplo, para generar células productoras de insulina *in vivo* y/o *in vitro*.

Por ejemplo, las células progenitoras positivas NKX6-1 trasplantadas producidas de acuerdo con un procedimiento descrito en el presente documento se diferencian de las células productoras de insulina como se demuestra en el Ejemplo 3.

35 En una realización, las células, por ejemplo, las células de la etapa 3, se cultivan con un activador PKC, como, por ejemplo, indolactama V y/o PDBu. Otros compuestos pueden incluir ITS (es decir, insulina selenio transferrina que es similar al uso del suplemento B27); Inhibidor de CYP26A, opcionalmente N-{4-[2-Etil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il) butil] fenil}-1,3-benzotiazol-2-amina.

40 En una realización, las células, por ejemplo, las células de la etapa 3, se cultivan con un activador PKC, como, por ejemplo, indolactama V y/o PDBu. Otros compuestos pueden incluir ITS (es decir, insulina selenio transferrina que es similar al uso del suplemento B27); Inhibidor de CYP26A, opcionalmente N-{4-[2-Etil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butyl]fenil}-1,3-benzotiazol-2-amina.

45 También se proporciona en otro aspecto un procedimiento *in vitro* para producir células productoras de insulina a partir de las células del endodermo de la Etapa 3 y/o de las células precursoras pancreáticas de la Etapa 4, que comprende el procedimiento el co-cultivo en la Etapa 3 y/o 4 de células y / o con células endoteliales. En una realización, el procedimiento comprende: El cultivo de células endodérmicas en presencia de células endoteliales CD34+.

50 El co-cultivo se lleva a cabo, por ejemplo, en medios NENA y/o NENaEx complementados con bFGF (por ejemplo, 50ng/ml) y VEGF (100ng/ml), pero también puede llevarse a cabo en cualquier medio que sea permisivo para la supervivencia de las células pancreáticas y endoteliales tal como EndoGRO (Millipore), medio MV2 (Promocell), medio de cultivo celular endotelial BD. El medio comprende opcionalmente uno o más de un componente de nogina, un componente de EGF, un componente de Nicotinamida y un componente de Exendina-4, así como uno o más de bFGF (u otro FGF) y VEGF (u otro compuesto que activa la señalización a través del receptor VEGF KDR). En una realización, el medio comprende un componente de nogina, un componente de EGF, un componente de Nicotinamida, bFGF y VEGF. En una realización, las células progenitoras pancreáticas están agregadas. Para agregar los progenitores pancreáticos, los cultivos en monocapa pueden separarse mecánicamente por medio de pipeteo, o pueden disociarse enzimáticamente y agregarse con una incubación en placas de baja fijación o al agitar la población de células.

55 En una realización, las células progenitoras pancreáticas positivas para NKX6-1 se agregan y los agregados se cultivan con células endoteliales CD34+. Los agregados pueden sembrarse directamente en las células endoteliales

CD34+ o separarse por medio de un biomaterial que permita la difusión, como una membrana u otro dispositivo. Los cultivos pueden mantenerse, por ejemplo, durante 7, 8, 9, 10 o más días, opcionalmente en medios que contengan NENAEEx, opcionalmente con 5ng/ml de bFGF y 100ng/ml de VEGF.

5 Las células endoteliales pueden, por ejemplo, derivarse de hESC. Por ejemplo, las hESC en cultivo pueden inducirse con una combinación de uno o más de BMP4, bFGF y VEGF. Después de un tiempo suficiente, por ejemplo, 6 días, las células CD34+ pueden clasificarse y cultivarse en un medio adecuado tal como el medio EGM-2 (Lonza) suplementado, por ejemplo, con bFGF y VEGF. Un tiempo suficiente, por ejemplo, comprende un tiempo de inducción lo suficientemente largo como para inducir uno o más de los receptores KDR, CD31, VE-Cadherina, VEGF y vWF y/o comprender la capacidad de absorber LDL acetilada como se muestra, por ejemplo, en la Figura 8.

10 En una realización, las células endoteliales se derivan de la línea H1 hESC. El protocolo puede extenderse a cualquier línea hESC y línea hiPS.

En una realización, las células endoteliales se cultivan en el medio EGM-2 hESC. Cualquier otro medio de cultivo de células endoteliales disponible comercialmente es adecuado.

15 La detección de células productoras de insulina puede incluir, por ejemplo, la detección de positividad de péptido c, por ejemplo, por medio de citometría de flujo y/o expresión de insulina y/o glucagón, por ejemplo, por RT-PCR.

En una realización, las células productoras de insulina generadas, por ejemplo, después del co-cultivo con células endoteliales son monohormonales.

20 Como se usa en el presente documento, el término "célula productora de insulina" se refiere a una célula diferenciada de un progenitor pancreático que secreta insulina. Una célula productora de insulina incluye células beta pancreáticas funcionales, así como células similares a beta pancreáticas que sintetizan, expresan o secretan insulina de manera constitutiva o inducible. Una población de células productoras de insulina, por ejemplo, producida por medio de la diferenciación de células endodérmicas en progenitores pancreáticos y la posterior diferenciación en células productoras de insulina de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento, pueden ser células beta pancreáticas funcionales o células similares a beta (por ejemplo, células que tienen al menos dos características de una célula beta funcional endógena). También se contempla que la población de células productoras de insulina, por ejemplo, producido por los procedimientos descritos en el presente documento, puede comprender células beta pancreáticas o células similares a beta pancreáticas, y también puede contener células no productoras de insulina (por ejemplo, células con un fenotipo similar a células beta con la excepción de que estas no producen ni secretan insulina).

30 La presente descripción también proporciona en otro aspecto células endoteliales útiles para promover la maduración de progenitores pancreáticos NKX6-1+ *in vitro*. Es útil determinar si las células productoras de insulina generadas son funcionales o se espera que sean funcionales (por ejemplo, si estas células productoras de insulina co-expresan cualquier otro gen pancreático clave, como PDX1 y NKX6-1). El procedimiento descrito en la presente solicitud utiliza células endoteliales humanas (o componentes de las mismas), en co-cultivo con células progenitoras pancreáticas y produce células de linaje pancreático que co-expresan PDX1 y NKX6-1. Se espera que las células descritas por el presente sean funcionales. Como se muestra en esta divulgación, las células endoteliales derivadas de hESC representan una población adecuada para la inducción y maduración de las células productoras de insulina a partir de hPSC.

35 Por consiguiente, en una realización, los procedimientos inducen la producción de más de alrededor del 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o alrededor del 95% de las células progenitoras pancreáticas positivas a NKX6-1 de una población de células endodérmicas y/o, por ejemplo, mayor de alrededor del 5%, 10%, 15%, 20%, 25 %, 30% 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o alrededor del 95% de células productoras de insulina a partir de células progenitoras pancreáticas positivas NKX6-1.

Las células pueden recolectarse (por ejemplo, centrifugarse y resuspenderse en un diluyente adecuado) como un cultivo celular mixto.

45 En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende además enriquecer y/o aislar, por ejemplo, las células progenitoras pancreáticas positivas NKX6-1 y/o las células beta pancreáticas positivas NKX6-1.

En una realización, la etapa de aislamiento comprende poner en contacto la población de células con un agente específico que se une a las células positivas NKX6-1.

50 También se ha demostrado, por ejemplo, en el Ejemplo 4, que los anticuerpos dirigidos contra HPx1 y HPx2 pueden usarse para enriquecer las células positivas para NKX6-1. Específicamente, se ha demostrado que los anticuerpos HPx1 y HPx2 permiten el enriquecimiento de las células progenitoras pancreáticas positivas NKX6-1.

Por consiguiente, en una realización, el procedimiento comprende poner en contacto una población de células que comprenden células positivas NKX6-1 con un anticuerpo de detección de epítipo HPX.

55 Un "anticuerpo de detección de epítipo HPX" como se usa en el presente documento, incluye, por ejemplo, anticuerpos designados HPx1 y HPx2 disponibles, por ejemplo, de Oregon Health & Science University (HPx2=OHSU#1038I), Consorcio de Biología Celular Beta (HPx2=AB2195 y HPx1=AB2194), Novus Biologicals (Hpx1=NBP1-18951, HPx2=NBP1-18952), así como los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo que HPx1 o HPx2. Por ejemplo, un anticuerpo que comprende las mismas secuencias de CDR que un anticuerpo HPx1 y/o HPx2,

que incluye, por ejemplo, formas humanizadas y quiméricas, detectará el mismo epítipo que HPx1 y/o HPx2.

También se demuestra en el presente documento que las células progenitoras positivas NKX6-1 expresan SOX9, PTF1a y SOX9, también conocido como SRY box 9 es un factor de transcripción; PTF1a, también conocido como factor de transcripción específico del páncreas 1a.

5 En una realización, el procedimiento comprende aislar/enriquecer para progenitores pancreáticos NKX6-1+ que comprende poner en contacto una población de células que comprenden células progenitoras pancreáticas con un anticuerpo contra HPx1 y/o HPx2 y aislar o purificar parcialmente la subpoblación ligada de células HPx1 y/o HPx2.

10 En otra realización, el procedimiento comprende aislar/enriquecer para progenitores pancreáticos NKX6-1+ que comprende poner en contacto una población de células que comprenden células progenitoras pancreáticas con un anticuerpo contra HPx1 y/o HPx2 en combinación con un anticuerpo contra CD142 que aísla o purifica parcialmente la subpoblación ligada de células HPx1 y/o HPx2 y CD142.

15 En una realización, el anticuerpo HPx1 y/o HPx2 y/o CD142 se conjuga a una esfera tal como una esfera magnética. En una realización, el enriquecimiento comprende la clasificación celular, por ejemplo, por medio de la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

El ejemplo 4 muestra, por ejemplo, que HPx tiñe aproximadamente el 60% de las células positivas GFP NKX6-1 inducidas por NENA el día 13.

La identificación de dos anticuerpos (HPx1 y HPx2) que tiñen la población progenitora NKX6-1+ facilitará, por ejemplo, el monitoreo, la cuantificación y la purificación de las células progenitoras pancreáticas derivadas de hPSC.

