

CÉLULAS TERAPÉUTICAS Y MÉTODOS RELACIONADOS CON ELLAS

SOLICITUD RELACIONADA

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad conforme al artículo 119(e) del título 35 del U.S.C. a la solicitud provisional de EE.UU. 63/443 261 presentada el 3 de febrero de 2023, cuyo contenido completo se incorpora aquí mediante esta referencia.

CAMPO

[0002] La presente divulgación se refiere en general al campo de la biología celular, las células madre, la diferenciación celular y las terapias basadas en células.

ANTECEDENTES

[0003] Se proporciona el siguiente análisis con el fin de que el lector pueda entender la divulgación y no se admite que describe o constituye un estado de la técnica de este.

[0004] La diabetes mellitus (es decir, la diabetes) es una enfermedad en la que la capacidad del organismo para producir o responder a la hormona insulina está alterada, lo que provoca un metabolismo anormal de los hidratos de carbono y niveles elevados de glucosa en sangre y orina. La enfermedad se subdivide en varios subtipos, descritos alternativamente como diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM), diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes (MODY), diabetes latente del adulto (LADA), diabetes frágil, diabetes magra, de tipo 1.5, de tipo 2, de tipo 3, diabetes relacionada con la obesidad, diabetes gestacional y otras nomenclaturas aceptadas en este campo.

[0005] Los pacientes con diabetes insulino dependiente pueden curarse mediante el trasplante de nuevas células de los islotes secretoras de hormonas, pero hasta la fecha este método ha sido limitado porque estas células son difíciles de obtener en cantidad, calidad y pureza suficientes. Véase, p. ej., Rickels MR, Roberts, RP. *Endocrine Reviews*, 40(2): 631–668 (2019). Por lo tanto, desde hace tiempo es un objetivo de la investigación biomédica generar células de islotes secretoras de hormonas a partir de células madre humanas de forma eficiente y consistente. Véase, por ejemplo, Pagliuca FW, et ál. *Cell*, 154(2): 428-439 (2014). Para lograr el objetivo de curar la diabetes, debe generarse un producto celular que cumpla los criterios de: (1) ser capaz de establecer un injerto funcional de células de islote secretoras de hormonas terapéuticamente relevantes en un paciente, y; (2) no perjudicar al paciente mediante una secreción hormonal no regulada, neoplasias u otros efectos adversos. Hasta la fecha, no se ha demostrado clínicamente la existencia de células que cumplan estos criterios.

[0006] La gran mayoría de los protocolos establecidos para generar células de islotes secretoras de hormonas a partir de células madre humanas se centran en generar la mayor población de células que expresen marcadores de células beta secretoras de insulina maduras: Pdx1, Nkx6.1 y péptido C (un marcador sustituto de la secreción de insulina). Véase, por ejemplo, Veres A, et ál. *Nature*, 569(7756): 368-373 (2019), Sharon N, et ál. *Cell* 176, 1-15 (2019), Hoglebe NJ, et ál. *Nature Protocols*, 16(9): 4109-4143 (2021). Estos protocolos producen poblaciones celulares muy variables que incluyen células no pancreáticas, células en división activa y células con características pancreáticas, pero sin equivalentes nativos conocidos. Esta impureza merma la eficacia potencial de la terapia celular para tratar la diabetes al tener una potencia menor en comparación con los islotes nativos, y también introduce el riesgo

de tumorigenicidad. Además, la baja reproducibilidad entre lotes de células afecta directamente el coste de producción de las células y limita el traslado de este protocolo a la clínica.

[0007] Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de métodos mejorados y predecibles para generar células terapéuticas productoras de hormonas para el tratamiento de la diabetes. Esta divulgación satisface las necesidades de una terapia de sustitución de islotes más pura, potente y segura para la diabetes.

COMPENDIO

[0008] En el presente documento se describen células y composiciones celulares que producen hormonas pancreáticas y pueden utilizarse para tratar la diabetes, así como métodos de fabricación e identificación de estas.

[0009] En un aspecto, la presente divulgación proporciona una célula endocrina sintética de sustitución (SRE) aislada, que expresa los factores de transcripción Pdx1 e ISL1, pero no expresa el factor de transcripción Nkx6.1. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una célula endocrina sintética de sustitución (SRE) aislada, que expresa los factores de transcripción MAFA e ISL1, pero no expresa el factor de transcripción Nkx6.1.

[0010] En algunas realizaciones de los dos aspectos, la célula SRE aislada se diferencia de una célula madre. En algunas realizaciones, la célula madre se selecciona de una célula madre embrionaria, una célula madre pluripotente inducida y una célula madre reprogramada multipotente. En algunas realizaciones de los dos aspectos, la célula madre se deriva de una línea celular. En algunas realizaciones de estos dos aspectos, la célula madre es una célula madre reprogramada multipotente. En algunas realizaciones de los dos aspectos, la célula madre reprogramada multipotente se obtuvo reprogramando una célula pancreática. En algunas realizaciones de estos dos aspectos, la célula madre reprogramada multipotente fue reprogramada con un plásmido de expresión que codifica (i) Oct4, Sox2, Klf4, y L-Myc; (ii) Oct4, Sox2, Klf4, y C-Myc; (iii) LIN28, Oct4, Sox2, y Nanog; o (iv) Gils1, Oct3/4, Sox2, y Klf4. En algunas realizaciones de estos aspectos, la célula madre está modificada genéticamente para evitar que actúen sobre ella los linfocitos. En algunas realizaciones de los dos aspectos, la célula madre se modifica genéticamente para carecer de expresión de MHCI y MHCII. En algunas realizaciones de estos aspectos, la célula madre está genéticamente modificada para evitar que actúen sobre ella los linfocitos citolíticos naturales. En algunas realizaciones de estos dos aspectos, la célula madre modificada genéticamente para expresar CD47. En algunas realizaciones de los dos aspectos, la célula madre reprogramada multipotente puede diferenciarse en tipos celulares de endodermo o ectodermo, pero no en tipos celulares de mesodermo. En algunas realizaciones de estos aspectos, la célula madre reprogramada multipotente no comprende ningún gen de reprogramación incorporado en su genoma.

[0011] En algunas realizaciones de estos aspectos, la célula SRE aislada expresa péptido C. En algunas realizaciones de estos aspectos, el péptido C se expresa a niveles equivalentes a los de las células maduras nativas de los islotes pancreáticos. En algunas realizaciones de estos dos aspectos, el péptido C se expresa a niveles superiores a los de una célula SRE que expresa Nkx6.1. En algunas realizaciones de estos aspectos, la expresión del péptido C responde a las fluctuaciones de la

concentración de glucosa.

[0012] En algunas realizaciones de los dos aspectos, la célula SRE aislada secreta insulina. En algunas realizaciones, la célula SRE aislada secreta glucagón.

[0013] En algunas realizaciones de estos aspectos, la célula SRE aislada es humana.

[0014] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una célula SRE aislada divulgada en el presente documento y un vehículo terapéuticamente aceptable.

[0015] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar la diabetes, que comprende administrar a un sujeto con diabetes al menos una célula SRE aislada divulgada en el presente documento (por ejemplo, una célula de cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores) o la composición farmacéutica que la comprende.

[0016] En algunas realizaciones, la diabetes es diabetes de tipo 1.

[0017] En algunas realizaciones, Nkx6.1 se expresa después de que la célula o la composición farmacéutica se administre al sujeto.

[0018] En algunas realizaciones, la administración comprende implantar la célula aislada o la composición farmacéutica en el sujeto.

[0019] En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

[0020] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para preparar una célula SRE aislada, que comprende: poner en contacto una célula madre indiferenciada con una combinación de factores de crecimiento para impulsar la diferenciación de la célula madre a un linaje endocrino, en donde la combinación de factores de crecimiento comprende ácido retinoico, un antagonista de Hedgehog y un inhibidor de la señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP).

[0021] En algunas realizaciones, el antagonista de Hedgehog se selecciona entre SANT1 y ciclopamina.

[0022] En algunas realizaciones, el inhibidor de la señalización de BMP es LDN193189.

[0023] En algunas realizaciones, la célula madre no está expuesta a triyodotironina (T3) o un análogo de esta durante el proceso de diferenciación.

[0024] En algunas realizaciones, la célula madre no está expuesta a un activador de la proteína cinasa C durante el proceso de diferenciación.

[0025] En algunas realizaciones, la célula madre no está expuesta a la nicotinamida, una forma de vitamina B3, durante el proceso de diferenciación.

[0026] En algunas realizaciones, la célula madre no está expuesta a la proteína del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFbeta1).

[0027] En algunas realizaciones, la célula madre no está expuesta al factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1).

[0028] En algunas realizaciones, la célula madre se deriva de una línea celular.

[0029] En algunas realizaciones, la célula madre se selecciona de una célula madre embrionaria, una célula madre pluripotente inducida y una célula madre reprogramada multipotente.

[0030] En algunas realizaciones, la célula madre es una célula madre reprogramada multipotente. En algunas realizaciones, la célula madre reprogramada multipotente se obtuvo reprogramando una célula pancreática. En algunas realizaciones, la célula madre reprogramada multipotente fue reprogramada con un plásmido de expresión

que codifica (i) Oct4, Sox2, Klf4, y L-Myc; (ii) Oct4, Sox2, Klf4, y C-Myc; (iii) LIN28, Oct4, Sox2, y Nanog; o (iv) Gils1, Oct3/4, Sox2, y Klf4. En algunas realizaciones, la célula madre reprogramada multipotente puede diferenciarse en tipos celulares de endodermo o ectodermo, pero no en tipos celulares de mesodermo. En algunas realizaciones, la célula madre reprogramada multipotente no comprende ningún gen de reprogramación incorporado en su genoma. En algunas realizaciones, la célula madre está modificada genéticamente para evitar que actúen sobre ella los linfocitos. En algunas realizaciones, la célula madre se modifica genéticamente para carecer de expresión de MHC I y MHC II. En algunas realizaciones, la célula madre está genéticamente modificada para evitar que actúen sobre ella los linfocitos citolíticos naturales. En algunas realizaciones, la célula madre está modificada genéticamente para expresar CD47.

[0031] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una célula SRE aislada obtenida por los métodos de diferenciación aquí divulgados (por ejemplo, el aspecto y las realizaciones inmediatamente anteriores). En algunas realizaciones, la célula expresa los factores de transcripción Pdx1 e ISL1, y no expresa el factor de transcripción Nkx6.1.

[0032] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una población de las células SRE anteriores. En algunas realizaciones, la población puede ser sustancialmente pura, lo que significa que incluye al menos alrededor del 70 %, al menos alrededor del 75 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 85 %, al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 99 %, al menos alrededor del 100 % o más de las células SRE. En algunas realizaciones, las células SRE pueden formularse con uno o más vehículos terapéuticamente aceptables.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0033] La FIG. 1 muestra el análisis de citometría de flujo de los grupos de SRE. Los grupos de SRE están formados por células que expresan predominantemente Pdx1, ISL1 e insulina. Una proporción menor de células expresa glucagón. En cambio, las células que expresan Nkx6.1 son casi indetectables.

[0034] La FIG. 2 muestra imágenes inmunofluorescentes de grupos de SRE. La tinción fluorescente reveló que ISL1 se expresa en los núcleos de las células que expresan el péptido C (A). Las células que expresan Nkx6.1 están casi ausentes (B), pero las células que sí expresan Nkx6.1 no coexpresan ISL-1 (C). ISL1 se expresa en los núcleos de las células que expresan el marcador del páncreas endocrino cromogranina A (D). Las células que expresan péptido C son más abundantes que las que expresan glucagón (E). Las células que expresan el péptido C no expresan Nkx6.1 (F).

[0035] La FIG. 3 muestra que los grupos de SRE secretan péptido C en respuesta a la glucosa. La incubación estática de 50 grupos de SRE durante 4 intervalos de 20 min en glucosa 2.2 mM demostró una secreción de péptido C gradualmente decreciente. La exposición a glucosa 16.7 mM provocó un aumento de la secreción de péptido C durante 40 min. La estimulación artificial de la secreción de péptido C en presencia de KCl 30 mM muestra una elevada reserva de péptido C disponible para la secreción.

[0036] Las FIG. 4A y 4B muestran el análisis del ARN SR1423 mediante el ensayo

qPCR de hPSC Scorecard para la expresión de un panel de 94 genes asociados con la pluripotencia, el endodermo, el mesodermo y el ectodermo siguiendo el manual Scorecard. La FIG. 4A muestra un diagrama de cajas y bigotes que representa los conjuntos de datos de genes de referencia. Los resultados revelan un transcriptoma con un perfil de expresión de diferenciación fuera del rango significativo de la media del conjunto de datos de referencia. La FIG. 4B representa el mapa térmico de la expresión génica relativa, que muestra que los genes relacionados con la diferenciación mesodérmica fueron los más regulados a la baja, en correlación con la incapacidad para la diferenciación mesodérmica *in vitro*.

[0037] Las FIG. 5A, 5B y 5C muestran la caracterización de la línea de células madre SR1423. La FIG. 5A muestra incrustaciones UMAP de células SR1423U, H1 hESC e iPSC analizadas mediante snRNA-Seq. La FIG. 5B representa el gráfico de cresta de la firma génica para la regulación transcripcional de las células madre pluripotentes. La FIG. 5C representa el diagrama de violín, que muestra la expresión de factores de transcripción clave de células madre en células SR1423, hESC e iPSC.

[0038] Las FIG. 6A y 6B muestran la caracterización de los grupos con alto y bajo contenido de NKX6-1. La FIG. 6A muestra los resultados de citometría de flujo de los grupos con alto y bajo contenido de NKX6-1. La FIG. 6B muestra las imágenes inmunofluorescentes de los grupos con alto y bajo contenido de NKX6-1. Los grupos del día 30-35 de cada protocolo se caracterizaron por la expresión de factores de transcripción clave de los islotes pancreáticos (Pdx1, Nkx6.1, ISL-1, MAFA) y hormonas (péptido C, glucagón).

[0039] Las FIG. 7A y 7B muestran la caracterización de la secreción de los grupos tipo islote. La FIG. 7A representa el índice de secreción (péptido C secretado durante la exposición estática a glucosa 16.7 mM dividido por el péptido C secretado durante la exposición a glucosa 2.2 mM) de los grupos tipo islote. El índice de secreción es superior a 1 para los grupos similares a islotes derivados de cultivos con bajo contenido de NKX6-1 (26 lotes), cultivos con alto contenido de NKX6-1 (16 lotes) e islotes humanos primarios (6 preparaciones), lo que indica sensibilidad a la glucosa. La FIG. 7B representa la liberación total de péptido C que incluye la exposición a KCl. La liberación fue sistemáticamente superior en los islotes humanos primarios, aunque no significativamente superior desde el punto de vista estadístico.

[0040] Las FIG. 8A y 8B muestran el efecto de los equivalentes de islotes con bajo contenido de NKX6-1 implantados. La FIG. 8A muestra la glucosa en sangre de ratones diabéticos inmunodeprimidos inducidos por STZ, que se restableció a niveles similares a los controles no diabéticos 5 semanas después del implante de 2500 (bajo) o 5000 (alto) equivalentes de islotes en el espacio subcapsular renal o en la almohadilla de grasa. La FIG. 8B muestra la cuantificación las mediciones del área total bajo la curva de glucosa en sangre después de la provocación oral con glucosa, mostrando que los animales tratados, pero no los animales de control diabéticos, son capaces de reducir la glucosa en sangre de forma similar a los controles no diabéticos.

[0041] La FIG. 9 muestra los niveles de glucosa en sangre en ayunas por zona de implante. De 10 000 a 40 000 grupos de islotes ricos en NKX6-1 no controlaron la glucosa en sangre tras su implantación a ratas diabéticas inmunodeprimidas

inducidas por STZ. El lugar del implante no influyó en el control de la glucosa.

[0042] Las FIG. 10A, 10B, 10C, 10D, 10E, 10F, 10G y 10H muestran la tinción inmunofluorescente de secciones de tejido de injertos explantados en varios puntos temporales. Las imágenes de tinción muestran un tejido remodelado con elementos de páncreas endocrino funcional. Las células con expresión de NKX6-1 procedentes de injertos con alto contenido en NKX6-1 mostraron una pérdida gradual de la expresión del péptido C durante las primeras 8 semanas tras el implante (FIG. 10A-10D). Los injertos con bajo contenido de NKX6-1 mantuvieron la expresión persistente de péptido C o insulina (FIG. 10E y 10G), CHGA (FIG. 10E), PDX1 (FIG. 10G) y la expresión activada de NKX6-1 (FIG. 10F). Las células endocrinas pancreáticas coexpresaron el antígeno mitocondrial humano (hMito) (FIG. 10H).

