

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 135**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

A61K 35/39 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2015** **PCT/US2015/066858**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016** **WO16100909**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2015** **E 15871229 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024** **EP 3234110**

54 Título: **Procedimientos para generar células β derivadas de células madre y usos de las mismas**

30 Prioridad:

18.12.2014 US 201462093999 P

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

04.11.2024

73 Titular/es:

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD
COLLEGE (100.0%)
17 Quincy Street
Cambridge, MA 02138, US**

72 Inventor/es:

**MELTON, DOUGLAS, A. y
MILLMAN, JEFFREY, R.**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 985 135 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 para generar células β derivadas de células madre y usos de las mismas

5 **Antecedentes de la invención**

La diabetes afecta a más de 300 millones de personas en todo el mundo de acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes. La diabetes de tipo 1 y la diabetes de tipo 2 implican destrucción de células β y/o disfunción de células β . Los pacientes diabéticos, en particular los que padecen diabetes de tipo 1, se podrían curar potencialmente a través de un trasplante de células β . Si bien el trasplante de islotes humanos cadavéricos puede hacer que los pacientes no sean dependientes de la insulina durante 5 años o más, dicho enfoque es limitado debido a la escasez y calidad de los islotes de donantes (Bellin *et al.*, 2012). Generar un suministro ilimitado de células β humanas a partir de células madre permitiría proporcionar tratamiento a millones de pacientes ya que es probable que solo sea necesario producir un tipo de célula, la célula β , y el modo de administración es bien conocido: trasplante a una localización vascularizada dentro del cuerpo con inmunoprotección. Además, también se retrasa la realización de cribados para identificar fármacos novedosos que mejoren la función, supervivencia o proliferación de las células β debido al suministro limitado de islotes y a la variabilidad resultante de diferentes causas de muerte, genética del donante y otros aspectos de su aislamiento. Como tal, un suministro constante y uniforme de células β derivadas de células madre ofrecería una plataforma útil para el descubrimiento de fármacos para la diabetes. Además, las células β derivadas de células madre genéticamente diversas se podrían usar para modelizar enfermedades *in vitro* o *in vivo*.

Shahjalal *et al.*, J. Mol. Cell Biol. (2014) 6: 394-408, divulgan un procedimiento para diferenciar células progenitoras endocrinas en células beta productoras de insulina que implica el uso de exendina-4 a una concentración de 50 ng/ml.

Natalicchio *et al.*, Diabetologia (2013) 56: 2456-2466, divulgan la experimentación con células de islotes pancreáticos o células INS-1E con tratamiento con palmitato o exendina-4.

30 **Sumario de la invención**

Existe una necesidad de procedimientos para generar células β derivadas de células madre (SC- β). La presente invención se dirige a soluciones para abordar esta necesidad, además de tener otras características deseables.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para generar células β derivadas de células madre (SC- β). El procedimiento incluye poner en contacto una población de células que comprende células progenitoras endocrinas en condiciones adecuadas para dirigir la diferenciación de dichas células progenitoras endocrinas en dichas células SC- β con una cantidad eficaz de un agente que disminuya la actividad de cinasa N terminal de c-Jun (JNK) en dichas células progenitoras endocrinas, generando de este modo dichas células SC- β , en el que las células progenitoras endocrinas comprenden células PDX1+/NKX6.1+/NEUROD1+/insulina+/glucagón-/somatostatina-, en el que la cantidad eficaz comprende una concentración de entre aproximadamente 0,1 μ m y aproximadamente 110 μ m, en las que el agente es SP600125. Las células SC- β producidas mediante los procedimientos descritos en el presente documento pueden presentar una o más características mejoradas (por ejemplo, índice de estimulación) en comparación con las células producidas mediante el mismo procedimiento en ausencia del inhibidor de JNK.

Otros aspectos y modos de realización de la presente invención se definen en las reivindicaciones adjuntas.

La práctica de la presente invención empleará típicamente, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, tecnología de ácido nucleico recombinante (por ejemplo, ADN), inmunología e interferencia de ARN (ARNi) que están dentro de la habilidad de la técnica. Descripciones no limitantes de determinadas de estas técnicas se encuentran en las siguientes publicaciones: Ausubel, F., *et al.*, (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols in Immunology, Current Protocols in Protein Science y Current Protocols in Cell Biology, todas de John Wiley & Sons, N.Y., edición de diciembre de 2008; Sambrook, Russell y Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001; Harlow, E. y Lane, D., Antibodies – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988; Freshney, R.I., "Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique", 5.^a ed., John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2005. Información no limitante con respecto a agentes terapéuticos y enfermedades humanas se encuentra en The Pharmacological Basis of Therapeutics de Goodman y Gilman, 11.^a ed., McGraw Hill, 2005, Katzung, B. (ed.) Basic and Clinical Pharmacology, McGraw-Hill/Appleton & Lange; 10.^a ed. (2006) o 11.^a edición (julio de 2009). Información no limitante con respecto a genes y trastornos genéticos se encuentra en McKusick, V.A.: Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1998 (12.^a edición) o la base de datos en línea más reciente: Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM™. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) y National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), a 1 de mayo de 2010, URL de la World

Wide Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/> y en Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA), una base de datos de genes, trastornos y rasgos hereditarios en especies animales (distintas de humanos y ratones), en <http://omia.angis.org.au/contact.shtml>. En caso de conflicto entre la especificación y cualquiera de las referencias, prevalecerá la especificación (incluyendo sus modificaciones). En el presente documento se usan los significados estándares de los términos aceptados en la técnica, a menos que se indique de otro modo. En el presente documento se usan abreviaturas estándar para diversos términos.

Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características de la presente invención se comprenderán mejor con referencia a la siguiente descripción detallada junto con los dibujos adjuntos. El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado a color. Las copias de la presente publicación de patente o solicitud de patente con dibujos a color se proporcionarán por la Oficina tras solicitud y pago de las tasas necesarias.