20 Antes de esta divulgación, no había indicación o evidencia de que los anticuerpos HPx1 y HPx2 (denominados colectivamente "HPx" en el presente documento), conocidas por detectar células exocrinas adultas (Dorrell et al., 2008), reconocieran progenitores pancreáticos. El uso de estos anticuerpos facilita los procedimientos para identificar, monitorear y aislar las células progenitoras pancreáticas derivadas, por ejemplo, de hESC/hiPSC o de otras fuentes de una manera que preserve su viabilidad para diversas aplicaciones posteriores.

25 Los anticuerpos HPx pueden ser combinados, por ejemplo, con otros anticuerpos, como, por ejemplo, CD142 para aumentar opcionalmente el número de células positivas NKX6-1 en la población enriquecida y/o aislada.

30 Por consiguiente, en una realización, el procedimiento comprende enriquecer y/o aislar una población de células progenitoras pancreáticas positivas NKX6-1, en donde al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o más de las células totales en la población aislada sean células progenitoras pancreáticas positivas NKX6-1.

Los procedimientos de aislamiento/enriquecimiento también pueden incluir, por ejemplo, el uso de otros agentes, como, por ejemplo, anticuerpos contra otros marcadores de superficie progenitora pancreática, como, por ejemplo, CD142.

35 En una realización, la población de células que comprende células positivas NKX6-1 es una población positiva NKX6-1 producida de acuerdo con un procedimiento descrito en el presente documento.

El término "población aislada de células" como se usa en el presente documento se refiere a una población de células que se ha removido y separado de una población de células mixta o heterogénea. En algunas realizaciones, una población aislada es una población de células sustancialmente pura en comparación con la población heterogénea de la que se aislaron o enriquecieron las células.

40 El término "sustancialmente puro", con respecto a una población celular particular, se refiere a una población de células que es al menos alrededor del 65%, preferiblemente al menos alrededor del 75%, al menos alrededor del 85%, más preferiblemente al menos alrededor del 90%, y lo más preferible al menos alrededor del 95% puro, con respecto a las células que constituyen una población celular total. De manera similar, con respecto a una población "sustancialmente pura" de progenitores pancreáticos positivos NKX6-1, se refiere a una población de células que contengan menos de alrededor del 30%, menos de alrededor del 20%, más preferiblemente menos de alrededor del 15%, 10% , 8%, 7%, lo más preferible menos de alrededor del 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos del 1%, de células que no sean progenitores pancreáticos positivos NKX6-1 o su progenie como se define por los términos del presente documento. En algunas realizaciones, la presente invención abarca procedimientos para expandir una población de progenitores pancreáticos positivos NKX6-1, en donde la población expandida de progenitores pancreáticos positivos NKX6-1 sea una población sustancialmente pura de progenitores pancreáticos positivos NKX6-1.

50 Los términos "enriquecer" o "enriquecido" se usan indistintamente en el presente documento y significan que el rendimiento (fracción) de células de un tipo aumenta en al menos alrededor del 10%, al menos alrededor del 20%, al menos alrededor del 30%, al menos alrededor del 40%, al menos alrededor del 50% o al menos alrededor del 60% sobre la fracción de células de ese tipo en el cultivo o preparación inicial. El enriquecimiento y la purificación parcial se pueden usar indistintamente.

55 **Composiciones y Kits**

Como se ha tratado anteriormente, se pueden aislar células progenitoras pancreáticas NKX6-1 y células productoras

de insulina diferenciadas. Por consiguiente, un aspecto adicional descrito en el presente documento incluye una población celular de células progenitoras pancreáticas positivas NKX6-1 enriquecida, purificada o aislada y/o células productoras de insulina diferenciadas, por ejemplo, producidas de acuerdo con un procedimiento descrito en el presente documento. Otro aspecto descrito incluye una composición que comprende una población celular de células progenitoras pancreáticas positivas NKX6-1 enriquecida, purificada o aislada y/o células productoras de insulina diferenciadas; y un diluyente adecuado.

Un diluyente adecuado incluye, por ejemplo, un medio de cultivo adecuado, o un medio de congelación que contenga, por ejemplo, suero, un sustituto del suero o un suplemento de suero y/o un crioprotector adecuado, como, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metilcelulosa o polivinilpirrolidona.

Los componentes para diferenciar las células NKX6-1+ de las células endodérmicas pueden comprenderse como un solo suplemento que se agregará a los medios de base tales como DMEM (o, por ejemplo, IMDM, RPMI, CMRL). El suplemento contendría en una realización los ingredientes activos: Nogina, EGF, nicotinamida, ácido ascórbico, L-glutamina y B27.

Otro aspecto descrito es una composición de medio de cultivo adecuada para diferenciar las células de una etapa a otra. Por ejemplo, una composición de medio de cultivo de la Etapa 4 adecuada puede comprender, por ejemplo, un componente de EGF, y/o un componente de Nicotinamida, opcionalmente un componente de nogina, y/o adicionalmente otros factores de crecimiento, etc., descritos en el presente documento, opcionalmente un componente de Exendina-4, por ejemplo, que puede promover la diferenciación de la Etapa 4.

El término "medio de cultivo celular" (también denominado en el presente documento "medio de cultivo" o "medio") como se refiere en el presente documento es un medio para cultivar células que contiene nutrientes que mantienen la viabilidad celular y apoyan la proliferación y opcionalmente la diferenciación. El medio de cultivo celular puede contener cualquiera de los siguientes en una combinación apropiada: sal(es), tampón(es), aminoácidos, glucosa u otro(s) azúcar(s), antibióticos, suero o reemplazo de suero, y otros componentes tales como factores de crecimiento de péptidos, vitaminas, etc. Los expertos en la técnica conocen los medios de cultivo celular normalmente utilizados para tipos de células particulares.

El medio de cultivo adecuado puede incluir un medio de cultivo base adecuado que incluye, por ejemplo, DMEM (Life Technologies), IMDM, RPMI, CMRL y/o cualquier otro medio que apoye el crecimiento de células endodérmicas para proporcionar, por ejemplo, una composición de medio de cultivo base en la cual puedan agregarse componentes y opcionalmente otros agentes (por ejemplo, para proporcionar una composición de medio de cultivo de la Etapa 4 adecuada).

Se pueden preparar medios de cultivo específicos para la etapa, por ejemplo, un medio de cultivo de la Etapa 4 (por ejemplo, medio NENA o NENAEx). El medio de cultivo puede usarse, por ejemplo, para cultivar la población de células de endodermo para inducir la diferenciación positiva de NKX6-1.

Por consiguiente, un aspecto adicional descrito en el presente documento es una composición de medio de cultivo que comprende:

un medio base de cultivo celular; y

uno o más a partir de:

i) un componente EGF,

ii) un componente de nicotinamida, y

iii) un componente nogina y

iv) opcionalmente un componente de Exendina-4.

La composición del medio (o medio base) puede comprender además uno o más antibióticos, como, por ejemplo, penicilina y estreptomina; uno o más aminoácidos, como, por ejemplo, L-Glutamina (Life Technologies), el sustituto del Suplemento B27 (Life Technologies) y/o una o más vitaminas como el ácido L-ascórbico (SIGMA). Se proporciona una receta adecuada, por ejemplo, en el Ejemplo 8.

La cantidad de los componentes en el suplemento puede ser, por ejemplo, cantidades que, cuando se diluyen en un medio de cultivo (por ejemplo, cuando se diluyen en un medio base de 450 ml) dan como resultado las concentraciones descritas en el presente documento para diferenciar, por ejemplo, una población endodérmica. De manera similar, la concentración de los componentes en el medio de cultivo puede ser la concentración descrita en el presente documento para diferenciar, por ejemplo, una población endodérmica.

Una realización descrita adicionalmente en el presente documento incluye un kit que comprende:

un componente de EGF,

un componente de nicotinamida; y/o

un componente nogina y/o

opcionalmente un componente de Exendina-4.

Como se ha descrito anteriormente, la composición y los componentes del kit pueden incluir cualquiera de los componentes descritos en cualquier otra parte del presente documento y, opcionalmente, instrucciones de uso. Por ejemplo, en una realización, el kit comprende un suplemento que comprende componentes, etc., para inducir la diferenciación de una o más etapas descritas en el presente documento (por ejemplo, suplemento en la Etapa 4). En una realización, el kit comprende un medio de cultivo base, opcionalmente un medio de cultivo base descrito en el presente documento.

Usos

Los progenitores pancreáticos derivados de HPSC NKX6-1+ (por ejemplo, enriquecidos con HPx1/2) y sus derivados de células beta podrían usarse para una serie de aplicaciones.

Por ejemplo, las células progenitoras pancreáticas NKX6-1 pueden usarse para la toxicología predictiva de fármacos y el descubrimiento de fármacos.

Por consiguiente, en una realización se proporciona un ensayo que comprende: Poner en contacto la población que expresa NKX6-1 generada al usar un procedimiento descrito en el presente documento con un compuesto de prueba, y determinar si el compuesto de prueba: 1) estimula la expansión, 2) desencadena la apoptosis, y/o 3) induce la diferenciación de las células que expresan NKX6-1 en células similares a las beta productoras de insulina a otras células productoras de hormonas (por ejemplo, somatostatina, glucagón, polipéptido pancreático y grelina), células acinares o ductales; en comparación con un control. Los ensayos conocidos en esta materia pueden usarse, por ejemplo, para evaluar la apoptosis y/o la expansión celular. La diferenciación con las células productoras de hormonas puede evaluarse al medir la producción de hormonas, opcionalmente, las hormonas secretadas o al evaluar los niveles de ARNm.

El uso de un anticuerpo HPX puede facilitar la detección del compuesto, al proporcionar una población más homogénea para poner en contacto con el compuesto de prueba. Además, la población enriquecida para las células de insulina+ generadas por el co-cultivo con células endoteliales puede usarse para analizar compuestos que puedan desencadenar la proliferación o la apoptosis y para compuestos que puedan mejorar la secreción de insulina estimulada por glucosa.