[0043] Las FIG. 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F, 11G y 11H muestran el análisis del transcriptoma de los grupos con bajo contenido de NKX6-1 y las etapas de diferenciación. La FIG. 11A muestra la incrustación UMAP de células madre SR1423, estadios 1-9 de diferenciación e islotes humanos. La FIG. 11B muestra la agrupación de los estadios de diferenciación de SR1423 por fases de diferenciación pancreática. La FIG. 11C representa el diagrama de puntos de los genes clave asociados con las diferenciaciones pancreáticas de la FIG. 11B. La FIG. 11D muestra la trayectoria de diferenciación y el pseudotiempo determinado por Monocle. La FIG. 11E muestra la trayectoria de diferenciación dividida por etapas de diferenciación. La FIG. 11F muestra la proyección de las células beta pancreáticas. La FIG. 11G muestra la regulación de la expresión génica en las células beta y las firmas génicas en pseudotiempo. La FIG. 11H muestra la expresión de CHGA, INSM1, FEV y YBX1 en los estadios 7-9 y en células de islotes humanos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0044] En el presente documento se describen células endocrinas sintéticas de sustitución (SRE) que pueden utilizarse para tratar la diabetes, métodos mejorados de generación de dichas células, poblaciones de dichas células y métodos de utilización de las células divulgadas para tratar la diabetes. Más específicamente, la presente divulgación proporciona diferenciación y aislamiento de células SRE que expresan factores de transcripción que comprenden una combinación de (a) homeobox-1 duodenal pancreática (Pdx1) y homeobox-1 LIN ISL (ISL1) o (b) factor de transcripción A BZIP MAF (MAFA) e ISL1, en el que las células SRE no expresan la proteína homeobox NKX6.1 (Nkx6.1). Además, la divulgación también proporciona métodos para producir células con el perfil de expresión anterior. Dichos protocolos pueden incluir, entre otros pasos, la exposición de células madre (en particular, células madre que muestren una preferencia o predisposición hacia un linaje endodermo) al ácido retinoico, un antagonista del erizo y un inhibidor de la señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP). Los cultivos pueden iniciarse en adhesión, permitiendo que las células formen de forma natural y espontánea estructuras tridimensionales, y transfiriendo después las estructuras tridimensionales a cultivos en suspensión. Es posible que las células no estén expuestas a Wnt3a durante el cultivo, ya sea mientras crecen en adhesión o en suspensión. Del mismo modo, las células pueden no estar expuestas a triyodotironina (T3) o a un análogo de esta, a un activador de la proteína cinasa C durante el cultivo, a nicotinamida, al factor de crecimiento transformante beta 1 o al factor de crecimiento similar a la

insulina-1, ya sea mientras crecen en adhesión o en suspensión.

[0045] Otro marcador de la célula endocrina pancreática, además de la célula beta secretora de insulina y la célula alfa secretora de glucagón, es el factor de transcripción ISL1 (Sharon 2019b). *In vivo*, las células que expresan ISL1 y que expresan insulina también expresan Nkx6.1. La presente divulgación describe una nueva población celular derivada de células madre que expresan ISL1 e insulina, pero no Nkx6.1. Otras células expresan ISL1 y glucagón. Se divulga un método que genera una población altamente pura de células positivas para ISL1 y negativas para Nkx6.1 que expresan insulina o glucagón, y una presencia mínima o nula de células no pancreáticas. Esta población se diferencia de las células madre mediante un protocolo de diferenciación que emplea una cantidad mínima de factores de transcripción, hormonas y análogos químicos. Evitar el uso de fórmulas complejas de factores de crecimiento mejora la reproducibilidad y la coherencia. Esta población es muy potente a la hora de crear injertos pancreáticos estables y funcionales tras su implante en un hospedador adecuado. Esta población celular puede activar la expresión de Nkx6.1 tras la implantación en el hospedador.

I. Definiciones

[0046] Como se usa en la presente, la expresión "alrededor de" es conocida por las personas del oficio de nivel medio y variará, en cierta medida, según el contexto en donde se use. Si existen usos del término que no les son claros a las personas de nivel medio en la técnica dado el contexto en el que se utilizan, "alrededor de" significará hasta más o menos 10 % del término particular.

[0047] Como se utiliza aquí, "sustancialmente libre de" se refiere a la composición a la que no se ha añadido el agente, pero no excluye que existan trazas del agente.

[0048] En el presente documento, "célula de los islotes" hace referencia a las células endocrinas pancreáticas diferenciadas terminalmente y a cualquier célula precursora comprometida para formar progenie clasificada normalmente como endocrina pancreática. La célula islote presenta algunas de las características morfológicas y marcadores fenotípicos (ejemplificados a continuación) típicos de un linaje de células islote. Las células alfa maduras secretan glucagón, las células beta maduras secretan insulina, las células delta maduras secretan somatostatina, las células PP secretan polipéptido pancreático.

[0049] Tal como se utiliza aquí, las células "endocrinas sintéticas de reemplazo" o "SRE" son células que son definitivamente identificables como células endocrinas pancreáticas basándose en la expresión específica de ISL1, Pdx1 o MAFA, y de las hormonas pancreáticas insulina o glucagón. Estas células, al implantarse en un sujeto humano, pueden madurar o alterar su perfil de expresión génica para asemejarse más a las células endocrinas maduras del páncreas de mamíferos. A efectos de la presente divulgación, las células "SRE" diferenciadas según el protocolo divulgado expresan una combinación de factores de transcripción pancreáticos de Pdx1 e ISL1 o MAFA e ISL1, pero no expresan el factor de transcripción Nkx6.1. Tras la implantación en un hospedador adecuado, la célula SRE puede acabar expresando Nkx6.1.

[0050] Tal como se utilizan en el presente documento, "progenitores pancreáticos", "precursores pancreáticos" o "células madre pancreáticas" son células pancreáticas que pueden madurar o cambiar su perfil de expresión génica pancreática tras el

implante a un hospedador adecuado. Las células maduras pueden adoptar un patrón de expresión génica que se asemeje más a los islotes pancreáticos nativos.

[0051] Tal como se utiliza aquí, el término "células madre" denota células indiferenciadas que son capaces de diferenciarse en células especializadas (por ejemplo, células pancreáticas productoras de insulina). A efectos de la presente solicitud, el término "célula madre" puede incluir células pluripotentes derivadas de tejido preembrionario, embrionario o fetal tras la fecundación capaces de producir progenitores de las tres capas germinales (es decir, endodermo, mesodermo y ectodermo); células pluripotentes inducidas (es decir, células que han sido transducidas con genes de reprogramación) que son capaces de producir progenitores de las tres capas germinales; y células multipotentes, como células reprogramadas (es decir, células que han sido transducidas con genes de reprogramación) que pueden diferenciarse solo en una o dos capas germinales o que se diferencian preferentemente en una capa germinal determinada (por ejemplo, células reprogramadas que se diferencian preferentemente en tipos celulares de ectodermo o endodermo). En los documentos PCT/US2013/047243 (publicado como WO2014/004341) y PCT/US2019/017281 (publicado como WO2019/157329) se dan a conocer ejemplos de células multipotentes adecuadas. El término incluye tanto líneas establecidas de células madre de diversos tipos (incluyendo células obtenidas de tejido primario) que son pluripotentes o multipotentes de la manera descrita.

[0052] Tal y como se utilizan en el presente documento, los términos "células pluripotentes inducidas" o "células madre pluripotentes inducidas" ("células iPS") denotan células pluripotentes derivadas de la reprogramación de células somáticas adultas, células reproductoras, células multipotentes u otros tipos de células, siguiendo métodos estándar aceptados en el arte (por ejemplo, transferencia nuclear de células somáticas, transducción con genes de reprogramación, inducción química (véase De Los Angeles et ál., *Cell Research*, 23: 1337–1338 (2013); Federation et ál., *Trends in Cell Biology*, 24: 179–187 (2013)), etc.). El término incluye tanto células madre pluripotentes inducidas establecidas, como células obtenidas de tejido primario que son pluripotentes de la manera descrita.

[0053] Tal como se utilizan aquí, los términos "células reprogramadas no pluripotentes" o "células reprogramadas multipotentes" denotan células derivadas por reprogramación de células somáticas adultas, células reproductivas, células pluripotentes u otros tipos celulares, con métodos de reprogramación conocidos, como la transducción/expresión de genes de reprogramación y otros métodos comentados anteriormente. A diferencia de las células pluripotentes inducidas, las "células reprogramadas no pluripotentes" o "células reprogramadas multipotentes" pueden diferenciarse solo en una o dos capas germinales o poseer una preferencia para diferenciarse en una determinada capa germinal (por ejemplo, células reprogramadas que se diferencian preferentemente en tipos celulares de ectodermo o endodermo, pero que no pueden diferenciarse eficientemente en células de mesodermo). El término incluye tanto células multipotentes inducidas establecidas (por ejemplo, SR1423), como células obtenidas de tejido primario que se reprograman para ser multipotentes de la manera descrita. En los documentos PCT/US2013/047243 (publicado como WO2014/004341) y PCT/US2019/017281 (publicado como WO2019/157329) se dan a conocer ejemplos de células

reprogramadas multipotentes adecuadas.

[0054] Tal como se utiliza aquí, el término "genes de reprogramación" denota genes y factores de transcripción conocidos que se utilizan comúnmente en la técnica para inducir la pluripotencia o multipotencia en células diferenciadas. Los genes de reprogramación ejemplares incluyen, entre otros, Oct4 (es decir, Oct-3/4 o Pou5f1); factores de transcripción de la familia Sox, como Sox1, Sox2, Sox3, Sox15 y Sox18; factores de transcripción de la familia Klf, como Klf4, Klf1, Klf2 y Klf5; factores de transcripción de la familia Myc, como C-myc, N-myc y L-myc; Nanog; LIN28; y Glis1. Los expertos en la materia comprenderán que los genes de reprogramación divulgados, así como otros genes de reprogramación conocidos en la materia, pueden combinarse de diversas maneras para inducir la pluripotencia o la multipotencia. Por ejemplo, Yu et ál., *Science*, 318(5858): 1917-20 (2007) demostraron que se puede utilizar una combinación de LIN28, Oct4, Sox2 y Nanog para generar células iPS, mientras que Maekawa et ál., *Nature*, 474(7350): 225-29 (2011) demostraron que se puede utilizar una combinación de Glis1, Oct-3/4, Sox2 y Klf4 para generar células iPS.

[0055] Tal como se utiliza aquí, los términos "diferenciar" o "diferenciación" denotan un cambio en el tipo de célula de una célula menos específica a una célula más específica. Por ejemplo, cualquier célula que haya salido del estado pluripotente y progresado por una vía de desarrollo hacia una línea germinal definida ha sufrido una diferenciación. El término "diferenciado" es un término relativo, por lo que las células diferenciadas pueden encontrarse en diferentes etapas en su desarrollo hacia un tipo de célula funcional madura. Por lo tanto, puede decirse que una célula que se encuentra en una fase posterior de la progresión del desarrollo está más diferenciada que una célula que se encuentra en una fase anterior.

[0056] Tal como se utiliza aquí, "factores inductores de diferenciación", tal y como se utiliza en esta divulgación, se refiere a uno de una colección de compuestos que se utilizan en los sistemas de cultivo de esta invención para inducir la diferenciación de células madre a células diferenciadas del linaje de los islotes (incluyendo células precursoras, células progenitoras, células con la capacidad de cambiar su perfil de expresión génica y células diferenciadas terminalmente). No se pretende limitar el modo de acción del compuesto. Por ejemplo, el agente puede ayudar al proceso de diferenciación induciendo o ayudando a un cambio de fenotipo, promoviendo el crecimiento de células con un fenotipo particular o retardando el crecimiento de otras. También puede actuar como inhibidor de otros factores que pueden estar en el medio o ser sintetizados por la población celular que, de otro modo, dirigirían la diferenciación por la vía hacia un tipo celular no deseado. Dentro de la categoría de "factores inductores de la diferenciación", una persona experta en la materia comprenderá que se sabe que ciertos factores inducen determinadas etapas del proceso de diferenciación. Por ejemplo, una persona con conocimientos ordinarios en la materia entendería que un "factor inductor de endodermo" puede incluir, pero sin limitarse a ello, Activina-A. Del mismo modo, un "factor inductor del endodermo" puede incluir, entre otros, ácido retinoico y/o un antagonista de Hedgehog y/o un inhibidor de BMP, ya sea solo o en combinación.

[0057] Tal como se utiliza en el presente documento, "a largo plazo", cuando se utiliza en relación con la supervivencia y el funcionamiento de células terapéuticas extrañas

utilizadas en una terapia o implante celular, significa un periodo de al menos seis meses o más.

[0058] En el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de células trasplantadas a un sujeto que proporciona el efecto farmacológico específico para el que se trasplantan las células, es decir, para producir insulina y reducir la glucosa en sangre. Cabe destacar que una cantidad terapéuticamente eficaz de células no siempre provocará una regulación normal de la glucosa en sangre en un sujeto diabético dado, aunque los expertos en la materia consideren que dicha concentración es una cantidad terapéuticamente eficaz. Para mayor comodidad, a continuación, se indican cantidades ejemplares.

[0059] Las personas del oficio de nivel medio pueden ajustar lo que se considera una cantidad terapéuticamente eficaz de acuerdo con las prácticas estándar según sea necesario para tratar a un sujeto específico. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar en función del lugar de implantación, la edad y el peso del sujeto, y/o el estado del sujeto, incluyendo la gravedad de la enfermedad del sujeto, la dieta del sujeto y/o la salud general del sujeto.

[0060] Los términos "tratamiento" o "tratar", tal como se utilizan aquí en referencia a la diabetes, se refieren a uno o más de los siguientes aspectos reducir, mejorar o eliminar uno o más síntomas o comorbilidades de la diabetes, como hiperglucemia e hipoglucemia, cardiopatía, enfermedad renal, enfermedad hepática, retinopatía, neuropatía, úlceras que no cicatrizan, enfermedad periodontal; reducir la dependencia del sujeto a la insulina exógena para regular la glucosa en sangre, regular la glucosa en sangre del sujeto sin el uso de insulina exógena; reducir el porcentaje de hemoglobina glicosilada del sujeto, o niveles de HbA1C; y/o reducir la dependencia del sujeto a otras intervenciones farmacéuticas, como sensibilizadores a la insulina, potenciadores de la excreción de glucosa y otras modalidades de tratamiento conocidas en la técnica.

[0061] Los términos "individuo", "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en la presente y se refieren a cualquier sujeto mamífero individual, por ejemplo, bovino, canino, felino, equino o ser humano. Preferiblemente, el "individuo", "sujeto" o "paciente" es un ser humano.

II. Identificación de células para terapias celulares

[0062] Una limitación de la terapia convencional basada en células madre es que las distintas células madre poseen diferentes propensiones a diferenciarse en tipos celulares maduros. Por ejemplo, se ha informado que las firmas epigenéticas de la población celular de partida pueden persistir en las células reprogramadas, un fenómeno denominado "memoria epigenética" Como resultado, las células iPS y otras células reprogramadas pueden diferenciarse preferentemente en células que pertenecen a la misma capa germinal de la que derivaron. En consecuencia, en algunas realizaciones, las células madre utilizadas en los métodos divulgados para generar células productoras de insulina pueden derivarse de células endodérmicas maduras que han sido reprogramadas en células madre pluripotentes o multipotentes. En algunas realizaciones, las células madre utilizadas en los métodos divulgados pueden derivarse de células pancreáticas humanas que han sido reprogramadas. Dichas células pancreáticas donantes pueden proceder del sujeto que está recibiendo tratamiento para la diabetes (es decir, un donante autólogo) o de

una persona que no está recibiendo tratamiento para la diabetes (es decir, un donante alogénico). En algunas realizaciones, las células madre utilizadas en los métodos descritos pueden ser células primarias reprogramadas de los islotes de Langerhans de páncreas de donantes adultos sanos.

[0063] Las células primarias cultivadas en cultivo celular pueden volverse homogéneas y perder rasgos funcionales maduros con el tiempo, posiblemente como resultado de la adaptación a condiciones de cultivo artificiales o de la deriva genética. En consecuencia, cuando se utilizan células primarias como población celular de partida, puede ser ventajoso reprogramar las células primarias en un plazo de, por ejemplo, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días o 1 día a partir de la recolección o aislamiento de las células. Por ejemplo, las células primarias aisladas pueden transducirse con genes de reprogramación en los 5 días siguientes a la recolección de las células.

[0064] Los expertos en la materia comprenderán que cuando se reprograman células primarias utilizando genes de reprogramación, pueden utilizarse numerosas combinaciones de genes de reprogramación. En algunas realizaciones, una célula primaria puede reprogramarse mediante transducción con Oct4, Sox2, Klf4 y L-Myc. En algunas realizaciones, una célula primaria puede reprogramarse mediante transducción con Oct4, Sox2, Klf4 y C-Myc. En algunas realizaciones, una célula primaria puede reprogramarse mediante transducción con LIN28, Oct4, Sox2 y Nanog. En algunas realizaciones, una célula primaria puede reprogramarse mediante transducción con Glis1, Oct-3/4, Sox2 y Klf4. Estas combinaciones ejemplares no pretenden ser limitativas, ya que otras combinaciones de genes de reprogramación son conocidas en la técnica y pueden utilizarse para los fines de los métodos divulgados.