La FIG. 1 es un gráfico que demuestra que las células SC-β generadas poniendo en contacto células progenitoras endocrinas dirigidas a diferenciarse en células SC-β con un agente ejemplar que disminuye el nivel y/o la actividad de la cinasa terminal de c-Jun (JNK), por ejemplo, el inhibidor de JNK SP600125, presentan un mayor índice de estimulación en relación con células SC-β generadas poniendo en contacto células progenitoras endocrinas dirigidas a diferenciarse en células SC-0 en ausencia de tratamiento con el inhibidor de JNK. Índice de estimulación = [insulina a glucosa 20 mM]/[insulina a glucosa 2 mM]. Índice de estimulación relativo = Índice de estimulación/índice de estimulación de control.

La FIG. 2A es un esquema que ilustra seis fases de diferenciación de células madre pluripotentes humanas a células SC-β. hPSC = célula madre pluripotente humana, DE = célula del endodermo definitivo, GT = célula del tubo intestinal, PP1 = célula progenitora pancreática 1, PP2 = célula progenitora pancreática 2, EN = célula progenitora endocrina, SC-β = células β derivadas de células madre.

La FIG. 2B es un esquema que ilustra un protocolo de diferenciación de seis etapas ejemplar para generar células SC-β a partir de células madre pluripotentes, como se describe adicionalmente en Pagliuca *et al.* 2014 y en la solicitud internacional PCT n.º PCT/US2014/041992.

La FIG. 2C es un esquema que ilustra un procedimiento ejemplar para generar células SC-β añadiendo un inhibidor de JNK a la etapa 6 del protocolo ejemplar mostrado en la FIG. 2B.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se dirige a generar células SC-β, en particular células SC-β que presentan función *in vitro* e *in vivo*. Más en particular, el trabajo descrito en el presente documento demuestra que poner en contacto células progenitoras endocrinas que progresan a células SC-β en un protocolo de diferenciación dirigida con un agente que disminuye el nivel y/o la actividad de la cinasa terminal de c-Jun (JNK) produce células SC-β que presentan un mayor índice de estimulación en relación con células SC-β generadas por el protocolo en ausencia de contacto con el agente.

Algunas definiciones

La "diferenciación" es el proceso por el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere los rasgos característicos de una célula especializada tal como, por ejemplo, una célula pancreática. Una célula diferenciada es aquella que ha asumido una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término "comprometida", cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha avanzado en la vía de diferenciación hasta un punto en el que, en circunstancias normales, continuará diferenciándose en un tipo de célula o subconjunto de tipos de células específicos y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o revertir a un tipo de célula menos diferenciada. Como se usa en el presente documento, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células procede y a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula sitúa a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un marcador específico de linaje se refiere a una característica asociada específicamente con el fenotipo de las células de un linaje de interés y se puede usar para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida al linaje de interés.

Como se usa en el presente documento, "marcadores" son moléculas de ácido nucleico o polipéptido que se expresan diferencialmente en una célula de interés. Expresión diferencial significa un nivel incrementado para un marcador positivo y un nivel disminuido para un marcador negativo en comparación con una célula indiferenciada. El nivel detectable del ácido nucleico o polipéptido marcador es suficientemente mayor o menor en las células de interés en comparación con otras células, de modo que la célula de interés se puede identificar y distinguir de otras células usando cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, una célula es "positiva" o "+" para un marcador específico cuando el

marcador específico se detecta suficientemente en la célula. De forma similar, la célula es "negativa" o "-" para un marcador específico cuando el marcador específico no se detecta suficientemente en la célula. Por ejemplo, positivo por FACS es normalmente superior al 2 %, mientras que el umbral negativo por FACS es normalmente inferior al 1 %.

El proceso de diferenciación de células madre pluripotentes en células endocrinas pancreáticas funcionales (es decir, células SC- β) *in vitro* se puede considerar en algunos aspectos como un progreso a través de seis fases consecutivas, como se muestra en el protocolo ejemplar representado en la FIG. 2A. En esta progresión por etapas, "fase 1" o "S1" se refiere a la primera etapa del proceso de diferenciación, la diferenciación de células madre pluripotentes en células que expresan marcadores característicos de células del endodermo definitivo ("DE", "células de fase 1" o "células S1"). "Fase 2" se refiere a la segunda etapa, la diferenciación de células que expresan marcadores característicos de células del tubo intestinal ("GT", "células de fase 2" o "células S2"). "Fase 3" se refiere a la tercera etapa, la diferenciación de células que expresan marcadores característicos de células del tubo intestinal en células que expresan marcadores característicos de células pancreáticas progenitoras 1 ("PP1", "células de fase 3" o "células S3"). "Fase 4" se refiere a la cuarta etapa, la diferenciación de células que expresan marcadores característicos de células pancreáticas progenitoras 1 en células que expresan marcadores característicos de células pancreáticas progenitoras 2 ("PP2", "células de fase 4" o "células S4"). "Fase 5" se refiere a la quinta etapa, la diferenciación de células que expresan marcadores característicos de células pancreáticas progenitoras 2 en células que expresan marcadores característicos de células del endodermo pancreático y/o células progenitoras endocrinas pancreáticas ("EN", "células de fase 5" o "células S5"). "Fase 6" se refiere a la diferenciación de células que expresan marcadores característicos de células progenitoras endocrinas pancreáticas en células que expresan marcadores característicos de células β endocrinas pancreáticas ("células SC- β ", "células de fase 6" o "células S6"). Sin embargo, se debe apreciar que no todas las células de una población particular progresan a través de estas fases a la misma velocidad, es decir, algunas células pueden haber progresado menos o más en la vía de diferenciación que la mayoría de las células presentes en la población.