Las células descritas también pueden usarse para el trasplante celular como se muestra, por ejemplo, en el Ejemplo 3. Por ejemplo, la población mixta de células, las células progenitoras pancreáticas positivas NKX6-1 enriquecidas y/o aisladas y/o las células productoras de insulina positivas NKX6-1 pueden introducirse en un sujeto que necesite de las mismas, por ejemplo, para tratar la diabetes y/o una condición de pre-diabetes.

Por consiguiente, un aspecto incluye obtener células y/o preparar células precursoras pancreáticas y/o células productoras de insulina de acuerdo con un procedimiento descrito en el presente documento, y administrar dichas células a un sujeto que necesite de las mismas, por ejemplo, un sujeto con diabetes.

También se incluyen los usos de dichas células y las composiciones que comprenden dichas células para trasplantar y/o tratar a un sujeto que necesite de las mismas, por ejemplo, para trasplantar y/o tratar a un sujeto con diabetes.

En una realización, la diabetes es diabetes tipo I. En otra realización, la diabetes es diabetes tipo II.

En una realización, las células progenitoras pancreáticas positivas NKX6-1 y/o las células beta se usan en ingeniería de tejidos. Por ejemplo, el acceso a poblaciones purificadas de células de linaje pancreático permitirá la generación de construcciones de ingeniería con un número definido de células pancreáticas.

En una realización, los procedimientos se aplican a enfermedades hiPSC específicas de pacientes y se usan, por ejemplo, para el modelado de la diabetes. Por ejemplo, las células pancreáticas u otras de un paciente con diabetes pueden aislarse, tratarse para obtener hiPSC que luego puede cultivarse e inducirse a diferenciarse en células progenitoras pancreáticas NKX6-1. Estas células pueden usarse para evaluar las características de la enfermedad, como, por ejemplo, los genes involucrados en la enfermedad o la respuesta a las células inmunes de los pacientes.

Por ejemplo, las células normales y las hiPSC de enfermedades específicas del paciente pueden inducirse células pancreáticas y endoteliales positivas NKX6-1 y ser comparadas. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo análisis genéticos, epigenéticos y proteómicos de progenitores pancreáticos y células beta de hiPSCs normales y específicos del paciente. Este tipo de análisis detallados pueden conducir al descubrimiento de vías de señalización, redes reguladoras transcripcionales y/o marcadores de la superficie celular que regulan el desarrollo pancreático humano normal, así como aquellos que desempeñan un papel en la enfermedad. Por ejemplo, las células normales y las hiPSC de enfermedades específicas del paciente pueden inducirse células pancreáticas y endoteliales positivas NKX6-1 y ser comparadas. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo análisis genéticos, epigenéticos y proteómicos de progenitores pancreáticos y células beta de hiPSCs normales y específicos del paciente. Este tipo de análisis detallados pueden conducir al descubrimiento de vías de señalización, redes reguladoras transcripcionales y/o marcadores de la superficie celular que regulan el desarrollo pancreático humano normal, así como aquellos que desempeñan un papel en la enfermedad.

El término "sujeto" como se usa en el presente documento incluye a todos los miembros del reino animal, incluidos los mamíferos, y se refiere adecuadamente a los seres humanos.

Los términos "tratar", "tratado", "tratamiento", etc., tal como se aplican a una célula aislada, incluyen someter la célula a cualquier tipo de proceso o condición o realizar cualquier tipo de manipulación o procedimiento en la célula. Aplicado a un sujeto, los términos se refieren a proporcionar atención médica o quirúrgica, asistencia o gestión de un individuo.

El término "tratamiento" tal como se usa en el presente documento aplicado a un sujeto, se refiere a un enfoque dirigido a obtener resultados beneficiosos o deseados, que incluye resultados clínicos e incluye procedimientos y aplicaciones médicas que incluyen, por ejemplo, intervenciones farmacéuticas, cirugía, radioterapia e intervenciones naturopáticas, así como tratamientos de prueba para tratar la diabetes. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, el alivio o la mejora de uno o más síntomas o afecciones, la disminución de la extensión de la enfermedad, la estabilización (es decir, no el empeoramiento) del estado de la enfermedad, la prevención de la propagación de la enfermedad, el retraso o la desaceleración de la enfermedad, la progresión de la enfermedad, la mejoría o la paliación del estado de la enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no recibe el tratamiento.

Como se usa en el presente documento, los términos "administrar", "introducir" y "trasplantar" se usan indistintamente en el contexto de la administración de células (por ejemplo, células progenitoras pancreáticas positivas NKX6-1, o su progenie diferenciada (por ejemplo, células productoras de insulina como, por ejemplo, las células beta pancreáticas) en un sujeto, por medio de un procedimiento o ruta que da como resultado una localización al menos parcial de las células introducidas en un sitio deseado. Las células pueden implantarse directamente en el páncreas, o alternativamente pueden administrarse por cualquier ruta apropiada que resulte en la administración en una ubicación deseada en el sujeto donde al menos una porción de las células o componentes implantados de las células permanezcan viables.

Además, las definiciones y realizaciones descritas en secciones particulares pretenden ser aplicables a otras realizaciones descritas en el presente documento para las que son adecuadas como comprendería un experto en la materia. Por ejemplo, en los siguientes pasajes, se definen en más detalle diferentes aspectos de la presente invención. Cada aspecto así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

La descripción anterior por lo general describe la presente solicitud. Se puede obtener una comprensión más completa al hacer referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no tienen la intención de limitar el alcance de la presente aplicación.

Los siguientes ejemplos no limitativos son ilustrativos de la presente descripción:

Ejemplos

Ejemplo 1

Nogina, EGF, Nicotinamida y Exendina-4 inducen la expresión de NKX6-1 en células endodérmicas derivadas de hESC.

Las células progenitoras pancreáticas con el potencial de generar células beta funcionales se caracterizan por la expresión de factores de transcripción clave: PDX1, SOX9, NKX6-1 y PTF1A. NKX6-1 es de particular importancia, ya que es esencial para el desarrollo de una población de células beta funcionales (Sander et al., 2000). Hasta la fecha, no se conocen los factores que regulan el desarrollo de estos progenitores a partir del endodermo pancreático PDX1.

En el presente documento se describe un procedimiento robusto para generar células endodérmicas NKX6-1+ a partir de hPSC con potencial para generar células beta funcionales. Al usar una línea celular de referencia reportero hESC en la que GFP se ha dirigido al locus NKX6-1 por medio de la recombinación homóloga, se identificaron factores que pueden inducir el desarrollo de una población NKX6-1-GFP+. Con este enfoque, las hPSC se diferencian de la "etapa de brote pancreático" (células que expresan PDX1+) durante un período de 7 días, al utilizar un protocolo publicado previamente (Nostro et al., 2011). Estas células se cultivan en uno o más componentes, opcionalmente una combinación del inhibidor de BMP (Nogina u otros antagonistas de BMP), EGF (o factores relacionados con EGF), Nicotinamida y Exendina-4 (NENAEx) (Figura 1) y se analizan a diferentes tiempos para la expresión de NKX6-1-GFP. La expresión de NKX6-1-GFP, medida por citometría de flujo, se detectó dentro de los 3 días de cultivo en NENAEx (Figura 2).

La Figura 1 ilustra esquemáticamente que las hPSC se diferencian hasta la etapa 3 (d7) de acuerdo con un protocolo descrito anteriormente (Nostro et al., 2011), con ligeras modificaciones (adición de Wnt3a en el día 1 y Exendina-4, Ex-4 desde el día 5 al día 7). Se usaron citocinas y moléculas pequeñas en las siguientes concentraciones: Activina A (Act1:100ng/ml), Wnt3a (Etapa 1:25ng/ml), bFGF (5ng/ml), FGF10 (50ng/ml), Wnt3a (Etapa 2: 3ng/ml), dorsomorfina (DM: 0,75µM), Nogina (NOG: 50ng/ml), ciclopamina-KAAD (Cyc: 2,5µM), ácido retinoico (RA: 2µM) Exendina-4 (Ex-4: 50ng/ml) EGF (50ng/ml), nicotinamida (NA: 10mM).

La Figura 2 demuestra que Nogina, EGF, Nicotinamida y Exendina-4 inducen la expresión de NKX6-1:GFP en células endodérmicas derivadas de hESC. Análisis cinético para GFP (día 7 al día 17, T7-T17) durante la diferenciación

pancreática de la línea NKX6-1^{GFP/w} hESC. Las células NKX6-1^{GFP/w} se diferenciaron de acuerdo al protocolo publicado (Nostro et al., 2011) hasta la etapa 3 y luego se trataron con Nogina (50ng/ml), EGF (50ng/ml), Nicotinamida (10mM) y Exendina-4 (50ng/ml) durante 11 días. La GFP, medida por citometría de flujo, comienza a detectarse en el día 10 y alcanza la expresión máxima de diferenciación en el día 13. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3).

La proporción de células NKX6-1-GFP+ aumentó dramáticamente durante los siguientes 3 días (por ejemplo, días 11-13 en cultivo), lo que representa más del 60% de todo el cultivo para el día 13. Los niveles de NKX6-1-GFP se mantuvieron constantes durante los siguientes 2 días y después disminuyeron moderadamente para el día 17 de cultivo.

Los análisis moleculares (RT-qPCR) revelaron una regulación positiva de la expresión de NKX6-1 entre los días 9 y 11, seguida por una disminución constante hasta el día 17 (Figura 3).

La Figura 3 muestra que la inducción de NKX6-1 coincide con la expresión de PDX1, PTF1A y SOX9. El análisis QPCR para NKX6-1, PDX1, PTF1A y SOX9 durante el análisis cinético para GFP (día 7 al día 17, T7-T17) durante la diferenciación pancreática de la línea NKX6-1^{GFP/w} hESC. Las células NKX6-1^{GFP/w} se diferenciaron de acuerdo al protocolo publicado (Nostro et al., 2011) hasta la etapa 3 y luego se trataron con Nogina (50ng/ml), EGF (50ng/ml), Nicotinamida (10mM) y Exendina4 (50ng/ml) durante 11 días. Los niveles de expresión se normalizan a los genes de limpieza TBP y se comparan con los niveles de expresión del páncreas adulto (AP, barra gris). Las barras de error representan el error estándar de la media (n=2).