[0065] En algunas realizaciones, las células utilizadas en los métodos de diferenciación y tratamiento divulgados pueden poseer una preferencia por diferenciarse hacia una línea germinal sobre otra. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una célula primaria o célula madre (por ejemplo, SR1423) puede diferenciarse eficientemente en linajes de ectodermo o endodermo, pero ser sustancialmente incapaz de diferenciarse en un linaje mesodérmico. Esto podría determinarse, por ejemplo, empleando protocolos o kits de diferenciación para empujar una célula madre hacia una línea germinal específica, pero sin detectar un marcador de línea germinal (por ejemplo, OTX2 para el ectodermo, Sox17 para el endodermo o Brachyury para el mesodermo).

[0066] En algunas realizaciones, una célula madre o una célula primaria que se diferencia preferentemente a lo largo de un linaje endodérmico puede identificarse mediante ciertos marcadores moleculares. Por ejemplo, una célula madre o una célula primaria que se diferencia preferentemente a lo largo de un linaje endodérmico puede expresar marcadores típicos de pluripotencia y tener un cariotipo normal, pero incluso si se expresan marcadores típicos de pluripotencia, las células madre pueden ser solo multipotentes y, por tanto, no ajustarse a los criterios aceptados de pluripotencia.

[0067] Una célula madre o primaria que se diferencie preferentemente a lo largo de un linaje endodérmico también puede poseer un perfil de expresión génica único. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una célula madre o una célula primaria que se

diferencia preferentemente a lo largo de un linaje endodérmico puede regular a la baja la expresión de BHMT2, Cox7A1 y HSPB2 en relación con un nivel de control o una célula de control. En algunas realizaciones, una célula madre o una célula primaria que se diferencia preferentemente a lo largo de un linaje endodérmico puede regular al alza la expresión de NAP1L1 en relación con un nivel de control o una célula de control. Además, las células que se diferencian preferentemente a lo largo de un linaje endodérmico pueden regular al alza la expresión de GLIS2, CCDC58 y MTX3 y a la baja la expresión de C7orf29 en relación con una célula de control. Los niveles de expresión pueden determinarse por cualquier medio conocido en la técnica, como qRT-PCR o análisis de microarrays, y las células de control utilizadas como estándar de comparación pueden incluir células pluripotentes que no muestren diferenciación preferente hacia el linaje endodérmico o una incapacidad sustancial para diferenciarse hacia el linaje mesodérmico, como las líneas de células madre embrionarias estándar que se encuentran en el registro de NIH. Aunque no nos ceñimos a la teoría, se cree que al menos BHMT2 y NAP1L1 desempeñan funciones en la modificación del ADN y pueden contribuir a la memoria epigenética.

[0068] En algunas realizaciones, la expresión diferencial de BHMT2, Cox7A1, HSPB2, y/o NAP1L1 puede ser de al menos alrededor de 1 log, al menos alrededor de 2 log o al menos alrededor de 3 log mayor (para BHMT2, Cox7A1, y HSPB2) o menor (para NAP1L1) en relación con la célula pluripotente que no muestra diferenciación preferencial hacia el linaje endodérmico y no es sustancialmente incapaz de diferenciarse hacia el linaje mesodérmico, o una célula madre que cumple los criterios estándar de pluripotencia.

[0069] La identificación de una célula madre con el perfil de expresión divulgado indica una preferencia por diferenciarse en un linaje endodérmico y, posteriormente, en una célula productora de insulina. La comprobación directa de la preferencia de diferenciación en capas germinales específicas aumenta la eficacia de la generación de líneas celulares inclinadas a un destino concreto y, por tanto, adecuadas para la terapia celular.

III. Protocolo de generación de células SRE

[0070] Las células endocrinas maduras de los islotes humanos nativos expresan los factores de transcripción Pdx1, ISL1 y Nkx6.1. En general, se cree que la expresión de Nkx6.1 se limita a las células beta secretoras de insulina. Por ejemplo, en los roedores, cada uno de estos tres factores de transcripción es esencial para el desarrollo endocrino del páncreas. Los islotes maduros aislados que contienen células beta Pdx1+/Nkx6.1+/Insulina+ son capaces de regular la glucemia tras el trasplante a sujetos diabéticos insulino dependientes (Marfil-Garza et ál., *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 10(7): 519-532 (2022)). La expresión de ISL1 y MAFA también se expresa en los progenitores endocrinos tempranos y de nuevo en los islotes en maduración, lo que indica funciones tanto en la especificación de los progenitores endocrinos como en la maduración o el mantenimiento de las células endocrinas funcionales. La expresión de MAFA se limita a las células de roedores que expresan insulina, y los ratones deficientes en MAFA presentan una sensibilidad a la glucosa alterada y diabetes. La sobreexpresión de MAFA, en combinación con Pdx1 y Ngn3, puede impulsar la reprogramación del fenotipo de célula beta en células pluripotentes humanas y transdiferenciar el páncreas exocrino cuando se combina

con Pax4. Por lo tanto, es posible que MAFA e ISL1 en ausencia de Nkx6.1 en poblaciones pancreáticas derivadas de células madre reflejen el destino de las células beta y tengan una alta potencia *in vivo* para la terapia de sustitución de islotes. [0071] Las células madre humanas pluripotentes son capaces de madurar en células endocrinas pancreáticas en el laboratorio (Silva et ál., *Stem cell Research and Therapy*, 13:308 (2022)). Para verificar su autenticidad, la expresión de genes y proteínas de las células endocrinas pancreáticas humanas derivadas de células madre pluripotentes se compara con la de células pancreáticas maduras y en desarrollo de roedores y humanos (Alvarez Dominguez et ál., *Cell*, 185(2): 235-249 (2022); Silva et ál., *Stem cell Research and Therapy*, 13:308 (2022); Yoshihara, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10 (2022)). El estado de la técnica describe el principal tipo de célula antidiabética derivada de células madre como la célula beta secretoras de insulina que progresa a lo largo de una línea de tiempo de maduración en la que las células pancreáticas expresan Pdx1 y Nkx6.1, seguido de la ganancia de expresión de insulina y péptido C (un subproducto de la síntesis de insulina) (Pagliuca FW, et ál. *Cell*, 154(2): 428-439 (2014); Velazco-Cruz et ál., *Stem Cell Reports*, 12(2): 351-365 (2019); Hoglebe 2020, Nostro 2015). Este orden de expresión es el mismo que durante el desarrollo nativo de los islotes en roedores y humanos, aunque la cronología de estos acontecimientos, la organización espacial de las células en desarrollo y sus entornos celulares son muy diferentes a los islotes derivados de células madre cultivados en el laboratorio.

[0072] Para imitar lo más fielmente posible el islote nativo, la bibliografía actual sobre el estado de la técnica indica que el islote ideal derivado de células madre pluripotentes contiene el máximo número de células que expresan el factor de transcripción definitivo de las células beta Nkx6.1 y el subproducto de la insulina, el péptido C. Además, el estado de la técnica indica que las poblaciones de células pancreáticas derivadas de células madre pluripotentes que expresan Pdx1 ganan expresión de ISL1 *después de* ganar expresión de Nkx6.1 (Veres et ál., *Nature* 569: 368-373 (2019)). Así pues, la bibliografía más reciente sugiere que las células pancreáticas que pueden implantarse para tratar la diabetes deben expresar Nkx6.1 y Pdx1, y esta misma bibliografía no dice nada con respecto a la expresión de ISL1 en islotes o precursores pancreáticos derivados de células madre.

[0073] Se ha descubierto que los islotes derivados de células madre pluripotentes que expresan Nkx6.1 y péptido C producen y secretan insulina, pero a niveles muy inferiores a los de los islotes pancreáticos maduros nativos (Fantuzzi et ál., *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10 (2022); Veres et ál., *Nature* 569: 368-373 (2019)). Así pues, se creía que estas poblaciones podrían seguir madurando tras la implantación en un sujeto, lo que conllevaría una mejora de la potencia con el tiempo (Augsornworawat et ál., *Cell Reports*, 32(8): 108850 (2020)). Sin embargo, datos no clínicos y clínicos demuestran que los islotes derivados de células madre pluripotentes carecen de potencia en comparación con los islotes nativos.

[0074] Para los protocolos divulgados, las fuentes celulares pueden incluir, entre otras, células madre embrionarias humanas, células madre pluripotentes inducidas, células reprogramadas no pluripotentes o multipotentes (por ejemplo, SR1423) y otras fuentes celulares convencionales conocidas en la técnica.

[0075] Los métodos divulgados para generar células SRE aisladas productoras de

insulina a partir de células madre comprenden un proceso de varios pasos en el que primero se inicia la diferenciación del endodermo, seguida de la diferenciación hacia el linaje celular endocrino para generar células secretoras de hormonas. A continuación, las células secretoras de hormonas maduran o adoptan características de células endocrinas funcionales tras el trasplante. La diferenciación del endodermo se inicia normalmente poniendo en contacto las células madre con un agente inductor del endodermo, como Activina-A. Cuando se ha alcanzado un número suficiente de células de endodermo, las células se ponen en contacto con un agente inductor de endodermo, como el ácido retinoico y/o un antagonista de hedgehog y/o un inhibidor de BMP, para diferenciar aún más las células en las células SRE. Los antagonistas de Hedgehog incluyen SANT1 y ciclopamina, entre otros. Los inhibidores de la señalización BMP incluyen, entre otros, el LDN193189. Mediante la exposición a otros factores de diferenciación y/o el trasplante a un hospedador, que se explica con más detalle a continuación, las células SRE pueden diferenciarse aún más en células secretoras de hormonas que pueden utilizarse para terapias celulares para tratar la diabetes.

[0076] En algunas realizaciones, las células madre se cultivan en un primer medio que comprende un agente inductor del endodermo. En algunas realizaciones, el agente inductor del endodermo comprende al menos Activina-A. En algunas realizaciones, el agente inductor del endodermo comprende Activina-A y Wortmannin. En algunas realizaciones, los métodos divulgados no emplean o incluyen el uso de un activador de la señalización Wnt, como CHIR-99021 (una pequeña molécula activadora de la señalización Wnt) y/o el factor de crecimiento Wnt3A. En algunas realizaciones, los métodos divulgados emplean o incluyen el uso de un activador de la señalización Wnt, como CHIR-99021, y/o el factor de crecimiento Wnt3A. La exposición de las células madre a un agente inductor del endodermo provoca la diferenciación de las células en células del endodermo.

[0077] En contraste con los métodos convencionales, en algunas realizaciones, el método de diferenciación divulgado expone las células a largo plazo al ácido retinoico (AR). En contraste con los métodos convencionales, en algunas realizaciones, el protocolo de diferenciación divulgado expone las células a largo plazo a un antagonista de Hedgehog como la ciclopamina o SANT1. En algunas realizaciones, el protocolo de diferenciación divulgado expone las células a un inhibidor de BMP como LDN193189. En contraste con los métodos convencionales, en algunas realizaciones, el protocolo de diferenciación divulgado expone las células a largo plazo a un inhibidor de BMP como LDN193189.

[0078] En contraste con los métodos convencionales, en algunas realizaciones, los métodos divulgados no emplean o incluyen el uso de triyodotironina (T3). En algunas realizaciones, los métodos divulgados emplean o incluyen el uso de T3. En algunas realizaciones, los métodos divulgados no emplean un activador de la proteína cinasa C o un análogo de este. En algunas realizaciones, los métodos divulgados no emplean nicotinamida, una forma de vitamina B3. En algunas realizaciones, los métodos divulgados emplean nicotinamida. En algunas realizaciones, los métodos divulgados no emplean la proteína del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFbeta1). En algunas realizaciones, los métodos divulgados emplean TGFbeta1. En algunas realizaciones, los métodos divulgados no emplean el factor de

crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1). En algunas realizaciones, los métodos divulgados emplean IGF-1.

[0079] A diferencia de los métodos convencionales, en algunas realizaciones, el protocolo de diferenciación divulgado no emplea la creación de cultivos tridimensionales en suspensión mediante la disociación de los cultivos de adhesión y la reagregación de las células en suspensión.

[0080] En algunas realizaciones, las células madre se diferencian en células de endodermo en presencia de Activina A a una concentración de alrededor de 1 a alrededor de 200 ng/mL, de alrededor de 25 a alrededor de 175 ng/mL, de alrededor de 50 a alrededor de 150 ng/mL, o de alrededor de 75 a alrededor de 125 ng/mL. Por ejemplo, la concentración de Activina A puede ser de alrededor de 1 ng/mL, alrededor de 10 ng/mL, alrededor de 20 ng/mL, alrededor de 40 ng/mL, alrededor de 50 ng/mL, alrededor de 60 ng/mL, alrededor de 70 ng/mL, alrededor de 80 ng/mL, alrededor de 90 ng/mL, alrededor de 100 ng/mL, alrededor de 110 ng/mL, alrededor de 120 ng/mL, alrededor de 130 ng/mL, alrededor de 140 ng/mL, alrededor de 150 ng/mL, alrededor de 160 ng/mL, alrededor de 170 ng/mL, alrededor de 180 ng/mL, alrededor de 190 ng/mL o alrededor de 200 ng/mL.

[0081] En algunas realizaciones, las células madre se diferencian en células del endodermo en presencia de Wortmannin a una concentración de alrededor de 0.1 a alrededor de 2.0 μ M, de alrededor de 0.25 a alrededor de 1.75 μ M, de alrededor de 0.5 a alrededor de 1.5 μ M, o de alrededor de 0.75 a alrededor de 1.25 μ M. Por ejemplo, la concentración de Wortmannin puede ser de alrededor de 0.1 μ M, alrededor de 0.5 μ M, alrededor de 1.0 μ M, alrededor de 1.5 μ M o alrededor de 2.0 μ M.

[0082] En algunas realizaciones, el medio utilizado para diferenciar células del endodermo en células SRE puede comprender KGF, pero en alguna realización el medio utilizado para diferenciar células de endodermo en células SRE puede comprender ácido retinoico, un antagonista de Hedgehog (por ejemplo, ciclopamina y/o SANT1), y un inhibidor de la señalización BMP (por ejemplo, LDN193189) y combinaciones de estos sin KGF.

[0083] En algunas realizaciones, el paso de diferenciación de células del endodermo en células SRE puede comprender el cultivo de las células durante 1-5 días en un medio que comprende ácido retinoico, un antagonista de Hedgehog (por ejemplo, ciclopamina o SANT1) y un inhibidor de la señalización BMP (por ejemplo, LDN193189), con o sin KGF. Por ejemplo, las células del endodermo pueden cultivarse en presencia de estos agentes inductores de endocrinas durante 1, 2, 3, 4 o 5 días, diferenciando así las células del endodermo en células SRE.

[0084] En algunas realizaciones, las células se diferencian en presencia de ácido retinoico durante al menos veinte (20) días a una concentración de alrededor de 0.05 μ M, alrededor de 0.1 μ M, alrededor de 0.5 μ M, alrededor de 1.0 μ M, alrededor de 1.5 μ M o alrededor de 2.0 μ M.

[0085] En algunas realizaciones, las células se diferencian en presencia del antagonista de Hedgehog ciclopamina durante al menos veinte (20) días a una concentración de alrededor de 0.05 μ M, alrededor de 0.1 μ M, alrededor de 0 μ M o alrededor de 0.5 μ M.

[0086] En algunas realizaciones, las células se diferencian en presencia de un

análogo químico de la ciclopamina SANT-1 ((4-bencil-piperazin-1-il)-(3,5-dimetil-1-fenil-1H-pirazol-4-ilmetileno)-amina) a una concentración de alrededor de 0.05 μM , alrededor de 0.1 μM , alrededor de 0.25 μM o alrededor de 0.5 μM .

[0087] En algunas realizaciones, las células se diferencian en presencia de LDN193189 a una concentración de alrededor de 0.05 μM , alrededor de 0.01 μM , alrededor de 0.1 μM o alrededor de 0.5 μM .

[0088] En algunas realizaciones, las células del endodermo se diferencian en células SRE en presencia de ácido retinoico a una concentración de alrededor de 1.0 a alrededor de 10.0 μM , de alrededor de 2.0 a alrededor de 8.0 μM o de alrededor de 3.0 a alrededor de 5.0 μM . Por ejemplo, la concentración de ácido retinoico puede ser de alrededor de 1.0 μM , alrededor de 1.5 μM , alrededor de 2.0 μM , alrededor de 2.5 μM , alrededor de 3.0 μM , alrededor de 3.5 μM , alrededor de 4.0 μM , alrededor de 4.5 μM , alrededor de 5.0 μM , alrededor de 5.5 μM , alrededor de 6.0 μM , alrededor de 6.5 μM , alrededor de 7.0 μM , alrededor de 7.5 μM , alrededor de 8.0 μM , alrededor de 8.5 μM , alrededor de 9.0 μM , alrededor de 9.5 μM o alrededor de 10.0 μM .

[0089] En algunas realizaciones, las células del endodermo se diferencian en células SRE en presencia de ciclopamina a una concentración de alrededor de 0.1 a alrededor de 1.0 μM o de alrededor de 0.25 a alrededor de 0.75 μM . Por ejemplo, la concentración de ciclopamina puede ser de alrededor de 0.1 μM , alrededor de 0.2 μM , alrededor de 0.25 μM , alrededor de 0.3 μM , alrededor de 0.4 μM , alrededor de 0.45 μM , alrededor de 0.5 μM , alrededor de 0.55 μM , alrededor de 0.6 μM , alrededor de 0.7 μM , alrededor de 0.75 μM , alrededor de 0.8 μM , alrededor de 0.9 μM o alrededor de 1.0 μM .

