

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 897 649**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2013 E 18190030 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.09.2021 EP 3450542**

(54) Título: **Diferenciación de células madre embrionarias humanas en células endocrinas pancreáticas**

(30) Prioridad:

08.06.2012 US 201261657160 P

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

02.03.2022

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

REZANIA, ALIREZA

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 897 649 T3

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

DESCRIPCIÓN

Diferenciación de células madre embrionarias humanas en células endocrinas pancreáticas

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención está en el campo de la diferenciación celular. Se divulga además el uso de ligandos de efrina y esfingosina-1-fosfato como reguladores de la diferenciación de células madre pluripotentes a células endocrinas.

10

ANTECEDENTES

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

15

En el desarrollo embrionario de vertebrados, una célula pluripotente da lugar a un grupo de células que comprende tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) en un proceso conocido como gastrulación. Tejidos como el tiroides, el timo, el páncreas, el intestino y el hígado se desarrollarán a partir del endodermo, a través de una etapa intermedia. La etapa intermedia en este proceso es la formación del endodermo definitivo. Las células de endodermo definitivo expresan una serie de marcadores, como, HNF3beta, GATA4, MIXL1, CXCR4 y SOX17.

20

Al final de la gastrulación, el endodermo se divide en dominios anteriores-posteriores que pueden reconocerse mediante la expresión de un panel de factores que marcan de manera única las regiones anterior, media y posterior del endodermo. Por ejemplo, Hhex y Sox2 identifican la región anterior, mientras que Cdx1, 2 y 4 identifican la mitad posterior del endodermo.

25

La migración del tejido del endodermo acerca el endodermo a diferentes tejidos mesodérmicos que ayudan a la regionalización del tubo intestinal. Esto se logra mediante una plétora de factores secretados, como FGF, Wnts, TGF-B, ácido retinoico (RA) y ligandos de BMP y sus antagonistas. Por ejemplo, FGF4 y BMP promueven la expresión de Cdx2 en el presunto endodermo del intestino posterior y reprimen la expresión de los genes anteriores Hhex y SOX2 (2000 Development, 127:1563-1567). La señalización de WNT también se ha demostrado que trabaja en paralelo a la señalización de FGF para promover el desarrollo del intestino posterior e inhibir el destino del intestino anterior (2007 Development, 134:2207-2217). Por último, el ácido retinoico secretado por el mesénquima regula el límite del intestino anterior-intestino posterior (2002 Curr Biol, 12:1215-1220).

30

El nivel de expresión de los factores de transcripción específicos puede usarse para designar la identidad de un tejido. Durante la transformación del endodermo definitivo en un tubo intestinal primitivo, el tubo intestinal se regionaliza en dominios amplios que pueden observarse a nivel molecular mediante patrones de expresión génica restringidos. Por ejemplo, el dominio de páncreas regionalizado en el tubo intestinal muestra una expresión muy alta de PDX-1 y una expresión muy baja de CDX2 y SOX2. De manera similar, la presencia de altos niveles de Foxe1 es indicativa de tejido del esófago; el NKX2.1 se expresa altamente en el tejido pulmonar; SOX2/Odd1 (OSR1) están altamente expresados en el tejido del estómago; expresión de PROX1/Hhex/AFP es alta en el tejido hepático; el SOX17 se expresa altamente en los tejidos de estructura biliares; PDX1, NKX6.1/PTF1a, y NKX2.2 se expresan altamente en el tejido pancreático; y la expresión de CDX2 es alta en tejido intestinal. El resumen anterior es una adaptación de Dev Dyn 2009, 238:29-42 y Annu Rev Cell Dev Biol 2009, 25:221-251.

35

La formación del páncreas surge de la diferenciación del endodermo definitivo en el endodermo pancreático (2009 Annu Rev Cell Dev Biol, 25:221-251; 2009 Dev Dyn, 238:29-42). Los dominios pancreáticos dorsal y ventral surgen del epitelio del intestino anterior. El intestino anterior también da lugar al esófago, la tráquea, los pulmones, tiroides, estómago, hígado, páncreas y sistema de conductos biliares.

40

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

45

D'Amour et al. describe la producción de cultivos Enriquecidos de endodermo definitivo derivado de células madre embrionarias humanas (ES) en presencia de una alta concentración de activina y suero bajo (Nature Biotechnol 2005, 23:1534-1541; Patente de Estados Unidos N° 7.704.738). El trasplante de estas células debajo de la cápsula renal de los ratones dio como resultado la diferenciación en células más maduras con características de tejido endodérmico (Patente de Estados Unidos N° 7.704.738). Las células del endodermo definitivo derivadas de

células madre embrionarias humanas pueden diferenciarse adicionalmente en células PDX1 positivas después de la adición de FGF-10 y ácido retinoico (Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 2005/0266554A1). El trasplante posterior de estas células precursoras pancreáticas en la almohadilla adiposa de ratones inmunodeficientes dio como resultado la formación de células endocrinas pancreáticas funcionales después de una fase de maduración de 3-4 meses (Patente de Estados Unidos Nº 7.993.920 y Patente de Estados Unidos Nº 7.534.608).

5 Fisk et al. informa de un sistema para producir células de islotes pancreáticos a partir de células madre embrionarias humanas (Patente de Estados Unidos Nº 7.033.831). En este caso, la vía de diferenciación se dividió en tres etapas. Las células madre embrionarias humanas se diferenciaron primero al endodermo usando una combinación de butirato de sodio y activina A (Patente de Estados Unidos Nº 7.326.572). Las células se cultivaron luego con antagonistas de BMP, como Noggin, en combinación con EGF o betacelulina para generar células PDX1 positivas. La diferenciación terminal fue inducida por nicotinamida.

10 15 También se han usado inhibidores de moléculas pequeñas para la inducción de células precursoras endocrinas pancreáticas. Por ejemplo, se han usado inhibidores de moléculas pequeñas del receptor de TGF-B y receptores de BMP (Development 2011, 138:861-871; Diabetes 2011, 60:239-247) para mejorar significativamente el número de células endocrinas pancreáticas. Además, también se han usado activadores de moléculas pequeñas para generar células de endodermo definitivo o células precursoras pancreáticas (Curr Opin Cell Biol 2009, 21:727-732; Nature Chem Biol 2009, 5:258-265).

20 25 Aunque se han logrado grandes avances en la mejora de los protocolos para generar células pancreáticas a partir de células madre pluripotentes humanas, aún existe una necesidad de generar un protocolo que dé como resultado células endocrinas funcionales y, en particular, células beta. Aquí, demostramos que una clase de ligandos de Efrina y esfingosina-1-fosfato o agonistas del receptor de esfingosina mejoran la producción de células endocrinas y aceleran el agrupamiento de hormonas endocrinas y células precursoras endocrinas.

SUMARIO

30 La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Por tanto, se refiere a un método para potenciar la expresión de somatostatina en células que expresan hormonas (células en etapa 6), que comprende cultivar células del endodermo pancreático (células en etapa 5) en un medio que comprende Activina A o Activina C.

35 En la presente se divulga además un método para potenciar la expresión de insulina y NKX6.1 cultivando una población de células del endodermo pancreático en un medio que comprende Efrina A4 o Efrina A3. En algunas realizaciones, la población de células del endodermo pancreático no expresa sustancialmente CDX2 o SOX2. En algunas realizaciones, la población de células del endodermo pancreático se obtiene mediante una diferenciación escalonada de células pluripotentes. En algunas realizaciones, las células pluripotentes son células pluripotentes embrionarias humanas.

40 45 50 55 En una realización, la invención se refiere a un método para potenciar la expresión de somatostatina a la vez que se suprime la expresión de insulina, glucagón y grelina cultivando células del endodermo pancreático en medio que comprende Activina A o Activina C. En algunas realizaciones, la población de células del endodermo pancreático tratada con Activina A o Activina C expresa más somatostatina que una población de células del endodermo pancreático no tratada con Activina A o Activina C. En algunas realizaciones, se suprime la expresión de insulina en la población de células del endodermo pancreático tratadas con Activina A o Activina C en comparación con la expresión de insulina en una población de células del endodermo pancreático no tratadas con Activina A o Activina C. En algunas realizaciones, se suprime la expresión de glucagón en la población de células del endodermo pancreático tratadas con Activina A o Activina C en comparación con la expresión de glucagón en una población de células del endodermo pancreático no tratadas con Activina A o Activina C. En algunas realizaciones, se suprime la expresión de gredina en la población de células del endodermo pancreático tratadas con Activina A o Activina C en comparación con la expresión de gredina en una población de células del endodermo pancreático no tratadas con Activina A o Activina C. En algunas realizaciones, las células del endodermo pancreático no expresan sustancialmente CDX2 o SOX2. En algunas realizaciones, las células del endodermo pancreático tratadas con Activina A o Activina C se obtienen mediante una diferenciación escalonada de células pluripotentes. En algunas realizaciones, las células pluripotentes de las que se derivan de células del endodermo pancreático son células pluripotentes embrionarias humanas.

60 65 En la presente se divulga además un método para potenciar la expresión de NKX6.1 mediante el tratamiento de células del endodermo pancreático en un medio que comprende semaforina 3a o Epigen. Como se divulga en la presente, la población de células del endodermo pancreático tratadas con medio que comprende semaforina 3a o Epigen puede expresar una cantidad potenciada de NKX6.1 en comparación con las células del endodermo pancreático no tratadas con medio que comprende semaforina 3a o Epigen. Como se divulga en la presente, el nivel de expresión de hormonas como insulina, glucagón y gherlina puede no verse afectado en las células del endodermo pancreático tratadas con medio que comprende semaforina 3a o Epigen en comparación con

las células del endodermo pancreático no tratadas con medio que comprende semaforina 3a o Epigen. En algunas realizaciones, las células del endodermo pancreático no expresan sustancialmente CDX2 o SOX2. Como se divulga en la presente, las células del endodermo pancreático tratadas con medio que comprende semaforina 3a o Epigen pueden obtenerse mediante una diferenciación escalonada de células pluripotentes. En algunas realizaciones, las células pluripotentes de las que se derivan las células del endodermo pancreático son células pluripotentes embrionarias humanas.