La diferencia en la cinética de la expresión de ARNm y GFP puede reflejar un retraso en la expresión transgénica y diferencias en la estabilidad del mensaje NKX6-1 y de la proteína GFP. La expresión de PDX1 se incrementó varios días antes, entre los días 7 y 8 (Figura 3). Los niveles de expresión de PDX1 alcanzaron su punto máximo en el día 10 y después disminuyeron en los siguientes 7 días. El patrón de expresión de PTF1A fue transitorio y se detectó entre los 10 y 14 de diferenciación. La expresión de SOX9 se incrementó entre los días 8 y 10 y después permaneció relativamente constante durante la duración del experimento. Tomados en conjunto, estos hallazgos demuestran que la combinación de NENAEx induce el desarrollo de progenitores endocrinos a partir del endodermo pancreático.

Ejemplo 2

La combinación de Nogina, EGF y nicotinamida (NENA) induce la expresión de NKX6-1 en células endodérmicas derivadas de hESC.

Para determinar además qué combinación de factores NENAEx era esencial para la generación de los progenitores NKX6-1+, se probaron diferentes combinaciones en los hESC NKX6-1-GFP reporteros, así como en una segunda línea hESC no manipulada, referencia H1 (WA01). La citometría de flujo intracelular se utilizó para evaluar la proporción de células NKX6-1+ en las poblaciones derivadas de H1. Como se muestra en la Figura 4, la combinación de Nogina, EGF y Nicotinamida (NENA) fue tan efectiva como la combinación de 4 factores de Nogina, EGF, Nicotinamida y Exendina-4 para inducir NKX6-1. La combinación de EGF y nicotinamida (ENA) indujo la expresión de NKX6-1 (46.9±7.4%), sin embargo, los niveles siempre fueron más bajos en comparación con la combinación de los 3 factores (NENA) (Figura 4A). La diferenciación H1 (WA01) mostró un patrón muy similar en respuesta al tratamiento con NENA (Figura 4B). Se han obtenido datos similares al utilizar la línea celular de referencia H9, lo que demuestra que este protocolo de inducción no depende de la línea celular y es ampliamente aplicable a la generación de progenitores NKX6-1 derivados de hPSC.

La Figura 4A demuestra que al usar la línea NKX6-1^{GFP/w} HESC, el porcentaje de NKX6-1: células GFP+ es mayor cuando las células endodérmicas se cultivan en presencia de Nogina, EGF, Nicotinamida (con o sin Exendina-4), en comparación con ningún tratamiento o una combinación de los compuestos anteriores.

La Figura 4B es un gráfico que demuestra que al usar la línea H1 (WA01) HESC, el porcentaje de células NKX6-1+ es más alto cuando las células endodérmicas se cultivan en presencia de Nogina, EGF, Nicotinamida (con o sin Exendina-4), en comparación con ningún tratamiento o varias combinaciones de los compuestos anteriores.

Ejemplo 3

Las células NKX6-1 generadas al usar el "tratamiento NENA" tienen el potencial de generar células productoras de insulina.

Para establecer el potencial de desarrollo de la población enriquecida en NKX6-1 derivada de hPSC, se trasplantaron 5-10x10⁶ células inducidas por NENA (día 14 de diferenciación) en la bolsa de grasa mamaria de ratones inmunocomprometidos. El análisis del injerto a las 4 semanas después del trasplante reveló la presencia de estructuras de tipo ductal (por ejemplo, CK19+) que mantuvieron la expresión de PDX1 y NKX6-1. En esta etapa, los injertos contenían pocas células de glucagón+ y casi ninguna célula de insulina+. A las 6 semanas después del trasplante, los injertos contenían un número sustancial de células NKX6-1+ (Figura 5A). Los injertos de 6 semanas contenían un mayor porcentaje de células de insulina+ en comparación con los injertos de 4 semanas. Todas estas células de insulina+ co-expresaron NKX6-1 (Figura 5A). Para demostrar que las células de insulina+ presentes en el injerto representan células productoras de insulina derivadas de hPSC, se llevó a cabo una inmunohistoquímica al usar un anticuerpo anti-peptido c humano. Como se muestra en la Figura 5B, el injerto contenía células péptido C+, lo que confirma que las células humanas producen insulina y no la toman de la sangre. Además, la co-tinción con un

anticuerpo anti-glucagón reveló que las células péptido C+ no expresan glucagón, lo que indica que no son polihormonales (Figura 5B). Los resultados de estos estudios de trasplante demuestran que los progenitores inducidos por NENA son capaces de diferenciarse en células productoras de insulina y células ductales después del trasplante *in vivo*.

5 Ejemplo 4

Los anticuerpos HPx marcan los progenitores NKX6-1+.

Estudios recientes identificaron el marcador de superficie CD142 como un epítipo potencial que podría usarse para aislar progenitores pancreáticos multipotentes de cultivos derivados de hPSC (Kelly et al., 2011). A través del análisis de una biblioteca de diferentes anticuerpos, se descubrieron dos anticuerpos HPx1 y HPx2 descritos previamente que tienen una porción de la población progenitora NKX6-1+. Como se muestra en la Figura 6, HPx (por ejemplo, HPx1 y/o HPx2) tiñe aproximadamente el 60% de la población de NKX6-1-GFP+ inducida por NENA en el día 13 de cultivo. HPx también tiñe una población de células NKX6-1-GFP-negativas. Se detectaron muy pocas células HPx+ en cultivos no tratados, lo que demuestra que la tinción de HPx se correlaciona bien con la aparición de progenitores NKX6-1+. El anticuerpo anti-CD142 marca una porción significativa de la población NKX6-1-GFP de acuerdo con lo informado por Kelly et al. (Kelly et al., 2011) (Figura 6C). Sin embargo, los cultivos no inducidos también contienen una gran población de CD142, a pesar del hecho de que se detectan pocas células NKX6-1+ en estas condiciones (Figura 6C). Estos hallazgos indican que la expresión de CD142 no se correlaciona bien con el desarrollo del progenitor NKX6-1+. Los patrones de tinción de HPx sugieren que será un reactivo superior para controlar el desarrollo de progenitores NKX6-1+ y para aislarlos de cultivos celulares mixtos.

20 Ejemplo 5

Los anticuerpos HPx pueden usarse para purificar una población enriquecida para células positivas NKX6-1.

Los anticuerpos HPx pueden usarse para purificar una población enriquecida para células positivas NKX6-1. Se realizaron dos experimentos para comparar HPx (por ejemplo, se usan indistintamente HPx, HPx1, HPx2, Px, Px1 y Px2: HPx1 y HPx2 reconocen la misma población y HPx1 y HPx2 pueden usarse indistintamente y/o juntos) frente a los anticuerpos CD142 (Figura 7).

Las células positivas y negativas para los dos anticuerpos se aislaron de las células diferenciadas de d14 NENA y se determinó la fracción que expresaba los niveles más altos de NKX6-1 (Figuras 7A y 10). Las células positivas y negativas para los dos anticuerpos se aislaron de las células diferenciadas de d14 NENA y se determinó la fracción que expresaba los niveles más altos de NKX6-1 (Figuras 7A y 10).

Estos resultados sugieren que HPx puede usarse para enriquecer las células positivas NKX6-1. La fracción CD142+ y Px2+ mostró un aumento de 2 veces en los niveles de expresión de NKX6-1 en comparación con la población de preclasificación (PS). Si bien ambos anticuerpos pueden usarse para enriquecer las células positivas NKX6-1, HPx muestra una mayor especificidad (ver Figura 6C) y proporciona un mayor rendimiento celular (se pueden aislar aproximadamente 3X más células usando HPx en comparación con CD142 en el mismo período de tiempo).

Los dos anticuerpos (CD142 y HPx) también se usaron en combinación para clasificar las células Px2+ y CD142+ de células diferenciadas NENA d14 y se evaluaron los niveles de expresión de NKX6-1 en las diferentes fracciones: preclasificación (PS), Px2-CD142-, poblaciones clasificadas Px2+ CD142-, Px2+ CD142+, Px2-CD142+ (Figura 7B). NKX6-1 se expresó en los niveles más altos en la población doble positiva Px2+ CD142+, sin embargo, el aumento de veces sobre PS fue el mismo que en la población única CD142+ o en la población única Px2+, lo que sugiere que hay poca ventaja en la clasificación doble.

La Figura 7 muestra el análisis de PCR cuantitativo (QPCR) para NKX6-1 en las poblaciones pre-clasificadas (PS), poblaciones clasificadas Px2+, Px2-, CD142+, CD142- de células H1 diferenciadas NENA (WA01) al día 14. (B) Análisis de PCR cuantitativo (QPCR) para NKX6-1 en las poblaciones pre-clasificadas (PS), poblaciones clasificadas Px2-CD142-, Px2+ CD142-, Px2+ CD142+, Px2-CD142+ de células H1 diferenciadas NENA (WA01) al día 14. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=2 para A y n=3 para B). La expresión de NKX6-1 se normaliza a un gen de limpieza TBP (proteína de unión TATA).

45 Ejemplo 6

Generación de células endoteliales capaces de promover la maduración de células péptido C+.

Las células endoteliales derivadas de HES se generaron al usar la línea celular de referencia H1 hESC por inducción con la combinación de BMP4, bFGF, VEGF. En el día 6, los CD34+ se clasificaron y cultivaron en un medio EGM-2 (Lonza) suplementado con 50ng/ml de bFGF y 100ng/ml de VEGF. Los análisis de las células CD34+ del día 6 revelaron que estas expresan KDR, CD31 y vWF y muestran la capacidad de captar LDL acetiladas (Fig. 8).

Se puede usar cualquier población endotelial, en particular células endoteliales derivadas de células madre embrionarias.

55 Ejemplo 7

El co-cultivo de células endoteliales derivadas de hESC y progenitores pancreáticos aumenta el conjunto de progenitores NKX6-1+ y promueve su maduración en células productoras de insulina.