Las características de los diversos tipos de células asociados con las fases mostradas en la FIG. 2A se describen ahora. "Células del endodermo definitivo", como se usa en el presente documento, se refiere a células que tienen las características de las células que surgen del epiblasto durante la gastrulación y que forman el tubo gastrointestinal y sus derivados. Las células del endodermo definitivo expresan al menos uno de los siguientes marcadores: FOXA2 (también conocido como factor nuclear de hepatocitos 3 β ("HNF3 β b")), GATA4, SOX17, CXCR4, Brachyury, Cerberus, OTX2, goosecoide, Kit-C, CD99 y MIXL1. Los marcadores característicos de las células del endodermo definitivo incluyen CXCR4, FOXA2 y SOX17. Por tanto, las células del endodermo definitivo se pueden caracterizar por su expresión de CXCR4, FOXA2 y SOX17. Además, dependiendo del tiempo que se permita que las células permanezcan en la fase 1, se puede observar un incremento en HNF4 α .

"Células del tubo intestinal", como se usa en el presente documento, se refiere a células derivadas del endodermo definitivo que pueden dar lugar a todos los órganos endodérmicos, tales como pulmones, hígado, páncreas, estómago e intestino. Las células del tubo intestinal se pueden caracterizar por su expresión sustancialmente incrementada de HNF4 α respecto a la expresada por las células del endodermo definitivo. Por ejemplo, durante la fase 2 se puede observar un incremento de diez a cuarenta veces en la expresión del ARNm de HNF4 α .

"Células progenitoras pancreáticas 1", como se usa en el presente documento, se refiere a células del endodermo que dan lugar al esófago, los pulmones, el estómago, el hígado, el páncreas, la vesícula biliar y una porción del duodeno. Las células progenitoras pancreáticas 1 expresan al menos uno de los siguientes marcadores: PDX1, FOXA2, CDX2, SOX2 y HNF4 α . Las células progenitoras pancreáticas 1 se pueden caracterizar por un incremento en la expresión de PDX1, en comparación con las células del tubo intestinal. Por ejemplo, más del cincuenta por ciento de las células de los cultivos de la fase 3 expresan típicamente PDX1.

"Células progenitoras pancreáticas 2", como se usa en el presente documento, se refiere a células que expresan al menos uno de los siguientes marcadores: PDX1, NKX6.1, HNF6, NGN3, SOX9, PAX4, PAX6, ISL1, gastrina, FOXA2, PTF1a, PROX1 y HNF4 α . Las células progenitoras pancreáticas 2 se pueden caracterizar como positivas para la expresión de PDX1, NKX6.1 y SOX9.

"Células progenitoras endocrinas pancreáticas" o "células progenitoras endocrinas" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a células del endodermo pancreático que se pueden convertir en una célula que expresa hormonas pancreáticas. Las células progenitoras endocrinas pancreáticas expresan al menos uno de los siguientes marcadores: NGN3; NKX2.2; NeuroD1; ISL1; PAX4; PAX6; o ARX. Las células progenitoras endocrinas pancreáticas se pueden caracterizar por su expresión de NKX2.2 y NeuroD1.

Un "precursor de la misma", como el término referido a una célula progenitora endocrina pancreática, se refiere a cualquier célula que se puede diferenciar en una célula progenitora endocrina pancreática, incluyendo, por ejemplo, una célula madre pluripotente, una célula del endodermo definitivo, una célula del tubo intestinal o una célula progenitora pancreática, cuando se cultiva en condiciones adecuadas para diferenciar la célula precursora en la célula proendocrina pancreática.

"Células endocrinas pancreáticas", como se usa en el presente documento, se refiere a células que pueden expresar al menos una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina, grelina y polipéptido pancreático. Además de estas hormonas, los marcadores característicos de las células endocrinas pancreáticas incluyen uno o más de NGN3, NeuroD1, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4, ARX, NKX2.2 y PAX6. Las células endocrinas pancreáticas que expresan marcadores característicos de células β se pueden caracterizar por su expresión de insulina y al menos uno de los siguientes factores de transcripción: PDX1, NKX2.2, NKX6.1, NeuroD1, ISL1, HNF30, MAFA y PAX6.

Los términos "célula β derivada de células madre" y "célula SC- β " se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a células diferenciadas *in vitro* (por ejemplo, a partir de células madre pluripotentes) que muestran al menos un marcador indicativo de una célula β pancreática (por ejemplo, PDX-1 o NKX6-1), que expresan insulina y muestran una respuesta GSIS característica de una célula β madura endógena tanto *in vitro* como *in vivo*. La respuesta GSIS de las células SC- β se puede observar dentro de las dos semanas posteriores al trasplante de la célula SC- β a un huésped (por ejemplo, un ser humano o un animal). Se debe entender que es necesario que las células SC- β no deriven (por ejemplo, directamente) de células madre, ya que los procedimientos de la divulgación pueden derivar células SC- β a partir de cualquier célula progenitora endocrina que exprese insulina o un precursor de la misma usando cualquier célula como punto de partida (por ejemplo, se pueden usar células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células progenitoras, células somáticas parcialmente reprogramadas (por ejemplo, una célula somática que se ha reprogramado parcialmente a un estado intermedio entre una célula madre pluripotente inducida y la célula somática de la que derivó), células multipotentes, células totipotentes, una versión transdiferenciada de cualquiera de las células anteriores, etc., ya que la invención no pretende limitarse de esta manera). En algunos aspectos, se excluyen las células humanas que derivan de células madre embrionarias humanas obtenidas exclusivamente mediante un procedimiento que requiere la destrucción de un embrión. El experto conoce bien dichos procedimientos y cómo evitarlos para los propósitos de generar células SC- β de acuerdo con los procedimientos de la presente invención.

En el presente documento se usan de manera intercambiable "d1", "1d" y "día 1"; "d2", "2d" y "día 2", etc. Estas combinaciones de números y letras se refieren a un día específico de incubación en las diferentes fases durante el protocolo de diferenciación por etapas de la presente solicitud.

Procedimientos para generar células SC- β

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, un procedimiento para generar células β derivadas de células madre (SC- β) comprende poner en contacto una población de células que comprende células progenitoras endocrinas en condiciones adecuadas para dirigir la diferenciación de dichas células progenitoras endocrinas en dichas células SC- β con una cantidad eficaz de un agente que disminuya la actividad de la cinasa N terminal de c-Jun (JNK) en dichas células progenitoras endocrinas, generando de este modo dichas células SC- β , en el que las células progenitoras endocrinas comprenden células PDX1+/NKX6.1+/NEUROD1+/insulina+/glucagón-/somatostatina-, en el que la cantidad eficaz comprende una concentración de entre aproximadamente 0,1 μ m y aproximadamente 110 μ m, en las que el agente es SP600125.