[0090] En algunas realizaciones, las células del endodermo se diferencian en células SRE en presencia de LDN193189 a una concentración de alrededor de 0.1 a alrededor de 1.0 μM o de alrededor de 0.25 a alrededor de 0.75 μM . Por ejemplo, la concentración de ciclopamina puede ser de alrededor de 0.1 μM , alrededor de 0.2 μM , alrededor de 0.25 μM , alrededor de 0.3 μM , alrededor de 0.4 μM , alrededor de 0.45 μM , alrededor de 0.5 μM , alrededor de 0.55 μM , alrededor de 0.6 μM , alrededor de 0.7 μM , alrededor de 0.75 μM , alrededor de 0.8 μM , alrededor de 0.9 μM o alrededor de 1.0 μM .

[0091] En algunas realizaciones, las células de endodermo se diferencian en células SRE en presencia de KGF a una concentración de 1 a alrededor de 100 ng/mL, de alrededor de 25 a alrededor de 75 ng/mL o de alrededor de 60 a alrededor de 70 ng/mL. Por ejemplo, la concentración de KGF puede ser de alrededor de 1 ng/mL, alrededor de 10 ng/mL, alrededor de 20 ng/mL, alrededor de 40 ng/mL, alrededor de 50 ng/mL, alrededor de 60 ng/mL, alrededor de 70 ng/mL, alrededor de 80 ng/mL, alrededor de 90 ng/mL o alrededor de 100 ng/mL. En algunas realizaciones, las células no se exponen a KGF hasta después de que las células se hayan diferenciado de células del endodermo en células endocrinas.

[0092] En algunas realizaciones, las células SRE pueden seguir cultivándose en presencia de factores de crecimiento y/u hormonas adicionales. En algunas realizaciones, las células SRE pueden cultivarse en un medio que comprenda Noggin, EGF, inhibidor de γ -secretasa XXI (GSXXi), Alk5i II, factor de crecimiento de fibroblastos 7 (FGF7) y/o combinaciones de estos. En algunas realizaciones, las células SRE pueden cultivarse en un medio que comprenda Noggin, EGF, inhibidor

de γ -secretasa XXI, Alk5i II, FGF7 y combinaciones de estos y que comprenda además ácido retinoico y/o ciclopamina (por ejemplo, ciclopamina KAAD). Por ejemplo, las células progenitoras pancreáticas pueden cultivarse en presencia de estos agentes durante alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4 o alrededor de 5 días, diferenciando así las células progenitoras pancreáticas en un linaje pancreático.

[0093] En algunas realizaciones, las células del endodermo se diferencian en células SRE en presencia de Noggin a una concentración de alrededor de 1 a alrededor de 100 ng/mL, de alrededor de 25 a alrededor de 75 ng/mL, o de alrededor de 60 a alrededor de 70 ng/mL. Por ejemplo, la concentración de Noggin puede ser de alrededor de 1 ng/mL, alrededor de 5 ng/mL, alrededor de 10 ng/mL, alrededor de 15 ng/mL, alrededor de 20 ng/mL, alrededor de 25 ng/mL, alrededor de 30 ng/mL, alrededor de 35 ng/mL, alrededor de 40 ng/mL, alrededor de 45 ng/mL, alrededor de 50 ng/mL, alrededor de 55 ng/mL, alrededor de 60 ng/mL, alrededor de 65 ng/mL, alrededor de 70 ng/mL, alrededor de 75 ng/mL, alrededor de 80 ng/mL, alrededor de 85 ng/mL, alrededor de 90 ng/mL, alrededor de 95 ng/mL o alrededor de 100 ng/mL. En algunas realizaciones, las células SRE se cultivan además en presencia de EGF a una concentración de alrededor de 1 a alrededor de 100 ng/mL, de alrededor de 25 a alrededor de 75 ng/mL o de alrededor de 60 a alrededor de 70 ng/mL. Por ejemplo, la concentración de EGF puede ser de alrededor de 1 ng/mL, alrededor de 5 ng/mL, alrededor de 10 ng/mL, alrededor de 15 ng/mL, alrededor de 20 ng/mL, alrededor de 25 ng/mL, alrededor de 30 ng/mL, alrededor de 35 ng/mL, alrededor de 40 ng/mL, alrededor de 45 ng/mL, alrededor de 50 ng/mL, alrededor de 55 ng/mL, alrededor de 60 ng/mL, alrededor de 65 ng/mL, alrededor de 70 ng/mL, alrededor de 75 ng/mL, alrededor de 80 ng/mL, alrededor de 85 ng/mL, alrededor de 90 ng/mL, alrededor de 95 ng/mL o alrededor de 100 ng/mL.

[0094] En algunas realizaciones, las células SRE se cultivan además en presencia de IGF-I a una concentración de alrededor de 1 a alrededor de 100 ng/mL, de alrededor de 25 a alrededor de 75 ng/mL, o de alrededor de 60 a alrededor de 70 ng/mL. Por ejemplo, la concentración de IGF-I puede ser de alrededor de 1 ng/mL, alrededor de 5 ng/mL, alrededor de 10 ng/mL, alrededor de 15 ng/mL, alrededor de 20 ng/mL, alrededor de 25 ng/mL, alrededor de 30 ng/mL, alrededor de 35 ng/mL, alrededor de 40 ng/mL, alrededor de 45 ng/mL, alrededor de 50 ng/mL, alrededor de 55 ng/mL, alrededor de 60 ng/mL, alrededor de 65 ng/mL, alrededor de 70 ng/mL, alrededor de 75 ng/mL, alrededor de 80 ng/mL, alrededor de 85 ng/mL, alrededor de 90 ng/mL, alrededor de 95 ng/mL o alrededor de 100 ng/mL. En algunas realizaciones, las células SRE se cultivan además en presencia de FGF7 a una concentración de alrededor de 1 a alrededor de 100 ng/mL, de alrededor de 25 a alrededor de 75 ng/mL o de alrededor de 60 a alrededor de 70 ng/mL. Por ejemplo, la concentración de FGF7 puede ser de alrededor de 1 ng/mL, alrededor de 5 ng/mL, alrededor de 10 ng/mL, alrededor de 15 ng/mL, alrededor de 20 ng/mL, alrededor de 25 ng/mL, alrededor de 30 ng/mL, alrededor de 35 ng/mL, alrededor de 40 ng/mL, alrededor de 45 ng/mL, alrededor de 50 ng/mL, alrededor de 55 ng/mL, alrededor de 60 ng/mL, alrededor de 65 ng/mL, alrededor de 70 ng/mL, alrededor de 75 ng/mL, alrededor de 80 ng/mL, alrededor de 85 ng/mL, alrededor de 90 ng/mL, alrededor de 95 ng/mL o alrededor de 100 ng/mL.

[0095] En algunas realizaciones, las células madre o las células del endodermo se diferencian en un sustrato adhesivo compuesto de vitronectina y/o laminina y/o colágeno. En algunas realizaciones, las células madre o células de endodermo que pueden formar espontánea y naturalmente estructuras tridimensionales se recogen y se transfieren a cultivo en suspensión.

[0096] En algunas realizaciones, las células madre utilizadas en el método de diferenciación divulgado se derivan de tejido primario pancreático. En algunas realizaciones, las células madre utilizadas en el método de diferenciación divulgado son células madre embrionarias. En algunas realizaciones, las células madre utilizadas en el método de diferenciación divulgado son células madre pluripotentes inducidas. En algunas realizaciones, las células madre utilizadas en el método de diferenciación divulgado son células reprogramadas no pluripotentes. En algunas realizaciones, las células madre son células madre humanas.

[0097] A efectos de la presente divulgación, puede ser deseable reprogramar células expresando genes de reprogramación en la célula sin incorporar los genes de reprogramación en el genoma de la célula. Los expertos en la materia reconocerán que los genes transducidos pueden expresarse en una célula sin incorporar esos genes al genoma utilizando, por ejemplo, plásmidos de expresión episomal. Los genes de reprogramación pueden expresarse en al menos 1, al menos 2, al menos 3, o al menos 4 o más plásmidos de expresión episomal. Como se discutió anteriormente, múltiples genes de reprogramación son conocidos en el arte y pueden ser utilizados para los fines de los métodos divulgados, pero en algunas realizaciones los genes de reprogramación comprenden Oct4, Sox2, Klf4, y L-Myc.

[0098] En algunas realizaciones, el tiempo total de cultivo necesario para diferenciar las células de una célula madre en una célula productora de insulina puede ser de alrededor de 30 días o menos. Por ejemplo, las células pueden cultivarse durante alrededor de 30 días, alrededor de 29 días, alrededor de 28 días, alrededor de 27 días, alrededor de 26 días, alrededor de 25 días o menos.

[0099] Los expertos en la materia comprenderán también que el tiempo total de cultivo en cada etapa de diferenciación puede variar. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para producir células pancreáticas secretoras de insulina, que comprende (a) cultivar células madre humanas en un primer medio que comprende Activina-A y Wortmannin, y opcionalmente no se exponen a factores de crecimiento de queratinocitos (KGF) antes de la diferenciación en células del endodermo, diferenciando así las células madre humanas en células del endodermo; y (b) cultivar las células del endodermo de (a) en un segundo medio que comprenda ácido retinoico, un antagonista de Hedgehog y un inhibidor de la señalización BMP y que opcionalmente comprenda KGF, diferenciando así las células del endodermo en células endocrinas.

[0100] En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para producir células SRE secretoras de insulina, que comprende (a) cultivar células madre humanas en un primer medio que comprende Activina-A y Wortmannin, y opcionalmente no se exponen a factores de crecimiento de queratinocitos (KGF) antes de la diferenciación en células del endodermo, diferenciando así las células madre humanas en células del endodermo; y (b) cultivar las células del endodermo de (a) en un segundo medio que comprenda ácido retinoico, un antagonista de

Hedgehog y un inhibidor de la señalización BMP y que opcionalmente comprenda KGF, diferenciando así las células del endodermo en células SRE.

[0101] En algunas realizaciones, las células SRE maduran además en un medio en donde las células humanas no están expuestas a T3.

[0102] En algunas realizaciones, las células SRE maduran además en un medio en donde las células humanas no están expuestas a un activador de la proteína cinasa C.

[0103] En algunas realizaciones, las células SRE maduran además en un medio en donde las células humanas no están expuestas a la nicotinamida, una forma de vitamina B3.

[0104] En algunas realizaciones, las células SRE maduran además en un medio en donde las células humanas no están expuestas a la proteína del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFbeta1).

[0105] En algunas realizaciones, las células SRE maduran además en un medio en donde las células humanas no están expuestas al factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1).

[0106] En algunas realizaciones, el tiempo total de cultivo para los pasos (a) y (b) puede ser de 30 días o menos. Por ejemplo, las células pueden cultivarse durante alrededor de 30 días, alrededor de 29 días, alrededor de 28 días, alrededor de 27 días, alrededor de 26 días, alrededor de 25 días o menos. En algunas realizaciones, el paso (a) puede comprender los días 1-3 de cultivo y el paso (b) puede comprender los días 4-27 de cultivo.

[0107] En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para producir células SRE secretoras de insulina, que comprende (a) cultivar células madre humanas en un primer medio que comprende Activina-A y Wortmannin, diferenciando así las células madre humanas en células del endodermo; (b) exponer las células durante los pasos de cultivo subsiguientes a ácido retinoico durante al menos veinte (20) días; (c) exponer las células durante los pasos de cultivo subsiguientes a un antagonista de Hedgehog tal como ciclopamina o un análogo químico durante al menos veinte (20) días; (d) exponer las células durante los pasos de cultivo subsiguientes a un inhibidor de la señalización de BMP como LDN193189 durante no más de seis (6) días; (e) no exponer las células a triyodotironina (T3), (f) no exponer las células a un activador de proteína cinasa C, (g) no exponer las células a IGF, (h) no exponer las células a TGFβ, (i) no exponer las células a nicotinamida, (j) iniciar el cultivo celular sobre un sustrato adhesivo y (k) transferir las células que forman natural y espontáneamente estructuras tridimensionales a cultivo en suspensión.

[0108] En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para producir células SRE secretoras de insulina, que comprende (a) cultivar células madre humanas en un primer medio que comprende Activina-A y Wortmannin o Activina-A, Wortmannin y un activador de la señalización Wnt tal como CHIR-99021, diferenciando así las células madre humanas en células del endodermo; (b) exponer las células durante los pasos de cultivo subsiguientes a ácido retinoico durante al menos dieciséis (16) días; (c) exponer las células durante los pasos de cultivo subsiguientes a un antagonista de Hedgehog como ciclopamina o un análogo químico como SANT1 durante no más de seis (6) días; (d) exponer las células

durante los pasos de cultivo subsiguientes a un inhibidor de la señalización de BMP como LDN193189 durante no más de seis (6) días; (e) no exponer las células a triyodotironina (T3), (f) no exponer las células a un activador de la proteína cinasa C, (g) no exponer las células a IGF, (h) no exponer las células a TGFβ, (i) no exponer las células a nicotinamida, (j) iniciar el cultivo celular sobre un sustrato adhesivo y (k) transferir células que forman natural y espontáneamente estructuras tridimensionales a cultivo en suspensión.

[0109] En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para producir células SRE secretoras de insulina, que comprende (a) cultivar células madre humanas en un primer medio que comprende Activina-A y Wortmannin o Activina-A, Wortmannin diferenciando así las células madre humanas en células del endodermo; (b) exponer las células durante los pasos de cultivo subsiguientes a ácido retinoico durante al menos veinte (20) días; (c) exponer las células durante los pasos de cultivo subsiguientes a un antagonista de Hedgehog como ciclopamina o un análogo químico como SANT1 durante no más de doce (12) días; (d) exponer las células durante los pasos de cultivo subsiguientes a un inhibidor de la señalización BMP como LDN193189 durante no más de seis (6) días; (e) exponer las células a triyodotironina (T3), un activador de la proteína cinasa C, IGF, TGFβ y nicotinamida, (f) iniciar el cultivo celular en un sustrato adhesivo y (g) transferir las células que forman estructuras tridimensionales de forma natural y espontánea al cultivo en suspensión.

[0110] En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos de producción de células secretoras de insulina de mamífero, que comprenden: cultivo de células madre de mamífero en adhesión, permitiendo así que las células madre de mamífero formen espontáneamente estructuras tridimensionales; y cultivo de las estructuras tridimensionales en suspensión; en donde los pasos de cultivo comprenden al menos una exposición de 20 días a ácido retinoico, un antagonista de Hedgehog y no comprenden exponer las células madre de estructuras tridimensionales a T3, un activador de proteína cinasa C, IGF, TGFβ o Nicotinamida.

[0111] En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para producir células secretoras de insulina, que comprenden: cultivar células madre de mamífero sobre un sustrato adhesivo en un primer medio que comprende Activina-A y Wortmannin, cultivar además las células en al menos un medio adicional que comprende ácido retinoico, un antagonista de Hedgehog y un inhibidor de la señalización BMP; y transferir las células a un cultivo en suspensión cuando las células forman estructuras celulares tridimensionales; en donde las células se exponen al ácido retinoico, un antagonista de Hedgehog, durante alrededor de 20 días.

[0112] En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para producir células secretoras de insulina, que comprenden: cultivar células madre de mamífero sobre un sustrato adhesivo en un primer medio que comprende Activina-A y Wortmannin, cultivar además las células en al menos un medio adicional que comprende ácido retinoico, un antagonista de Hedgehog y un inhibidor de la señalización BMP; y transferir las células a un cultivo en suspensión cuando las células forman estructuras celulares tridimensionales; en donde las células se exponen al ácido retinoico, un antagonista de Hedgehog, durante alrededor de 16

días.

[0113] En algunas realizaciones, puede ser preferible seleccionar una célula madre de partida o una célula progenitora no pluripotente que se diferencie preferentemente o esté predispuesta a la diferenciación hacia el linaje del endodermo. Esto puede permitir una diferenciación más sencilla y lograr un cultivo más puro y maduro de células secretoras de insulina en comparación con los métodos tradicionales.

[0114] A los efectos del método actualmente divulgado, se determinó que la producción de células secretoras de insulina se optimiza cuando las células se cultivan inicialmente en adhesión o el cultivo se inicia sobre un sustrato adhesivo (por ejemplo, una superficie cargada positivamente o una superficie recubierta con vitronectina o Matrigel), permitiendo así que las células formen natural y espontáneamente estructuras tridimensionales (por ejemplo, agregados de células). Estas estructuras tridimensionales formadas por células adheridas pueden entonces cultivarse en suspensión mientras duren los métodos divulgados.