5 Para estos estudios, se agregaron los progenitores inducidos por NENAEx en el día 10 de cultivo generados a partir de la línea celular reportera NKX6-1-GFP y los agregados se sembraron en células endoteliales CD34+ derivadas de hESC confluentes. Estos cultivos se mantuvieron durante 7 días adicionales en medios que contenían NENAEx con 10 5ng/ml de bFGF y 100ng/ml de VEGF. Como controles, las células se mantuvieron como monocapa o se cultivaron agregados en placas recubiertas con colágeno en ausencia de células endoteliales. Como se muestra en la Figura 9A, las células cultivadas en las células endoteliales mantuvieron una mayor proporción de células NKX6-1-GFP+ que las cultivadas como monocapa o como agregados en el colágeno. Los análisis de las diferentes poblaciones para detectar la presencia de células productoras de insulina revelaron diferencias sorprendentes. Solo los agregados co-cultivados con las células endoteliales generaron cantidades sustanciales de células péptido C+. Aproximadamente el 33% de las 15 células NKX6-1-GFP+ eran péptido C+, lo que representa el 17% de la población total agregada (33% del 53% de las células GFP). Los análisis RT-qPCR confirmaron los análisis de citometría de flujo y mostraron que solo la población co-cultivada con las células endoteliales expresó el mensaje de insulina y glucagón (Figura 9B). Estos hallazgos demuestran que las células endoteliales derivadas de hESC son capaces de apoyar la maduración de las células péptido C+ de los progenitores NKX6-1+. El hecho de que las células péptido C+ co-expresen NKX6-1-GFP sugiere fuertemente que son células beta monohormonales.

Ejemplo 8

Tabla 1. Fórmula a modo de ejemplo para la composición del MEDIO de la Etapa 4

	Stock Conc.	FinalConc.	por ml
DMEM (Life Technologies)*			1 ml
L-Glutamina (Life Technologies)	100x	1%	10µl
Suplemento B27 (Life Technologies)	100x	1%	10µl
ÁCIDO L-ASCÓRBICO (AA) (SIGMA)	5µg/ml	50µg/ml	10µl
Nogina	100µg/ml	50µg/ml	0,5µl
EGF (R&D Systems)	100µg/ml	50µg/ml	0,5µl
Nicotinamida (SIGMA)	1,64 M	10mM	6µl
Exendina-4** (SIGMA)	50µg/ml	50ng/ml	1µl

* DMEM podría ser sustituido por otros medios de base como IMDM, RPMI, CMRL o cualquier otro medio que apoye el crecimiento de las células endodérmicas. Los medios de base contienen antibióticos: Penicilina / Estreptomicina (Life Technologies).

** Exendina-4 no es necesaria para la inducción de NKX6-1.

El co-cultivo con células endoteliales para generar células de insulina+ está respaldado por la adición de bFGF y VEGF (R&D Systems).

Ejemplo 9

Marcadores de la población de la sección posterior del intestino anterior (etapa 3). Las células endodérmicas en la etapa 3 deben expresar al menos FOXA2 y puede ser positivo o negativo para PDX1 (otros factores como HNF1, factor nuclear de hepatocitos 4, alfa (HNF4A) **ID del gen: 3172** y un cut homeobox 1 (ONECUT1 / HNF6) **ID del gen: 3175**, por ejemplo, también pueden expresarse).

Marcadores de la población de progenitores pancreáticos (etapa 4). Las células diferenciadas en NKX6-1+ progenitores pancreáticos pueden, además de expresar NKX6-1, también expresar FOXA2, PDX1, SRY (región determinante por el sexo Y)-box 9 (SOX9) **ID del gen 6662** y factor de transcripción específico del páncreas, 1a (PTF1A) **ID del gen: 256297**.

Ejemplo 10

Ejemplos de componentes de Nogina:

- Nogina
- BMPR1A
- BMPR1B
- Dorsomorfina
- LDN 193189
- CORDINA

- O combinaciones de los compuestos anteriores.

Ejemplo 11

Ejemplos de componentes de EGF:

- EGF
- 5 • Anfiregulina (AR)
- Factor de crecimiento transformante (TGF)
- Betacelulina (BTC)
- EGF de unión a heparina (HB-EGF)
- Epiregulina (EPR)
- 10 • Neuregulinas (NRG1, NRG2, 3 NRG4)

O combinaciones de los factores anteriores y EGF que puedan afectar las posteriormente moléculas de señalización, incluidos, por ejemplo, activadores de MAPK o PI3-quinasa.

Ejemplo 12

Ejemplos de componentes de nicotinamida:

- 15 • Inhibidores de la poli-(ADP-ribosa) sintetasa, por ejemplo, benzamida y 3-aminobenzamida (Otonkoski et al., 1993).
- Inhibidores de Sir-2, por ejemplo, sirtinol, M15, splitomicina (Bitterman et al., 2002).
- Otros inhibidores de HDAC que incluyen, por ejemplo, AN-9, CI-994, FK228, LAQ-824, MS275, SAHA, ácido valproico, TSA, butirato de sodio (Bitterman et al., 2002).

Ejemplo 13

Tabla 2 Porcentaje de células NKX6-1+ en el día 13 de diferenciación al usar la línea celular humana ES: H9 (WA09)

Tratamiento en la etapa 4	Porcentaje de células NKX6-1+
Sin tratamiento	6,1
Nogina (N)	21,7
EGF (E)	18,5
Nicotinamida (NA)	14,0
Nogina EGF (NE)	16,6
Nogina Nicotinamida (NNA)	12,6
EGF Nicotinamida (ENA)	38,3
Nogina EGF Nicotinamida (NENA)	56,4
Nogina Exendina-4 EGF Nicotinamida (NExENA) n=1	34,86

Ejemplo 14

Los progenitores pancreáticos derivados de HPSC (enriquecidos en HPx1/2) y sus derivados de células beta podrían usarse para la toxicología predictiva de fármacos y el descubrimiento de fármacos.

Específicamente, la población que expresa NKX6-1 generada al usar las condiciones de cultivo descritas en el presente documento puede usarse para identificar compuestos que pueden: 1) estimular la expansión, 2) desencadenar la apoptosis, 3) inducir la diferenciación de las células que expresan NKX6-1 a células similares a las beta, así como a otras células productoras de hormonas (somatostatina, glucagón, polipéptido pancreático y grelina), células acinares o ductales. El uso del anticuerpo HPX puede facilitar la detección del compuesto, al proporcionar una población homogénea. Además, la población enriquecida para las células de insulina+ generadas por el co-cultivo con células endoteliales puede usarse para analizar compuestos que puedan desencadenar la proliferación o la apoptosis y para compuestos que puedan mejorar la secreción de insulina estimulada por glucosa.

Ejemplo 15

- 1) Trasplante de células en modelos de animales diabéticos para probar la efectividad y funcionalidad de las

células positivas NKX6-1 y/o positivas para insulina generadas *in vitro*. Brevemente, las células se trasplantarán en diferentes modelos animales inmunodeficientes donde la diabetes puede ser inducida genéticamente o por tratamiento farmacológico (como el tratamiento con estreptozotocina) y la funcionalidad de las células pancreáticas derivadas de PSC humano (positivas NKX6-1 y/o positivas para insulina) se evaluará por medio de la medición de la concentración de glucosa en sangre y los niveles de péptido C humano en el suero del animal.

5

- 2) Trasplante de células: a) se comparan los efectos del trasplante de poblaciones progenitoras frente a las células beta funcionales, b) se comparan los efectos del trasplante de progenitores pancreáticos enriquecidos con HPx1/2 frente a poblaciones de linaje mixto que consisten en un número definido de células pancreáticas y otros tipos de células, incluidas las células endoteliales y los fibroblastos.

10

Ejemplo 16

Las células progenitoras pancreáticas se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 al usarse NENA. Como se muestra en la Figura 10, las células HPx1+ se aislaron al usarse clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y se enriquecieron para una población que expresa niveles más altos de ARNm de NKX6-1/TBP, SOX9/TBP y PTF1a/TBP en comparación con las células HPx1 y las células pre-seleccionadas (PS).

15

Ejemplo 17

Se generaron células pancreáticas NKX6-1+ al usarse el tratamiento "NENA" descrito en el Ejemplo 1 y se trasplantaron a ratones inmunocomprometidos. Estas células generan células funcionales productoras de insulina de acuerdo con lo indicado por la secreción de péptido C humano en respuesta a la tolerancia a la glucosa. Los niveles de secreción de péptido C humano en respuesta a la tolerancia a la glucosa se midieron por ELISA a las 6, 12 y 18 semanas después del trasplante de células diferenciadas H1 (WA01) d13 en ratones inmunocomprometidos (Figura 11). Se llevaron a cabo cinco trasplantes (identificados como 1, 2, 3, 4 y 5) más un trasplante al usar células de control (identificadas como "control"). Los ratones 1, 3, 4 y 5 tenían niveles significativamente elevados de péptido C en suero.

20

25

Citas de las referencias mencionadas en la especificación

Bitterman, K.J., Anderson, R.M., Cohen, H.Y., Latorre-Esteves, M. y Sinclair, D.A. 2002 Inhibición del silenciamiento y el envejecimiento acelerado por la nicotinamida, un supuesto regulador negativo de la levadura Sir2 y la SIRT1 humana. *JBC* 277(47): 45099

5 Dorrell, C., Abraham, S.L., Lanxon-Cookson, K.M., Canaday, P.S., Streeter, P.R., y Grompe, M. 2008. Aislamiento de los principales tipos de células pancreáticas y células iniciadoras de cultivo a largo plazo por medio de utilizar nuevos marcadores de superficie humana. *Célula madreRes* 1(3): 183-194.

10 Jaramillo, M. y Banerjee, I. 2012. El co-cultivo de células endoteliales por medio de la maduración de células madre embrionarias humanas a células productoras de insulina pancreática en un enfoque de diferenciación dirigida. *J Vis Exp* (61).