"Poner en contacto", "poner en contacto la célula" y cualquier derivación de los mismos, como se usan en el presente documento, se refieren a cualquier medio de introducir un agente (por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos, ribocimas, anticuerpos, moléculas pequeñas, etc.) en una célula diana o en un entorno en el que está presente la célula (por ejemplo, cultivo celular), incluyendo medios químicos y físicos, ya sea directa o indirectamente. Poner en contacto también pretende englobar procedimientos para exponer una célula, administrar a una célula o "cargar" una célula con un agente mediante vectores víricos o no víricos, y en los que dicho agente es bioactivo tras la administración. El procedimiento de administración se elegirá para el agente y uso particular. Los parámetros que afectan a la administración, como es conocido en la técnica médica, pueden incluir, entre otros, el tipo de célula afectada y la localización celular. En algunos aspectos, poner en contacto se refiere a exponer una célula o un entorno en el que se localiza la célula (por ejemplo, medio de cultivo celular) a al menos un agente que disminuye el nivel y/o la actividad de JNK.

Se cree que las células SC- β generadas al poner en contacto células progenitoras endocrinas (o sus precursoras) dirigidas a diferenciarse en células SC- β de acuerdo con cualquier protocolo presentarán una función *in vitro* e *in vivo* mejorada cuando se pongan en contacto con un agente que disminuya la actividad de cinasa N terminal de c-Jun (JNK). Como se usa en el presente documento, "dirigido a diferenciarse" se refiere al proceso de provocar que una célula de un primer tipo de célula se diferencie en una célula de un segundo tipo de célula.

Recientemente se ha informado de dos protocolos para dirigir la diferenciación de células madre pluripotentes en células endocrinas productoras de insulina que expresan marcadores clave de células β pancreáticas maduras (por ejemplo, células SC- β), cada uno de los cuales incluye diferencian células en células progenitoras endocrinas que se pueden dirigir para diferenciarse en células SC- β , así como protocolos para dirigir las células progenitoras endocrinas pancreáticas en células SC- β , que se pueden usar en el procedimiento divulgado en el presente documento para generar células SC- β . En primer lugar, se usó un protocolo de seis fases para la producción a gran escala de células β humanas funcionales usando células madre pluripotentes humanas (hPSC) mediante

modulación secuencial de múltiples vías de señalización en un sistema tridimensional de cultivo celular, sin usar ningún transgén ni modificación genética, para generar células productoras de insulina monohormonales, sensibles a la glucosa, que presentaban marcadores clave de células β y ultraestructura de células β (véase Pagliuca *et al.*, 2014 y la publicación internacional PCT n.º WO/2014/201167. Pagliuca y colaboradores informaron de que dichas células imitaban la función de los islotes humanos *in vitro* e *in vivo*, y demostraron la utilidad potencial de dichas células para trasplantes *in vivo* para tratar la diabetes. En segundo lugar, se describió un protocolo de siete fases que convierte células madre embrionarias humanas (hESC) en células productoras de insulina que expresan marcadores clave de células β pancreáticas maduras, tal como MAFA, y muestran una secreción de insulina estimulada por glucosa como la de los islotes humanos usando incubaciones estáticas *in vitro* (Rezania *et al.*, 2014). Se descubrió que las células producidas mediante dicho protocolo, denominadas células S7, revertían rápidamente la diabetes en ratones en poco más de un mes.

Como se describe en el presente documento, las células progenitoras endocrinas se dirigen a diferenciarse en células SC- β poniendo en contacto las células progenitoras endocrinas en condiciones que promueven la agrupación celular con i) un inhibidor de la vía de señalización del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y ii) un activador de la vía de señalización de hormonas tiroideas para inducir la maduración *in vitro* de al menos algunas de las células progenitoras endocrinas en células SC- β . Las células progenitoras endocrinas se pueden poner en contacto opcionalmente con un inhibidor de proteína cinasa (por ejemplo, estaurosporina).

Una "cantidad eficaz" de un agente (o composición que contiene dicho agente) se refiere a la cantidad suficiente para lograr un efecto deseado, por ejemplo, cuando se administra a una célula o sujeto de acuerdo con una forma de administración, vía y/o pauta seleccionada. Como apreciarán los expertos en esta técnica, la cantidad absoluta de un agente o composición particular que es eficaz puede variar dependiendo de factores tales como el criterio de valoración biológico o farmacológico deseado, el agente que se va a administrar, el tejido diana, etc. Los expertos en la técnica entenderán además que una "cantidad eficaz" se puede poner en contacto con las células o administrarse en una dosis única, o se puede lograr el efecto deseado mediante el uso de dosis múltiples. Una cantidad eficaz de una composición puede ser una cantidad suficiente para reducir la gravedad o prevenir uno o más síntomas o signos de un trastorno (por ejemplo, diabetes). De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, la cantidad eficaz del agente que disminuye la actividad de JNK comprende una concentración de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 110 μ M. En un modo de realización, la cantidad eficaz del agente comprende 1 μ M. En algunos aspectos, las células progenitoras endocrinas (células S5) se ponen en contacto con 1 μ M de SP600125 para generar células SC- β que presentan una función *in vitro* o *in vivo* mejorada.

Inhibidores de la cinasa N terminal de c-Jun (JNK)

La presente invención usa SP600125 en el procedimiento para generar células SC- β . Los agentes que disminuyen la actividad de JNK (también denominados en el presente documento "inhibidores de JNK") pueden ser moléculas pequeñas orgánicas o inorgánicas; sacáridos; oligosacáridos; polisacáridos; macromoléculas biológicas, por ejemplo, péptidos, proteínas y análogos y derivados de péptidos; peptidomiméticos; ácidos nucleicos y análogos y derivados de ácidos nucleicos (incluyendo, pero sin limitarse a, microARN, ARNip, ARNh, ARN antisentido, ribocimas a y aptámeros); un extracto elaborado a partir de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos o células animales; tejidos animales; composiciones naturales o sintéticas; y cualquier combinación de los mismos.