[0115] Así, en algunas realizaciones, la población de células madre de partida se cultiva en adhesión, mientras que las etapas posteriores del cultivo tienen lugar en suspensión. A efectos de la presente divulgación, las frases "cultivado en adhesión" o "cultivado en adhesión" se refieren al cultivo celular estándar en donde las células se adhieren a la superficie de la placa de cultivo. En algunos casos, la placa de cultivo puede estar recubierta con un sustrato para promover la adhesión y en algunos casos la placa puede recibir una carga neta positiva para promover la adhesión. En general, el cultivo de células madre, como las células iPS, requiere un sustrato adhesivo, y en la técnica se conocen varios sustratos que promueven la adhesión. Por ejemplo, la vitronectina o el Matrigel pueden aplicarse a un recipiente de cultivo celular para promover la adhesión, pero el Matrigel se obtiene de células de sarcoma de ratón y, por tanto, no es preferible para uso clínico. En algunas realizaciones, la diferenciación se inicia cultivando la población de células madre de partida con un medio inductor de endodermo y se cultiva en adhesión. La formación de estructuras tridimensionales (por ejemplo, agregados de células diferenciadas/diferenciadas) en el sustrato o placa puede producirse gradualmente a medida que avanza la diferenciación. Para alrededor del día 15, las estructuras 3D empiezan a despegarse de la placa, y estas estructuras 3D pueden transferirse a vasos que no estén recubiertos con un sustrato adhesivo (por ejemplo, vitronectina), de forma que las estructuras 3D se cultiven en una suspensión que flote libremente. Esta transición, del cultivo en adherencia a un cultivo en suspensión, es novedosa y permite una diferenciación más natural hacia una célula secretoras de insulina.

[0116] En algunas realizaciones, las células se exponen preferentemente al ácido retinoico, a un antagonista de Hedgehog y a un inhibidor de la señalización BMP durante al menos alrededor de 16 días, al menos alrededor de 17 días, al menos alrededor de 18 días, al menos alrededor de 19 días, al menos alrededor de 20 días, al menos alrededor de 21 días, al menos alrededor de 22 días, al menos alrededor de 23 días, al menos alrededor de 24 días, al menos alrededor de 25 días, al menos alrededor de 26 días, al menos alrededor de 27 días o al menos alrededor de 28 días. En algunas realizaciones, esta exposición continuada al ácido retinoico, a un antagonista de Hedgehog y a un inhibidor de la señalización BMP puede comenzar después de que la población de células madre de partida haya sido forzada hacia un

linaje endodérmico, por ejemplo, después de que la población de células madre de partida haya sido cultivada en presencia de Activina A y wortmannin durante alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4 o alrededor de 5 días.

[0117] Los expertos en la materia comprenderán que los métodos divulgados pueden aplicarse en general a células madre de mamíferos, como células madre humanas y de primates no humanos. Sin embargo, otras células de mamíferos, como las células madre de cerdo, vaca, caballo, oveja, perro o gato, también pueden diferenciarse según los métodos descritos. Además, los expertos en la materia reconocerán que los métodos divulgados pueden emplear diversas formas de cultivo celular, incluyendo, por ejemplo, cultivos adherentes y/o cultivos en suspensión.

[0118] Los protocolos divulgados para generar células productoras de insulina mejoraron el rendimiento de las células progenitoras de células beta productoras de insulina tanto a partir de células madre embrionarias humanas como de tejido pancreático reprogramado. A diferencia de los métodos convencionales de preparación de células productoras de insulina o precursores pancreáticos, el protocolo aquí descrito produce poblaciones casi homogéneas de células productoras de insulina. Producir una población celular homóloga no solo es importante para la eficacia terapéutica, sino también para la seguridad, ya que las células madre residuales u otras células proliferativas pueden formar teratomas al ser trasplantadas y tener potencial tumorigénico. El alto grado de diferenciación y homogeneidad proporcionado por los métodos de diferenciación divulgados produce menos células con potencial tumorigénico, lo que es esencial en el desarrollo de una terapia celular útil.

[0119] Antes de emplear los métodos de diferenciación divulgados, las células madre que se diferencian preferentemente en células del endodermo pueden identificarse de acuerdo con los métodos divulgados en la Sección II de esta solicitud. Esto puede aumentar la eficacia global del proceso de diferenciación, así como el rendimiento de las células productoras de insulina.

IV. Composiciones basadas en células y métodos de tratamiento

[0120] Las células SRE aquí divulgadas pueden utilizarse para tratar la diabetes en un sujeto que lo necesite. En algunas realizaciones, el sujeto que necesita tratamiento es un mamífero, por ejemplo, un sujeto humano con diabetes insulino dependiente.

[0121] La presente divulgación proporciona métodos para producir una población de células SRE sustancialmente homólogas, que pueden incorporarse a una composición de base celular para tratar la diabetes. En consecuencia, se proporcionan composiciones celulares para el tratamiento de la diabetes, que comprenden una población de células SRE y un vehículo adecuado para su implantación en un sujeto humano que las necesite, en donde al menos el 66% de las células son células pancreáticas beta productoras de insulina. En algunas formas de realización, la composición celular puede comprender al menos alrededor de 67%, al menos alrededor de 68%, al menos alrededor de 69%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 75%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95%, al menos alrededor de 96%, al menos alrededor de 97%, al menos alrededor de 98%, al menos alrededor de 99% o al menos alrededor de 100% de células pancreáticas productoras de insulina que

expresan los factores de transcripción Pdx1 e ISL1, y no expresan el factor de transcripción Nkx6.1. En algunas formas de realización, la composición celular puede comprender al menos alrededor de 67%, al menos alrededor de 68%, al menos alrededor de 69%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 75%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95%, al menos alrededor de 96%, al menos alrededor de 97%, al menos alrededor de 98%, al menos alrededor de 99% o al menos alrededor de 100% de células pancreáticas productoras de insulina que expresan los factores de transcripción MAFA e ISL1, y no expresan el factor de transcripción Nkx6.1.

[0122] Los vehículos adecuados para implantar células terapéuticas son conocidos en la técnica y pueden incluir, entre otros, hidrogeles, andamiajes de polímeros naturales y sintéticos, matriz extracelular (que puede comprender, por ejemplo, colágeno, laminina, fibronectina, etc.), ácido hialurónico, andamiajes biomiméticos, andamiajes de polilactida (PLA), andamiajes de poliglicólido (PGA), andamiajes de copolímero PLA-PGA (PLGA), así como andamiajes de hidroxiapatita y criogeles macroporosos. En algunas realizaciones, el vehículo adecuado para el trasplante puede comprender la encapsulación de las células SRE en macrocápsulas, tales como macrocápsulas que comprenden alginato, sulfato de celulosa, glucomanano o una combinación de estos.

[0123] En algunas realizaciones, al menos el 66% de las células SRE expresan Pdx1. En algunas realizaciones, al menos alrededor de 67%, al menos alrededor de 68%, al menos alrededor de 69%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 75%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95%, al menos alrededor de 96%, al menos alrededor de 97%, al menos alrededor de 98%, al menos alrededor de 99% o al menos alrededor de 100% de las células SRE expresan Pdx1.

[0124] En algunas realizaciones, al menos el 66% de las células SRE expresan MAFA. En algunas realizaciones, al menos alrededor de 67%, al menos alrededor de 68%, al menos alrededor de 69%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 75%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95%, al menos alrededor de 96%, al menos alrededor de 97%, al menos alrededor de 98%, al menos alrededor de 99% o al menos alrededor de 100% de las células SRE expresan MAFA.

[0125] En algunas realizaciones, al menos el 66% de las células SRE expresan ISL1. En algunas realizaciones, al menos alrededor de 67%, al menos alrededor de 68%, al menos alrededor de 69%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 75%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95%, al menos alrededor de 96%, al menos alrededor de 97%, al menos alrededor de 98%, al menos alrededor de 99% o al menos alrededor de 100% de las células SRE expresan ISL1.

[0126] En algunas realizaciones, al menos alrededor del 68% de las células SRE no expresan Nkx6.1. En algunas realizaciones, al menos alrededor de 67%, al menos alrededor de 68%, al menos alrededor de 69%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 75%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95%, al menos alrededor de 96%, al menos alrededor de 97%, al menos alrededor de 98%, al menos alrededor de 99% o al

menos alrededor de 100% de las células SRE no expresan Nkx6.1.

[0127] En algunas realizaciones, al menos el 66% de las células SRE expresan péptido C. En algunas realizaciones, al menos alrededor de 67%, al menos alrededor de 68%, al menos alrededor de 69%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 75%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95%, al menos alrededor de 96%, al menos alrededor de 97%, al menos alrededor de 98%, al menos alrededor de 99% o al menos alrededor de 100% de las células SRE expresan péptido C.

[0128] También se divulga aquí una población de las células SRE divulgadas aquí. Dicha población de células SRE puede incorporarse a una composición celular como la descrita anteriormente. En algunas realizaciones, la población puede ser sustancialmente pura, lo que significa que incluye al menos alrededor del 70 %, al menos alrededor del 75 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 85 %, al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 99 %, al menos alrededor del 100 % o más de las células SRE. En algunas realizaciones, las células SRE pueden formularse con uno o más vehículos terapéuticamente aceptables.

[0129] Las composiciones celulares para el tratamiento de la diabetes pueden prepararse según los métodos aquí descritos. Por ejemplo, las células SRE divulgadas de una composición basada en células pueden, por ejemplo, derivarse según un método que comprende contactar una célula madre con una combinación de factores de crecimiento para impulsar la diferenciación de la célula madre a un linaje endocrino, en donde la combinación de factores de crecimiento comprende ácido retinoico, un antagonista de Hedgehog y un inhibidor de la señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP). En algunas realizaciones, el antagonista de Hedgehog se selecciona entre SANT1 y ciclopamina. En algunas realizaciones, el inhibidor de la señalización de BMP es LDN193189. En algunas realizaciones, la célula madre no está expuesta a triyodotironina (T3) o un análogo de esta durante el proceso de diferenciación. En algunas realizaciones, la célula madre se expone a T3 o a un análogo de esta durante el proceso de diferenciación. En algunas realizaciones, la célula madre no está expuesta a un activador de la proteína cinasa C durante el proceso de diferenciación. En algunas realizaciones, la célula madre se expone a un activador de la proteína cinasa C durante el proceso de diferenciación.

[0130] Varios factores inductores de endodermo son conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, Activina-A y Wortmannin. Del mismo modo, se conocen en la técnica diversos factores inductores endocrinos, incluidos, entre otros, el ácido retinoico, los antagonistas de Hedgehog, como la ciclopamina y el SANT1, y los inhibidores de la señalización BMP, como el LDN193189.

[0131] La fuente de las células madre utilizadas para preparar la composición celular divulgada no está particularmente limitada; sin embargo, elegir una célula o línea celular que se diferencie preferentemente en un linaje endodérmico, como se divulga aquí, puede aumentar el rendimiento de las células productoras de insulina y aumentar la eficiencia de la diferenciación. Así, en algunas realizaciones, las células madre utilizadas en los métodos de diferenciación divulgados para preparar una composición de base celular se derivan de tejido primario pancreático. En algunas realizaciones, las células madre utilizadas en el método de diferenciación divulgado

son células madre embrionarias. En algunas realizaciones, las células madre utilizadas en el método de diferenciación divulgado son células madre pluripotentes inducidas. En algunas realizaciones, las células madre utilizadas en el método de diferenciación divulgado son células reprogramadas no pluripotentes. En algunas realizaciones, las células madre son células madre humanas.

[0132] En algunas realizaciones, las células madre utilizadas en los métodos de diferenciación divulgados se modifican genéticamente para evitar la activación de los linfocitos del hospedador. En algunas realizaciones, las células madre utilizadas en los métodos de diferenciación divulgados se modifican genéticamente para carecer de expresión de MHC I y MHCII.

[0133] En algunas realizaciones, las células madre utilizadas en los métodos de diferenciación divulgados se modifican genéticamente para evitar la destrucción dirigida por los linfocitos citolíticos naturales. En algunas realizaciones, las células madre utilizadas en los métodos de diferenciación divulgados se modifican genéticamente para expresar CD47.

[0134] A efectos de la presente divulgación, cuando se preparan células productoras de insulina para su incorporación en una composición celular para el tratamiento de la diabetes, puede ser deseable reprogramar las células expresando genes de reprogramación en la célula sin incorporar los genes de reprogramación en el genoma de la célula. Los expertos en la materia reconocerán que los genes transducidos pueden expresarse en una célula sin incorporar esos genes al genoma utilizando, por ejemplo, plásmidos de expresión episomal. Los genes de reprogramación pueden expresarse en al menos 1, al menos 2, al menos 3, o al menos 4 o más plásmidos de expresión episomal. Como se discutió anteriormente, múltiples genes de reprogramación son conocidos en el arte y pueden ser utilizados para los fines de los métodos divulgados, pero en algunas realizaciones los genes de reprogramación comprenden Oct4, Sox2, Klf4, y L-Myc.

[0135] En algunas realizaciones, la composición celular se encapsula, por ejemplo, en microcápsulas o macrocápsulas.

[0136] La presente divulgación también proporciona métodos para tratar la diabetes utilizando las composiciones celulares divulgadas. Los métodos de tratamiento de la diabetes comprenden generalmente la implantación de una cantidad terapéuticamente eficaz de las células SRE divulgadas en un sujeto que las necesite. La cantidad terapéuticamente eficaz de células SRE puede estar en forma de una composición celular, por ejemplo, una población de células SRE microencapsuladas o macroencapsuladas.

[0137] Así, en algunas realizaciones, los métodos comprenden implantar en un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de células productoras de insulina encapsuladas en macrocápsulas. La composición de las macrocápsulas no está particularmente limitada y los expertos en la materia comprenderán que pueden utilizarse diversos materiales para encapsular las células productoras de insulina. Por ejemplo, las cápsulas pueden contener alginato, sulfato de celulosa, glucomanano o una combinación de estos. En algunas realizaciones, las macrocápsulas pueden comprender al menos una barrera en la que la barrera exterior está compuesta por sulfato de celulosa y glucomanano. En algunas realizaciones, las macrocápsulas pueden tener la forma de un tubo cilíndrico

compuesto por una cápsula interior de alginato y una cápsula exterior de sulfato de celulosa y glucomanano.

[0138] En algunas realizaciones, los métodos comprenden implantar en un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de células productoras de insulina encapsuladas en las macrocápsulas divulgadas alrededor de una vez al año, una vez cada dos años, una vez cada tres años, una vez cada cuatro años, una vez cada cinco años o más. En algunas realizaciones, las células implantadas sobrevivirán al menos seis meses tras la implantación. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el sujeto puede requerir un solo implante. En algunas realizaciones, la composición celular puede necesitar ser reemplazada una vez cada 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 meses, una vez cada 1, 2, 3, 4 o 5 años o más o hasta que el sujeto tenga hiperglucemia recurrente, o un retorno al estado diabético.

[0139] En algunas realizaciones, la composición celular puede implantarse en el epiplón mayor del sujeto. El epiplón mayor (también conocido como gran epiplón, epiplón mayor, epiplón gastrocólico o membrana) es un gran pliegue en forma de delantal de peritoneo visceral que cuelga del estómago y se extiende desde la curvatura mayor del estómago hacia atrás para ascender hasta el colon transversal antes de llegar a la pared abdominal posterior. Así, la composición celular puede implantarse en una bolsa formada quirúrgicamente a partir del epiplón.

[0140] En algunas realizaciones, la composición celular se implanta en la cavidad peritoneal. En algunas realizaciones, la composición celular se implanta en la cavidad peritoneal y se ancla al epiplón. En algunas realizaciones, la composición celular se implanta en una bolsa de epiplón.

[0141] Las dosis ejemplares de células productoras de insulina pueden variar en función del tamaño y la salud del individuo tratado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un implante ejemplar de células encapsuladas en la composición celular divulgada puede comprender de 5 millones de células a 30 millones de células por kg de peso corporal.

[0142] Además, los métodos de tratamiento divulgados pueden comprender adicionalmente la administración de un segundo agente terapéutico además de las células terapéuticas encapsuladas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el compuesto terapéutico adicional puede incluir, entre otros, inyecciones de insulina, metformina, sulfonilureas, meglitinidas, tiazolidinedionas, inhibidores de DPP-4, agonistas del receptor de GLP-1 e inhibidores de SGLT2.

[0143] Los regímenes de tratamiento particulares que comprenden la implantación de la composición celular con células productoras de insulina pueden evaluarse en función de si mejorarán los resultados de un paciente determinado, es decir, si ayudarán a estabilizar o normalizar los niveles de glucosa en sangre del sujeto o a reducir el riesgo o la aparición de síntomas o comorbilidades asociados a la diabetes, incluidos, entre otros, episodios de hipoglucemia, niveles elevados de hemoglobina glucosilada (niveles de HbA1C), cardiopatías, retinopatías, neuropatías, enfermedades renales, enfermedades hepáticas, enfermedades periodontales y úlceras que no cicatrizan. En algunas realizaciones, la composición celular estará encapsulada, por ejemplo, en una cápsula que comprenda alginato, sulfato de celulosa, glucomanano o una combinación de estos.

[0144] Así, a efectos de la presente divulgación, un sujeto es tratado si se obtienen

uno o más resultados beneficiosos o deseados, incluidos resultados clínicos deseables. Por ejemplo, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, uno o más de los siguientes: disminución de uno o más síntomas derivados de la diabetes, aumento de la calidad de vida de los diabéticos, disminución de la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la diabetes, retraso o prevención de las complicaciones asociadas a la diabetes y/o prolongación de la supervivencia de las personas.