Kelly, O.G., Chan, M.Y., Martinson, L.A., Kadoya, K., Ostertag, T.M., Ross, K.G., Richardson, M., Carpenter, M.K., D'Amour, K.A., Kroon, E., Moorman, M., Baetge, E.E., y Bang, A.G. 2011. Marcadores de la superficie celular para el aislamiento de tipos de células pancreáticas derivadas de células madre embrionarias humanas. *Nat Biotechnol* 29 (8): 750-756.

15 Lammert, E., Cleaver, O., y Melton, D. 2001. Inducción de la diferenciación pancreática por señales de los vasos sanguíneos. *Science* 294 (5542): 564-567.

20 Nostro, M.C., Sarangi, F., Ogawa, S., Holtzinger, A., Comeo, B., Li, X., Micallef, S.J., Park, I.H., Basford, C., Wheeler, M.B., Daley, G.Q., Elefanty, A.G., Stanley, E.G., y Keller, G. 2011. La señalización específica de la etapa a través de los miembros de la familia TGFbeta y WNT regula el patrón y la especificación pancreática de las células madre pluripotentes humanas. *Development* 138 (5): 861-871.

Otonkoski, T., Beattie, G.M., Mally, M.I., Ricordi, C., y Hayek, A. 1993. La nicotinamida es un potente inductor de diferenciación endocrina en células pancreáticas fetales humanas cultivadas. *J Clin Invest* 92 (3): 1459-1466.

25 Sander, M., Sussel, L., Connors, J., Scheel, D., Kalamaras, J., Dela Cruz, F., Schwitzgebel, V., Hayes-Jordan, A., y German, M. 2000. El gen Homeobox NKX6-1 se encuentra posteriormente a Nkx2.2 en la vía principal de formación de células beta en el páncreas. *Development* 127 (24): 5533-5540.

30 Yoshitomi, H. y Zaret, K.S. 2004. Las interacciones con las células endoteliales inician el desarrollo del páncreas dorsal por medio de inducir selectivamente el factor de transcripción Ptf1a. *Development* 131 (4): 807-817.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para producir células progenitoras pancreáticas NKX6-1+ a partir de una población de células endodérmicas, comprendiendo el procedimiento poner en contacto a la población de células endodérmicas con una combinación de 1) al menos un componente de EGF seleccionado a partir de EGF, un conjugado activo de EGF y un fragmento activo de EGF; y 2) nicotinamida o una sal de la misma para inducir la diferenciación de al menos una porción de la población de células endodérmicas en células progenitoras pancreáticas NKX6-1+.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la combinación comprende además al menos un componente de nogina seleccionado de nogina, un conjugado activo de nogina, un fragmento activo de nogina, BMPR1A, BMPR1B, Dorsomorfinina, LDN193189, cordina y cualquier combinación de dos o más de los mismos.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el componente de EGF es EGF o EGF de unión a heparina (HB-EGF).
4. El procedimiento de la reivindicación 2 o 3, en el que la combinación comprende Nogina, EGF y nicotinamida.
- 15 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la combinación comprende además Exendina-4 o un fragmento activo de la misma.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la población de células endodérmicas se diferencia de las células madre pluripotentes (PSC), preferiblemente una célula madre embrionaria (ESC) o una célula madre pluripotente inducida (iPSC).
- 20 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la célula madre pluripotente es un ESC humano (hESC) o un iPSC humano (hiPSC).
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende primero producir una población de células endodérmicas.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el procedimiento de producción de la población de células endodérmicas comprende uno o más de los pasos o subpasos a, b y c; y el paso d, comprendiendo los pasos:
- 25 a) Poner en contacto una población de células madre pluripotentes con una combinación de:
- I) un agonista nodal, preferiblemente ActA y un agonista de señalización wnt, preferiblemente, Wnt3a o CHIR 99021,
- II) un agonista nodal, preferiblemente ActA, un agonista de FGF, preferiblemente bFGF, y
- III) un agonista nodal, preferiblemente ActA y un agonista de FGF, preferiblemente bFGF;
- 30 para producir células diferenciadas en la Etapa 1;
- b) Poner en contacto las células diferenciadas en la Etapa I con un agonista de FGF, preferiblemente FGF10, y un componente de nogina, preferiblemente dorsomorfinina, para producir células diferenciadas en la Etapa 2;
- c) Poner en contacto las células diferenciadas en la Etapa 2 con una nogina, ácido retinoico (RA) o RA, un inhibidor de señalización de hedge-hog, preferiblemente ciclopamina-KAAD (Cyc), un agonista de FGF, preferiblemente FGF10 y Exendina-4 para proporcionar una población de células endodérmicas; y
- 35 d) Poner en contacto la población de células endodérmicas con una combinación que comprende al menos un componente de EGF seleccionado de EGF, un conjugado activo de EGF y un fragmento activo de EGF y nicotinamida o una sal del mismo en una cantidad suficiente para inducir la diferenciación de al menos una porción de la población de células endodérmicas en células progenitoras pancreáticas NKX6-1+.
- 40 10. El procedimiento de la reivindicación 9 en el que el paso a) II) comprende además un agonista de señalización wnt, preferiblemente Wnt3a CHIR 99021 o en el que el paso b) comprende además poner en contacto las células de la Etapa I con uno o más de un agonista de señalización wnt, preferiblemente Wnt3a.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende enriquecer o aislar una población de células NKX6-1 positiva; en el que la etapa de enriquecimiento o aislamiento comprende poner en contacto la población de células con un anticuerpo de detección de epítipo HPx y aislar o purificar parcialmente la subpoblación ligadas de células HPx1 y/o HPx2.
- 45 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el anticuerpo que detecta el epítipo HPx es HPx1 y/o HPx2.
- 50