En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un método escalonado para diferenciar células pluripotentes que comprende cultivar células del endodermo pancreático en un medio que comprende Activina A o Activina C. Como se divulga en la presente, las células del endodermo pancreático pueden cultivarse en un medio que comprende Efrina A4 o Efrina A3. En algunas realizaciones, las células del endodermo pancreático se cultivan en un medio que comprende Activina A o Activina C. Como se divulga en la presente, las células del endodermo pancreático pueden cultivarse en un medio que comprende semaforina 3a o Epigen. En algunas realizaciones, las células madre pluripotentes de las que derivan las células del endodermo pancreático son células madre pluripotentes embrionarias humanas.

En la presente se divulga además un método para inducir la expresión de agrupaciones endocrinas tratando las células endocrinas pancreáticas con agonista del receptor de esfingosina-1. Como se divulga en la presente, el agonista del receptor de esfingosina-1 usado para tratar células endocrinas pancreáticas puede ser esfingosina-1-fosfato (S1P).

También se divultan en la presente células preparadas mediante los métodos de la invención y métodos de uso de las células de la invención.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1A a la Figura 1G muestran datos de análisis de PCR en tiempo real de la expresión de los siguientes genes en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 diferenciadas como se describe en el Ejemplo 1: insulina (FIG. 1A), somatostatina (FIG. 1B), ghrelina (FIG. 1C), glucagón (FIG. 1D), PDX-1 (FIG. 1E), NKX6.1 (Figura 1F) y NGN3 (FIG. 1G).

La Figura 2A a la Figura 2C muestran imágenes de células inmunoteñidas para insulina. FIG. 2A, control; FIG. 2B, células tratadas con 50 ng/ml de Efrina-A3; y FIG. 2C, células tratadas con 100 ng/ml de Efrina-A3, como se describe en el Ejemplo 2.

La Figura 3A a la Figura 3C muestran imágenes de células inmunoteñidas para insulina. FIG. 3A, control; FIG. 3B, células tratadas con 50 ng/ml de Efrina-A4; y FIG. 3C, células tratadas con 100 ng/ml de Efrina-A4, como se describe en el Ejemplo 2.

La Figura 4A a la Figura 4D representan imágenes de contraste de fase de cultivos S6 de células tratadas con esfingosina-1-fosfato (S1P) e imágenes obtenidas el día 1 (FIG. 4A), día 7 (FIG. 4B), y dos aumentos diferentes en el día 10 (FIG. 4C y FIG. 4D). Las imágenes muestran que en el día 7, había una evidencia clara de agrupamiento de células endocrinas y en el día 10 los grupos estaban separados entre sí por una capa delgada de epitelio del endodermo pancreático.

La Figura 5A a la Figura 5D representan imágenes de células tratadas con S1P e inmunoteñidas para Hb9 (FIG. 5A) y NKX6.1 (FIG. 5B), o inmunoteñidas para insulina (FIG. 5C) y Hb9 (FIG. 5D).

Las FIG. 6A y FIG. 6B representan imágenes de contraste de fase, a diferentes aumentos, de células tratadas con S1P 10 μ M y recogidas tres días después del comienzo de la etapa 6. La Figura 6C y la Figura 6D representan imágenes de células inmunoteñidas para NKX2.2. FIG. 6C, células de control; FIG. 6D, células tratadas con S1P.

55 DESCRIPCIÓN DETALLADA

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

60 Definiciones

Las células madre son células indiferenciadas definidas por su capacidad, a nivel de célula individual, para autorenovarse y diferenciarse. Las células madre pueden producir células de progenie, que incluyen progenitores autorrenovadores, progenitores no renovadores y células terminalmente diferenciadas. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de varios linajes celulares de

múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Las células madre también dan lugar a tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante y contribuyen sustancialmente a la mayoría, si no todos, de los tejidos después de la inyección en los blastocistos.

5 Las células madre se clasifican por su potencial de desarrollo como: (1) totipotente, lo que significa que es capaz de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias; (2) pluripotente, lo que significa que es capaz de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias; (3) multipotente, lo que significa que es capaz de dar lugar a un subconjunto de linajes celulares pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir progenie que incluye HSC (autorrenovables), progenitoras oligopotentes restringidas a células sanguíneas, y todos los tipos y elementos celulares (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre); (4) oligopotente, lo que significa que es capaz de dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes celulares que las células madre multipotentes; y (5) unipotente, lo que significa que es capaz de dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

10
15 La diferenciación es el proceso mediante el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada como, por ejemplo, una célula nerviosa o una célula muscular. Una célula diferenciada o una célula inducida por diferenciación es aquella que ha adquirido una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término "comprometido", cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha procedido en la vía de diferenciación a un punto en el que, en circunstancias normales, continuará diferenciándose en un tipo de célula específica o subconjunto de tipos de células, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o revertir a un tipo de célula menos diferenciada. "Desdiferenciación" se refiere al proceso mediante el cual una célula revierte a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Como se usa en la presente, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células proviene y a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula coloca a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un marcador específico del linaje se refiere a una característica específicamente asociada con el fenotipo de las células de un linaje de interés y puede usarse para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida con el linaje de interés.

20
25
30
35 "Marcadores", como se usa en la presente, son moléculas de ácido nucleico o polipéptido que se expresan diferencialmente en una célula de interés. En este contexto, la expresión diferencial significa un nivel aumentado para un marcador positivo y un nivel disminuido para un marcador negativo en comparación con una célula no diferenciada. El nivel detectable del ácido nucleico o polipéptido marcador es suficientemente más alto o más bajo en las células de interés en comparación con otras células, de tal manera que la célula de interés puede identificarse y distinguirse de otras células usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica .

40 Como se usa en la presente, una célula es "positiva para" un marcador específico o "positiva" cuando el marcador específico se detecta en la célula. De manera similar, la célula es "negativa para" un marcador específico, o "negativa" cuando el marcador específico no se detecta en la célula.

45 Como se usa en la presente, "densidad celular" y "densidad de siembra" se usan indistintamente en la presente y se refieren al número de células sembradas por área unitaria de un sustrato sólido o semisólido plano o curvado.

50 Como se usa en la presente, "etapa 1" y "S1" se usan indistintamente para identificar células que expresan marcadores característicos del endodermo definitivo (DE).

55 "Endodermo definitivo", como se usa en la presente, se refiere a células que tienen las características de células que surgen del epiblasto durante la gastrulación y que forman el tracto gastrointestinal y sus derivados. Las células de endodermo definitivo expresan por lo menos uno de los siguientes marcadores: HNF3 beta, GATA4, SOX17, CXCR4, Cerberus, OTX2, goosecoide, C-Kit, CD99 y MIXL1.

60 "Tubo intestinal", como se usa en la presente, se refiere a células derivadas del endodermo definitivo que expresan por lo menos uno de los siguientes marcadores: HNF3-beta, HNF1-beta, o HNF4-alfa. Las células del tubo intestinal pueden dar lugar a todos los órganos endodérmicos, como los pulmones, el hígado, el páncreas, el estómago y el intestino.

65 En la presente se usan indistintamente "etapa 2" y "S2" que identifican células que expresan marcadores característicos del tubo intestinal primitivo.

El "endodermo del intestino anterior" se refiere a las células del endodermo que dan lugar al esófago, los pulmones, el estómago, el hígado, el páncreas, la vesícula biliar, y una parte del duodeno.

70 "Intestino posterior" se refiere a las células del endodermo que pueden dar lugar al estómago posterior,

páncreas, hígado y una parte del duodeno.

El "endodermo del intestino medio" se refiere a las células del endodermo que pueden dar lugar a los intestinos, partes del duodeno, el apéndice y el colon ascendente.

5 El "endodermo del intestino posterior" se refiere a las células del endodermo que pueden dar lugar al tercio distal del colon transverso, el colon descendente, el colon sigmoide y el recto.

10 Tanto "etapa 3" como "S3" se usan indistintamente para identificar células que expresan marcadores característicos del endodermo del intestino anterior. "Células que expresan marcadores característicos del linaje del intestino anterior", como se usa en la presente, se refiere a células que expresan por lo menos uno de los siguientes marcadores : PDX-1, FOXA2, CDX2, SOX2 y HNF4 alfa.

15 En la presente se usan indistintamente "etapa 4" y "S4" para identificar células que expresan marcadores característicos del precursor del intestino anterior pancreático. "Células que expresan marcadores característicos del linaje precursor del intestino anterior pancreático", como se usa en al presente, se refiere a células que expresan por lo menos uno de los siguientes marcadores: PDX-1, NKX6.1, HNF6, FOXA2, PTF1a, Prox1 y HNF4 alfa.

20 Como se usa en la presente, "etapa 5" y "S5" se usan indistintamente para identificar células que expresan marcadores característicos del endodermo pancreático y células precursoras del endocrino pancreático. "Células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático", como se usa en la presente, se refiere a células que expresan por lo menos uno de los siguientes marcadores: PDX1, NKX6.1, HNF1 beta, PTF1 alfa, HNF6, HNF4 alfa, SOX9, HB9 o PROX1. Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático no expresan sustancialmente CDX2 o SOX2.

25 "Célula endocrina pancreática", o "célula que expresa la hormona pancreática", o "células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático", o "Células de Etapa 6", o "células S6" se usan indistintamente en la presente, y se refieren a una célula capaz de expresar por lo menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina, grelina y polipéptido pancreático.

30 "Célula positiva a la insulina pancreática" se refiere a una población endocrina de células que expresan insulina, HB9, NKX2.2 y NKX6.1.

35 "Célula precursora endocrina pancreática" o "Célula progenitora endocrina pancreática" se refiere a células del endodermo pancreático capaces de convertirse en una célula que expresa la hormona pancreática. Dicha célula puede expresar por lo menos uno de los siguientes marcadores: NGN3, NKX2.2, NeuroD, ISL-1, Pax4, Pax6 o ARX.

40 En la presente se usan indistintamente "d1", "d 1" y "día1"; "d2", "d 2" y "día 2"; "d3", "d 3" y "día 3", y así sucesivamente. Estas combinaciones de letras y números se refieren a un día específico de incubación en las diferentes etapas durante el protocolo de diferenciación escalonado de la aplicación instantánea.

"Glucosa" y "D-glucosa" se usan indistintamente en la presente y se refieren a dextrosa, un azúcar encontrado comúnmente en la naturaleza.

45 En la presente se usan indistintamente "NeuroD" y "NeuroD1" que identifican una proteína expresada en células progenitoras endocrinas pancreáticas y el gen que la codifica.