[0145] Además, aunque el sujeto de los métodos es generalmente un sujeto con diabetes, la edad del paciente no está limitada. Los métodos divulgados son útiles para tratar la diabetes en todos los grupos de edad y cohortes. Así, en algunas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto pediátrico, mientras que en otras realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto adulto.

[0146] Un experto en la materia apreciará fácilmente que la presente divulgación está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como los inherentes a estos. Los expertos en la materia podrán realizar modificaciones y otros usos. Estas modificaciones se incluyen en el espíritu de la divulgación. Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la presente divulgación. Sin embargo, debe entenderse que la invención no debe limitarse a las condiciones específicas o detalles descritos en estos ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Células SRE que expresan Pdx1 e ISL1

Materiales y métodos

[0147] *Cosecha de islotes:* Se obtuvieron páncreas humanos enteros, debidamente consentidos y anonimizados, de donaciones de órganos registradas. Los lóbulos se inyectaron con colagenasa P (Roche n.º 1129 002 001) resuspendida a 1.4 mg/ml en solución de aislamiento de islotes (solución salina equilibrada de Hanks (Invitrogen n.º 14065-056) con 0.35 g de NaHCO₃ por L y 1 % de albúmina de suero humano (Roche A9731)). Los lóbulos inflados se incubaron a 37 °C durante 15-25 min con agitación suave. El digerido se diluyó con solución fría de aislamiento de islotes y se centrifugó a 1500 RPM durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó y el pellet se lavó en solución fría de aislamiento de islotes con trituración vigorosa. La solución se filtró a través de un tamiz de 420 µm (Bellco Glass, Inc, n.º de cat. 1985-00040) y se centrifugó. El pellet se volvió a suspender en 1.100 g/ml de Histopaque (Sigma n.º 10771, Sigma n.º 11191) y se centrifugó durante 30 min a 1200 RPM. Se recogió el sobrenadante, se diluyó 2 veces en solución de aislamiento de islotes y se centrifugó a 1500 RPM durante 5 minutos. El pellet se enjuagó en solución de aislamiento de islotes, se centrifugó y se cultivó en medio E8 (Gibco n.º A1517001) en una incubadora humidificada a 37 °C y CO₂ al 5 %. Al día siguiente, los islotes se centrifugaron a 1500 RPM durante 5 min y se volvieron a suspender en TrypLE Select 10X sin diluir (Life Technologies n.º A12177) y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Los islotes disociados se diluyeron en medio E8, se centrifugaron y se volvieron a suspender en medio E8 suplementado con 100 ng/ml de hidrocortisona (Sigma n.º H0135), 1 U/ml de trombina (Sigma n.º T9326) y 100 ng/ml de EGF (Sigma E5036). Las células se cultivaron en placas recubiertas con vitronectina (Life Technologies n.º A14700) siguiendo las instrucciones del fabricante.

[0148] *Reprogramación:* Las células se enjuagaron con PBS (Gibco n.º 14190144) y

se incubaron en TrypLE select 1X durante 5 min a 37 °C. La digestión se detuvo con medio E8 y las células se centrifugaron a 1000 RPM durante 5 min. Las células se resuspendieron en solución de electroporación BTX (VWR n.º 89130-542) a 2×10^6 células por 200 µl y se añadieron a la cubeta de electroporación con 20 µg de plásmidos de reprogramación. Se construyeron dos plásmidos de reprogramación que comprendían secuencias de expresión episomal EBNA, resistencia a la ampicilina y los genes de reprogramación Oct4, Sox2, Klf4 y L-Myc bajo el control del promotor CMV. La cubeta de electroporación se pulsó utilizando un pulsador de genes XL (Bio-Rad). Las células se transfirieron a placas recubiertas de vitronectina en medio E6 (Life Technologies n.º a1516401) suplementado con 100 ng/ml de bFGF (Life Technologies n.º PHG6015) e hidrocortisona 1 µM. Las células se cultivaron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %. Después de 24 h, se cambió el medio con E6 suplementado con 100 ng/ml de bFGF, hidrocortisona 1 µM y butirato sódico 100 µM (Sigma n.º P1269), y se cambió cada dos días. Las colonias de células madre se separaron manualmente y se transfirieron a placas recubiertas de vitronectina en medio E8. Inicialmente, se sometieron 73 líneas generadas a partir del tejido primario de dos donantes a un cribado para determinar la capacidad de expresar marcadores endodérmicos tras 4 días de exposición a los agentes inductores del endodermo Activina-A y Wortmannin. Se seleccionaron los cultivos con la mayor proporción de células que expresaban marcadores endodérmicos. Veinticuatro líneas celulares que habían superado el primer cribado se sometieron posteriormente a un cribado para determinar la capacidad de expresar marcadores pancreáticos tras su exposición a un protocolo de diferenciación pancreática de 12 días. La línea celular que generó sistemáticamente la mayor proporción de células pancreáticas se denominó SR1423, y se almacenó y se utilizó para todos los experimentos posteriores.

[0149] Caracterización de la línea celular: SR1423 expresaba marcadores típicos de las células pluripotentes y tenía un cariotipo normal. El perfil STR de ADN de SR1423 confirmó que se trata de una línea celular única que coincide con el tejido donante. Además, SR1423 crece a una velocidad típica de las líneas celulares pluripotentes. Se observó que otras líneas de células madre pluripotentes inducidas (en lo sucesivo denominadas "iPSC") procedentes del mismo donante y del mismo experimento de reprogramación también mostraban una diferenciación preferencial. La línea de iPSC "B" también se diferenció bien hacia el endodermo, mientras que las líneas "C" y "D" no mostraron preferencia por la diferenciación hacia el linaje endodérmico (datos no mostrados). Con el fin de determinar si existía una correlación entre los perfiles de expresión génica y la incapacidad de las iPSC para diferenciarse en linajes específicos, se realizaron perfiles de *microarrays* de genoma completo de los genes expresados de SR1423, así como de las líneas B, C y D. Véanse, por ejemplo, Southard SM. et ál. PLoS ONE 13(9) (2018), Koyanagi-Aoi M. et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013). El análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado, basado en un cambio de expresión en pliegues de al menos Log2, reveló que SR1423 se agrupaba con la línea celular B, pero no con las C y D. Esto identificó un patrón de expresión génica que se correlaciona con una diferenciación robusta y preferente hacia el linaje endodérmico. De los 10 genes con mayor expresión diferencial, BHMT2, Cox7A1, HSPB2 y NAP1L1 se correlacionaron significativamente con la

capacidad de formar endodermo mediante una medida qRT-PCR.

[0150] Cultivo de células madre: Las células iPS indiferenciadas se mantuvieron en placas de cultivo tisular de 6 pocillos (Greiner Bio-One n.º 657160) recubiertas con vitronectina XF (Stem Cell Technologies n.º 07180) o 17 µg/cm² de Geltrex (Life Technologies n.º A1413301) siguiendo las instrucciones del fabricante y alimentadas diariamente con medio E8. Los cultivos se pasaron al 75-85 % de confluencia cada 3-5 días con EDTA 0.5 mM (Life Technologies n.º 15575) y se sembraron a 7 x10³ células/cm².

[0151] Diferenciación: Las células adherentes indiferenciadas se expusieron a un protocolo de diferenciación multietapa como el siguiente: Etapa 1 (3 días) que comprende una mezcla 50:50 de RPMI:CMRL suplementada con B27, Activina A y Wortmannin; Etapa 2 (2-8 días) compuesta por DMEM bajo en glucosa suplementado con B27, SANT1, RA, LDN y KGF; Etapa 3 (4 días) compuesta por DMEM bajo en glucosa suplementado con B27, SANT1, RA, KGF y EGF. En la etapa 3, los grupos celulares tridimensionales se transfieren al cultivo en suspensión; Etapa 4 (4 días) compuesta por DMEM bajo en glucosa suplementado con B27, SANT1, RA, Gsxxi, Alk5i, sulfato de zinc y estaurosporina; Etapa 5 (4-35 días) compuesta por DMEM bajo en glucosa suplementado con sulfato de zinc.

Caracterización de los grupos de SRE

[0152] Citometría de flujo: Entre los días 28 y 40, los grupos de SRE se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la proporción de células que expresaban marcadores endocrinos específicos del páncreas. Al menos 500 grupos se dispersaron en células individuales mediante incubación en solución de tripsina EDTA durante 5 min a 37 °C con agitación a 1000 RPM. La reacción se detuvo añadiendo un 20% del volumen de suero bovino fetal. La suspensión celular se pasó por un filtro celular de 70 µm para recoger una suspensión de células individuales. Las células se cuantificaron utilizando un contador celular automatizado BioRad TC20. Se utilizaron entre 100 000 y 200 000 células para la citometría de flujo de cada combinación de marcadores y controles sin tinción. Las células se precipitaron y se resuspendieron en BD Cytofix/Cytoperm e incubadas a temperatura ambiente durante 20-30 min. Las células se sedimentaron en una centrifugadora refrigerada a 5 °C durante 2 min a 2000 RPM. El sedimento celular se volvió a suspender en amortiguador BD. Las células se volvieron a precipitar y se resuspendieron en amortiguador PhosPerm III durante 20-30 minutos en hielo. Las células se precipitaron de nuevo y se volvieron a suspender en amortiguador de lavado BD. Las células se volvieron a precipitar y se resuspendieron en amortiguador de lavado suplementado con anticuerpos primarios conjugados con fluoróforos o controles de isotipo. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-PDX1-Alexa-647 (dilución 1:100), anti-insulina-Alexa-647 (dilución 1:2500), anti-Nkx6.1-Alexa-488 (dilución 1:50), antiglucagón-PE (dilución 1:500), anti-ISL1-PE (dilución 1:100), control de isotipo Alexa-647 (dilución 1:100), control de isotipo Alexa-488 (dilución 1:100) o control de isotipo PE (dilución 1:500). Las muestras se incubaron durante 1 h, a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Las células se precipitaron de nuevo y se volvieron a suspender en amortiguador de lavado. Las células se precipitaron de nuevo y se volvieron a suspender en FBS al 1% en PBS. Las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo Guava con el software InCyte. La FIG. 1 muestra que los grupos

SRE están compuestos por células que expresan predominantemente Pdx1, ISL1 e insulina. Una proporción menor de células expresa glucagón. En cambio, las células que expresan Nkx6.1 son casi indetectables.

[0153] *Inmunofluorescencia:* Entre los días 28 y 40, los grupos de SRE se visualizaron mediante inmunofluorescencia para marcadores endocrinos específicos del páncreas. Se fijaron al menos 100 grupos en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los grupos fijados se dejaron sedimentar por gravedad y se volvieron a suspender en sacarosa al 20 % en PBS. La solución se incubó a temperatura ambiente hasta que todos los grupos se depositaron en el fondo del tubo. Los grupos se volvieron a suspender en medio de congelación OCT, se transfirieron a un criomolde y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Los bloques congelados se seccionaron con un grosor de 10 μ m utilizando un criotomo Shandon y se transfirieron a portaobjetos recubiertos de silano. Las secciones en portaobjetos de microscopio se permeabilizaron en Triton-X-100 al 0.5 % en PBS durante 20 minutos y se enjuagaron en PBS. Las secciones se incubaron en amortiguador de bloqueo compuesto por suero de caballo al 10 % en TX-100 al 0.1 % en PBS durante 1 h. Las secciones se enjuagaron en PBS y se incubaron en anticuerpos primarios diluidos en suero de caballo al 1% en TX-100 al 0.1 % en PBS. Todos los anticuerpos primarios se diluyeron 1:100. Las secciones se incubaron a 5 °C durante la noche. Las secciones se enjuagaron en PBS y se incubaron durante 2 h, a temperatura ambiente en anticuerpos secundarios en suero de caballo al 1% en TX-100 al 0.1% en PBS. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anticonejo caballo-Alexa-488, antirrátón caballo-Alexa-595 y anticabra caballo-Alexa-595. Las secciones se enjuagaron en PBS y se tiñeron durante 2 minutos con Hoechst 1:1000 en PBS. Las secciones se enjuagaron en PBS cubiertas con solución Fluoromount, se cubrieron con un cubreobjetos y se tomaron imágenes utilizando un microscopio de fluorescencia EVOS con filtros de DAPI, rodamina y fluoresceína. Todas las imágenes se fotografiaron con un aumento total de 200X. La FIG. 2 confirma que los grupos SRE están formados por células que expresan predominantemente Pdx1 e ISL1, y que las células que expresan Nkx6.1 son casi indetectables. ISL1 se expresa en los núcleos de las células que expresan péptido C y en los núcleos de las células que expresan el marcador del páncreas endocrino cromogranina A. Aunque las células que expresan Nkx6.1 están casi ausentes, las pocas células que expresan Nkx6.1 no coexpresan ISL-1.

[0154] *Rendimiento de los grupos de SRE:* Entre los días 28 y 40, los grupos de SRE se expusieron a niveles variables de glucosa y se analizó el sobrenadante para detectar la presencia de péptido C secretado. Se enjuagaron 50 grupos de SRE en amortiguador de bicarbonato suplementado con cloruro sódico, cloruro cálcico, cloruro magnésico y ácido clorhídrico (amortiguador GSIS). Los grupos de SRE se dejaron sedimentar por gravedad y se volvieron a suspender en 300 μ l de amortiguador GSIS suplementado con glucosa 2.2 mM durante 20 min a 37 °C y CO₂ al 5 %. Se dejaron sedimentar los grupos por gravedad, se recogió el sobrenadante y se guardó en hielo. Este procedimiento se repitió 3 veces más. A continuación, los grupos se volvieron a suspender en glucosa 16.7 mM durante 20 minutos. Esto se repitió una segunda vez. A continuación, los grupos se volvieron a suspender en amortiguador GSIS suplementado con glucosa 16.7 mM y cloruro potásico 30 mM

durante 20 minutos. Se analizó el contenido de péptido C de los sobrenadantes con un kit ELISA de péptido C de Mercodia y se cuantificó con un lector de placas de absorbancia. La FIG. 3 muestra que la incubación de 50 grupos de SRE durante 4, intervalos de 20 min en glucosa 2.2 mM demuestra una secreción de péptido C gradualmente decreciente. La exposición a glucosa 16.7 mM provoca un aumento de la secreción de péptido C en 40 minutos. La estimulación artificial de la secreción de péptido C en presencia de KCl 30 mM muestra una elevada reserva de péptido C disponible para la secreción.

Ejemplo 2 - Células SRE que expresan MAFA e ISL-1

Introducción

[0155] La cura de sustitución de islotes para la diabetes de tipo 1 no está disponible para la mayoría de los pacientes debido a la falta de suministro de islotes de donantes y a la necesidad de una potente inmunosupresión. Los grupos similares a islotes cultivados a partir de células madre pluripotentes humanas inmortalizadas son un sustituto viable de los islotes cadavéricos y pueden fabricarse a gran escala. Las células madre pluripotentes se definen por una capacidad inherente para seguir vías de maduración que especifican cada tejido del embrión en desarrollo y, con el tiempo, todos los tejidos adultos. Los protocolos para guiar la maduración pancreática de células madre pluripotentes tienen como objetivo desencadenar la elección del destino pancreático y restringir los linajes no pancreáticos. Estos protocolos crean poblaciones compuestas por células con características pancreáticas funcionales y células no diana. La hipótesis es que la presencia de células sin una especificación endocrina adecuada puede disminuir la potencia clínica y la seguridad de la población.

[0156] Las células madre pluripotentes inducidas son epigenéticamente distintas de las células madre embrionarias y pueden conservar la impronta epigenética del tejido de origen, lo que da lugar a una expresión génica y una capacidad de diferenciación diferenciales entre líneas celulares. El objetivo era aprovechar este fenómeno reprogramando células primarias de islotes pancreáticos de un donante humano que diera su consentimiento para crear una línea de células madre con mayor potencial de diferenciación pancreática. Para lograrlo, se desarrolló un protocolo para la reprogramación episomal de estas células primarias de islotes pancreáticos, y se buscaron clones inmortalizados para identificar poblaciones que respondieran eficientemente a las señales de maduración para volver a formar poblaciones de células con características pancreáticas. La línea celular con mejores resultados (clon SR1423) se caracteriza por un potencial de destino restringido y, por tanto, no cumple los criterios de pluripotencia. La caracterización adicional que aquí se presenta pone de relieve la distinción entre SR1423, células madre pluripotentes inducidas (iPSC) y células madre embrionarias (ESC).

[0157] Los grupos pancreáticos derivados de células madre son funcionalmente menos maduros que los islotes primarios y contienen poblaciones celulares con perfiles transcriptómicos y epigenómicos que comparten algunas características con las poblaciones celulares fetales, neonatales e infantiles. Hasta la fecha, los destinos de las poblaciones de células diferenciadas que expresan subconjuntos de marcadores pancreáticos no están bien definidos. En particular, se identifican poblaciones progenitoras distintas basadas en la expresión diferencial del factor de

transcripción NKX6-1 entre las células que expresan el factor de transcripción PDX-1 *in vitro* e *in vivo*. PDX-1 es un determinante clave de la actividad pancreática que se activa al principio del compromiso pancreático y permanece expresado durante el desarrollo y en el tejido pancreático endocrino y exocrino maduro. NKX6-1 se activa en el compromiso temprano de las células endocrinas pancreáticas y vuelve a expresarse en las células beta secretoras de insulina. Entre las poblaciones de células madre pluripotentes diferenciadas, se ha sugerido que las PDX-1+/NKX6-1+ están destinadas a formar células beta secretoras de insulina funcionales, mientras que las PDX-1+/NKX6-1- forman células polihormonales que se transforman *in vivo* en células alfa secretoras de glucagón o en células no funcionales no diana.