Los inhibidores de JNK ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los inhibidores de JNK de fórmula I como se describe en la patente de EE. UU. n.º 8.183.254; los derivados de benzotiazol de acuerdo con la fórmula I y tautómeros, isómeros geométricos, enantiómeros, diastereómeros, racematos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos descritos en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2009/0176762; una secuencia inhibidora de JNK, péptido quimérico o ácido nucleico descrito en la patente de EE. UU. n.º 6.610.820 y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2009/0305968, por ejemplo péptidos permeables a las células que se unen a JNK e inhiben la actividad de JNK o la activación de c-Jun, incluyendo péptidos que tienen secuencias de aminoácidos de DTYRPKRPTT LNLFPQVPRS QDT (SEQ ID NO:1); EEPHKHRPTT LRLTLGAQD S (SEQ ID NO:2); TDQSRPVQPF LNLTPRKPR YTD (SEQ ID NO:3); o SDQAGLTTLR LTPRHKE E (SEQ ID NO:4); compuestos inhibidores de la cinasa N terminal de c-Jun de fórmula I descritos en la patente de EE. UU. n.º 7.612.086; un inhibidor de JNK de fórmula I descrito en la publicación de la solicitud internacional PCT n.º WO/2011/018417; un agente que inhibe MKK4 como se describe en el presente documento (por ejemplo, inhibidores de MKK4); un agente que inhibe la proteína que interactúa con JNK (JIP) (véase, por ejemplo, Chen T, *et al.* Biochem J. 2009, 13 de mayo; 420(2):283-94, divulga moléculas pequeñas que alteran la interacción JIP-JNK para proporcionar un enfoque alternativo para la inhibición de JNK); SP600125 (antra[1,9-cd]pirazol-6(2H)-ona; 1,9-pirazoloantrona) (Calbiochem, La Jolla, California); un compuesto basado en la estructura de 6,7-dihidro-5H-pirrol[1,2-a]imidazol (por ejemplo, ER-181304); SB203580; un inhibidor selectivo de JNK3 descrito en la publicación de la solicitud internacional PCT WO 2010/039647; 7-(5-7V-fenilaminopentil)-2H-antra[1,9-cd]pirazol-6-ona; 7-(7-7V-benzoilaminoheptil)amino-2H-antra[1,9-cd]pirazol-6-ona; y 7-(5-(p-toliloxi)pentil)amino-2H-antra[1,9-cd]pirazol-6-ona; una forma negativa dominante de JNK, por ejemplo, una molécula de JNK-1 catalíticamente inactiva construida reemplazando los sitios de activación de la fosforilación

de Thr183 y Tyr185 con Ala y Phe, respectivamente, que actúa como un inhibidor dominante de la molécula de JNK-1 natural como se describe en la publicación de la solicitud internacional PCT n.º WO 1996/036642; un polipéptido JIP-1 que se une a JNK como se describe en las publicaciones de patentes de EE. UU. 2007/0003517 y 2002/0119135, que incluye un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos
 5 S G D T Y R P K R P T T L N L F P Q V P R S Q D T L N (SEQ ID NO:5).

Como se describe en el presente documento, un inhibidor de JNK disminuye el nivel y/o la actividad de JNK en células puestas en contacto en al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % en relación con el nivel o la actividad de JNK en las células en ausencia de contacto con el inhibidor de JNK. Si bien no es necesario, un inhibidor de JNK puede inhibir completamente el nivel y/o la actividad de JNK en las células. Se debe apreciar que los inhibidores de JNK pueden disminuir el nivel y/o la actividad de JNK en cualquier célula de la población en la que las células progenitoras endocrinas se están diferenciando en células SC-β, incluyendo las células SC-β generadas en la población, las células progenitoras endocrinas o cualquier precursor de las mismas.

Como se describe en el presente documento, un agente disminuye el nivel y/o la actividad de JNK al inhibir la fosforilación de JNK. Sin embargo, se debe apreciar que el agente puede actuar por medio de cualquier mecanismo que dé como resultado una disminución del nivel y/o la actividad de JNK. Por ejemplo, se puede disminuir el nivel y/o la actividad de JNK disminuyendo el nivel y/o la actividad de la proteína cinasa cinasa 4 activada por mitógenos (MKK4). La MKK4, un miembro de la familia de las MAP cinasa cinasas, fosforila y activa directamente las cinasas NH2 terminales de c-Jun (JNK) en respuesta al estrés celular y a las citocinas proinflamatorias. JNK es un miembro de la familia de las MAP cinasas y un componente clave de una vía de señalización de proteína cinasas activadas por estrés. Dichos agentes se pueden denominar en el presente documento inhibidores de MKK4. Un inhibidor de MKK4 puede disminuir el nivel y/o la actividad de JNK en células puestas en contacto en al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % en relación con el nivel o la actividad de JNK en las células en ausencia de contacto con el inhibidor de JNK.

Se debe apreciar, como se indica anteriormente, que la población de células que comprende las células progenitoras endocrinas puestas en contacto de acuerdo con el procedimiento puede comprender diferentes tipos de células a medida que las células se diferencian en células SC-β. Preferentemente, una cantidad máxima de células endocrinas en la población puesta en contacto con un inhibidor de JNK o un inhibidor de MKK4 se diferencian en células SC-β. En algunos modos de realización del procedimiento, entre al menos un 5 % y un 65 % de las células endocrinas de la población se diferencian en células SC-β.