50 En la presente se usan indistintamente "LDN" y "LDN-193189" para indicar un inhibidor del receptor de BMP disponible de Stemgent, CA, Estados Unidos.

Aislamiento, Expansión y Cultivo de Células Madre Pluripotentes

55 Las células madre pluripotentes pueden expresar uno o más de los antígenos embrionarios específicos de la etapa (SSEA) 3 y 4, y marcadores detectables usando anticuerpos designados Tra-1-60 y Tra-1-81 (Thomson et al., 1998, Science 282:1145-1147). La diferenciación de células madre pluripotentes in vitro da como resultado la pérdida de la expresión de SSEA-4, Tra-1-60 y Tra-1-81. Las células madre pluripotentes no diferenciadas típicamente tienen actividad de fosfatasa alcalina, que puede detectarse fijando las células con paraformaldehído al 4% y luego desarrollando con Vector Red como sustrato, según lo descrito por el fabricante (Vector Laboratories, CA, USA). Las células madre pluripotentes no diferenciadas también expresan típicamente OCT4 y TERT, como se detecta mediante RT-PCR.

60 Otro fenotipo deseable de células madre pluripotentes propagadas es un potencial para diferenciarse en células de las tres capas germinales: tejidos de endodermo, mesodermo y ectodermo. La pluripotencia de las células madre puede confirmarse, por ejemplo, inyectando células en ratones SCID, fijando los teratomas que se forman usando paraformaldehído al 4%, y luego examinándolas histológicamente para evidencias de tipos de células de las

tres capas germinales. Alternativamente, la pluripotencia puede determinarse mediante la creación de cuerpos embrioides y evaluando los cuerpos embrioides para la presencia de marcadores asociados con las tres capas germinales.

- 5 Las líneas de células madre pluripotentes propagadas pueden cariotiparse usando una técnica de bandeo G estándar y compararse con los cariotipos publicados de las especies de primates correspondientes. Es deseable obtener células que tengan un "cariotipo normal", lo que significa que las células son euploides, en donde todos los cromosomas humanos están presentes y no se alteran notablemente. Las células pluripotentes pueden expandirse fácilmente en cultivo usando varias capas alimentadoras o usando vasos recubiertos con proteínas de la matriz.
- 10 Alternativamente, las superficies definidas químicamente en combinación con medios definidos tales como los medios mTesr®1 (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) pueden usarse para la expansión rutinaria de las células. Las células pluripotentes pueden eliminarse fácilmente de las placas de cultivo usando quelantes enzimáticos, mecánicos o el uso de varios quelantes de calcio como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).
- 15 Alternativamente, las células pluripotentes pueden expandirse en suspensión en ausencia de proteínas de la matriz o una capa alimentadora.

Fuentes de Células Madre Pluripotentes

- 20 Los tipos de células madre pluripotentes que pueden usarse en la presente incluyen líneas establecidas de células pluripotentes derivadas de tejido formado después de la gestación, incluyendo tejido no humano (como, por ejemplo, un blastocito) o tejido fetal tomado en cualquier momento durante la gestación, típicamente, pero no necesariamente, antes de aproximadamente las 10 a 12 semanas de la gestación. Ejemplos no limitativos divulgados en la presente por referencia solamente son líneas establecidas de células madre embrionarias humanas (hESC) o células germinales embrionarias humanas, como por ejemplo, las líneas de células madre embrionarias humanas H1, H7 y H9 (WiCell Research Institute, Madison, WI, USA). Adecuadas para el uso son las células tomadas de una población de células madre pluripotentes ya cultivadas en ausencia de células alimentadoras. También son adecuadas las células pluripotentes inducibles (iPS) o células pluripotentes reprogramadas que pueden derivarse de células somáticas adultas usando expresión forzada de una serie de factores de transcripción relacionados pluripotentes, como OCT4, NANOG, Sox2, KLF4, y ZFP42 (Annu Rev Genomics Hum Genet 2011, 12:165-185). Las células madre embrionarias humanas divulgadas en la presente solo por referencia también pueden prepararse como se describe por Thomson et al. (Patente de Estados Unidos Nº 5.843.780; Science, 1998, 282: 1145-1147 ; Curr Top Dev Biol 1998, 38:133-165 ; Proc Natl Acad Sci USA 1995, 92:7844-7848).

Formación de Células que Expresan Marcadores Característicos del Linaje del Endodermo Pancreático a partir de Células Madre Pluripotentes

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

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

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

- 50 Los marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se seleccionan del grupo que consiste de PDX1, NKX6.1, HNF1 beta, PTF1 alfa, HNF6, HNF4 alfa, SOX9, HB9 y PROX1. Adecuada para su uso en la presente invención es una célula que expresa por lo menos uno de los marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático es una célula del endodermo pancreático en la que la expresión de PDX-1 y NKX6.1 es sustancialmente más alta que la expresión de CDX2 y SOX2.

5 Los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático se seleccionan del grupo que consiste de NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4, ARX, NKX2.2 y PAX6. En una realización, una célula endocrina pancreática es capaz de expresar por lo menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático. Adecuada para su uso en la presente invención es una célula que expresa por lo menos uno de los marcadores característicos del linaje endocrino pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje endocrino pancreático es una célula endocrina pancreática. La célula endocrina pancreática puede ser una célula que expresa hormonas pancreáticas. Alternativamente, la célula endocrina pancreática puede ser una célula secretora de hormonas pancreáticas.

10 10 Las células endocrinas pancreáticas de la invención son células que expresan marcadores característicos del linaje celular □. Una célula que expresa marcadores característicos del linaje celular □ expresa PDX1 y por lo menos uno de los siguientes factores de transcripción: NKX2.2, NKX6.1, NEUROD, ISL1, HNF3 beta, MAFA, PAX4 y PAX6. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje celular □ es una célula □.

15 20 En la presente se divulga además un método para potenciar la expresión de insulina y NKX6.1 cultivando una población de células en etapa 5 en un medio que comprende Efrina A4 o Efrina A3. Como se divulga en la presente, la expresión de insulina y NKX6.1 puede potenciarse en la población de células hasta por lo menos 2 veces más que la expresión de insulina y NKX6.1 en una población de células no tratadas. En algunas realizaciones, la población de células en etapa 5 no expresa sustancialmente CDX2 o SOX2. En algunas realizaciones, las células de la población en etapa 5 se obtienen mediante una diferenciación escalonada de células pluripotentes. En algunas realizaciones, las células pluripotentes son células pluripotentes embrionarias humanas.

25 30 35 En una realización, la invención se refiere a un método para potenciar la expresión de somatostatina a la vez que se suprime la expresión de insulina, glucagón y grelina mediante el cultivo de células en etapa 5 en un medio que comprende Activina A o Activina C. En algunas realizaciones, la población de células tratada expresa por lo menos dos veces más somatostatina que los cultivos no tratados. En algunas realizaciones, la expresión de insulina se suprime hasta aproximadamente la mitad de la expresión de insulina en cultivos no tratados. En algunas realizaciones, la expresión de glucagón se suprime hasta aproximadamente 1/10 de la expresión de glucagón en cultivos no tratados. En algunas realizaciones, la expresión de grelina se suprime hasta aproximadamente 1/3 de la expresión de grelina en cultivos no tratados. En algunas realizaciones, las células en etapa 5 no expresan sustancialmente CDX2 o SOX2. En algunas realizaciones, las células en etapa 5 se obtienen mediante una diferenciación escalonada de células pluripotentes. En algunas realizaciones, las células pluripotentes son células pluripotentes embrionarias humanas.

40 45 También se divulga en la presente un método para potenciar la expresión de NKX6.1 mediante el tratamiento de células en etapa 5 en un medio que comprende semaforina 3a o Epigen. Como se divulga en la presente, la población de células tratadas puede expresar por lo menos dos veces más NKX6.1 que los cultivos no tratados. Como se divulga en la presente, el nivel de expresión de hormonas puede no verse afectado en cultivos tratados en comparación con cultivos no tratados. En algunas realizaciones, las células en etapa 5 no expresan sustancialmente CDX2 o SOX2. En algunas realizaciones, las células en etapa 5 se obtienen mediante una diferenciación escalonada de células pluripotentes. En algunas realizaciones, las células pluripotentes son células pluripotentes embrionarias humanas.

50 55 60 En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un método escalonado para diferenciar células pluripotentes que comprende cultivar células en etapa 5 en medio que comprende Activina A o Activina C. Como se divulga en la presente, las células en etapa 5 pueden cultivarse en medio que comprende Efrina A4 o Efrina A3. En algunas realizaciones, las células en etapa 5 se cultivan en un medio que comprende Activina A o Activina C. Como se divulga en la presente, las células en etapa 5 pueden cultivarse en un medio que comprende semaforina 3a o Epigen. En algunas realizaciones, las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes embrionarias humanas.

65 También se divulga en la presente un método para inducir la expresión de insulina que comprende cultivar células del endodermo pancreático con un ligando de efrina. Como se divulga en la presente, el ligando de efrina puede seleccionarse de efrina A3 y efrina A4. Como se divulga en la presente, el cultivo de las células del endodermo pancreático con un ligando de efrina puede potenciar la expresión de insulina y NKX6.1. Como se divulga en la presente, el cultivo de las células del endodermo pancreático con un ligando de efrina puede potenciar la expresión de insulina y NKX6.1 en las células del endodermo pancreático hasta por lo menos 2 veces más que la expresión de insulina y NKX6.1 en las células del endodermo pancreático no tratadas. En algunas realizaciones, las células del endodermo pancreático no expresan sustancialmente CDX2 o SOX2. En algunas realizaciones, las células del endodermo pancreático se obtienen mediante una diferenciación escalonada de células madre pluripotentes. En algunas realizaciones, las células madre pluripotentes usadas en los métodos de la invención son células madre pluripotentes embrionarias humanas.

En la presente se divultan además células que expresan insulina y NKX6.1 preparadas mediante los métodos divulgados en la presente.

5 En la presente se divulga además un método para inducir la formación de agrupaciones endocrinas que comprende cultivar células del endodermo pancreático con un agonista del receptor de esfingosina-1. En algunas realizaciones, las células del endodermo pancreático se obtienen mediante una diferenciación escalonada de células madre pluripotentes. En algunas realizaciones, las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes embrionarias humanas.