[0158] Sin embargo, recientemente se ha identificado en los islotes de roedores una población de células beta que carece de expresión de NKX6-1. Además, Pavluch et ál. demostraron que la expresión de NKX6-1 era prescindible para la secreción de insulina sensible a la glucosa en células de insulinoma de rata. Además, NKX6-1 también desempeña una función importante en la especificación de la población enterocromafín de células enteroendocrinas productoras de serotonina del intestino. Las poblaciones pancreáticas y enterocromafines que expresan NKX6-1 emergen de una población progenitora común que expresa NGN3 y comparten características funcionales similares. Dado que las células que expresan serotonina son comunes entre las poblaciones de células pancreáticas derivadas de células madre, se especula que las poblaciones pancreáticas derivadas de células madre que expresan NKX6-1 pueden contener células no diana con identidad enterocromafín. Por lo tanto, NKX6-1 no es un determinante claro de la identidad de las células beta o de su destino.

[0159] La expresión de los factores de transcripción ISL1 y MAFA también se expresa en los progenitores endocrinos tempranos y de nuevo en los islotes en maduración, lo que indica funciones tanto en la especificación de los progenitores endocrinos como en la maduración o el mantenimiento de las células endocrinas funcionales. La expresión de MAFA se limita a las células de roedores que expresan insulina, y los ratones deficientes en MAFA presentan una sensibilidad a la glucosa alterada y diabetes. La sobreexpresión de MAFA, en combinación con PDX1 y NGN3 puede impulsar la programación del fenotipo de célula beta en células pluripotentes humanas y transdiferenciar el páncreas exocrino cuando se combina con Pax4. Por lo tanto, es posible que MAFA e ISL1 en ausencia de NKX6-1 en poblaciones pancreáticas derivadas de células madre reflejen el destino de las células beta y tengan una alta potencia *in vivo* para la terapia de sustitución de islotes. Se comparó la potencia *in vivo* de una población de células pancreáticas derivadas de células madre que expresaban predominantemente NKX6-1 y una población que carecía de expresión de NKX6-1, pero expresaba altamente MAFA e ISL1.

Materiales y métodos

[0160] hPSC Scorecard. Las células SE1423u indiferenciadas se descongelaron y se cultivaron de forma rutinaria hasta el pasaje 23. Las placas de 10 cm casi confluentes se lisaron en TriZOL y se almacenaron a -80 °C. Se recogió el ARN del lisado TriZOL de acuerdo con el protocolo de purificación descrito en el manual de hPSC Scorecard de ThermoFisher TaqMan. Los precipitados de ácido nucleico se disolvieron en 50 µL de agua libre de nucleasas y, a continuación, se almacenaron alícuotas a -80 °C.

Una vez descongelados, se determinó la concentración de ácido nucleico mediante NanoDrop. La transcripción inversa se realizó por duplicado siguiendo el protocolo del ensayo hPSC Scorecard de ThermoFisher TaqMan. Brevemente, se mezclaron 2 µg de ácido nucleico con reactivos de síntesis de ADNc ThermoFisher High Capacity (cebadores hexámeros aleatorios, inhibidor de RNasa, amortiguador, transcriptasa inversa, dNTP y agua). La mezcla se incubó a 37 °C durante 2 horas y, a continuación, las enzimas se inactivaron por calor a 85 °C durante 5 minutos. El ADNc se almacenó a -80 °C hasta su uso. La qPCR cuantitativa se realizó según el manual del ensayo hPSC Scorecard de ThermoFisher. Se cargaron placas de 96 pocillos del panel de hPSC Scorecard de ThermoFisher prefabricadas con plantilla de ADNc y TaqMan Fast Advanced PCR Master Mix. Los parámetros de ciclado se programaron de acuerdo con el manual del ensayo Scorecard. Se repitió el procedimiento. Los archivos de resultados contenían valores Ct para cada pocillo, y estos valores se copiaron en una plantilla proporcionada por ThermoFisher, que se formateó para su uso con el software en línea Scorecard. Los valores formateados se guardaron como archivos .txt para cargarlos en el software en línea Scorecard. Los resultados de cada réplica se cargaron en el software y se agruparon.

[0161] Cultivo celular y diferenciación. Las células madre indiferenciadas se mantuvieron en mTeSR-E8 (Stem Cell Technologies) en placas de plástico precubiertas con vitronectina de longitud completa (Peprotech) con cambios diarios de medio. En el Cuadro 1 se indican las señales de orientación para la diferenciación y su duración. Las etapas 1 y 2 utilizaron medios basales compuestos por una mezcla 1:1 de RPMI y DMEM F-12 suplementada con BSA y SM1 (Stem Cell Technology) o B27 (ThermoFisher). Las etapas 7-9 utilizaron una mezcla 1:3 de medios basales CMRL y RMPI suplementados con BSA. Las etapas 6-9 se llevaron a cabo en cultivo en suspensión utilizando un sistema de cultivo de biorreactor de rueda vertical.

Tabla 1: Comparación de las claves de orientación que impulsan la diferenciación de SR1423U a poblaciones con alto y bajo contenido de NKX6-1

Comparación de protocolos de diferenciación					
alto contenido de NKX6-1			bajo contenido de NKX6-1		
Etapas	Long. (días)	Señal de orientación	Etapas	Long. (días)	Señal de orientación
1	3	Activina A	1	1	Activina A
		Inhibición PI3K (Wortmannin)			Wortmannin
2	2	Factor crecim. fibroblastos 7 (FGF7)			Inhibición GSK3 (CHIR99021)
3	1	Ácido retinoico (AR o RA)	2	2	Activina A
		Inhibición de Hedgehog (SANT1)			Wortmannin
		FGF7	3	2	FGF7
		Inhibición BMP (LDN193189)	4	2	RA
4	4	LDN193189			SANT1
		Activina A			FGF7
		Nicotinamida			LDN193189
		Factor crecim. epidérmico (EGF)	5	4	RA (1/20 conc)
5	4	RA (1/20 conc)			SANT1
		FGF7			FGF7
		EGF			LDN193189
		SANT1	6	4	RA (1/20 conc)
6	6	SANT1			SANT1
		RA (1/20 conc)			FGF7
		Inhibidor señalización Notch (GSXXi)			EGF
		LDN193189	7	6	RA (1/20 conc)
		Inhibición TGFbeta (Alk5i)			SANT1
		EGF			GSXXi
7	4	SANT1			Alk5i
		RA (1/20 conc)	8, 9	19	Sin aditivo
		Alk5i			
		Nicotinamida			
		Factor crecim. tipo insulina 1 (IGF1)			
		Triyodotironina (T3)			
8	15	SANT1			
		RA (1/20 conc)			
		Alk5i			
		Nicotinamida			
		IGF1			
		T3			
		TGF beta 1			

[0162] Citometría de flujo. Se prepararon suspensiones de células individuales a partir de la incubación de racimos en tripsina/EDTA (VWR). Se añadió un 20% del volumen total de suero bovino fetal y se colocó el tubo en hielo. La suspensión se pasó por un filtro de 70 µm. El eluido se cuantificó a partir de alícuotas de 20 µL que se mezclaron con azul de tripano y se contaron dos veces utilizando el contador celular automatizado TC20 (BioRad). Las células se precipitaron y se resuspendieron en 1 ml de solución Cytofix/Cytoperm (Becton Dickinson) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se separaron 150 000 células en una centrifugadora refrigerada y se lavaron en amortiguador de lavado BD (Becton

Dickinson) durante 20-30 minutos en hielo. Se sedimentaron las células y se resuspendieron en una dilución 1:100 de anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos en amortiguador de lavado BD y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C. Se enjuagaron las células en amortiguador de lavado BD y se resuspendieron en BSA al 1% en PBS. Las muestras se cuantificaron junto con controles sin tinción utilizando un sistema de citometría de flujo Guava.

[0163] Inmunofluorescencia. Las muestras se fijaron durante 30 minutos en paraformaldehído al 4%, se enjuagaron en PBS y se resuspendieron en sacarosa al 30% hasta que sedimentaron en el fondo del recipiente. Las muestras fijadas se criopreservaron en medio OCT crio seccionado a un grosor de 10 µm y se recogieron en portaobjetos de microscopio recubiertos de silano (VWR). Las secciones se permeabilizaron en TX-100 al 2.5 % (Sigma) disuelto en PBS durante 20 minutos, se enjuagaron y se incubaron en una solución de bloqueo de TX-100 al 1% y suero de caballo al 10% durante 1 hora. Las secciones se enjuagaron y se incubaron durante la noche a 4 °C en anticuerpo primario diluido 1:100 en PBS suplementado con TX-100 al 1 % y suero de caballo al 2 %. Los portaobjetos se enjuagaron y se incubaron en una dilución 1:1.000 de anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos criados en caballo durante 1 hora. Las secciones se enjuagaron, se incubaron en colorante Hoescht 20 nM durante 2 minutos, se enjuagaron, se fijaron bajo un cubreobjetos y se visualizaron con un microscopio fluorescente Evos (ThermoFisher).

[0164] scRNA-Seq. Las células diferenciadas SR1423 se cosecharon el último día de cada etapa de diferenciación. Para las etapas de cultivo adherente, se lavó con PBS una placa de cultivo tisular confluyente de 15 cm y, a continuación, se trató con EDTA 5 mM durante 5 minutos a 37 °C, y se generaron suspensiones de células individuales mediante trituración manual. Las células individuales se criopreservaron antes de la preparación de la biblioteca. Para las fases de suspensión de la diferenciación SR1423, se recogieron aproximadamente 50 mg de grupos y se criopreservaron en medio de cultivo + DMSO al 10 %. Los núcleos se aislaron directamente de las células crioconservadas y de las muestras de grupos, que se utilizaron para la preparación de bibliotecas de células individuales por Sigulomics, Inc. utilizando la química del kit de preparación de bibliotecas 10X Genomics 3' v3. Los núcleos se cargaron en el controlador de cromo para seleccionar 5000 núcleos para la secuenciación. Tras la preparación de las bibliotecas, la secuenciación se llevó a cabo en Novogene USA utilizando el secuenciador NovaSeq 6000 (Illumina) con un objetivo de 35 000 lecturas por célula.

[0165] Procesamiento de datos de scRNA-Seq y análisis. Tras la secuenciación, las lecturas se alinearon con el genoma humano de referencia (GRCh38) utilizando CellRanger v.7.1.0 (10X Genomics). A continuación, los datos se procesaron en R V.4.3.0 utilizando Seurat v5. Se filtró para excluir las células con menos de 500 genes expresados y menos de 3000 transcritos detectados. Tras el filtrado, se normalizaron los datos y se seleccionaron los 3000 genes variables más importantes para su integración. Se realizó un análisis de componentes principales de estos genes variables y los datos se integraron mediante un análisis recíproco de componentes principales utilizando los 30 primeros componentes principales. La matriz de

expresión de ARN se cargó en VISION v3.0.1, y se realizó un análisis de vías unicelulares utilizando los parámetros por defecto y la base de datos completa de vías Reactome. Los resultados del análisis de vías de VISION se añadieron al objeto Seurat como un nuevo ensayo. Se identificaron las 200 vías variables más importantes y se utilizaron para el análisis de componentes principales, la incrustación en el gráfico del vecino más próximo y la agrupación con una resolución de 0.5. Se calculó la proyección uniforme de múltiples basándose en los 20 primeros componentes principales del análisis de vías de Reactome. Los abandonos se imputaron mediante la función RunALRA implementada a través de SeuratWrappers utilizando parámetros por defecto. Los datos extraídos solo se utilizaron para visualizar la expresión génica. Los análisis de trayectorias y pseudotiempo se realizaron con Monocle v2. Para estos análisis, la matriz de expresión de ARN normalizada se redujo a 1000 células de cada muestra de partida y se cargó en Monocle. En Monocle, la reducción de la dimensionalidad se realizó mediante el método DDRTree y se calculó el pseudotiempo.

[0166] Experimentos con animales. La cría de animales y los implantes, cuidados y seguimiento de los animales se llevaron a cabo siguiendo protocolos aprobados por el IACUC en las instalaciones de investigación por contrato de Noble Life Sciences y Bioqual, Inc. Los ratones NSG procedían de Jackson Labs. Las ratas SRG procedían de Envigo.

[0167] *Estreptozotocina.* La diabetes se indujo con una única inyección intraperitoneal de 150 mg/kg de estreptozotocina (ratones, Sigma) o 50 mg/kg (ratas) a animales que no estaban en ayunas. La diabetes se confirmó mediante dos mediciones de glucosa en sangre superiores a 350 mg/dL. A los animales hiperglucémicos se les administró una dosis de gránulos de insulina subcutánea siguiendo las instrucciones del fabricante (Linshin Canada).

[0168] *Implantes - Implante renal subcapsular.* Se contaron 2500 o 5000 equivalentes de islotes de Seraxis utilizando el método automatizado del contador de células de islotes (Biorep) y se transfirieron a un tubo cónico de 1.5 mL para implantes en ratones. Se contaron manualmente 10 000 o 40 000 grupos y se transfirieron a un tubo cónico de 1.5 ml para implantes en ratas. Los grupos similares a los islotes se granularon utilizando un microcentrifugador de mesa y se aspiraron en la punta de una aguja flexible de gavage de calibre 15. Se depositó en una bolsa subcapsular renal utilizando técnicas quirúrgicas veterinarias estándar.

[0169] *Implantes - Implantes de epiplón/almohadilla de grasa.* La almohadilla de grasa gonadal se extrajo de la parte inferior del abdomen utilizando una técnica quirúrgica veterinaria estándar y se extendió plana a lo largo del abdomen. Se precipitaron 2500 o 5000 equivalentes de islotes de los grupos Seraxis utilizando un microcentrifugador de mesa y se resuspendieron en 20 µL de plasma humano purificado (Tisseel, componente A). La mezcla de racimo y plasma se depositó en la almohadilla de grasa. Se colocó un volumen igual de solución de fibrina (Tisseel, componente B) sobre la mezcla de plasma de grupo, que se cerró con un pliegue del tejido restante de la almohadilla de grasa. Para los implantes en ratas, se extrajo el epiplón de la parte superior del abdomen y se depositaron 10 000 o 40 000 grupos de la misma forma.

[0170] *Implantes - Implantes intraesplénicos.* Se incubaron 50 grupos de islotes o

islotes primarios secuencialmente en amortiguador suplementado con glucosa 2.2 mM y 16.7 mM durante 30 minutos, seguido de una incubación de 30 minutos de KCl. Se analizó el sobrenadante para determinar el contenido de péptido C mediante ELISA (Mercodia). El índice de secreción representa la relación entre el péptido C secretado durante la exposición a glucosa 16.7 mM y el péptido C secretado durante la exposición a glucosa 2.2 mM. La liberación total de péptido C corresponde a la suma del péptido C secretado durante ambas exposiciones y KCl.

Resultados

[0171] Línea de células madre indiferenciadas. La línea de células madre humanas, SR1423, se generó provocando la expresión transitoria de los factores de Yamanaka en células de islotes humanos extraídas del páncreas de un donante consentido con alta compatibilidad HLA y de grupo sanguíneo para el trasplante alogénico de órganos de donantes. En lugar de realizar un cribado de pluripotencia, esta línea celular se seleccionó por su capacidad de diferenciarse hacia el endodermo definitivo y, posteriormente, hacia el destino de las células progenitoras pancreáticas que expresan PDX-1. Los análisis mostraron que SR1423 no cumple los criterios de pluripotencia, ya que no expresa el gen maestro de control de la especificación del mesodermo, brachyury, en respuesta a agentes inductores del mesodermo. Se empleó el ensayo hPSC Scorecard para comparar los genes relacionados con la pluripotencia con un conjunto de datos de referencia de múltiples células madre pluripotentes. El SR1423 indiferenciado mostró un perfil de expresión génica fuera del rango del conjunto de datos de referencia, con el potencial de diferenciación mesodérmica con la puntuación más baja (FIG. 4A-4B). En consonancia con experimentos previos de diferenciación dirigida, el gen T (TBXT, brachyury) estaba muy regulado a la baja, mientras que los factores de transcripción SOX17 y HNF1B, que especifican el endodermo temprano, estaban regulados al alza sin ninguna señal externa de diferenciación.