Figura 1

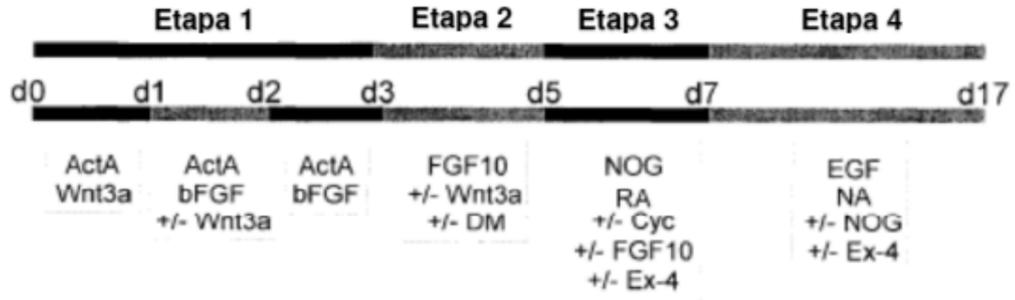


Figura 2

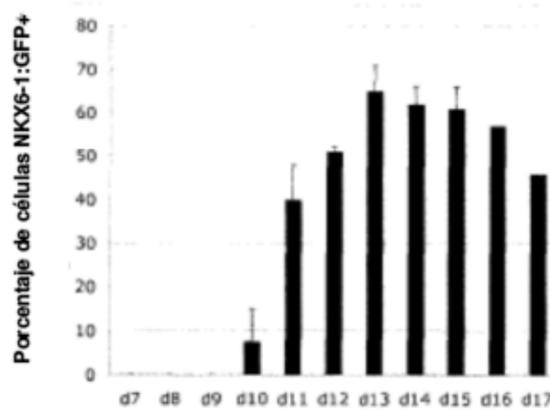


Figura 3

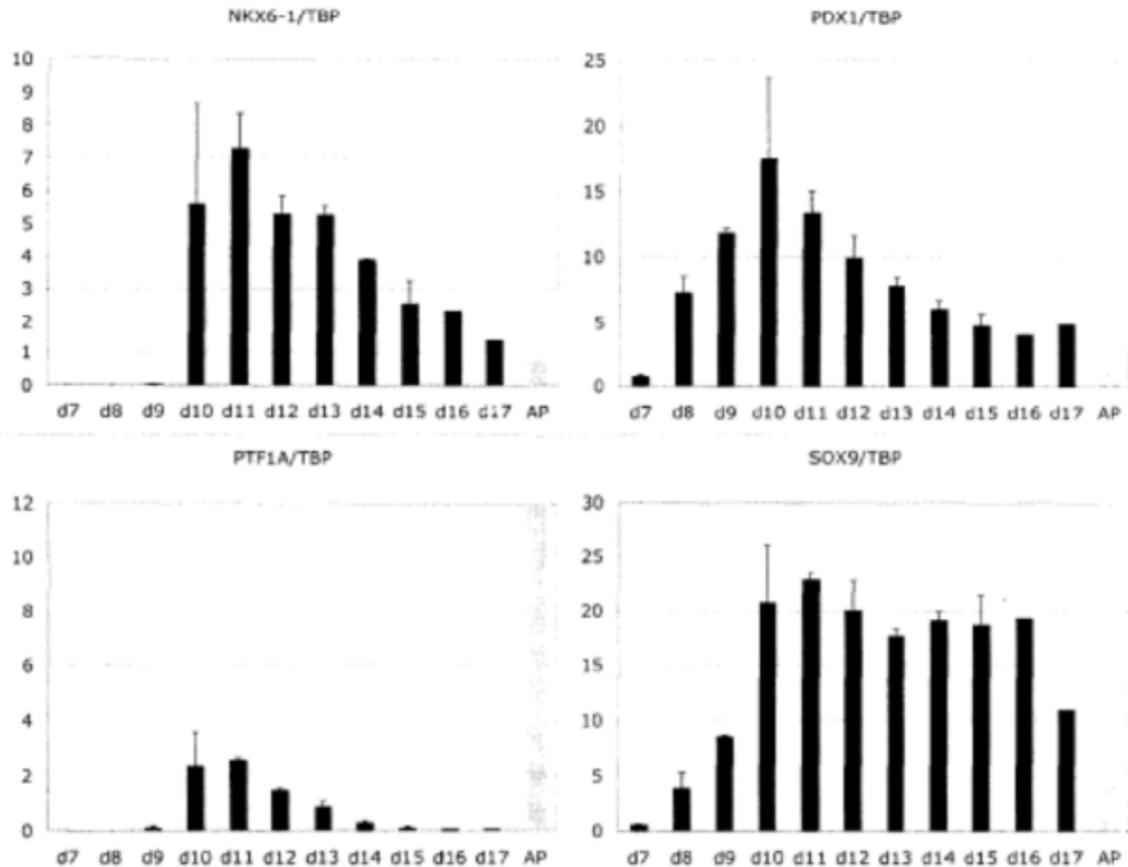


Figura 4

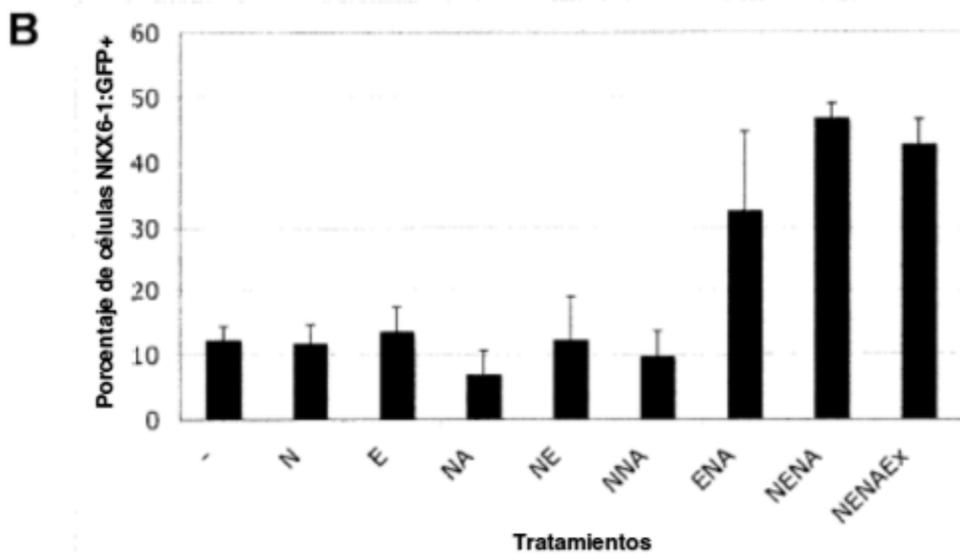
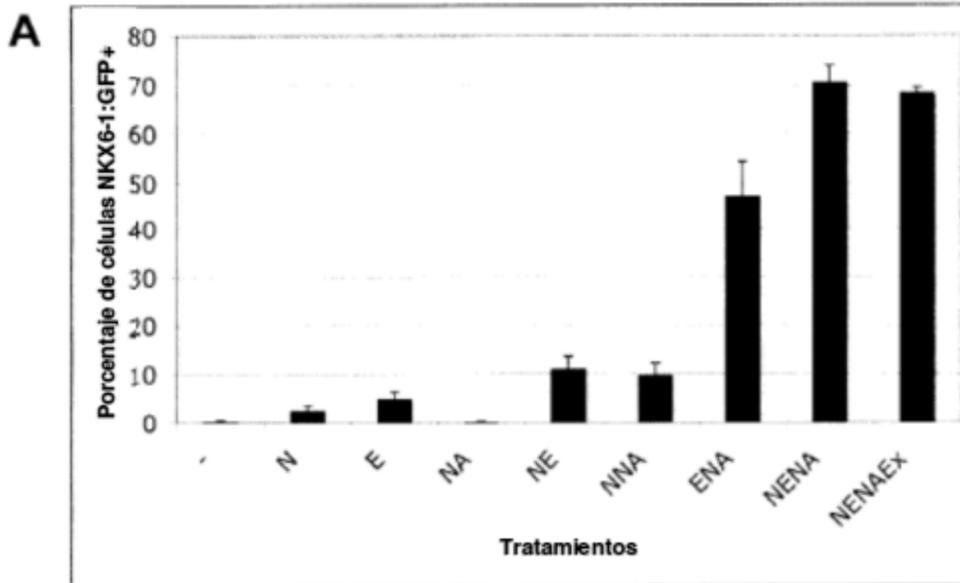