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

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Identificación de EfrinaA4 como un Inductor Fuerte de la Expresión de Insulina

Este ejemplo se llevó a cabo para comprender el papel de varias proteínas en la generación de cultivos el endodermo pancreático/endocrino a partir de la diferenciación de células ES humanas.

20 Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (hESC H1, fase 40) se sembraron como células individuales a 1×10^5 células/cm² en placas recubiertas de MATRIGEL™ (dilución 1:30; BD Biosciences, NJ) en medio mTeSR® 1 (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) suplementado con 10 µM de Y27632 (Rock inhibidor, Nº de Catálogo Y0503, SigmaAldrich, St. Louis, MO). Cuarenta y ocho horas después de la siembra, los cultivos se lavaron en PBS incompleto (solución salina tamponada con fosfato sin Mg o Ca). Los cultivos se diferenciaron en linajes del endodermo pancreático/endocrino de la siguiente manera:

30 a) Etapa 1 (Endodermo definitivo (DE) - 3 días): las células se cultivaron durante un día en medio de la etapa 1: medio MCDB-131 (Nº de Catálogo 10372-019, Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con BSA libre ácidos grasos al 0,1% (Nº de catálogo 68700, Proliant, Ankeny, IA), 0,0012 g/ml de bicarbonato sódico (Nº de Catálogo S3187, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), IX GlutaMax™ (Nº de Catálogo Invitrogen 35050-079), D-Glucosa 4,5 mM (SigmaAldrich, Nº de Catálogo G8769), 100 ng/ml de GDF8 (R&D Systems, Minneapolis, MN) y 1 µM de compuesto MCX (un inhibidor de GSK3B, 14-Prop-2-en-1-il-3,5,7,14,17,23,27-heptaazatetraciclo [19.3.1.1~2,6~1~8,12~]heptacosa-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-nonaen-16-ona, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 2010-0015711). Las células se cultivaron luego

35 durante días adicionales en medio MCDB-131 suplementado con BSA libre de ácidos grasos al 0,1%, 0,0012 g/ml de bicarbonato sódico, IX GlutaMax™, D-Glucosa 4,5 mM, 100 ng/ml de GDF8 y 0,1 µM de compuesto MCX . Las células se cultivaron luego durante un día adicional en medio MCDB-131 suplementado con BSA libre de ácidos grasos al 0,1%, 0,0012 g/ml de bicarbonato sódico, IX GlutaMax™, D-Glucosa 4,5 mM y 100 ng/ml de GDF8, luego

40 b) Etapa 2 (tubo intestinal primitivo - 2 días): las células se trataron durante dos días con medio MCDB-131 suplementado con BSA libre de ácidos grasos al 0,1%; 0,0012 g/ml de bicarbonato sódico; IX GlutaMax™; D-glucosa 4,5 mM; Ácido ascórbico 0,25 mM (Sigma, St. Louis, MO) y 25 ng/ml de FGF7 (R&D Systems, Minneapolis, MN), luego

45 c) Etapa 3 (intestino anterior - 2 días): las células se trataron con medio MCDB-131 suplementado con una dilución 1:200 de ITS-X (Invitrogen); Glucosa 4,5 mM; IX GlutaMax™; 0,0017 g/ml de bicarbonato sódico; BSA libre de ácidos grasos al 2%; SANT-1 0,25 µM (Sigma, St. Louis, MO); 10 ng/ml de Activina-A (R&D Systems); Ácido retinoico 1 µM (RA, Sigma); 25 ng/ml de FGF7; Ácido ascórbico 0,25 mM; TPB 200 nM (un activador de PKC, Nº de catálogo 565740, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ); forskolina 10 µM (FSK, Sigma), y LDN 100 nM (un inhibidor del receptor de BMP, Nº de catálogo 04-0019; Stemgent; San Diego, CA) para el día 1. El día 2, las células se trataron con medio MCDB-131 suplementado con una dilución 1:200 de ITS-X; Glucosa 4,5 mM; IX GlutaMax™; 0,0017 g/ml de bicarbonato sódico; BSA libre de ácidos grasos al 2%; 0,25 µM de SANT-1; 10 ng/ml de activina A; RA1 µM; 25 ng/ml de FGF7; Ácido ascórbico 0,25 mM, TPB 200 nM, forskolina 10 µM y LDN 10 nM, luego

50 d) Etapa 4 (precursor del intestino anterior pancreático - 2 días); las células se trataron con medio MCDB-131 complementado con una dilución 1:200 de ITS-X; Glucosa 4,5 mM; IX GlutaMax™; 0,0015 g/ml de bicarbonato sódico; BSA libre de ácidos grasos al 2%; SANT-10,25 µM; RA 50 nM; LDN-19318950 nM; forskolina 10µM; ácido ascórbico 0,25 mM; y TPB 100 nM durante dos días, luego

55 e) Etapa 5 (endodermo pancreático/endocrino - 3 días): las células en la etapa 4 se trataron con medio MCDB-131 suplementado con una dilución 1:200 de ITS-X; Glucosa 20 mM; IX GlutaMax™; 0,0015 g/ml de bicarbonato sódico; BSA libre de ácidos grasos al 2%; SANT-1 0,25 µM; RA 50 nM; forskolina 10 µM; ácido

ascórbico 0,25 mM durante tres días, con la adición de inhibidor de ALk5 100 nM SD-208 (divulgado en Molecular Pharmacology 2007, 72:152-161) solo durante los días 2-3.

En el día 1 de la etapa 5, los factores enumerados en la Tabla I siguiente se añadieron a los medios y tras la finalización de la S5 (día 3 de la etapa 5) se recogió el ARNm para análisis por PCR de los genes del endodermo pancreático/endocrinos relevantes. Como control, los cultivos se trataron solo con los medios S5 enumerados anteriormente. El ARN total se extrajo con el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) y se transcribió de manera inversa usando un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc se amplificó usando Mezcla Maestra Universal Taqman y Ensayos de Expresión génica Taqman que se precargaron en Matrices Taqman personalizadas (Applied Biosystems). Los datos se analizaron usando Software de Detección de Secuencia (Applied Biosystems) y se normalizaron a células madre embrionarias humanas (hES) no diferenciadas usando el método $\Delta\Delta Ct$. Todos los cebadores se adquirieron de Applied Biosystems.

Tabla I- Lista de factores probados en la S5 del Ejemplo 1

Proteína	Concentración	Número de catálogo de R & D Systems
Epigen	20 ng/ml	6629-EP-025
Semaforina 3a	50 ng/ml	1250-S3-025
Netrina 4	100 ng/ml	1254-N4-025
Galectina-8	100 ng/ml	1305-GA-050
Triptasa-Y-1	20 ng/ml	1667-SE-010
BetaCelulina	20 ng/ml	261-CE-010
Lumican	100 ng/ml	2846-LU-050
Epimorfina	50 ng/ml	2936-EP-025
Mesotelina	50 ng/ml	3265-MS-050
Matrilin-4	100 ng/ml	3380-MN-050
Meteorin	50 ng/ml	3475-MN-025
Efrina-A4	100 ng/ml	369-EA
IBSP	100 ng/ml	4014-SP-050
EFG-L6	50 ng/ml	4329-EG-025
R-Spondin-1	100 ng/ml	4645-RS-025
Efrina-B 1	100 ng/ml	473 EB-200
Hepsina	50 ng/ml	4776-SE-010
Activina A	20 ng/ml	338-AC-010
EfA4	50 ng/ml	6827-A4-050
Neurocan	100 ng/ml	6508-NC-050
DKK1	100 ng/ml	5439-DK-010
Calicreína-4	50 ng/ml	1719-SE-010
EGF	20 ng/ml	236-EG-200
BDNF	20 ng/ml	248-BD-005
Spinesin	50 ng/ml	2495-SE-010
HGF	20 ng/ml	294-HG-005
EfB4	50 ng/ml	3038-B4-100
Relaxin1	50 ng/ml	3257-RN-025
Activina C	20 ng/ml	4879-AC-010
BMP5	20 ng/ml	615-BMC-020
IGF-1	20 ng/ml	291-G1-200

La Figura 1A a la Figura 1G representan datos de análisis de PCR en tiempo real de la expresión de los siguientes genes en células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 diferenciadas a la etapa 5 como se describe en el Ejemplo 1 y en presencia de factores enumerados en la Tabla I: Insulina (FIG 1A), somatostatina (FIG. 1B), ghrelina (FIG. 1C), glucagón (FIG. 1D), PDX-1 (figura 1E), NKX6.1 (figura 1F) y NGN3 (FIG. 1G).

Como se muestra en Figura 1, la Efrina-A4 mejoró la expresión de ARNm de NKX6.1 y de insulina en comparación con los cultivos de control (FIG. 1F) a la vez que muestra un impacto mínimo en la expresión de PDX-1 (FIG. 1E) y NGN3 (FIG. 1G). Factores como la Activina-A y Activina-C potenciaron significativamente la expresión de la somatostatina (FIG. 1B) a la vez que suprinen la expresión de insulina (FIG 1A), glucagón (FIG. 1D) y ghrelina (FIG. 1C) Además, factores como la semaforina 3a y el Epigen mejoraron la expresión de NKX6.1 sin afectar a la expresión de hormonas en comparación con cultivos no tratados. En la Figura 1, el nivel medio de expresión de los diferentes marcadores en cultivos de control se muestra por una línea de puntos en los gráficos.

Ejemplo 2

Verificación del Efecto de las Efrinas en la Expresión de Insulina en S5

Este ejemplo describe la validación de éxitos identificados en el Ejemplo 1. En particular, el efecto de la adición de Efrina-A3 o Efrina-A4 en S5 en el protocolo enumerado a continuación.