35 Células SC-β obtenidas mediante el procedimiento de generación de células SC-β

Se proporciona una célula SC-β no natural o población de las mismas aislada generada de acuerdo con un procedimiento descrito en el presente documento que presenta una respuesta GSIS tanto *in vitro* como *in vivo*, en el que la célula SC-β o población de las mismas aislada presenta un índice de estimulación de entre aproximadamente 1,4 y aproximadamente 2,4. La célula SC-β o población aislada también presenta al menos un rasgo característico de una célula β endógena madura (por ejemplo, monohormonalidad). En algunos modos de realización, la célula SC-β o población de las mismas aislada produce entre aproximadamente 300 uUI y aproximadamente 4000 uUI cada 30 minutos por cada 10⁶ células totales mediante incubación a una alta concentración de glucosa.

Las células SC-β divulgadas en el presente documento comparten muchos rasgos característicos distintivos de las células β naturales, pero son diferentes en determinados aspectos (por ejemplo, perfiles de expresión génica). En algunos modos de realización, la célula SC-β no es natural. Como se usa en el presente documento, "no natural" significa que las células SC-β son marcadamente diferentes en determinados aspectos con respecto a las células β que existen en la naturaleza, es decir, células β naturales. Se debe apreciar, sin embargo, que estas marcadas diferencias típicamente pertenecen a rasgos característicos estructurales que pueden dar como resultado que las células SC-β presenten determinadas diferencias funcionales, por ejemplo, aunque los patrones de expresión génica de las células SC-β difieran de los de las células β naturales, las células SC-β se comportan de forma similar a las células β naturales, pero determinadas funciones pueden estar alteradas (por ejemplo, mejoradas) en comparación con las células β naturales. Por ejemplo, una mayor frecuencia de células SC-β responde a glucosa 20 mM en comparación con la frecuencia de células β naturales. Otras diferencias entre las células SC-β y las células β naturales serían evidentes para el experto en la técnica en base a los datos divulgados en el presente documento.

Las células SC-β (por ejemplo, humanas) generadas de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento pueden presentar al menos una de las siguientes características de una célula β pancreática madura endógena: i) una respuesta a múltiples provocaciones con glucosa que se asemeja a la respuesta de los islotes endógenos (por ejemplo, al menos una, al menos dos o al menos tres o más provocaciones secuenciales con glucosa); ii) una morfología que se asemeja a la morfología de una célula β endógena; iii) empaquetamiento de insulina en gránulos secretorios o gránulos de insulina cristalinos encapsulados; iv) un índice de estimulación superior a al menos 1,4; v) apoptosis inducida por citocinas en respuesta a citocinas; vi) secreción potenciada de

insulina en respuesta a fármacos antidiabéticos conocidos (por ejemplo, secretagogos); vii) monohormonales, es decir, no coexpresan de forma anómala otras hormonas, tales como glucagón, somatostatina o polipéptido pancreático; viii) una baja tasa de replicación; y ix) incremento del Ca^{2+} intracelular en respuesta a la glucosa.

5 Además, se proporciona una microcápsula que comprende la célula SC- β o población de las mismas aislada generada de acuerdo con el procedimiento del presente documento que presenta una respuesta GSIS tanto *in vitro* como *in vivo*, en la que la célula SC- β o población de las mismas presenta un índice de estimulación de entre aproximadamente 1,4 y aproximadamente 2,4 encapsulada en la misma.

10 También se proporciona un dispositivo de macroencapsulación que comprende la célula SC- β o población de las mismas aislada generada de acuerdo con el procedimiento del presente documento que presenta una respuesta GSIS tanto *in vitro* como *in vivo*, en el que la célula SC- β o población de las mismas presenta un índice de estimulación de entre aproximadamente 1,4 y aproximadamente 2,4.

15 Además, se proporciona una línea celular que comprende la célula SC- β aislada generada de acuerdo con el procedimiento del presente documento que presenta una respuesta GSIS tanto *in vitro* como *in vivo*, en la que la célula SC- β o la población de las mismas presenta un índice de estimulación de entre aproximadamente 1,4 y aproximadamente 2,4 que expresa insulina de manera estable.

20 Ensayos

En un ensayo se puede usar una célula SC- β o población de las mismas aislada generada de acuerdo con los procedimientos del presente documento, o una línea celular que comprende la célula SC- β aislada generada de acuerdo con el procedimiento del presente documento que presenta una respuesta GSIS tanto *in vitro* como *in vivo*, en la que la célula SC- β o la población de las mismas presenta un índice de estimulación de entre aproximadamente 1,4 y aproximadamente 2,4 que expresa insulina de manera estable (i) para identificar uno o más agentes candidatos que promuevan o inhiban el destino de una célula β seleccionado del grupo que consiste en proliferación de células β , replicación de células β , muerte de células β , función de células β , susceptibilidad de células β al ataque inmunológico y susceptibilidad de células β a la desdiferenciación o diferenciación, o (ii) para identificar uno o más agentes candidatos que promuevan la diferenciación de al menos una célula endocrina positiva para insulina o un precursor de la misma en al menos una célula SC- β . Típicamente, los ensayos implican poner en contacto la célula SC- β , población de las mismas o línea celular aislada con uno o más agentes candidatos para evaluar su capacidad para i) promover o inhibir el destino de una célula β seleccionado del grupo que consiste en proliferación de células β , replicación de células β , muerte de células β , función de células β , susceptibilidad de células β al ataque inmunológico y susceptibilidad de células β a la desdiferenciación o diferenciación, o ii) promover la diferenciación de al menos una célula endocrina positiva para insulina o un precursor de la misma en al menos una célula SC- β y evaluar si el agente candidato posee la capacidad de i) promover o inhibir el destino de una célula β seleccionado del grupo que consiste en proliferación de células β , replicación de células β , muerte de células β , función de células β , susceptibilidad de células β al ataque inmunológico y susceptibilidad de células β a la desdiferenciación o diferenciación, o ii) promover la diferenciación de al menos una célula endocrina positiva para insulina o un precursor de la misma en al menos una célula SC- β .