[0172] El análisis del transcriptoma mediante secuenciación de ARN unicelular (scRNA-Seq) también demostró un perfil de expresión génica de las células indiferenciadas que se diferencia de los conjuntos de datos de iPSC y ESC publicados anteriormente (FIG. 5A-5C). La agrupación no supervisada con conjuntos de datos de células individuales iPSC (GSE202398) y hESC (GSE143783) reveló que las SR1423U son exclusivas de cada tipo de célula madre, pero más similares a las iPSC que a las hESC (FIG. 5A). El análisis de rutas también demostró que la regulación transcripcional de SR1423U se sitúa entre la de iPSC y hESC (FIG. 5B) con un perfil único de expresión de factores de transcripción (FIG. 5C). En consonancia con los datos del ensayo hPSC Scorecard y la falta de potencial mesodérmico, la baja expresión de POU5F1 (OCT4), NANOG y LIN28 sugiere una reprogramación incompleta de SR1423U. En conjunto, estos datos demuestran que SR1423U es una célula madre derivada de islotes única y parcialmente reprogramada.

[0173] Diferenciación SR1423. SR1423 responde a los protocolos básicos de diferenciación que dirigen la elección del destino pancreático endocrino y genera poblaciones altamente puras de células con características de células endocrinas pancreáticas. Como se ha descrito anteriormente, SR1423 es una línea de células madre multipotentes, y no pluripotentes. SR1423 se caracteriza, por tanto, como una

línea de células madre multipotentes con tendencia al endodermo pancreático. SR1423 se ha obtenido y mantenido en una sala blanca siguiendo los principios de las buenas prácticas de fabricación (BPF). Se crearon y se caracterizaron bancos de células maestras y de células de trabajo para comprobar la ausencia de agentes adventicios y otros parámetros relevantes para la aplicación clínica. La mayor parte de los trabajos aquí descritos se realizaron con alícuotas del banco de células de trabajo.

[0174] Se diseñaron dos protocolos de maduración que guiaron la diferenciación de las células SR1423 a grupos que contenían proporciones nativas de células que expresaban péptido C y glucagón, y demostraron una secreción de péptido C fisiológica y sólida que respondía a la glucosa. El péptido C, un subproducto de la síntesis de insulina, es secretado por las células beta en concentraciones equimolares a la insulina y se utiliza con frecuencia como marcador sustitutivo fiable de la producción y secreción de insulina.

[0175] *Primer protocolo de diferenciación.* Una revisión de la bibliografía que describe la diferenciación de las células del islote pancreático a partir de células madre pluripotentes sugiere que una población diana ideal contiene una gran proporción de células que coexpresan los factores de transcripción PDX-1 y NKX6-1, y la hormona insulina, un perfil que se encuentra en las células beta del islote adulto nativo. Por lo tanto, se diseñó el primer perfil basado en estos principios que impulsa a SR1423 a generar grupos similares a islotes con una alta proporción de células que expresaban PDX-1, NKX6-1 y el subproducto del procesamiento de la insulina, el péptido C (detallado en los métodos, Tabla 1). La citometría de flujo y la tinción inmunofluorescente (FIG. 6A-6B) mostraron una población de células que coexpresan PDX-1, NKX6-1, y péptido C. Estas poblaciones celulares secretaron péptido C en respuesta a la glucosa *in vitro* (FIG. 7A-7B). La expresión del péptido C se encuentra en ausencia de NKX6-1, y algunas células que expresan NKX6-1 carecen de péptido C (FIG. 6A-6B). Así pues, la expresión de NKX6-1 no es necesaria ni suficiente para la expresión del péptido C en esta población celular.

[0176] *Segundo protocolo de diferenciación.* Las células del segundo protocolo expresaron de forma más robusta los factores de transcripción pancreáticos ISL-1 y MAFA. Se diseñó un segundo protocolo que generaba principalmente células que carecían de expresión de NKX6-1, pero mantenían la expresión de PDX-1 y péptido C. La citometría de flujo y la tinción inmunofluorescente (FIG. 6A-6B) confirmaron una población de células que coexpresan PDX-1 e insulina, y una baja proporción de células que expresan NKX6-1. Esta población expresa de forma más robusta los factores de transcripción ISL-1 y MAFA mediante microscopía de inmunofluorescencia que las células del primer protocolo. ISL-1 se expresa en los progenitores endocrinos pancreáticos tempranos y permanece expresada en las células endocrinas pancreáticas maduras. ISL-1 es un activador clave de NKX6-1 y otros genes que se encuentran en las células beta maduras sensibles a la glucosa. MAFA es un regulador de la maduración de las células beta. Los grupos de este protocolo secretaron péptido C a niveles similares a los islotes nativos en condiciones de cultivo estáticas (FIG. 7A-7B)

[0177] *Rendimiento In Vivo.* Se trasplantaron grupos similares a islotes de poblaciones con alto contenido de NKX6-1 y bajo contenido de NKX6-1 a ratones

inmunodeprimidos y ratas químicamente diabéticas mediante la aplicación de estreptozotocina. Los grupos se introdujeron en el espacio subcapsular renal, intraesplénico, en una bolsa formada a partir del epiplón (ratas) o en una bolsa formada a partir de la almohadilla de grasa gonadal (ratones). Los animales que recibieron grupos de NKX6-1-bajo alcanzaron de forma reproducible el control de la glucosa dentro de los plazos analizados (FIG. 8A), mientras que los animales que recibieron grupos con alto contenido de NKX6-1 no lo consiguieron (FIG. 9). El control de la glucosa no se vio influido por el lugar del implante en estos sitios. El control de la glucosa se logró en ratones que recibieron dosis de grupos con bajo contenido de NKX6-1 equivalentes a 2500 y 5000 islotes humanos. Los animales que demostraron el control de la glucosa a las 11-13 semanas postinjerto demostraron la capacidad de controlar la glucosa en sangre de manera similar a los controles no diabéticos después de la ingestión oral de dextrosa (FIG. 8B).

[0178] Los injertos de grupos con alto contenido de NKX6-1 (primer protocolo) revelaron una pérdida de expresión del péptido C en la población positiva para NKX6-1 a lo largo del tiempo (FIG. 10A-10D). Esto contrasta con informes anteriores según los cuales las células copositivas para PDX-1/NKX6-1 maduran en un contexto hiperglucémico *in vivo* para generar células secretoras de insulina homólogas a las células beta nativas en este lapso de tiempo. En el explante se observó que los grupos de ambos protocolos se habían remodelado con tejido del hospedador para formar estructuras con abundante tejido endocrino humano mezclado con tejido del hospedador remodelado (FIG. 10A-10H). Aunque los grupos se administraron en forma de bolo, los explantes revelaron estructuras parecidas a islotes que estaban separadas entre sí por tejido parecido al parénquima y, en algunos casos, conductos. Entre los explantes de injertos con bajo contenido de NKX6-1, la expresión de marcadores endocrinos dentro de las estructuras similares a islotes fue similar a la de los islotes nativos con cromogranina A robusta (FIG. 10E) y PDX-1 (FIG. 10G) coexpresada con péptido C o insulina. Se expresó NKX6-1 con ISL-1 y péptido C, lo que indica una activación *in vivo*. Las células endocrinas pancreáticas también fueron reconocidas por el anticuerpo antimitocondrias humanas, lo que demuestra su origen humano. Estos datos demuestran que los conglomerados pancreáticos derivados de células madre SR1423 cooperan activamente o impulsan la remodelación del tejido huésped de roedores para formar injertos pancreáticos estables con características anatómicas de páncreas endocrino. Los grupos de poblaciones con bajo contenido de NKX6-1 mantienen una expresión persistente del péptido C, continúan a lo largo de las vías de maduración de los islotes y son potentemente capaces de regular la glucemia de los roedores.

[0179] Caracterización de bajo contenido de NKX6-1. El análisis no supervisado del transcriptoma del protocolo con bajo contenido de NKX6-1 mediante scRNA-Seq utilizando el método Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) para la reducción de la dimensionalidad revela que las etapas 0 (indiferenciada), 1 y 2 se agrupan por separado en grupos discretos de acuerdo con los cambios morfológicos drásticos que se producen cuando las células madre inician la diferenciación (FIG. 11A-11H). Estas etapas y las subsiguientes manifiestan perfiles de expresión génica consistentes con la maduración progresiva hacia la identidad endocrina pancreática. Las etapas 1 y 2 muestran perfiles de expresión génica endodérmica que incluyen

CXCR4, SOX17, CER1 y LEFTY1. Las señales de orientación de las etapas 3-6 impulsan la expresión de genes característicos del compromiso pancreático como FOXA2, HNF4A, HNF1B, PDX-1, SOX9 y PTF1A. Las señales de orientación de las etapas 7, 8 y 9 promueven la adopción progresiva de la expresión génica característica del páncreas endocrino, incluyendo NKX2-2, NEUROG3, NEUROD1, MAFB, MAFA, PAX4, PAX6, ISL-1, CHGA y CHGB. La expresión simultánea de MafA, Ngn3, Pdx1 y Pax4 se observa en la etapa 7 (FIG. 11C). El grupo de la etapa 9 es adyacente al grupo formado por islotes humanos nativos (FIG. 11A). Estos hallazgos de diferenciación hacia islotes pancreáticos se ven respaldados además por el análisis de trayectoria pseudotemporal realizado con Monocle, que demuestra una diferenciación progresiva y sin objetivos de las células madre SR1423 hacia grupos similares a islotes. Además, el análisis de vías mediante VISION demuestra una adquisición dependiente de la etapa de la identidad similar a la célula β y la regulación de la expresión génica (FIG. 11F-11G). En conjunto, estos datos describen una diferenciación progresiva de las células madre a través del endodermo, el tubo digestivo, el progenitor pancreático y, finalmente, el compromiso endocrino pancreático.

[0180] A continuación, se caracterizaron más las etapas tardías de SR1423 centrando los análisis en las células endocrinas pancreáticas. Basándose en los datos snRNA-Seq, la diferenciación SR1423 produce una población pura de células endocrinas que muestran un 100% de positividad para CHGA entre los progenitores endocrinos y endocrinos pancreáticos (etapas 7-9, FIG. 11H). YBX1-INSM1-FEV es necesario para la especificación y el mantenimiento de la identidad de los progenitores endocrinos. Estos genes también se encuentran en las etapas 7-9, así como en los islotes humanos maduros. A pesar de la producción de insulina sensible a la glucosa, estas células conservan la expresión de genes críticos para el mantenimiento de los progenitores pancreáticos, lo que afirma que las células endocrinas pancreáticas derivadas de SR1423 son menos maduras que los islotes adultos, pero están comprometidas con ese destino.

Discusión

[0181] El estudio demuestra que dos poblaciones dispares de células pancreáticas, distinguidas por la expresión de NKX6-1, tienen una potencia similar *in vitro* en términos de expresión y secreción de insulina, pero diferente *in vivo*. Las células con bajo contenido de NKX6-1 fueron más capaces de controlar la glucemia en roedores diabéticos y los explantes mostraron una identidad celular estable y la inducción de NKX6-1 *in vivo*. Estos resultados son contrarios a la trayectoria de diferenciación establecida de las células beta nativas. Las observaciones de coexpresión de los factores transdiferenciadores PDX1, MAFA, NGN3 y PAX4 pueden explicar la adopción de una identidad similar a la de las células beta *in vitro* en ausencia de NKX6-1. Se ha informado de que las células que carecen de NKX6-1 representan una población multihormonal en los islotes diferenciados derivados de células madre. El péptido C y el glucagón son poblaciones muy separadas en los grupos con bajo contenido de NKX6-1 descritos aquí; por lo tanto, las células con bajo contenido de NKX6-1 pueden tener una identidad alternativa. Un posible destino sería el de las células "hub" de los islotes, que no son polihormonales a pesar de carecer de expresión de NKX6-1. Según los informes, las células Hub tienen un contenido de

NKX6-1 bajo o ausente, un menor número de gránulos de insulina que sus homólogas NKX6-1+ y presentan características tanto de células beta maduras como inmaduras. *In vivo*, NKX6-1 se activa en muchas células de los grupos originalmente bajos en NKX6-1, lo que posiblemente permite una arquitectura de islotes más estándar con células principales y secundarias.

[0182] La mayoría de los protocolos de la literatura científica tienen como objetivo lograr la máxima expresión de NKX6-1. No se pretende que la población de células que expresan NKX6-1 aquí descrita sea idéntica a las células que expresan NKX6-1 derivadas de células pluripotentes y descritas por otros grupos. Se desconoce si las células que expresan NKX6-1 y que perdieron la expresión del péptido C *in vivo* se desdiferenciaron, se transdiferenciaron hacia otro fenotipo endocrino o si finalmente completaron la maduración y restablecieron la expresión de insulina.

[0183] Se ha demostrado que los implantes en animales de islotes derivados de células madre tardan semanas más en regular la glucemia que los islotes nativos, a pesar de mostrar una secreción de insulina sensible a la glucosa *in vitro*. Este retraso implica que los islotes derivados de células madre no son funcionalmente maduros *in vitro*, pero pueden alcanzar la maduración funcional *in vivo*. Se ha propuesto la hipótesis de que solo una pequeña población de progenitores es capaz de madurar *in vivo* y que la infradosificación explica el retraso en la regulación de la glucosa. Los perfiles del transcriptoma mostrados aquí demuestran que los grupos pancreáticos derivados de células madre comparten la mayor homología con las poblaciones endocrinas pancreáticas prenatales. La expresión y secreción de insulina en poblaciones derivadas de células madre es, por tanto, promiscua y puede no ser una medida fiable de la función y potencia de las células beta. Otros han llegado a una conclusión similar en el contexto de las células que coexpresan insulina y otras hormonas pancreáticas. Aquí se plantea la hipótesis de que el retraso en la regulación de la glucosa tras el implante está ocupado por la maduración en curso de las células endocrinas.

[0184] Se produce una remodelación tisular significativa en las primeras semanas de cada lugar de implante evaluado (espacio renal subcapsular, intraesplénico y epiplón o almohadilla de grasa intraabdominal). En cada uno de estos lugares, se formaron estructuras similares a islotes y, en algunos casos, estructuras similares a conductos que no se observaron en los grupos celulares *in vitro*. Es probable que los procesos de reparación y regeneración de lesiones tisulares, incluida la respuesta de supervivencia a la hipoxia y el estrés celular, promuevan la formación de estas estructuras a partir del material implantado. Se ha informado que el páncreas regenerado muestra un mejor crecimiento de los islotes y un mayor contenido de insulina cerca de los conductos. Además, las células de conductos secretan citocinas angiogénicas que facilitarían la vascularización del lugar implantado. Del mismo modo, otros han demostrado los beneficios de promover la vascularización en sitios poco vascularizados y de promover un nicho pancreático mediante la entrega de grupos en un andamiaje sintético o natural. Por lo tanto, la remodelación tisular puede ser clave en el establecimiento de un nicho funcional en el que se produzca la maduración de las células beta. La interpretación actual de los explantes es que el proceso de remodelación es un determinante crítico de la función del injerto y, por tanto, influye en la dosis efectiva.

[0185] El trasplante de grupos similares a islotes a diabéticos insulín dependientes en un entorno clínico podría mejorarse aumentando la compatibilidad alógena del injerto. Ese objetivo puede alcanzarse interrumpiendo la expresión de las proteínas mayores de histocompatibilidad I y II, los principales impulsores antigénicos del rechazo de tejidos alógenos. Se han realizado estas y otras modificaciones en SR1423U, definiendo nuevas líneas celulares para mejorar la tolerabilidad y la seguridad para su uso futuro en receptores no inmunodeprimidos.

[0186] Grupos similares a islotes similares a los descritos aquí son objeto de estudios de caracterización y no clínicos para respaldar la solicitud de ensayos clínicos. El protocolo de expansión y diferenciación celular se ha adaptado a un proceso de fabricación que sigue las directrices cGMP utilizando recipientes cerrados y escalables dentro de un entorno de sala blanca. Este trabajo demuestra el avance hacia el desarrollo de una terapia de sustitución de islotes potente y segura para la diabetes insulín dependiente.

Conclusión

[0187] Las poblaciones de células derivadas de células madre que expresan marcadores endocrinos pancreáticos pueden secretar insulina en respuesta a la glucosa sin expresión de NKX6-1. Una población de células que expresan el factor de transcripción de los islotes pancreáticos ISL-1 y MAFA, sin NKX6-1, fue más potente en el control de la glucemia en roedores diabéticos que una población similar que expresaba NKX6-1, lo que implica que NKX6-1 puede ser un indicador engañoso de la identidad y el compromiso de las células beta en células derivadas de células madre. Se concluyó que los grupos pancreáticos derivados de SR1423 que expresan ISL-1 y MAFA, pero no NKX6-1 en modelos animales tienen un potencial terapéutico significativo para el tratamiento de la diabetes insulín dependiente.

Ejemplo 3 - Tratamiento de la diabetes en un adulto humano con las células terapéuticas divulgadas

[0188] Este ejemplo ilustra métodos de uso del protocolo divulgado para generar células terapéuticas para tratar la diabetes de tipo I en un adulto humano.

[0189] Un sujeto humano adulto con diabetes insulín dependiente recibe un trasplante que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende las células SRE divulgadas en la bolsa del epiplón o en la cavidad peritoneal del sujeto. Se evalúan los niveles de glucosa en sangre del sujeto. El sujeto es monitorizado tras el implante de un número terapéuticamente efectivo de células SRE para asegurar que los niveles de glucosa en sangre del sujeto se han estabilizado. El sujeto se somete además a un cribado de hemoglobina glucosilada y comorbilidades de la diabetes a lo largo del tiempo.

* * * * *