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (hESC H1, pase 40) se sembraron como células individuales a 1×10^5 células/cm² en placas recubiertas de MATRIGEL™ (dilución 1:30; BD Biosciences, NJ) en medio mTeSR® 1 suplementado con 10 µM de Y27632. Cuarenta y ocho horas después de la siembra, los cultivos se lavaron en PBS incompleto (solución salina tamponada con fosfato sin Mg o Ca). Los cultivos se diferenciaron en linajes del endodermo pancreático/endocrinos de la siguiente manera:

- a) Etapa 1 (endodermo definitivo (DE) - 3 días): las células se cultivaron durante un día en los medios de la etapa 1 (ver el Ejemplo 1, anterior). Las células se cultivaron luego durante un día adicional en medio MCDB-131 suplementado con BSA libre de ácidos grasos al 0,1%, 0,0012 g/ml de bicarbonato sódico, 1X GlutaMax™, D-Glucosa 4,5 mM, 100 ng/ml de GDF8 y MCX 0,1 µM compuesto. Las células se cultivaron luego durante un día adicional en medio MCDB-131 suplementado con BSA libre de ácidos grasos al 0,1%, 0,0012 g/ml de bicarbonato de sodio, IX GlutaMax™, D-Glucosa 4,5 mM y 100 ng/ml de GDF8, luego
 - b) Etapa 2 (tubo intestinal primitivo-2 días): las células se trataron durante dos días con medio MCDB-131 suplementado con BSA libre de ácidos grasos al 0,1%; 0,0012 g/ml de bicarbonato sódico; IX GlutaMax™; D-glucosa 4,5 mM; ácido ascórbico 0,25 mM (Sigma, MO) y 25 ng/ml de FGF7 (R&D Systems, MN), luego
 - c) Etapa 3 (intestino anterior - 2 días): las células se trataron con medio MCDB-131 suplementado con una dilución 1:200 de ITS-X (Invitrogen, Ca); Glucosa 4,5 mM; IX GlutaMax™; 0,0017 g/ml de bicarbonato sódico; BSA libre de ácidos grasos al 2%; SANT-1 0,25 µM (Sigma, MO); 10 ng/ml de Activina-A (R & D Systems, MN); RA1 µM (Sigma, MO); 25 ng/ml de FGF7; ácido ascórbico 0,25 mM; TPB 200 nM (activador de PKC; Nº de catálogo 565740; EMD Chemicals, Gibbstown, NJ); forskolina 10 µM y LDN 100 nM (inhibidor del receptor BMP; Nº de catálogo 04-0019; Stemgent) para el día 1. El día 2, las células se trataron con medio MCDB-131 suplementado con una dilución 1:200 de ITS-X; Glucosa 4,5 mM; IX GlutaMax™; 0,0017 g/ml de bicarbonato sódico; BSA libre de ácidos grasos al 2%; SANT-1 0,25 µM; 10 ng/ml de activina A; RA 1 µM; 25 ng/ml de FGF7; ácido ascórbico 0,25 mM, TPB 200 nM, forskolina 10 µM y LDN 10 nM, luego
 - d) Etapa 4 (precursor del intestino anterior pancreático - 2 días): las células se trataron con medio MCDB-131 suplementado con una dilución 1:200 de ITS-X; Glucosa 4,5 mM; IX GlutaMax™; 0,0015 g/ml de bicarbonato sódico; BSA libre de ácidos grasos al 2%; SANT-1 0,25 µM; RA 50 nM; LDN-193189 50 nM; forskolina 10 µM; ácido ascórbico 0,25 mM; y TPB 100 nM durante dos días, luego
 - e) Etapa 5 (endodermo pancreático/endocrino - 3 días): las células de la etapa 4 se trataron con medio MCDB-131 suplementado con una dilución 1:200 de ITS-X; Glucosa 4,5 mM; IX GlutaMax™; 0,0015 g/ml de bicarbonato sódico; BSA libre de ácidos grasos al 2%; SANT-1 0,25 µM; RA 50 nM; forskolina 10 µM; ácido ascórbico 0,25 mM; Inhibidor de ALk5 100 nM (solo para los días 2-3) (SD-208, divulgado en Molecular Pharmacology 2007, 72:152-161) y +/- 0-100 ng/ml de Efrian-A3 o Efrina-A4 (R & D systems, MN) durante tres días.
- Al final de la Etapa 5, los cultivos de control y tratados con Efrina se fijaron y tiñeron para la expresión de proteínas de insulina (usando anticuerpo anti-insulina de cobaya de Millipore, Cambridge, MA). La Figura 2 representa imágenes de células inmunoteñidas para insulina. La FIG. 2A, células de control; la FIG. 2B, células tratadas con 50 ng/ml de Efrina A3; la FIG. 2C células tratadas con 100 ng/ml de Efrina A3. La Figura 3 representa imágenes de células inmunoteñidas para insulina. La FIG. 3A células de control; la FIG. 3B, células tratadas con 50 ng/ml de Efrina A4; la FIG. 3C células tratadas con 100 ng/ml de Efrina A4. Estos datos muestran que, consistente con los datos del Ejemplo 1, la adición tanto de Efrian-A3 como de Efrina-A4 en la etapa 5 mejoraba significativamente la expresión de proteínas de la insulina.

Ejemplo 3**La adición de Esfingosina-1-Fosfato en S6 Acelera Significativamente la Formación de Grupos Celulares que Contienen Hormonas Endocrinas**

Este ejemplo describe la progresión de la formación de grupos endocrinos en la etapa 6 y el efecto de la esfingosina-1-fosfato en la aceleración de la formación de los grupos ricos en endocrinos.

Las células de la línea de células madre embrionarias humanas H1 (hESC H1, pase 40) se sembraron como células individuales a 1×10^5 células/cm² en platos recubiertos de MATRIGEL™ (dilución 1:30; BD Biosciences, NJ) en medio mTeSR®1 (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) suplementado con 10 µM de Y27632. Cuarenta y ocho horas después de la siembra, los cultivos se lavaron en PBS incompleto (solución salina tamponada con fosfato sin Mg o Ca). Los cultivos se diferenciaron en linajes del endodermo pancreático/endocrinos de la siguiente manera:

a) Etapa 1 (endodermo definitivo (DE) - 3 días): las células se cultivaron durante un día en los medios de la etapa 1 (ver el Ejemplo 1, anterior). Las células se cultivaron luego durante un día adicional en medio MCDB-131 suplementado con BSA libre de ácidos grasos al 0,1%, 0,0012 g/ml de bicarbonato sódico, IX GlutaMax™, D-Glucosa 4,5 mM, 100 ng/ml de GDF8 y MCX compuesto 0,1 µM. Las células se cultivaron luego durante un día adicional en medio MCDB-131 suplementado con BSA libre de ácidos grasos al 0,1%, 0,0012 g/ml de bicarbonato sódico, IX GlutaMax™, D-Glucosa 4,5 mM y 100 ng/ml de GDF8, luego

b) Etapa 2 (tubo intestinal primitivo - 2 días): las células se trataron durante dos días con medio MCDB-131 suplementado con BSA libre de ácidos grasos al 0,1%; 0,0012 g/ml de bicarbonato sódico; IX GlutaMax™; D-glucosa 4,5 mM; ácido ascórbico 0,25 mM (Sigma, MO) y 25 ng/ml de FGF7 (R & D Systems, MN), luego

c) Etapa 3 (intestino anterior - 2 días): las células se trataron con medio MCDB-131 suplementado con una dilución 1:200 de FTS-X (Invitrogen, Ca); Glucosa 4,5 mM; IX GlutaMax™; 0,0017 g/ml de bicarbonato sódico; BSA libre de ácidos grasos al 2%; SANT-1 0,25 µM (Sigma, MO); 10 ng/ml de Activina-A (R & D Systems, MN); RA 1 µM (Sigma, MO); 25 ng/ml de FGF7; ácido ascórbico 0,25 mM; TPB 200 nM (activador de PKC; Nº de catálogo 565740; EMD Chemicals, Gibbstown, NJ); forskolina 10 µM (FSK, Sigma, MO) y LDN 100 nM (inhibidor del receptor de BMP, Nº de catálogo 04-0019; Stemgent, CA) para el día 1. En el día 2, las células se trataron con medio MCDB-131 suplementado con un dilución 1:200 de FTS-X; Glucosa 4,5 mM; IX GlutaMax™; 0,0017 g/ml de bicarbonato sódico; BSA libre de ácidos grasos al 2%; SANT-1 0,25 µM; 10 ng/ml de activina A; RA 1 µM; 25 ng/ml de FGF7; ácido ascórbico 0,25 mM, TPB 200 nM y LDN 10 nM, luego

d) Etapa 4 (precursor del intestino anterior del páncreas - 2 días); las células se trataron con medio MCDB-131 suplementado con una dilución 1:200 de ITS-X; Glucosa 4,5 mM; IX GlutaMax™; 0,0015 g/ml de bicarbonato sódico; BSA libre de ácidos grasos al 2%; SANT-1 0,25 µM; RA 50 nM; LDN-19318950 nM; Forskolina 10 µM; ácido ascórbico 0,25 mM; 2 ng/ml de FGF7; 1 ng/ml de AA; y TPB 100 nM durante dos días, luego

e) Etapa 5 (endodermo pancreático/endocrino - 3 días): las células de la etapa 4 se trataron con medio MCDB-131 suplementado con una dilución 1:200 de ITS-X; Glucosa 15 mM; IX GlutaMax™; 0,0015 g/ml de bicarbonato sódico; BSA libre de ácidos grasos al 2%; SANT-1 0,25 µM; RA 50 nM; forskolina 10 µM; ácido ascórbico 0,25 mM; y 1 ng/ml de FGF7 durante tres días; con la adición de inhibidor de ALK5 SD-208 100 nM en los días 2-3 solamente, luego

f) Etapa 6 (endocrino pancreático -3-10 días): las células de la etapa 5 se trataron con medio MCDB-131 suplementado con una dilución 1:200 de ITS-X; Glucosa 15 mM; IX GlutaMax™; 0,0015 g/ml de bicarbonato sódico; BSA libre de ácidos grasos al 2%; SANT-1 0,25 µM; RA 50 nM; ácido ascórbico 0,25 mM; durante 3-10 días. En algunos cultivos, se añadieron 10 µM de esfingosina-1-fosfato (Sigma, MO) durante tres días.

La Figura 4A a la Figura 4D representan imágenes de contraste de fase de cultivos de S6 de células tratadas con esfingosina-1-fosfato (SIP) y se obtuvieron imágenes el día 1 (FIG. 4A), día 7 (FIG. 4B), y con dos aumentos diferentes en el día 10 (FIG. 4C y FIG. 4D). Las imágenes muestran que en el día 7, había una clara evidencia de agrupamiento de células endocrinas y en el día 10 los grupos estaban separados entre sí por una capa delgada de epitelio del endodermo pancreático.