Procedimientos para tratamiento

45 En el presente documento se describen procedimientos para el tratamiento de un sujeto que lo necesita. Los procedimientos implican administrar a un sujeto que lo necesita una población aislada de células SC- β o una microcápsula que comprende células SC- β encapsuladas en la misma. El sujeto puede necesitar células β adicionales. El sujeto puede tener un riesgo incrementado de desarrollar diabetes. Una población aislada de células SC- β generadas mediante un procedimiento de la presente invención puede ser para su uso en la administración a un sujeto para el tratamiento de diabetes de tipo 1 o de tipo 2. En algunos aspectos, el sujeto tiene, o tiene un riesgo incrementado de desarrollar, un trastorno metabólico. La administración al sujeto puede comprender implantar células SC- β , una microcápsula que comprende células SC- β o un dispositivo de macroencapsulación que comprende células SC- β en el sujeto. El sujeto puede ser un sujeto humano o un sujeto animal. Las células se pueden implantar como células dispersas o formar grupos que se pueden infundir en la vena porta hepática. Las células se pueden proporcionar en soportes poliméricos degradables biocompatibles, dispositivos porosos no degradables o encapsuladas para protegerlas de la respuesta inmunitaria del huésped. Las células se pueden implantar en un sitio apropiado en un receptor. Los sitios de implantación incluyen, por ejemplo, el hígado, el páncreas natural, el espacio subcapsular renal, el epiplón, el peritoneo, el espacio subseroso, el intestino, el estómago o una bolsa subcutánea.

60 Para potenciar una mayor diferenciación, supervivencia o actividad de las células implantadas *in vivo*, se pueden administrar factores adicionales, tales como factores de crecimiento, antioxidantes o agentes antiinflamatorios, antes de, simultáneamente con o después de la administración de las células. Estos factores se pueden secretar por células endógenas y exponer a las células administradas *in situ*. Se puede inducir la diferenciación de las células implantadas mediante cualquier combinación de factores de crecimiento administrados endógena y exógenamente conocidos en la técnica.

La cantidad de células usadas en la implantación depende de diversos factores, incluyendo la afección del paciente y la respuesta al tratamiento, y se puede determinar por un experto en la técnica.

El procedimiento de tratamiento descrito en el presente documento puede comprender además la incorporación de las células en un soporte tridimensional antes de la implantación. Las células se pueden mantener *in vitro* en este soporte antes de su implantación en el paciente. De forma alternativa, el soporte que contiene las células se puede implantar directamente en el paciente sin cultivo *in vitro* adicional. Opcionalmente, el soporte se puede incorporar con al menos un agente farmacéutico que facilite la supervivencia y función de las células trasplantadas.

Islote o páncreas artificial

Además, se proporciona un islote o páncreas artificial que comprende las células SC- β generadas de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento.

Un páncreas artificial es un dispositivo que encapsula y nutre los islotes de Langerhans para reemplazar los islotes y las células β destruidas por la diabetes de tipo 1. Un páncreas artificial puede contener un millón de islotes o más y se puede implantar en la cavidad peritoneal o debajo de la piel, donde puede responder a los cambios en los niveles de glucemia liberando hormonas, tales como insulina. Se puede elaborar un páncreas artificial usando componentes vivos (por ejemplo, islotes sensibles a la glucosa y secretores de insulina) y no vivos (por ejemplo, para proteger los islotes del cuerpo del paciente diabético y su mecanismo inmunológico destructivo, al tiempo que se permite que los islotes prosperen).

Las células β se pueden usar en cualquier páncreas artificial. El páncreas artificial puede comprender islotes microencapsulados o recubiertos que comprenden células SC- β generadas de acuerdo con los procedimientos del presente documento. El páncreas artificial puede comprender un dispositivo de macroencapsulación en el que se agrupan y encapsulan células de islotes que comprenden células SC- β generadas de acuerdo con los procedimientos del presente documento. El dispositivo de macroencapsulación puede comprender una lámina de hidrogel de PVA para un páncreas artificial de la presente invención (Qi *et al.*, 2004). El islote artificial puede comprender células SC- β generadas de acuerdo con los procedimientos del presente documento, junto con otras células de islotes (α , δ , etc.) en forma de una lámina de islotes. La lámina de islotes comprende una capa de islotes humanos artificiales que comprenden las células SC- β macroencapsuladas dentro de una membrana (por ejemplo, de alginato ultrapuro). La membrana laminar está reforzada con una malla y se puede recubrir en la superficie para evitar o minimizar el contacto entre las células encapsuladas en el interior y la respuesta inmunitaria del huésped del receptor del trasplante. El oxígeno, la glucosa y otros nutrientes se difunden fácilmente hacia la lámina a través de la membrana que nutre los islotes, y las hormonas, tales como la insulina, difunden fácilmente. En la literatura se pueden encontrar ejemplos adicionales de membranas diseñadas para la macroencapsulación/implantación de un islote o páncreas artificial (Isayeva *et al.* 2003). En la literatura se puede encontrar otro ejemplo de implante macroencapsulado adecuado para un islote o páncreas artificial (Aurélien, *et al.* 2014).

Terminología

Se debe entender que los artículos "un", "una", "el" y "la", como se usan en el presente documento, a menos que se indique claramente lo contrario, incluyen los referentes en plural. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en o de otro modo son relevantes para un producto o procedimiento determinado, a menos que se indique lo contrario o sea de otro modo evidente por el contexto. Se debe entender que, en general, cuando se hace referencia a que la invención, o aspectos de la invención, comprenden elementos, rasgos característicos, etc. particulares, determinados modo de realización de la invención o aspectos de la invención consisten en o consisten esencialmente en dichos elementos, rasgos característicos, etc. Para propósitos de simplicidad, dichos modos de realización no se han establecido específicamente en todos los casos en *haec verba* en el presente documento. También se debe entender que cualquier modo de realización de la invención, por ejemplo, cualquier modo de realización encontrado en la técnica anterior, se puede excluir explícitamente de las reivindicaciones, independientemente de si la exclusión específica se menciona en la memoria descriptiva. Por ejemplo, se puede excluir cualquier agente del género de inhibidores de JNK.