Figura 5

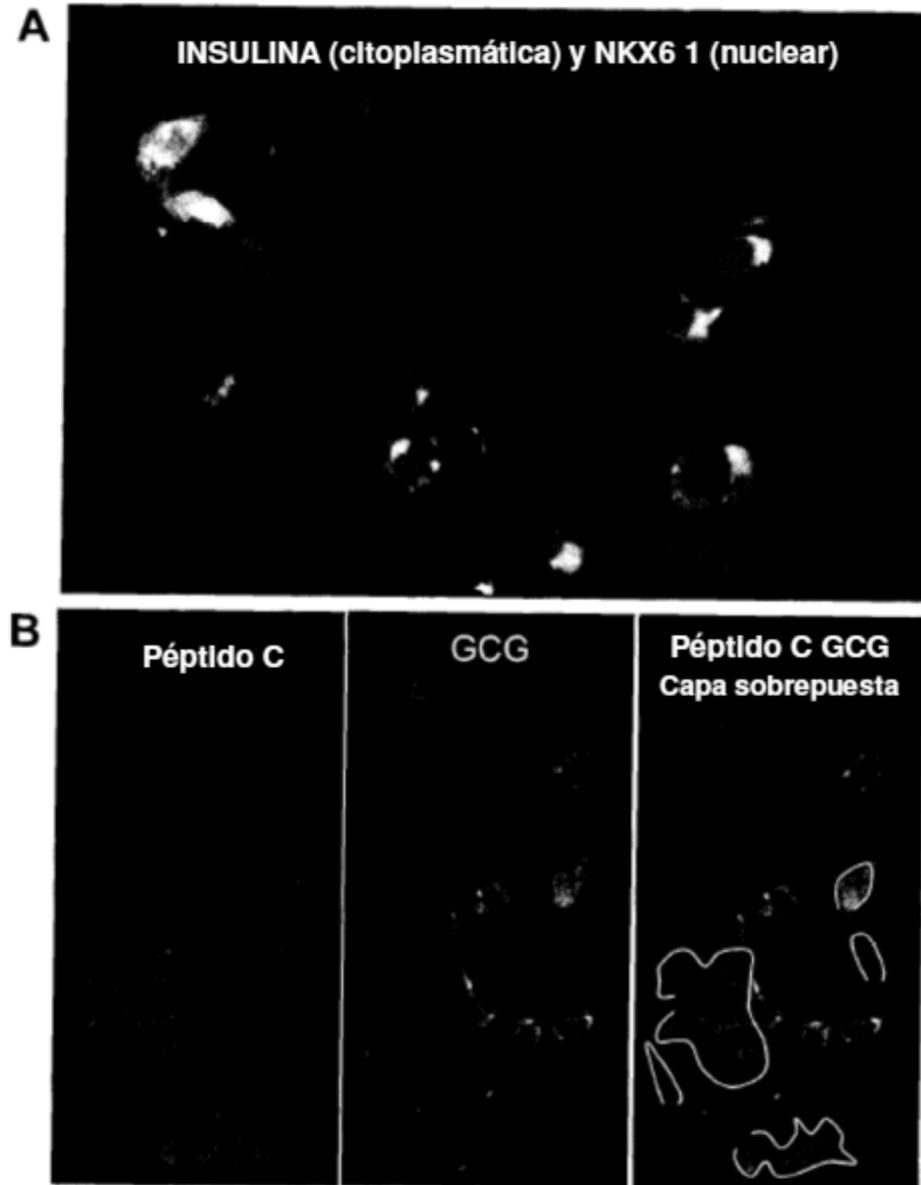


Figura 6

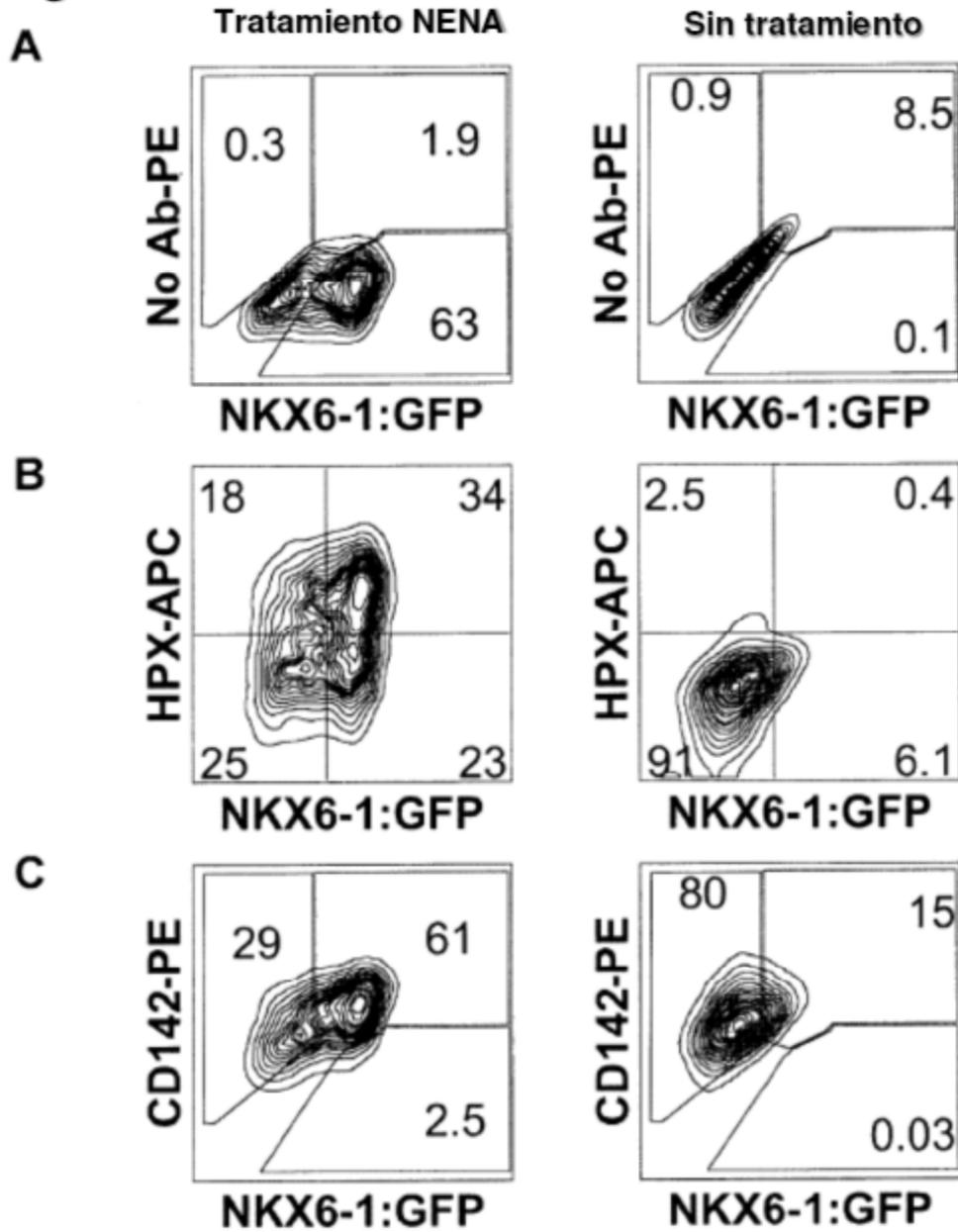


Figura 7

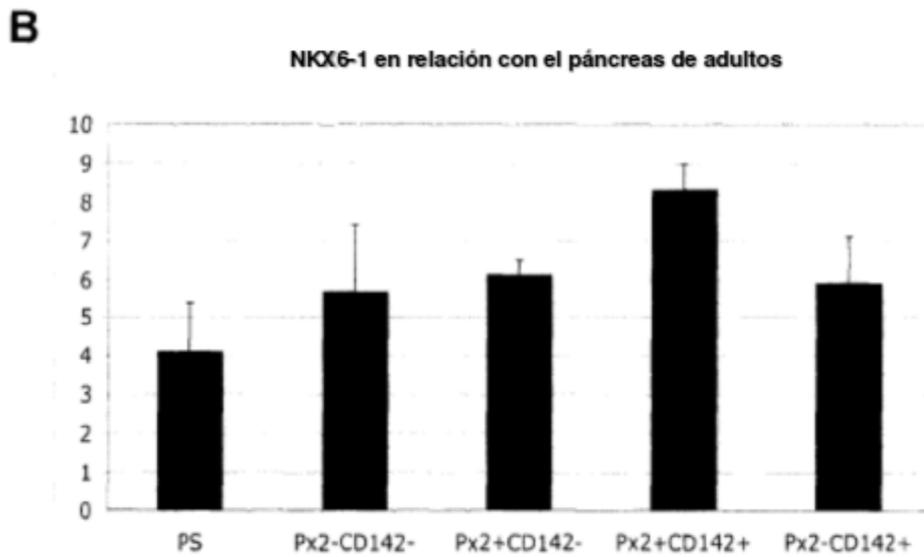
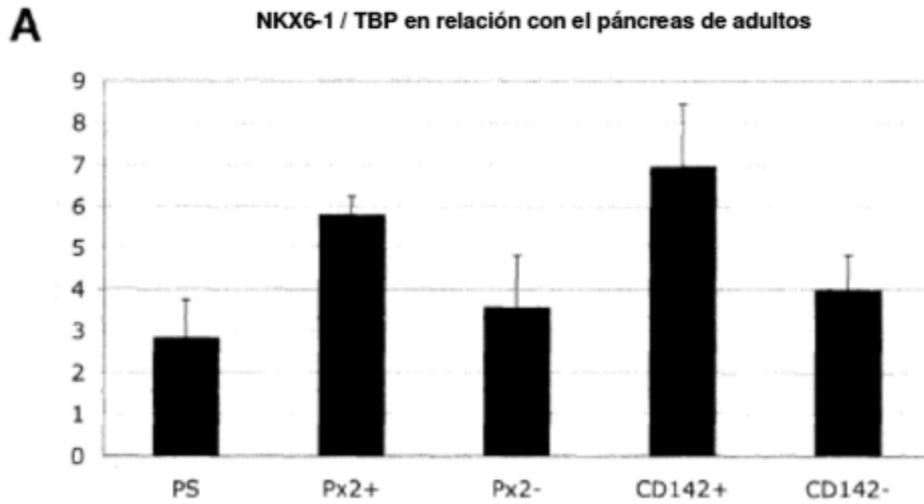


Figura 8

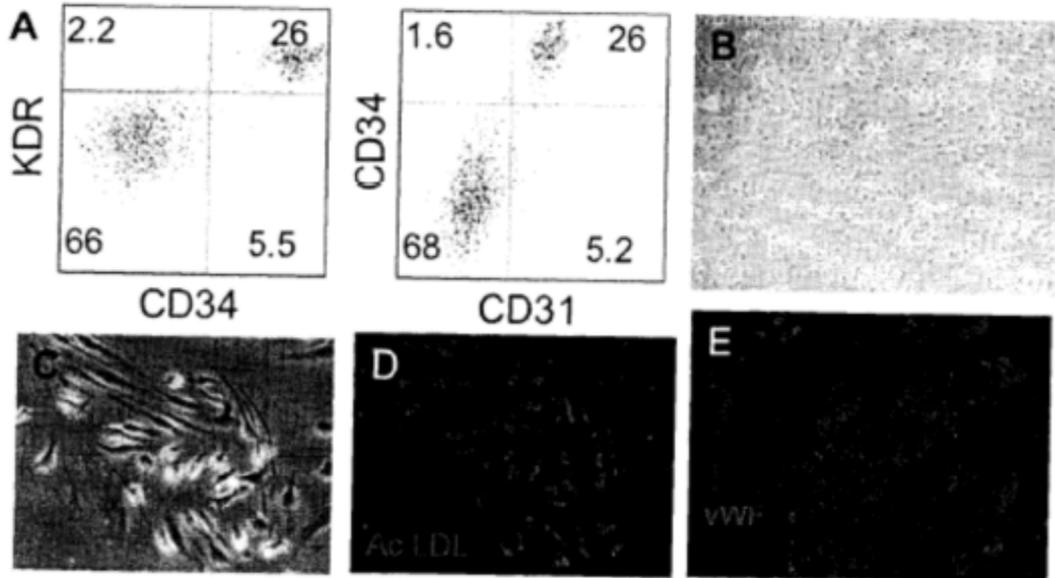


Figura 9

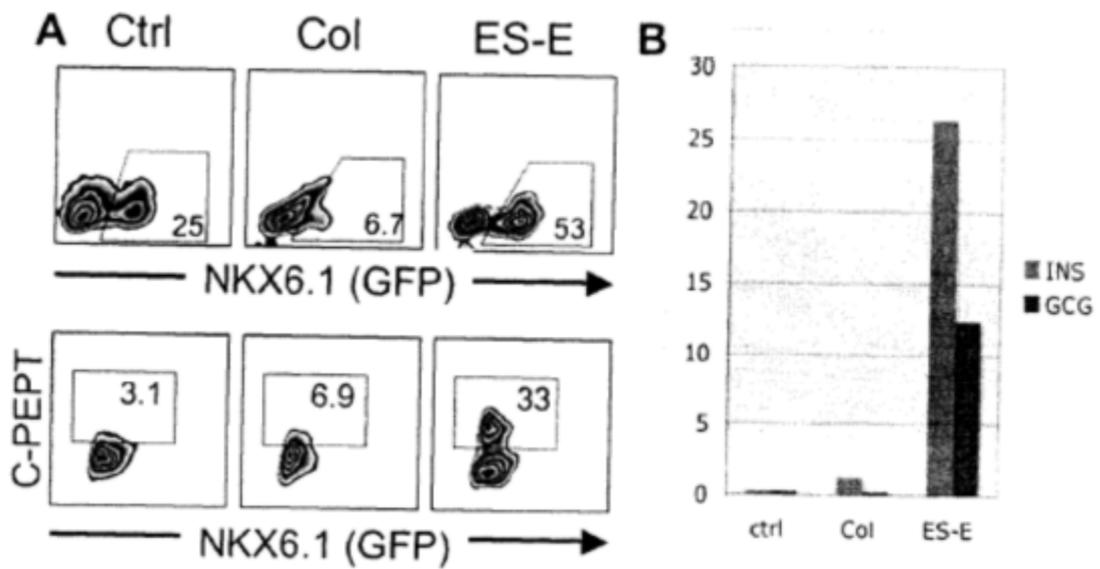


Figura 10

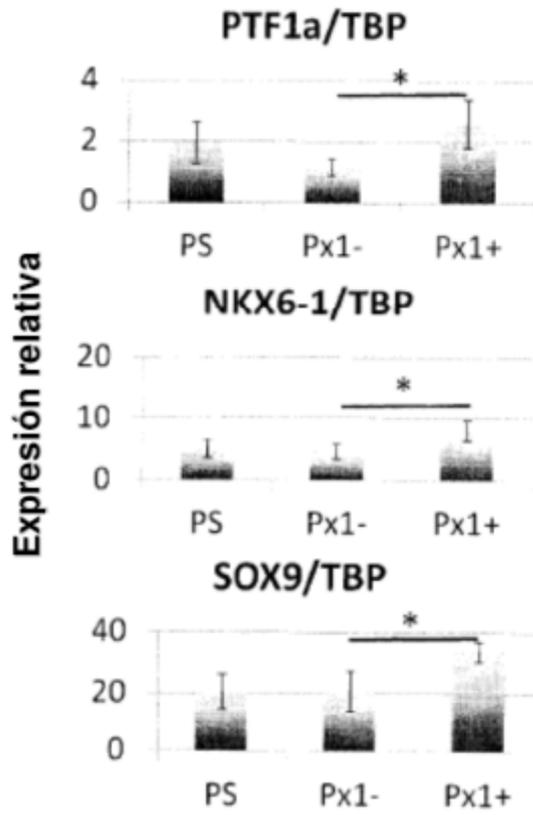


Figura 11