La Figura 5A a la Figura 5D representan imágenes de células inmunoteñidas para Hb9 (FIG. 5A) y NKX6.1 (FIG. 5B), o inmunoteñidas para insulina (FIG. 5C) y Hb9 (FIG. 5D). LA FIG. 5A y la FIG. 5B muestran que los grupos endocrinos se enriquecieron para Hb9 mientras que el epitelio pancreático que rodeaba los grupos se enriqueció con NKX6.1. Algunas de las células en los grupos enriquecidos con Hb9 también fueron positivas para NKX6.1. Los grupos se enriquecieron con insulina y Hb9 como se muestra en las FIG. 5C y FIG. 5D. Este cambio morfológico se parece mucho al desarrollo pancreático en el que el epitelio rico en NKX6.1 + PDX-1 + da lugar a grupos endocrinos. En cada caso, el par de imágenes se obtuvo usando diferentes filtros del mismo campo de células.

Las FIG. 6A y FIG. 6B representan imágenes de contraste de fase, a diferentes aumentos, de células tratadas con 10 μ M de esfingosina-1-fosfato (S1P) y recogidas tres días después del inicio de la etapa 6. Estas imágenes muestran que los grupos endocrinos emergieron solo 3 días después del inicio de la etapa 6. Esto es aproximadamente 7 días antes que la formación de los grupos en los cultivos de control.

5 La Figura 6C y la Figura 6D representan imágenes de células de control (FIG. 6C) y células tratadas con S1P (FIG. 6D) inmunoteñidas para NKX2.2. En cultivos tratados con S1P, los grupos endocrinos también se enriquecieron para células NKX2.2 + (FIG. 6C), en comparación con los cultivos de control en los que las células NKX2.2 + se distribuyeron uniformemente a lo largo del cultivo (FIG. 6D).

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para potenciar la expresión de somatostatina en células que expresan hormonas (células en etapa 6), que comprende cultivar células del endodermo pancreático (células en etapa 5) en un medio que comprende Activina A o Activina C.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que se suprime la expresión de insulina, glucagón y grelina.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que la población de células del endodermo pancreático tratadas con Activina A o Activina C expresa más somatostatina en comparación con una población de células del endodermo pancreático no tratadas con Activina A o Activina C.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en el que se suprime la expresión de insulina en la población de células del endodermo pancreático tratadas con Activina A o Activina C en comparación con la expresión de insulina en una población de células del endodermo pancreático no tratadas con Activina A o Activina C.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, en el que se suprime la expresión de glucagón en la población de células del endodermo pancreático tratadas con Activina A o Activina C en comparación con la expresión de glucagón en una población de células del endodermo pancreático no tratadas con Activina A o Activina C.
- 30 6. El método de la reivindicación 1, en el que se suprime la expresión de grelina en la población de células del endodermo pancreático tratadas con Activina A o Activina C en comparación con la expresión de grelina en una población de células del endodermo pancreático no tratadas con Activina A o Activina C.
- 35 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las células del endodermo pancreático no expresan sustancialmente CDX2 o SOX2, preferiblemente en el que las células del endodermo pancreático expresan aproximadamente menos del 10% de CDX2 o SOX2.
- 40 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las células del endodermo pancreático tratadas se obtienen mediante una diferenciación escalonada de células pluripotentes.
9. El método de la reivindicación 8, en el que las células pluripotentes son células pluripotentes humanas.
10. El método de la reivindicación 9, en el que las células madre pluripotentes humanas son células madre pluripotentes embrionarias humanas.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el método comprende cultivar células del endodermo pancreático en un medio que comprende Activina A.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el método comprende cultivar células del endodermo pancreático en un medio que comprende Activina C.

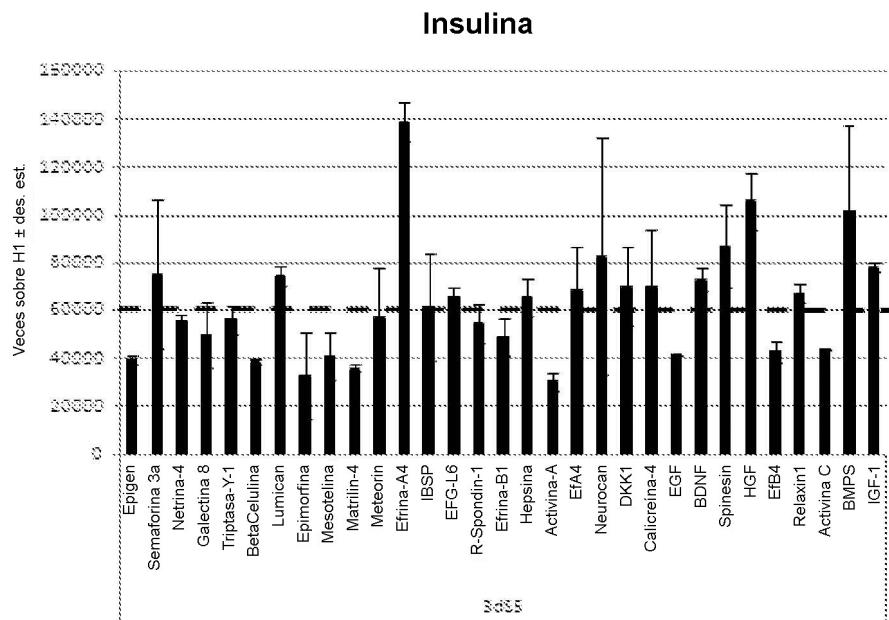
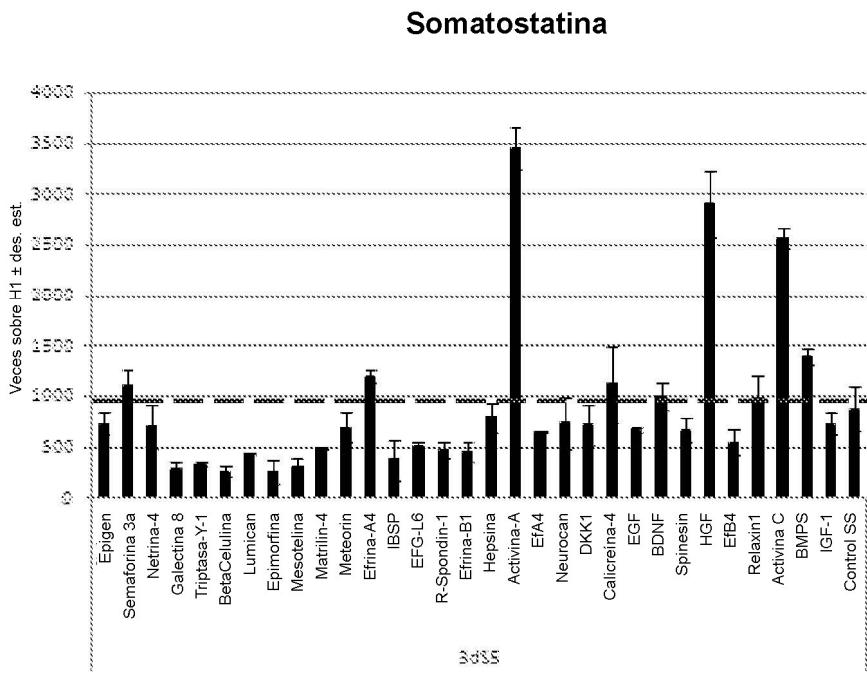
FIG. 1A**FIG. 1B**

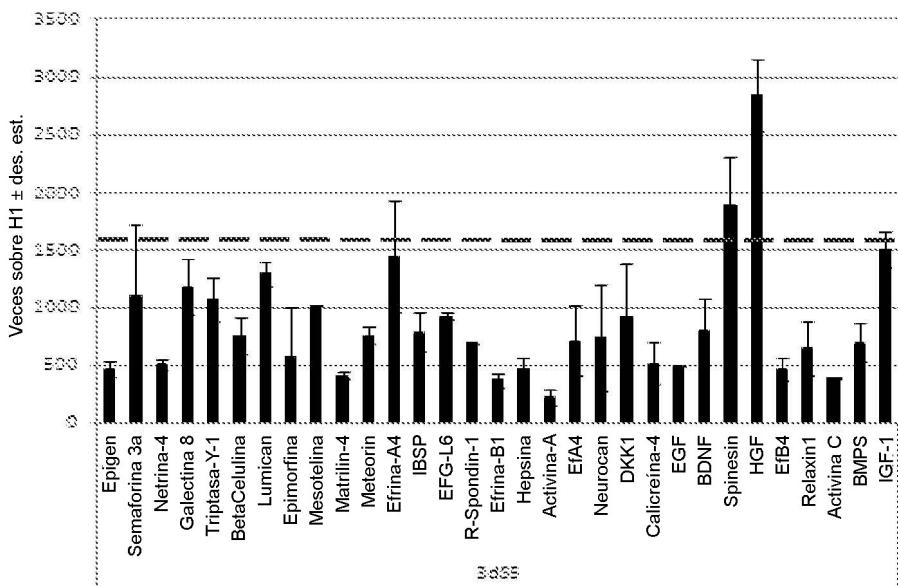
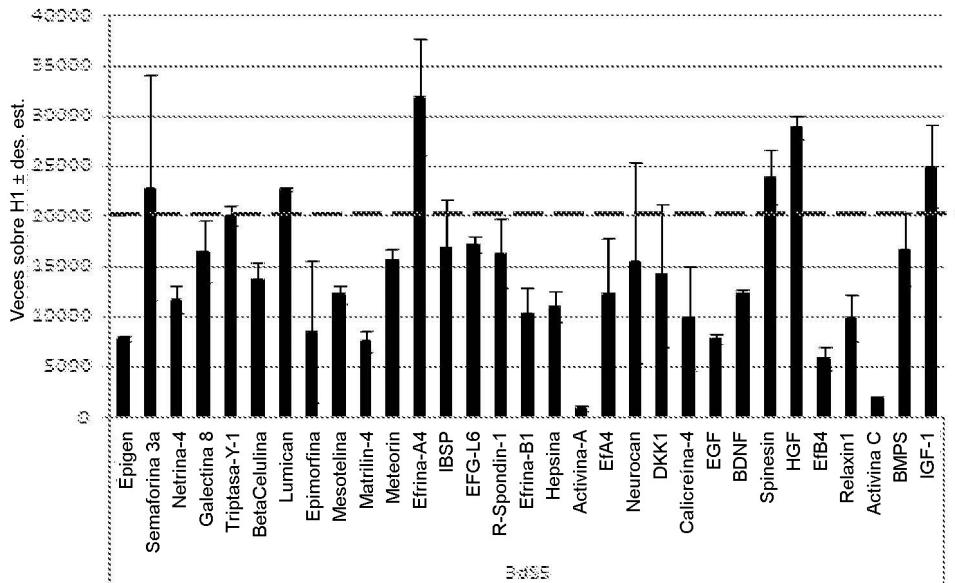
FIG. 1C**Grelina****FIG. 1D****Glucagón**