Cuando en el presente documento se proporcionan intervalos, la invención incluye modos de realización en los que se incluyen los criterios de valoración, modos de realización en los que se excluyen ambos criterios de valoración y modos de realización en los que se incluye un criterio de valoración y se excluye el otro. Se debe asumir que ambos criterios de valoración están incluidos a menos que se indique de otro modo. Además, se debe entender que, a menos que se indique de otro modo o que sea evidente de otro modo por el contexto y la comprensión de un experto en la técnica, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor o subintervalo específico dentro de los intervalos establecidos en los diferentes modo de realización de la invención, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. También se entiende que, cuando en el presente documento se establece una serie de valores numéricos, la invención incluye modos de realización que se relacionan de manera análoga con cualquier valor o intervalo intermedio definido por dos valores cualesquiera en la serie, y que el valor más bajo se puede

tomar como mínimo y el valor más alto se puede tomar como máximo. Los valores numéricos, como se usa en el presente documento, incluyen valores expresados como porcentajes. Para cualquier modo de realización de la invención en el que un valor numérico esté precedido por "aproximadamente", la invención incluye un modo de realización en el que se cita el valor exacto. Para cualquier modo de realización de la invención en el que un valor numérico esté precedido por "aproximadamente", la invención incluye un modo de realización en el que el valor esté precedido por "aproximadamente". En general, "aproximadamente" incluye números que se encuentran dentro de un intervalo del 1 % o en algunos modos de realización del 5 % de un número en cualquier dirección (mayor o menor que el número), a menos que se establezca de otro modo o sea evidente de otro modo por el contexto (excepto donde dicho número excedería inadmisiblemente el 100 % de un valor posible).

Referencias

1. Bellin *et al.*, (2012). Potent induction immunotherapy promotes long-term insulin independence after islet transplantation in type 1 diabetes. *Am. J. Transplant.* 12, 1576-1583.
2. Pagliuca *et al.* (2014). Generation of Functional Human Pancreatic β cells In Vitro. *Cell.* 159, 428-439.
3. Rezania *et al.* (2014). Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived *in vitro* from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotech.* 32(11), 1121-1133.
4. Isayeva, *et al.* (2003). Characterization and performance of membranes designed for macroencapsulation/implantation of pancreatic islet cells. *Biomaterials* 24(20), 3483-3491.
5. Motté, *et al.* (2014). Composition and function of macroencapsulated human embryonic stem cell-derived implants: comparison with clinical human islet cell grafts. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 307(9), E838-E846.
6. Qi *et al.* (2004). PVA hydrogel sheet macroencapsulation of the bioartificial pancreas. *Biomaterials* 24(27), 5885-5892.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para generar células β derivadas de células madre (Sc- β), β), comprendiendo el procedimiento poner en contacto una población de células que comprende células progenitoras endocrinas en condiciones adecuadas para dirigir la diferenciación de dichas células progenitoras endocrinas en dichas células SC- β con una cantidad eficaz de un agente que disminuya la actividad de la cinasa N terminal de c-Jun (JNK) en dichas células progenitoras endocrinas, generando de este modo dichas células SC- β , en el que las células progenitoras endocrinas comprenden células PDX1+/NKX6.1+/NEUROD1+/insulina+/glucagón-/somatostatina-, en el que la cantidad eficaz comprende una concentración de entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 110 μ M, en las que el agente es SP600125.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que entre al menos un 5 % y un 65 % de las células endocrinas de la población se diferencian en dichas células SC- β .
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la actividad de JNK disminuye en un 70 %.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la actividad de JNK disminuye en un 90 %.
5. El procedimiento de una cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el agente inhibe completamente la actividad de JNK.

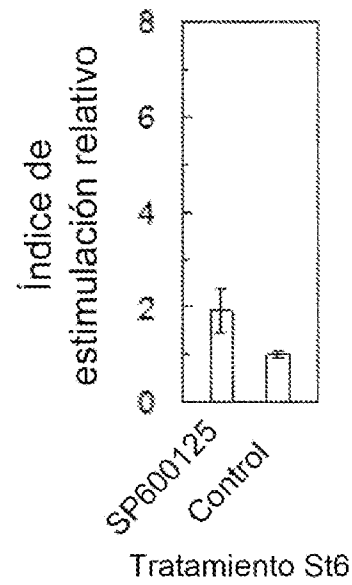


FIG. 1



FIG. 2A

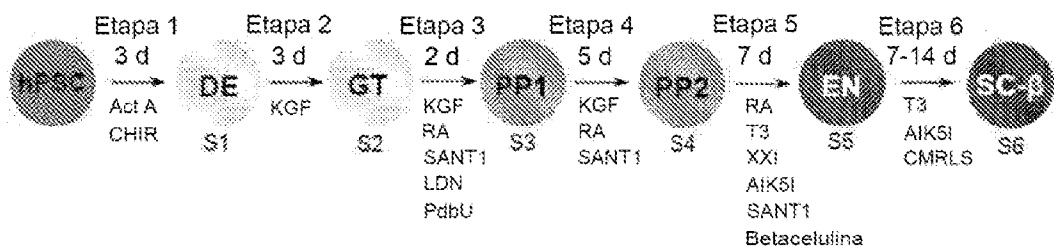


FIG. 2B

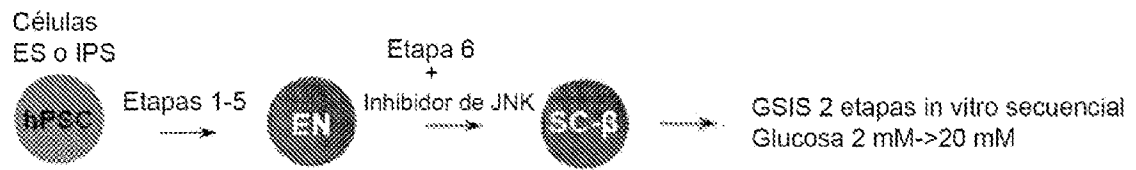


FIG. 2C