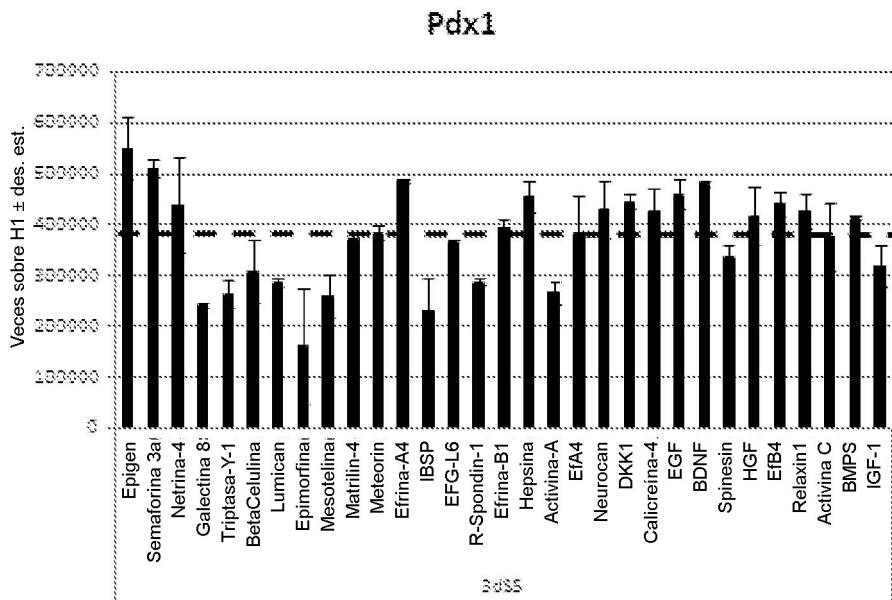
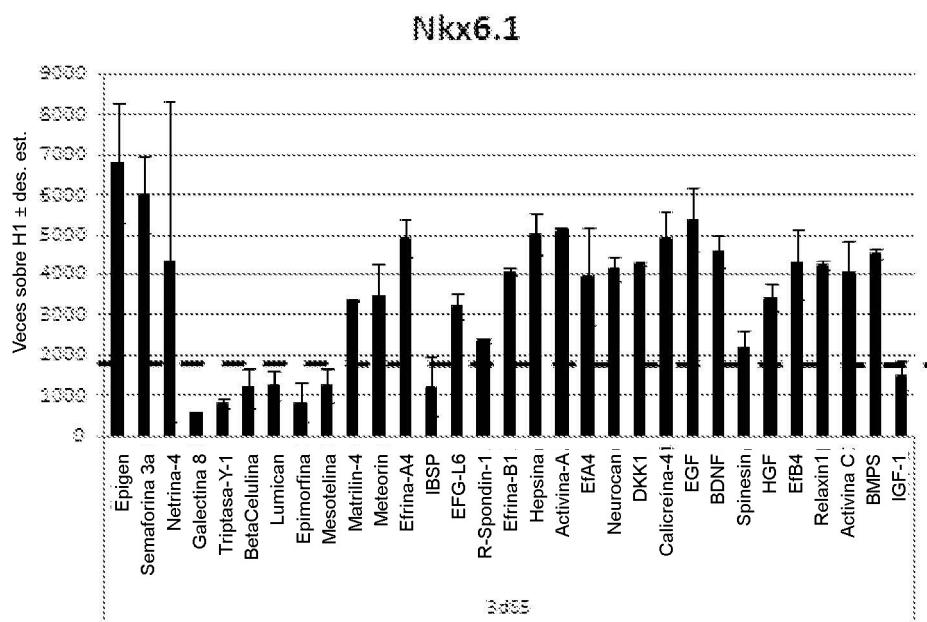
FIG. 1E**FIG. 1F**

FIG. 1G

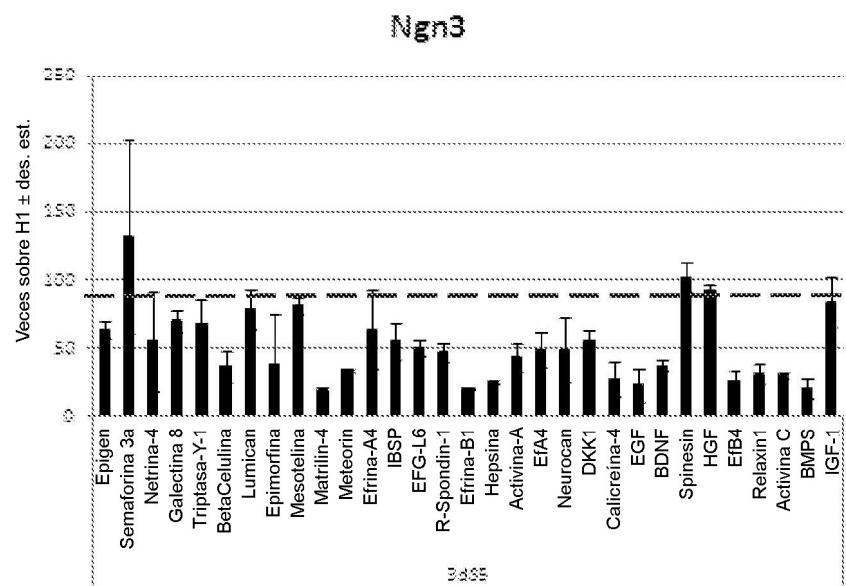


FIG. 2A

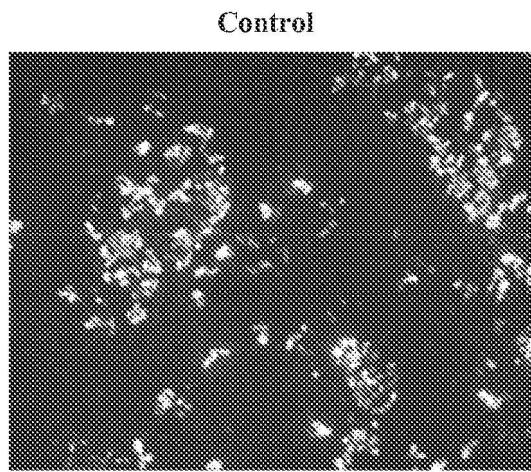


FIG. 2B

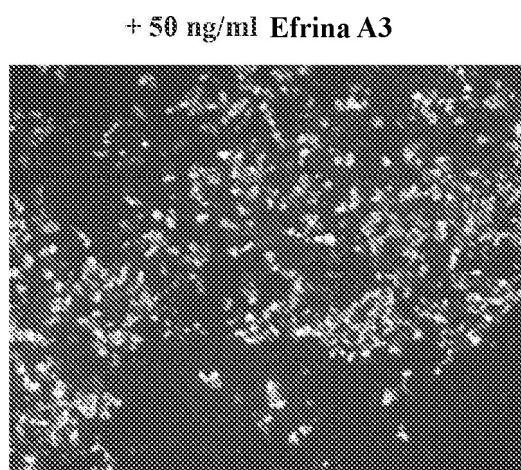


FIG. 2C

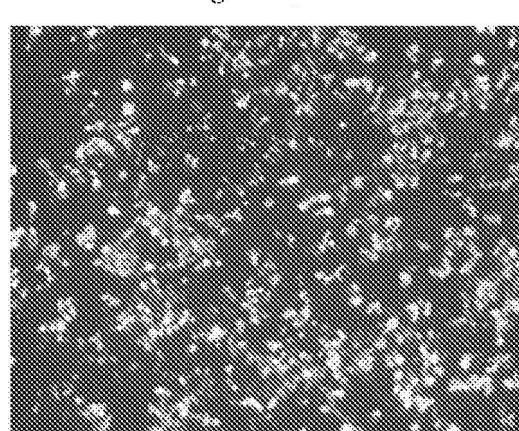


FIG. 3A

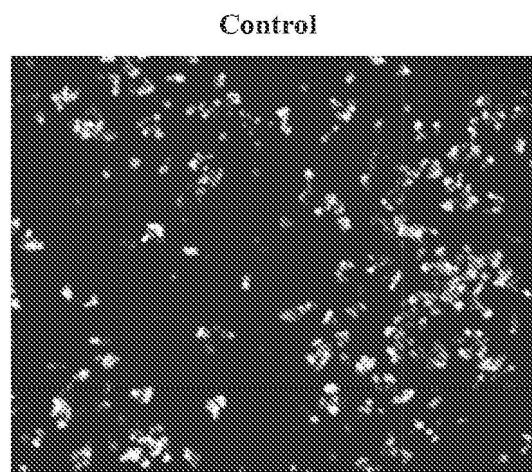


FIG. 3B

+50 ng/ml Efrina A4

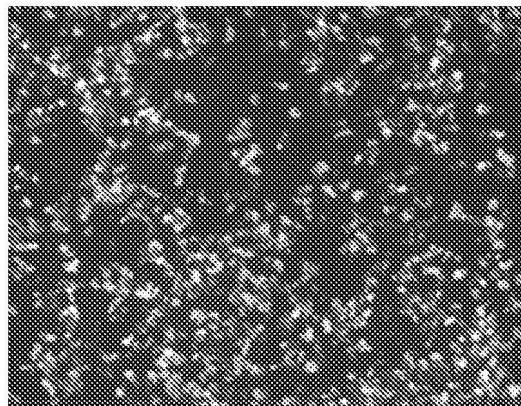


FIG. 3C

+100 ng/ml Efrina A4

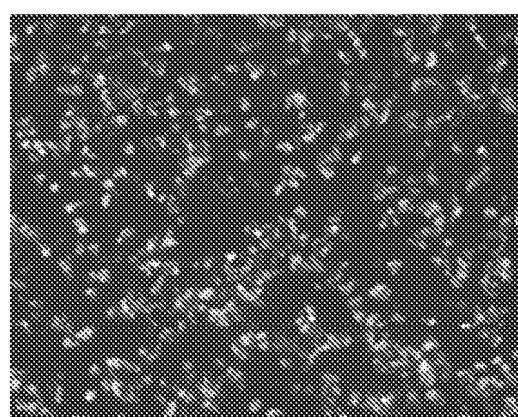


FIG. 4A

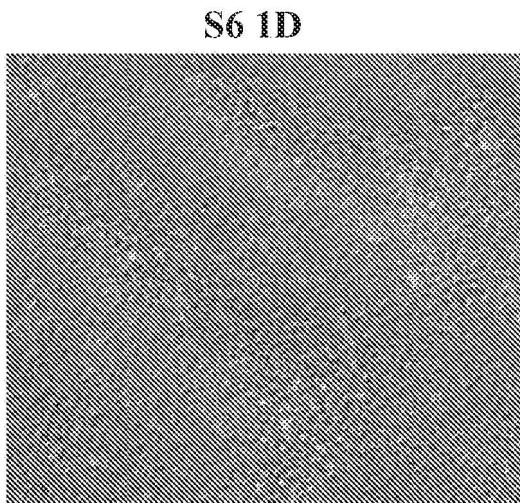


FIG. 4B

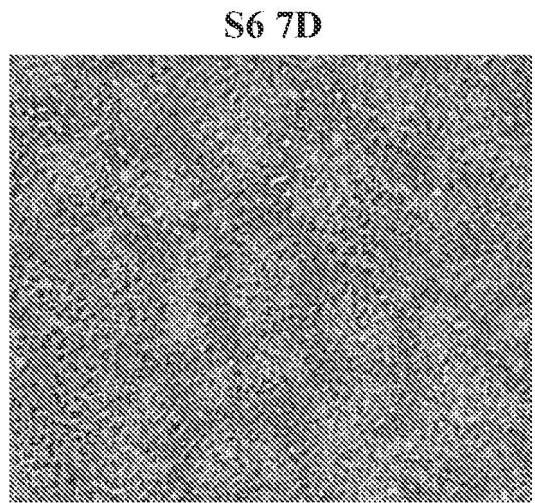


FIG. 4C

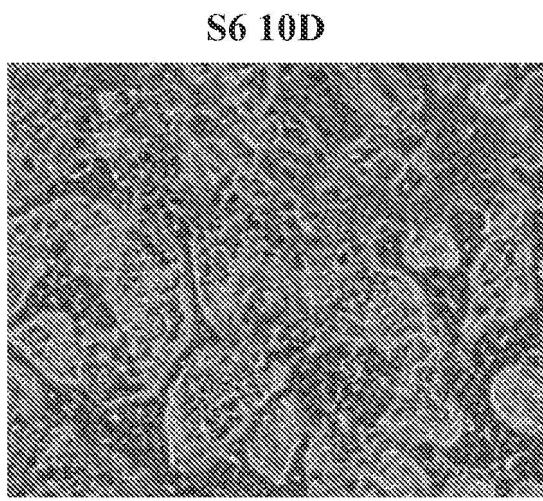


FIG. 4D

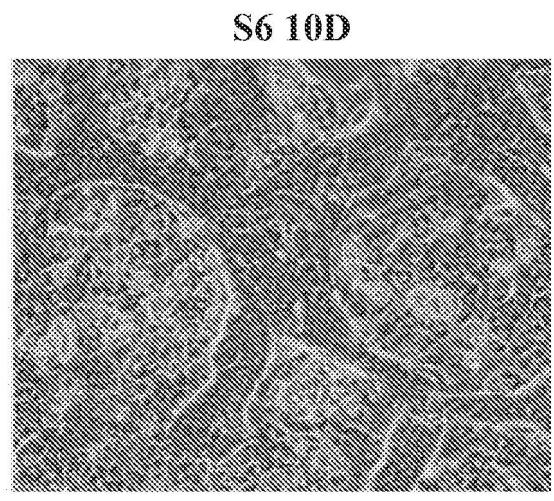


FIG. 5A

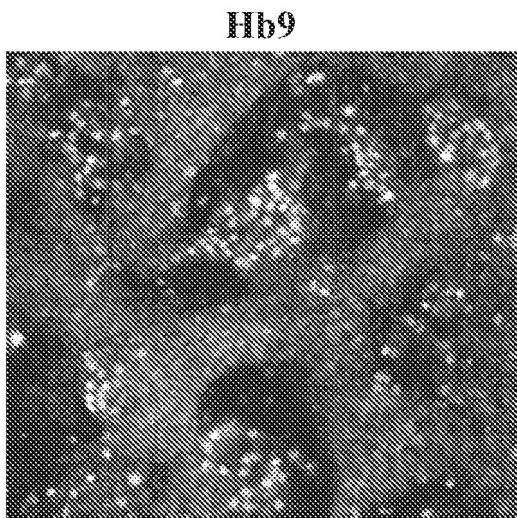


FIG. 5B

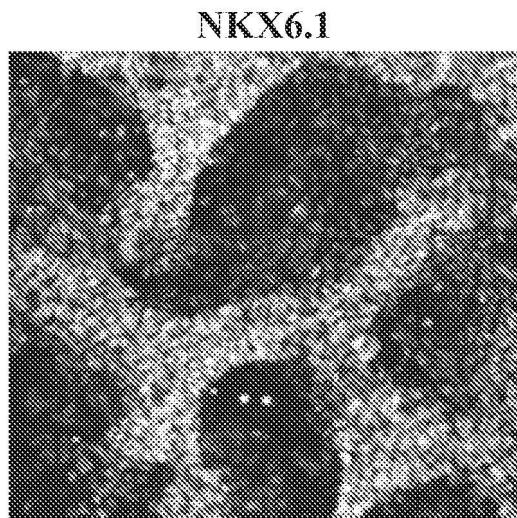


FIG. 5C

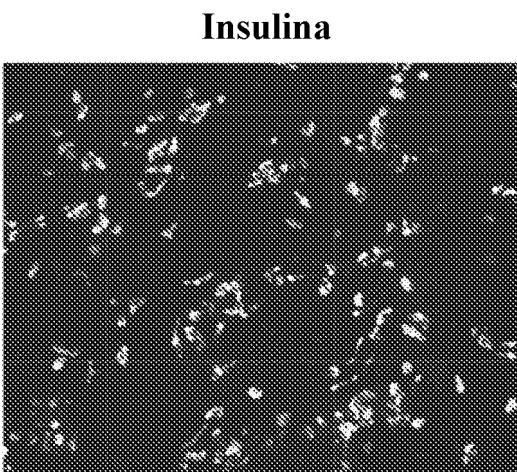


FIG. 5D

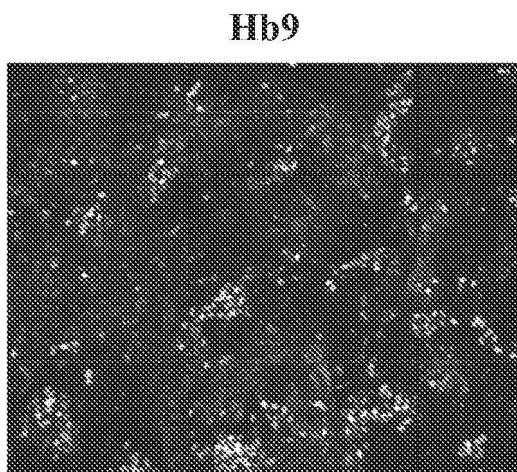


FIG. 6A

S6 3D (10X)

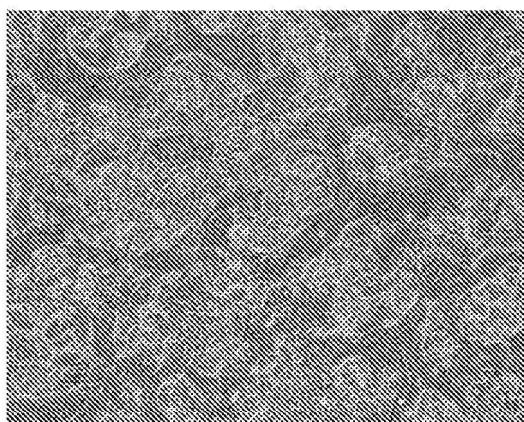


FIG. 6B

S6 3D (20X)

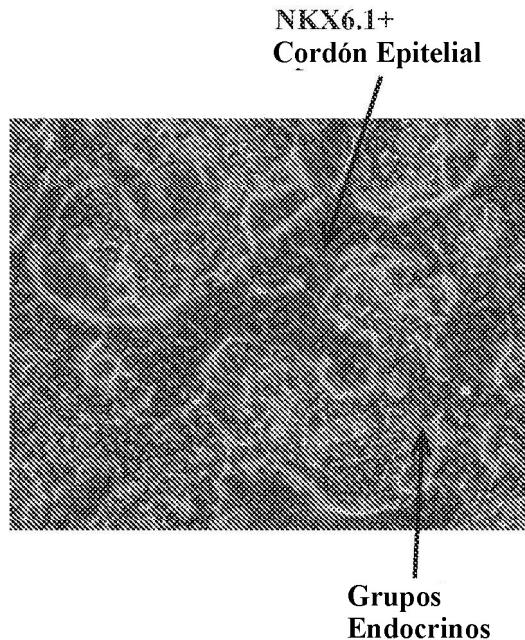


FIG. 6C

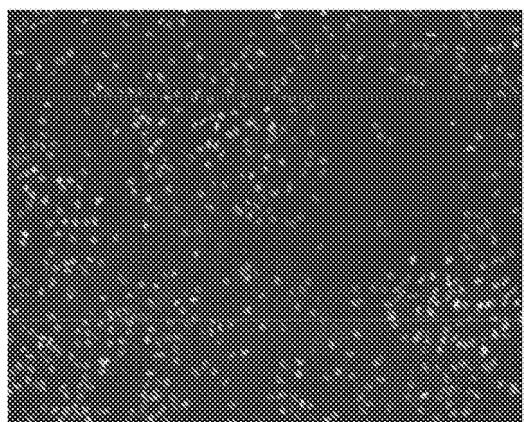


FIG. 6D

